

**REGULATION DER ENTWICKLUNG UND REGENERATION
VON SKELETTMUSKELZELLEN DURCH DIE TRANSKRIPTIONSFAKTOREN
LBX1 UND MYF-6**

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOCTOR RERUM NATURALIUM
(DR. RER. NAT.)

VORGELEGT DER

MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN-TECHNISCHEN FAKULTÄT
DER MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG

VON HERRN DETLEV MENNERICH
GEBOREN AM 23.12.1969 IN VEERSSSEN (JETZT UELZEN)

1. REFERENT: PROF. DR. DR. THOMAS BRAUN

2. REFERENT: PROF. DR. ELMAR WAHLE

3. REFERENT: PD DR. MICHAEL KESSEL

EINGEREICHT AM 30.08.2000

DISPUTATION AM 20.12.2000

Diese Dissertation ist von der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg genehmigt worden.

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als angegebenen Hilfsmittel verwendet wurden. Die Passagen der Arbeit, die anderen Schriften entnommen sind, wurden unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Halle, im August 2000

1 Inhaltsverzeichnis

2	Einleitung	5
2.1	Skelettmuskelaufbau	5
2.2	Transkriptionsfaktoren	7
2.3	Embryonale Skelettmuskelentwicklung in Vertebraten	11
2.4	Regeneration von Skelettmuskeln	12
2.5	Ziel der Arbeit	13
3	Material und Methoden	17
3.1	Material	17
3.1.1	Gebrauchsgüter	17
3.1.2	Chemikalien und Enzyme	17
3.1.3	Radiochemikalien	17
3.1.4	Mausstämme und befruchtete Hühncheneier	18
3.1.5	Verwendete Bakterienstämme	18
3.1.6	Verwendete Zelllinien	18
3.1.7	Klonierungsvektoren	19
3.1.8	Oligonukleotide	19
3.1.8.1	Oligonukleotide zur Sequenzierung der Hühnchen Lbx-1 cDNA	19
3.1.8.2	Oligonukleotide zur Verwendung in PCR Klonierungsstrategien	19
3.1.8.3	In RT-PCR verwendete Oligonukleotide	20
3.1.8.4	Oligonukleotide zur Generierung gezielter Punktmutationen	20
3.1.8.5	Sonstige Oligonukleotide	20
3.2	Molekularbiologische Methoden	21
3.2.1	Whole-mount in situ Hybridisierung	22
3.2.1.1	Synthese der Antisense RNA Probe	22
3.2.1.2	Präparation der Embryonen	22
3.2.1.3	Hybridisierung der Antisense RNA Probe	23
3.2.1.4	Nachbehandlung der Embryonen	23
3.2.1.5	Histochemische Anfärbung	24
3.2.1.6	Doppelfärbung	25
3.2.2	Photodokumentation von whole-mount hybridisierten Embryonen	25
3.2.3	Schnitte von Geweben und Embryonen	25
3.2.3.1	Beschichtung von Objektträgern	25
3.2.3.2	Paraffinschnitte	26
3.2.3.3	Kryoschnitte	26
3.2.3.4	Vibratomschnitte	27
3.2.4	In ovo Mikromanipulation an Hühnchenembryonen	27
3.2.4.1	Brutbedingungen von befruchteten Hühncheneiern	27
3.2.4.2	Vorbereitung der Hühnchenembryonen zur Mikromanipulation	28
3.2.4.3	Bead Implantierung	28
3.2.5	Retroviraler Gentransfer	28
3.2.5.1	Darstellung eines konzentrierten RCASBP(A) Virus Stocks	29
3.2.5.2	Titerbestimmung des aufkonzentrierten RCASBP(A) Virus Stocks	30
3.2.5.3	Injektion des RCAS(A) Virus in ovo in Hühnchenembryonen	30
3.2.6	ex vivo Gewebekulturen	31

3.2.6.1	Präparation des Gewebes	31
3.2.6.2	Einbettung der Explantate in Collagenkissen	31
3.2.6.3	Kultur und Virusinfektion der Explantate.....	32
3.2.6.4	Mitomycin C Behandlung der Explantate.....	32
3.2.6.5	Präparation der gesamten Explantat-RNA	33
3.2.7	Immunhistochemische Anfärbung	33
3.2.8	Polymerasekettenreaktion PCR	35
3.2.8.1	Primer Design.....	35
3.2.8.2	Standard PCR	35
3.2.8.3	RT-PCR.....	36
3.2.8.3.1	Reverse Transkription	36
3.2.8.3.2	Reverse Transkription anschließende PCR.....	36
3.2.8.4	Radioaktive PCR	37
3.2.8.5	PCR-Mutagenese	37
3.2.8.6	PCR-Klonierung	38
3.2.9	Immunpräzipitation	39
3.2.9.1	Darstellung des Myc 1-9E10.2 Antikörpers	39
3.2.9.2	In vitro Translation.....	39
3.2.9.3	Immunpräzipitation der in vitro translatierten Proteine	40
3.2.10	Gel-Retentionsanalyse (EMSA).....	41
3.2.10.1	Radioaktive Markierung eines doppelsträngigen Oligonukleotids	41
3.2.10.2	Gel-Retentionsanalyse	42
3.2.11	CAT-Assay (Chloramphenicol-Acetyl-Tranferase Reaktion).....	42
3.2.11.1	Kotransfektion	43
3.2.11.2	Abernten und Lyse der Zellen	43
3.2.11.3	β -Galaktosidase Reaktion	43
3.2.11.4	CAT-Reaktion.....	44
4	Ergebnisse	47
4.1	Klonierung des Hühnchenhomologs des Transkriptionsfaktors Lbx1 ..	47
4.1.1	Durchsuchen einer cDNA Bank.....	47
4.1.2	Sequenzanalyse der Hühnchen Lbx1 cDNA	48
4.1.2.1	Vergleich der Aminosäuresequenzen der orthologen <i>lady bird</i> Gene ...	49
4.2	Expressionsanalyse des Homöobox Gens <i>Lbx1</i>	51
4.2.1	Hamburger Hamilton Stadium 14 (HH14).....	51
4.2.2	Hamburger Hamilton Stadium 18 (HH18).....	52
4.2.3	Hamburger Hamilton Stadium 20 (HH20).....	53
4.2.4	Hamburger Hamilton Stadium 25 (HH25) und 28 (HH28)	57
4.3	Protein beladene Bead-Implantationen induzieren Lbx1	58
4.3.1	SF/HGF Bead Implantierung induziert keine Lbx1 Expression in den delaminierenden Muskelvorläuferzellen	58
4.3.2	FGF-2 Bead-Implantierung induziert Lbx1 in der ektopischen Extremitätenbildung.....	60
4.4	Retroviraler Lbx1 Gentransfer	61
4.4.1	Klonierung des retroviralen Vektors pRCASBP(A)-Lbx1	61
4.4.1.1	Titerbestimmung der Retroviren RCASBP(A)-Lbx1, RCASBP(A)-HAM-Pax3 und RCASBP(A)-hAP	63
4.4.2	In ovo Injektion des RCASBP(A)-Lbx1 Virus induziert Myogenese	64
4.4.3	Retroviral eprimiertes Lbx1 und Pax3 induzieren Myogenese in ex vivo Kollagen-Gewebe-Kulturen	66

4.4.4	Gegenseitige Regulation von Lbx1, Pax3 und Dach2	69
4.4.5	Retroviral überexprimiertes Lbx1 und Pax3 erhöhen die Zellproliferationsrate	70
4.4.6	Nach Blockierung der Zellproliferation sind Lbx1 und Pax3 nicht in der Lage myogene Differenzierung zu induzieren	71
4.5	Lbx1 zeigt keine eindeutige transaktivierende Wirkung.....	73
4.5.1	Klonierung des GAL4BD-Lbx1 Expressionsvektors	73
4.5.2	Kompetitionen des starken Aktivators Gal4-BD-VP16 mit GAL4-BD-Lbx1.....	74
4.6	Analyse einer humanen heterozygoten Punktmutation in der bHLH-Domäne des myogenen Faktors Myf6.....	77
4.6.1	Durchsuchen einer Patientengruppe mit Myopathien auf Mutationen in den myogenen Faktoren (MRF- myogenic regulatory factor)	77
4.6.2	Biochemische Analyse des mutierten Myf6 Proteins.....	79
4.6.2.1	Einführung der humanen AS112 Mutation in die wildtyp Myf6 cDNA..	79
4.6.2.2	Das Myf6 Bindungspotential an die Dimerisierungspartner der E-Proteine ist stark reduziert.....	80
4.6.2.3	Das mutierte Myf6 Protein ist nur stark vermindert in der Lage seine DNA-Zielsequenz zu binden.....	82
4.6.2.4	Das mutierte Myf6 Protein zeigt kein Transaktivierungspotential	82
4.6.3	Analyse der Patientensituation P5 und P6 im Mausmodell	84
5	Diskussion	87
5.1	Überblick	87
5.2	Lbx1 und Pax3 spezifizieren hypaxiale Muskelvorläuferzellen und induzieren deren myogene Differenzierung.....	88
5.2.1	Pax3 ist notwendig zur in vivo Aktivierung von Lbx1	90
5.2.2	Retrovirale Überexpression von Lbx1 oder Pax3 induziert in vivo bzw. ex vivo myogene Differenzierung	92
5.2.3	Pax3 und Lbx1 – eine wechselseitige Regulation ?	96
5.2.4	Der „community effect“	98
5.2.5	Ein heterozygoter Myf6 Genotyp führt zu einer leichten Myopathie und gepaart mit einer Dystrophinopathie des Typs Becker erschwert sie den Krankheitsverlauf massiv.....	101
5.3	Ausblick	103
6	Anhang	106
6.1	Abkürzungen	106
6.2	Lösungen und Medien.....	107
6.3	Curriculum vitae	108
6.4	Tagungsbeiträge und Publikationen	109
7	Literatur	110
8	Zusammenfassung	121

2 Einleitung

Das Ziel der modernen Molekularbiologie ist die Identifizierung und Charakterisierung von Genen, die für die Umsetzung des biologischen Konstruktionsplanes verantwortlich sind, der von einer befruchteten Zygote zum adulten Organismus führt. Dabei liegt der Schwerpunkt in der Aufklärung von komplexen zellulären Prozessen und molekularen Interaktionen, die die Determinierung und Differenzierung von Zellen steuern und in ihrer Gesamtheit die morphologischen Veränderungen während der Embryogenese bilden. Das organisierte Zusammenspiel einer Vielzahl von Genprodukten führt zur Ausbildung komplexer einzelner Organe, welche erst in ihrem Zusammenspiel den Organismus lebensfähig gestalten.

Die Entwicklung der Skelettmuskulatur gehört zu den am besten untersuchten Beispielen der Organentwicklung und hat in vielerlei Hinsicht eine Vorreiterrolle gespielt und Paradigmen gesetzt.

2.1 Skelettmuskelaufbau

In Vertebraten kann man grundsätzlich drei verschiedene Arten von Muskeln unterscheiden: quergestreifte Skelettmuskulatur, Herzmuskulatur und glatte Muskulatur. Diese Muskeltypen unterscheiden sich in ihrer Entwicklung, in ihrem Aufbau und in ihrer Funktion. Der Herzmuskel und die glatte Muskulatur führen unwillkürliche Kontraktionen aus, z.B. das Pumpen des Herzens oder die Darmperistaltik. Dagegen wird der Skelettmuskel in Vertebraten willkürlich bewusst dazu benutzt, Bewegungen wie Laufen, Schwimmen oder Fliegen auszuführen. Da die nachfolgende Arbeit ausschließlich die Entwicklung und die Regeneration von quergestreifter Skelettmuskulatur behandelt, wird dessen Aufbau und Funktionsweise einleitend näher beschrieben, ohne auf Herzmuskel oder die glatte Muskulatur vertiefend einzugehen.

Die Muskelfasern der Skelettmuskulatur sind Syncytien, die sich während der embryonalen Entwicklung durch die Verschmelzung vieler einzelner Zellen bilden (Abbildung 1). Die Kerne der ursprünglich einzelnen Zellen bleiben in den Muskelfasern erhalten und lokalisieren sich peripherär an der umgebenden Plasmamembran (A). Der größte Teil des Cytoplasmas besteht aus Myofibrillen (B), den kontraktilelementen der Muskelzellen. Die Myofibrillen sind zylinderförmige Gebilde mit einem Durchmesser von 1-2 μm . Sie erstrecken sich in der Regel über die gesamte Länge der Muskelfaser, wobei die Muskelfaser in einem erwachsenem Menschen selbst einen Durchmesser von 50 μm und eine Länge von mehreren Zentimetern erreicht. Jede Myofibrille besteht aus einer Kette kontraktilelemente,

den Sarkomeren (C). Sarkomere sind jeweils 2.2 μm lang und verleihen den Myofibrillen ihr quergestreiftes Aussehen, woher auch der Name „quergestreifte“ Skelettmuskulatur kommt. Bei starker Vergrößerung erkennt man in jedem Sarkomer eine Reihe heller und dunkler Streifen. Dabei befindet sich der dunkle Bereich in der Mitte zwischen zwei hellen Reihen. Die Grenze zwischen zwei hellen Bereichen trennt ein Sarkomer vom nächsten – die Grenze wird als Z-Scheibe bezeichnet (D). Jedes Sarkomer besteht aus einer genau angeordneten Sammlung paralleler ineinandergreifender Filamente. Die dünnen Actin-Filamente sind an Enden des

Sarkomers an den Z-Scheiben befestigt. Sie reichen bis annähernd zur Mitte des Sarkomers und überlappen dort, regelmäßig angeordnet, mit den dicken Myosin Filamenten (D). Durch das Ineinanderschieben dieser überlappenden Filamente kommt es zur Muskelkontraktion.

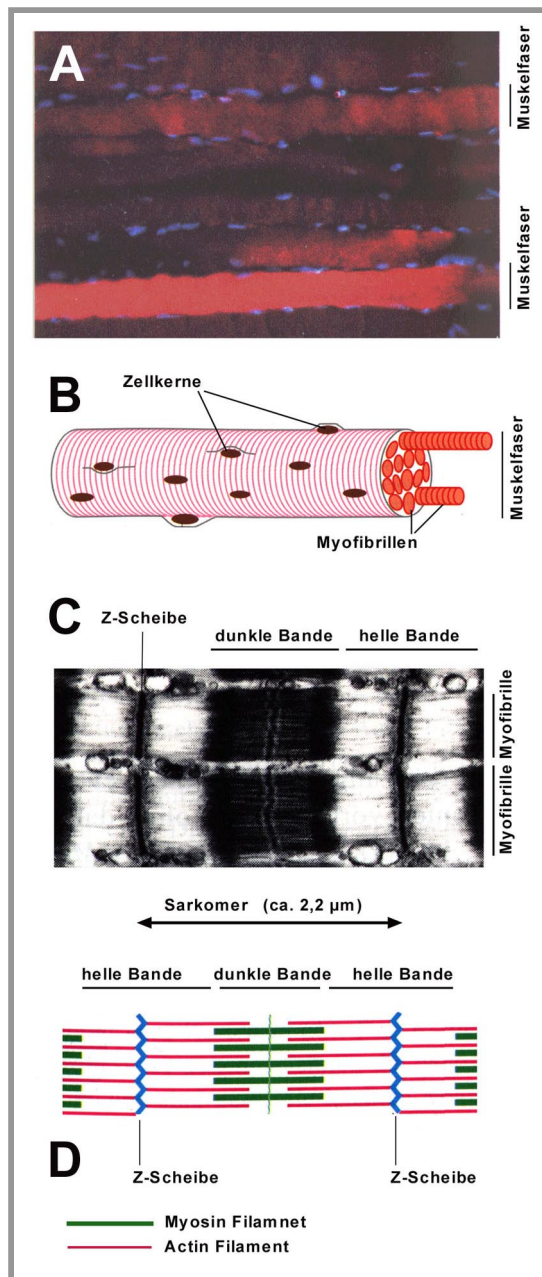


Abbildung 1: Aufbau der Skelettmuskelzellen. **A:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Rattenmuskels. Die Zellkerne (blau) sind am Rand der Muskelfaser (rot) lokalisiert. In **B** ist eine Muskelfaser mit den Zellkernen und den Myofibrillen schematisch dargestellt. Die Myofibrillen bestehen aus den kontraktilen Untereinheiten, den Sarkomeren. In **C** ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme von Sarkomeren abgebildet. Die Z-Scheiben, die dunklen Banden (bestehend aus Myosin Filamenten) und die hellen Banden (bestehend aus Actin Filamenten) sind erkennbar. **D** zeigt den schematischen Aufbau eines Sarkomers. Die Darstellungen sind übernommen aus (Alberts 1994).

Die nachfolgende Arbeit beschäftigt sich weniger mit der Funktion der Untereinheiten von Muskelzellen, sondern mit deren embryonaler Entwicklung und Regeneration.

2.2 Transkriptionsfaktoren

Nach der Befruchtung einer Eizelle durchläuft der sich entwickelnde Embryo verschiedene Entwicklungsstadien. Nach Abschluss der Gastrulation werden bald erste Muskelzellen detektierbar. Allerdings wird der Beginn der embryonalen Muskelentwicklung bereits während der frühen Gastrulation vermutet. Multipotente mesodermale Zellen empfangen Signale, die sie determinieren ein Muskelschicksal anzunehmen. Als Muskelvorläuferzellen determinierte Zellen proliferieren zunächst, ohne mit der eigentlichen Muskeldifferenzierung zu beginnen. Erst in der weiteren Entwicklung empfangen diese Vorläuferzellen Signale, die ihnen die myogene Differenzierung aufdrängen.

Die Determinierung von multipotenten Zellen und deren spätere Differenzierung in spezifische Zelltypen wird durch ein komplexes Netzwerk von Regulationsmechanismen kontrolliert, das die Genexpression der betroffenen Zellen steuert. In einer eukaryontischen Zelle kann die Kontrolle der Genexpression innerhalb verschiedener Ebenen stattfinden: auf der Ebene der Transkription, der Aufbereitung („processing“) der mRNA, der Translation und durch post-translationale Modifikation sowie durch den Transport von Proteinen. Der wohl wichtigste Schritt innerhalb dieser Prozesse zur Übersetzung genetischer Informationen ist die Regulation der Transkription.

Transkriptionsfaktoren besitzen die Eigenschaft, direkt spezifische DNA-Sequenzen von Promotoren oder cis-aktiven Elementen (Enhancer und Silencer) zu binden und regulieren somit gezielt die Transkription einzelner Gene. Um diese Regulation ausführen zu können, besitzen diese Proteine in der Regel mindestens zwei unterschiedliche Domänen: eine DNA-bindende Domäne, welche spezifisch Zielsequenzen bindet, und eine transregulierende Domäne, welche die Transkription der Zielgene aktiv stimuliert oder reprimiert.

Innerhalb der Klasse der Transkriptionsfaktoren stellt die Genfamilie von Homöoboxgenen eine wichtige Gruppe transregulativer Faktoren dar. Die Homöodomänen Proteine spezifizieren u.a. die Festlegung der posterior-anteriore Körperachse innerhalb des sich entwickelnden Embryos. Die Homöodomäne besteht aus 60 Aminosäuren, die in drei α -helikale Regionen organisiert sind. Helix I, welcher ein flexibler N-terminaler Arm vorausgeht, ist durch eine Schleife („loop“) von Helix II getrennt, die ihrerseits mit der Helix III das charakteristische „Helix-Turn-Helix“ Motiv bildet. In dieser stabilen Konformation interagiert der N-terminale Arm der Homöodomäne in der kleinen Furche und die Helix III in der großen Furche mit spezifischen Basenfolgen innerhalb des DNA-Doppelstranges (Gehring et al. 1994). Gene der Homöobox-Familie wurden zuerst in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt. Die Mutationen in den Genen des *Bithorax*-Komplexes oder des *Antennapedia*-Komplexes (McGinnis et al. 1984) führten zu Transformationen

der Blastoderm-Segmente und somit zu schwerwiegenden Defekten im Körperbauplan. Historisch wurden diese Störungen, die einen Körperteil in einen anderen umwandeln, als homöotische Mutationen bezeichnet.

Die Untersuchungen an den Homöoboxgenen zeigten, dass sie Teil einer komplexen Kaskade von Genen sind, die durch ihr Zusammenspiel den Körper des Embryos und später dessen Organogenese maßgeblich regulatorisch beeinflussen. In der Fruchtfliege wurden die Gene der Reihenfolge ihrer Aktivierung nach in drei Klassen unterteilt. Die erste Klasse umfasst die mütterlichen Gene, die für die Ausprägung einer anfänglichen Polarität innerhalb der Eizelle verantwortlich sind. Sie determinieren die posterior-anteriore und dorso-ventrale Achse des Embryos. Die zweite Klasse, die Segmentierungsgene, interpretieren die Vorgaben der mütterlichen Gene und induzieren eine Unterteilung des Embryos in 15 Segmente und aktivieren ihrerseits die dritte Klasse, die als homöotischen Gene bezeichnet wurden.

Die Homöoboxgene finden sich in verschiedenen Spezies, von *Drosophila melanogaster* über höhere Vertebraten bis hin zum Menschen. Die hohe Konservierung der Aminosäuresequenz der Homöodomänen im Laufe der Evolution ist ein deutliches Indiz dafür, dass die Homöodomänen-Proteine auch funktionell unter einem hohen Evolutionsdruck stehen. Das menschliche Homöodomänen-Protein *Hox-7a* unterscheidet sich z.B. in nur 1 von 60 Aminosäuren zur direkt homologen *antp*-Domäne in *Drosophila*, obwohl sich die Wege der Evolution bereits vor ca. 500 Millionen Jahren trennten.

Eine ähnlich wichtige und zwischen den Spezies hochkonservierte Genfamilie der Transkriptionsfaktoren stellt die basische Helix-Loop-Helix (bHLH) Genfamilie dar. Die bHLH Proteine binden durch die Interaktion von basischen Aminosäuren, die sich N-terminal der ersten Helix befinden, an spezifische Sequenzen doppelsträngiger DNA. Die Helices I und II enthalten an jeder dritten bzw. vierten Position hydrophobe Aminosäuren, so dass an der Oberfläche der Proteine eine hydrophobe Eigenschaft präsentiert wird. Diese hydrophobe Oberfläche befähigt die Proteine sich untereinander zu Homodimer-Komplexe zusammenzulagern, oder mit ähnlichen bHLH Proteinen Heterodimer-Komplexe auszubilden. Untersuchungen ergaben, dass Heterodimer-Komplexe und z.T. auch Homodimer-Komplexe, bestehend aus zwei identischen Proteinen, befähigt sind, mit hoher Affinität an DNA-Doppelstränge zu binden. Sowohl in *Drosophila melanogaster* (*daughterless*) als auch in höheren Vertebraten (*E12*, *E47*) existieren ubiquitär exprimierte bHLH Proteine, welche während der Zelldeterminierung oder -differenzierung nach Heterodimerisierung transregulative Funktionen übernehmen. Dabei stehen oft mehrere Partner zur Verfügung: positiv regulierende Faktoren, welche die Transkription von Zielgenen stimulieren, und negativ wirkende, d.h. reprimierende Faktoren. In den Organismen *Homo sapiens*, *Mus musculus* (Maus) oder *Gallus gallus* (Huhn) werden die bHLH

Proteine *E12* und *E47* ubiquitär exprimiert. Als Partner in Heterodimer-Komplexen stimulieren bHLH Proteine der MyoD Familie (*MyoD*, *Myf-5*, *Myogenin* und *Myf-6*) aktiv die Transkription von Zielgenen, die zu einer myogenen Differenzierung von Zellen führen. Als Antagonist kann das HLH-Protein *ID* (inhibitor of differentiation) ebenfalls an die E-Proteine und Proteine der MyoD Familie binden (wenn auch mit deutlich niedriger Affinität) und somit eine Repression der Transkription derselben Zielgenen führen, so dass die myogene Differenzierung gehemmt wird. Die Antagonisten werden zusammen mit den myogenen Differenzierungsgenen in Muskelvorläuferzellen exprimiert, solange diese sich im proliferativen Zustand befinden. In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass nach Beenden des Zellzyklusses der reprimierende Faktor *ID* herunterreguliert wird und infolgedessen Proteine der MyoD Familie die myogene Differenzierung transaktivieren können (Benezra et al. 1990a; Benezra et al. 1990b; Jen et al. 1992).

Die Homöobox und bHLH Proteine beschreiben zwei Klassen von Transkriptionsfaktoren. Es existieren jedoch eine Vielzahl weiterer Transkriptionsfaktor-Familien (die nicht näher beschrieben werden): POU-Transkriptionsfaktoren, basische Leucine-Zipper-Proteine, Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren u.s.w. .

Eine entscheidende Rolle wird den Transkriptionsfaktoren bei der Spezifikation von den über 200 verschiedenen Zelltypen (Muskelzellen, Nervenzellen, Hautzellen, Blutzellen u.s.w.) während der Embryogenese zugeschrieben. In einer Vielzahl von Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sie u.a. an der Determinierung pluripotenter Zellen und deren späterer Differenzierung beteiligt sind. Dabei beeinflussen Transkriptionsfaktoren z.T. auch die Kontrolle des Zellzyklusses.

Die Myogenese ist im komplexen Zusammenspiel verschiedener Faktoren eines der am besten untersuchten Systeme. Frühe Untersuchungen ergaben, dass Muskelvorläuferzellen nicht in der Lage sind auszudifferenzieren, bevor sie den Zellzyklus verlassen haben (Bischoff and Holtzer 1969). Die Skelettmuskelentwicklung offenbarte eine Abhängigkeit der Genexpression zwischen der Proliferation von Vorläuferzellen und deren Differenzierung. Hat die Muskelzelle einmal den Zellzyklus verlassen und die Expression der myogenen Differenzierungsmarker der MyoD Familie begonnen, gibt es für die Zelle im Normalfall keine Umkehr (Nadal-Ginard 1978). Diese gegensätzlichen Situationen aus Proliferation und Differenzierung wurden in verschiedenen pathologischen Situationen oder durch experimentelle Manipulationen ebenfalls bei der Entwicklung von Nerven-, Blut- oder Hautzellen beschrieben. Die Regulation der irreversiblen Differenzierung von Muskelzellen wird durch verschiedene Mechanismen erklärt: Antagonisten (wie oben beschrieben ID-Proteine) fungieren als Repressoren einer myogenen Differenzierung. Die Anwesenheit hoher Wachstumsfaktor Konzentrationen stimuliert zum einen die ID-Transkription, aktiviert aber auch eine

Protein-Kinase C. Die Kinase phosphoryliert die bHLH-Proteine der MyoD Familie innerhalb der DNA-bindenden Domäne, so dass folglich die spezifische DNA-Bindung nicht zu Stande kommt. Ein weiterer Mechanismus ist ein zellübergreifender Effekt: durch Zell-Zell-Kontakte können über die *Delta/Notch* Signaltransduktion Transkriptionen spezifischer Gene reguliert werden. Proteine der MyoD Familie werden durch die Aktivierung von Notch-Rezeptoren supprimiert: das aktivierte Notch-Protein stimuliert die Transkription von *Hes-1* (hairy enhancer of split), einem weiteren bHLH Protein. Die Ausbildung von Heterodimeren zwischen *Hes-1* und Proteinen der *MyoD* Familie inhibiert diese, so dass die myogene Differenzierung nicht aktiviert werden kann.

Die Entstehung von funktionellen Skelettmuskelzellen geht einher mit dem Austritt der Muskelvorläuferzellen aus dem Zellzyklus und dem Beginn terminaler Differenzierung. Verschiedene Untersuchungen lassen vermuten, dass Transkriptionsfaktoren der basischen Helix-Loop-Helix Familie und auch Homöoboxgene eine kritische Rolle innerhalb der molekularen Kontrolle von terminaler Differenzierung und Zellzykluskontrolle übernehmen.

Der Zellzyklus wird direkt durch die Gen-Familie von Cyclin-abhängigen Kinasen (cdk) gesteuert. Die Aktivität der Kinasen ist zum einen abhängig von der Bindung spezifischer Cycline und zum anderen von der Phosphorylierung dieser cdk/Cyclin-Komplexe durch die cdk-aktivierende Kinase (CAK). Aktivierte cdk/Cyclin-Komplexe regulieren den Zellzyklus positiv, indem sie ihrerseits das Retinoblastoma-Protein (pRB) phosphorylieren, wodurch dessen Aktivität als Repressor des Zellzyklusses aufgehoben wird. Der Zellzyklus wird im Wesentlichen durch Proteine gesteuert, die an cdk/Cyclin Komplexe binden und diese inaktivieren. Diese Inhibitoren (CKI) sind in zwei Gruppen unterteilt: die Ink4-Familie (p15, p16, p18 und p19) und die Cip/Kip Familie (p21, p27 und p53). In verschiedenen Studien konnte für den myogenen Differenzierungsfaktor MyoD u.a. eine Interaktion mit cdk4 nachgewiesen werden, was vermutlich zu einem Verlust der DNA-Bindung von MyoD und der transaktivierenden Eigenschaften führt (Zhang et al. 1999a; Zhang et al. 1999b).

In anderen Studien wurden für Transkriptionsfaktoren als Regulationsmöglichkeit des Zellzyklusses deren direkte Induzierung von CKIs vorgeschlagen. So konnte für MyoD gezeigt werden, dass es den cdk-Inhibitor p21 induziert (Halevy et al. 1995; Parker et al. 1995). Der Homöobox-Transkriptionsfaktor GAX wurde in Überexpressionsexperimenten in proliferierenden Kardiomyocyten von Hühnchenembryonen als ein negativer Regulator des Zellzyklusses identifiziert (Fisher et al. 1997). Während die GAX-Überexpression zu einer Reduzierung der Kardiomyocytenzellzahl führte, konnte im Gegensatz hierzu in *Xenopus*-Embryonen nach RNA-Injektionen der Homöobox-Transkriptionsfaktoren Nkx2.3 und Nkx2.5 eine deutliche Erhöhung der Kardiomyocytenzellzahl detektiert werden (Chen and Fishman 1996; Cleaver et al. 1996).

Diese und andere Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Myogenese und die gesamte Organogenese durch das komplexe Zusammenspiel unterschiedlicher Einflüsse gesteuert wird, wobei der Kontrolle des Zellzyklusses eine entscheidene Rolle zukommt.

2.3 Embryonale Skelettmuskelentwicklung in Vertebraten

Obwohl die embryonale Skelettmuskelentwicklung (Myogenese) zu den am besten studierten Entwicklungsmechanismen gehört, sind dennoch wichtige Details ungeklärt. Der Großteil der Forschungsarbeiten ist in den Modellorganismen *Mus musculus* (Maus) und *Gallus gallus* (Huhn) vollzogen worden. Der letzte Stand der Forschung ist in folgenden Artikeln zusammengefasst: (Arnold and Braun 1996; Amthor et al. 1998; Blagden and Hughes 1999; Brand-Saberri and Christ 1999; Buscher and Izpisua Belmonte 1999; Ordahl 2000c)

Alle Skelettmuskelzellen des Körperrumpfes, der Extremitäten und der Zunge entwickeln sich aus Zellen des paraxialen Mesoderms. Während der Somitogenese formen die mesenchymalen Zellen des paraxialen Mesoderm stereotypisch links und rechts des Neuralrohres in rostral nach kaudaler Richtung epitheliale Strukturen, die Somiten (Christ and Ordahl 1995). Die epithelialen Zellen der Somiten sind u.a. der Ursprung sämtlicher Skelettmuskelzellen. Der epithelialisierte Somit lässt sich in eine dorsale und eine ventrale Hälfte unterteilen (Abbildung 2 A).

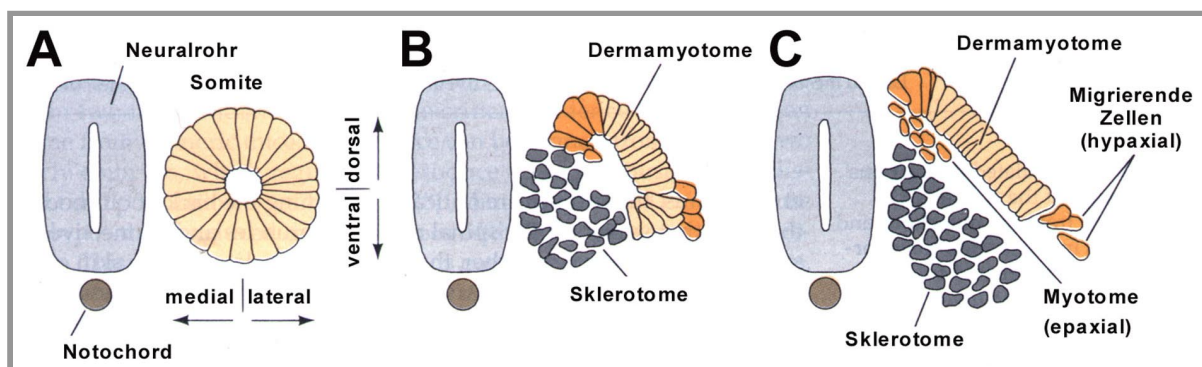


Abbildung 2: Schematische Darstellung von transversalen Ansichten auf die Somitendifferenzierung. **A** zeigt den noch undifferenzierten segmentierten Somiten und seine Orientierungen. In **B** delaminieren die ventro-medialen sklerotomalen Zellen. In **C** ist die weitere Kompartimentierung des Somiten in das Myotom (epaxiale Muskelanlage) und den aus der ventrolateralen Lippe delaminierenden hypaxialen Muskelvorläuferzellen dargestellt. Abbildung wurde übernommen aus (Gilbert 1997).

Zellen der ventralen Hälfte unterziehen sich einer epithelialen-mesenchymalen Transformation und delaminieren aus dem Zellverband des Somiten heraus und bilden das Sklerotom (B), die Quelle für Zellen der Rippen- und Wirbelsäulenanlage.

Die dorsale Hälfte des Somiten verbleibt im epithelialen Zellverband und bildet das Dermamyotom (B). Die Zellen des Dermamyotoms sind durch ihren undifferenzierten, proliferativen Zustand gekennzeichnet. Sie sind der Ursprung von epaxialer und hypaxialer Muskulatur (Ordahl and Le Douarin 1992).

Die epaxialen Muskeln (interkostale und tiefe Rückenmuskulatur) bilden sich ausschließlich aus den mittleren Bereichen des Dermamyotoms. Zellen, die am Rand des mittleren Dermamyotoms lokalisiert sind, deepithelialisieren und formen das medial zwischen dem Dermamyotom und Sklerotom gelegene Myotom (C). Die Zellen des Myotoms starten als erste die myogene Differenzierung (Denetclaw et al. 1997; Williams and Ordahl 1997), die durch die Expression von Genen der MyoD-Familie (*Myf-5* und *MyoD*, *Myogenin* und *Myf-6*) markiert wird (Ott et al. 1991; Braun et al. 1992).

Die hypaxiale Muskulatur (Muskeln der Extremitäten, der Zunge oder der Körperwand) findet ihren Ursprung im ventro-lateralen Bereich des Dermamyotoms. Zellen der ventro-lateralen Lippe (C) durchlaufen eine epithelial-mesenchymale Transformation und migrieren in die Zielbereiche der hypaxialen Muskelanlagen. Während ihrer Wanderung exprimieren die Muskel-Vorläuferzellen keine Gene der MyoD-Familie (Sassoon et al. 1989; Braun et al. 1994; Tajbakhsh and Buckingham 1994). Sie werden von Beginn der Delamination bis zum Ende der Migration durch die Expression der Transkriptionsfaktoren *Pax3* (Bober et al. 1994; Goulding et al. 1994) und *Lbx1* (Mennerich et al. 1998; Schäfer and Braun 1999) und des Tyrosine-Kinase-Rezeptors *c-met* (Bladt et al. 1995) markiert. Erst nach dem Erreichen der Zielregionen beginnen diese Zellen mit der Expression von Genen der MyoD-Familie, d.h. mit dem Start der myogenen Differenzierung.

2.4 Regeneration von Skelettmuskeln

Während die embryonale Entwicklung von Skelettmuskelzellen bereits gut untersucht und ein Grossteil der involvierten Faktoren charakterisiert worden ist, findet die Regeneration von Skelettmuskeln in adulten Organismen erst in den letzten Jahren größere Aufmerksamkeit. Es fällt auf, dass eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren und anderen Signalmolekülen, die während der Embryonalentwicklung aktiv sind, bei der Regeneration eine ähnliche Rolle zukommt. Verschiedene Regulationsmechanismen besitzen sowohl in der embryonalen Entwicklung als auch nach Verletzungen während der Regeneration von Skelettmuskeln in adulten Organismen Gültigkeit. Wie die embryonale myogene Differenzierung ist auch die Regeneration von Skelettmuskelzellen charakterisiert durch die spezifische Kontrolle der Proliferation von Muskelvorläuferzellen und ihrer myogenen Differenzierung, gefolgt von der Fusion der Myoblasten zu multinuklearen Muskelfasern. Es konnte gezeigt werden, dass *MyoD* eine bedeutende Rolle bei der

Kontrolle der Differenzierung von Muskelvorläuferzellen während der Regeneration besitzt (Megoney et al. 1996). In Vertebraten existieren sogenannte Satellitenzellen, die auch als Muskelstammzellen bezeichnet werden (Bader et al. 1988; White and Esser 1989). Satellitenzellen sind als separate Zellen innerhalb der Basallaminamembran (die die Muskelfaser umgibt) lokalisiert. Nach einer Verletzung oder während eines Muskelaufbautrainings werden die Satellitenzellen zur Proliferation stimuliert. Es wird angenommen, dass nach erfolgter Zellteilung eine Tochterzelle als Muskelstammzelle erhalten bleibt. Die zweite Tochterzelle kann laut Modellvorstellungen als Muskelvorläufer weiter proliferieren, um den Pool an Vorläuferzellen zu erhöhen, oder in die myogene Differenzierung eintreten. Wie schon in der embryonalen Muskelentwicklung markiert *MyoD* das Ende des Zellzyklusses und den Beginn der myogenen Differenzierung. So kommt es in *MyoD* defizienten Mäusen zu einer Ansammlung von Muskelvorläuferzellen, ohne dass die Muskelregeneration effizient abgeschlossen wird (Rudnicki et al. 1992): Zum einen wird der Pool der Muskelvorläuferzellen ständig erhöht, da das Beenden des Zellzyklusses der Muskelvorläuferzellen nicht durch die *MyoD* Expression eingeleitet wird. Zum anderen differenzieren die zahlreichen Muskelvorläuferzellen wegen des Fehlens des myogenen Differenzierungsfaktors nicht effizient aus.

Bedeutende Fragen sind jedoch noch ungeklärt. Die Mechanismen, die nach einer Verletzung von Muskelgewebe ablaufen, können grob wie folgt beschrieben werden: Einleitung der Myolyse, d.h. des Abbaus des verletzten Gewebes und zum anderen der Start der Regeneration des Gewebes. Nachdem das nekrotische Gewebe „abgeräumt“ ist, beginnt die Vermehrung der Muskelvorläuferzellen, die anschließend zu neuen Muskelfasern fusionieren. Ist das verletzte Muskelgewebe ersetzt, wird spezifisch die Proliferation von Vorläuferzellen gestoppt, so dass wiederum lediglich die Satellitenzellen zurückbleiben.

Die Faktoren, die zu kontrolliertem Ablauf der Regeneration führen, sind zur Zeit Gegenstand intensiver Forschung. Als gesichert gilt, dass die Transkriptionsfaktoren der MyoD-Familie als entscheidende Faktoren wirken, um in Vorläuferzellen die myogene Differenzierung zu induzieren.

2.5 Ziel der Arbeit

Das Ziel der nachfolgenden Untersuchungen ist es zu verstehen, welche Faktoren zur Induzierung von myogenen Differenzierungsgenen der MyoD-Familie führen. Es ist unbestritten, dass die Expression der bHLH Proteine den Beginn der myogenen Differenzierung beschreiben, aber wenig ist darüber bekannt, durch welche Faktoren ihre Transkription aktiviert wird und durch welche Faktoren die pluripotenten Zellen als Muskelvorläuferzellen spezifiziert werden. Die „Laterale Inhibition“ mit der Delta/Notch-Signalkaskade beschreibt einen Mechanismus, bei dem der Delta-

Ligand den Notch-Rezeptor der benachbarten Zelle bindet. Im Zuge dieser Interaktion wird die Notch-Zelle induziert, die Hes-1 Transkription zu starten. Die Ausbildung von Hes-1/MyoD Komplexen führt zur Inhibierung der myogenen Differenzierung (Sasai et al. 1992; Kopan et al. 1994; Jarriault et al. 1995). Weitere Antagonisten von Proteinen der MyoD-Familie, die zu einer Inhibierung der myogenen Differenzierung führen, sind w.o. beschrieben ID-1 (Benezra et al. 1990a) oder Twist (Spicer et al. 1996), welches im Dermamyotom und Sklerotom exprimiert, das MyoD-Protein in zur Transaktivierung inaktivem Heterodimers-Komplex bindet. Neben den Antagonisten sind die basischen HLH-Proteine der MEF-Familie als positive Kofaktoren einer myogenen Differenzierung beschrieben. MEF2A aktiviert in Fibroblasten die Proteine der MyoD-Familie, so dass es zu einer myogenen Differenzierung kommt (Kaushal et al. 1994).

Es stellte sich die Frage, ob die Markergene der hypaxialen Muskelvorläuferzellen *Lbx1* und *Pax3* lediglich für die Migration von Bedeutung sind, oder ob sie in der Lage sind, die myogene Differenzierung aktiv zu regulieren. Es wurde die Funktion des Homöobox Transkriptionsfaktors *Lbx1* während der Entwicklung hypaxialer Muskulatur durch gezielte retrovirale Überexpressionen im Modellorganismus *Gallus*

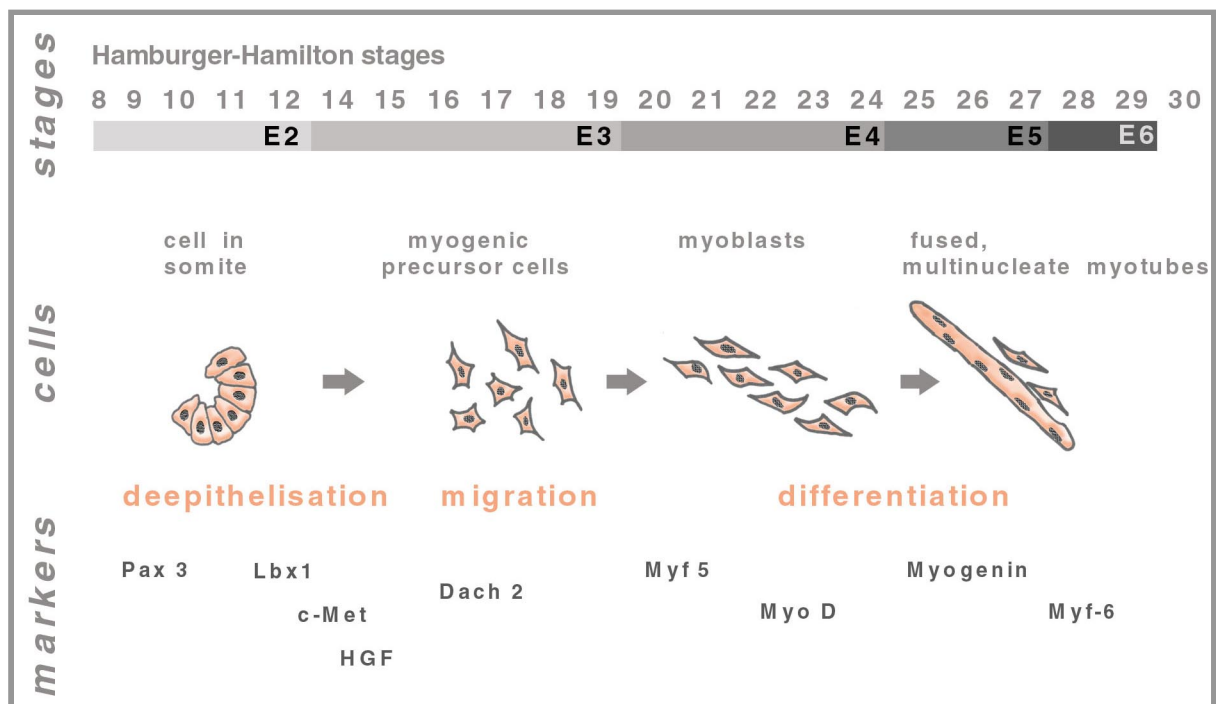


Abbildung 3: Schematische Darstellung der embryonalen Entwicklung hypaxialer Extremitätenmuskulatur. Oben ist der Zeitrahmen angedeutet, wobei E für Embryontag steht und darüber die entsprechenden Hamburger-Hamilton-Stadien angezeigt sind. In der Mitte ist der Werdegang der Muskelvorläuferzellen skizziert, von der Delamination über die Migration bis zur myogenen Differenzierung. Im unteren Drittel sind die für die jeweiligen Stadien bekannten Markergene aufgelistet.

gallus untersucht. Das Homöoboxgen *Lbx1* wird u.a. in Zellen des ventro-lateralen Dermamyotoms exprimiert und markiert die migrierenden hypaxialen Muskelvorläuferzellen auf ihrem Weg in die auswachsenden Extremitäten. An den Zielorten der zukünftigen Muskelkompartimente angekommen, bleibt die *Lbx1* Transkription aktiv, während durch Expression von *Myf-5* und *MyoD* die myogene Differenzierung der Muskelvorläuferzellen aktiviert wird. Wie in Abbildung 3 schematisch dargestellt, werden hypaxiale Muskelvorläuferzellen, neben *Lbx1*, noch von dem Transkriptionsfaktor *Pax3* und von dem Tyrosin-Kinase Rezeptorgen *c-met* markiert.

Verschiedene Untersuchungen ließen eine unterschiedliche Einordnung der vier Gene der MyoD-Familie zu: Während *Myf-5* und *MyoD* eher für die Zelldeterminierung (die noch eine weitere Proliferation der Muskelvorläuferzellen erlaubt) und die frühe Differenzierung stehen, wird die Funktion von *Myogenin* und *Myf-6* vor allem innerhalb der terminalen Differenzierung gesehen. Gerade *Myf-6* unterscheidet sich im Expressionsmuster von den anderen drei Faktoren dieser Familie. Zunächst ist *Myf-6* nur schwach und relativ kurzzeitig im Myotom (in der Maus von E9.0 - E11.5) exprimiert im Gegensatz zu den anderen myogenen Differenzierungsfaktoren. *Myf-6* scheint als einziges Gen nicht an der Kopfmuskelentwicklung beteiligt zu sein. Die eigentliche Funktion des *Myf-6* Gens wird daher in adulten Muskeln vermutet, obgleich gezielte Geninaktivierungsstudien in der Maus keine definierte Funktionszuordnung in diesem Vorgang offenbarte. Die Transkription von *Myf-6* wird am Ende der Embryogenese hochreguliert. Es wird vermutet, dass *Myf-6* in adulten Organismen der myogene Differenzierungsfaktor ist, der die Maturation von Muskelvorläuferzellen und evtl. auch die Regeneration reguliert.

Im Zuge der nachfolgenden Untersuchungen wurde im zweiten Teil der Promotionsarbeit in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Birgit Kerst (Klinik für Neuropädiatrie und Neuropathologie, Charité, Prof. Dr. Christoph Hübner, Humboldt Universität Berlin) eine humane Mutation in der basischen DNA-bindenden Domäne des bHLH Transkriptionsfaktors *Myf-6* biochemisch analysiert. Im Mausmodell wurden die humanen Genotypen nachgestellt, um Einblicke in den humanen Krankheitsverlauf zu erhalten.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Gebrauchswaren

Röntgenfilme	Fuji, Kodak
Plastikwaren	Nunc, Greiner, Falcon
Reaktionsgefäße	Schütt
Polyamidmembran Nytran Plas	Schleicher & Schüll
Objektträger, Deckgläser	Schütt
Glaskapillaren	Science Products GmbH
Einmalfilter	Satorius
Blotting- und Filterpapier	Schleicher & Schüll

3.1.2 Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders erwähnt, wurden Chemikalien p.a. und Enzyme nachfolgender Firmen verwendet: Amersham (Braunschweig), Boehringer Mannheim (Mannheim), Invitrogen (Leek, NL), Merck (Darmstadt), Molecular Probes (Göttingen), New England Biolabs (Schwalbach), Pharmacia (Freiburg), Promega (Mannheim), Quiagen (Hilden), Roth (Karlsruhe), Serva Feinbiochemiker (Heidelberg), Sigma Chemie (Deisenhofen), Stratagene (Heidelberg)

3.1.3 Radiochemikalien

Die folgenden Radiochemikalien wurden entweder von Amersham (Braunschweig) oder NEN Life Science (Köln) bezogen.

[α -³²P] dCTP (6000 Ci/mmol; 10 mCi/ml; wässrige Lsg.)

[α -³⁵S] dATP (>1000 Ci/mmol; 10 mCi/ml; wässrige Lsg.)

[γ -³²P] dATP (6000 Ci/mmol; 10 mCi/ml; wässrige Lsg.)

[α -³⁵S] Methionin (wässrige Lsg.)

D-threo-[Dichloracetyl-1-¹⁴C] Chloramphenicol (57 mCi/mmol; 25 μ Ci/ml; 0.25M Tris pH7.5)

3.1.4 Mausstämme und befruchtete Hühncheneier

Alle Mäuse wurden von der Firma Harlan-Winkelmann bezogen oder stammten aus der Eigenzucht.

ICR	zur Generierung von Wildtypembryonen
C57BL/6J	zur Generierung von Wildtypembryonen
mdx Maus	dieser Mausstamm trägt eine von vier bekannten Mutationen im Dystrophingen. Dabei handelt es sich um einen Basenaustausch im Exon 23, welcher in einem Stopcodon im 4.8 Kb Transkript resultiert. Im hemizygoten Phänotyp fehlt den männlichen Tieren die Expression der 427 KDa Dystrophin Isoform im Muskel sowie im Gehirn (das mdx Gen ist X-chromosomal lokalisiert)(Bulfield et al. 1984; Sicinski et al. 1989).
Myf-6 Maus	(Braun and Arnold 1995)

Virusfreie befruchtete SPF Hühncheneier wurden von Charles River (Exertal) bezogen.

3.1.5 Verwendete Bakterienstämme

XL1 Blue	Stratagene; recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)] ^c
JM110	Stratagene; rpsL thr leu thi hsdR17 (r _k ⁻ , m _k ⁺)lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI ^q ZΔM15]
LE 392	Promega; hsdR574 (r _k ⁻ , m _k ⁺) supE44 supF58 lacY1 oder Δ(lacIZY)6 galK2 galT22 metB1 trpR55
Y1090	Promega ; Δ(lacU169) proA ⁺ Δ(lon) ara D139 strA hflA150 [chr:Tn10(tet ^r)] (pMC9)
XL1-Blue MRF'	Stratagene
XL0LR	Stratagene

3.1.6 Verwendete Zelllinien

C3H10T1/2 Fibroblasten	(Reznikoff et al. 1973)
C2C12	(Yaffe and Saxel 1977)
Chicken Embryonal Fibroblasten (CEF)	präpariert nach (Fekete and Cepko 1993)

3.1.7 Klonierungsvektoren

pBS	Stratagene
pCS2MT	freundlicher Weise von Prof. Dr. T. Braun zur Verfügung gestellt
pRCASBP(A)	freundlicher Weise von Prof. Dr. T. Braun zur Verfügung gestellt
pGemT	Promega
pGAL4-BD	freundlicher Weise von Prof. Dr. T. Braun zur Verfügung gestellt
pKSII	Stratagene; Genbank X52327

3.1.8 Oligonukleotide

Benötigte Oligonukleotide wurden von verschiedenen Firmen synthetisiert: Pharmacia (Freiburg), Eurogentec (Köln) und Roth (Karlsruhe). Sämtliche Oligonukleotidsequenzen sind in 5'>3' Orientierung angegeben.

3.1.8.1 Oligonukleotide zur Sequenzierung der Hühnchen Lbx-1 cDNA

Oligonukleotidsequenz (5' - > 3')	Bezeichnung	Strang	Position in bp (siehe 4.1.2)
CGGGGAGGCGGCGAGCAAAG	lbx5utr1	minus	70 – 50
CGCACCGACGGCTTGTTGAGG	A2-Race	minus	285 – 264
CTTCTCGGCGGCGGACAGC	A1-Race	minus	336 – 318
GCTGTCCGCCGCCGAGAAGC	A10-Race	plus	318 – 337
GTCGGGCGGGCGCTGCTCTC	S1-Race	plus	360 – 380
CTGGCCAGCAAACCTTCAA	S2-Race	plus	412 – 431
CCGCTGCCGAAGA	RT-Race	minus	498 – 485
GCCTTCACCAACCACAGATC	lbx2a	plus	532 – 552
AGCTCGTAGATCTGGTGGTT	lbx-hd3	minus	560 – 541
AACCACCAGATCTACGAGCT	lbx-hd5	plus	541 – 560
ATCACCTGGTTCCAGAACCG	lbx2b	plus	649 – 668
GTCGGCCTTCATCTC	RT2	minus	721 – 707
GGCCTTGGCCGAGCTGGAGC	hdlbxr3	plus	769 – 788
GCTCCAGCTCGGCCAAGGCC	hdlbxr5	minus	788 – 769
CGTGGAGATCGACGTGGATG	lbx-153r3	plus	936 – 955

3.1.8.2 Oligonukleotide zur Verwendung in PCR Klonierungsstrategien

Oligonukleotidsequenz (5' - > 3')	Bezeichnung
CTACCCTCTAGAGGTTACTTCTCCACCACTTCCTCC	Myf6-stop-Xba1
CTACCCTCGAGAGTTACTTCTCCACCACTTCCTC	Myf6-stop-Xho1

GCCGGAATTCGATGATGATGGACCTTTTTGAAACTG	Myf6-start-EcoR1
CGCCTATCGATTGCCACCAGTACTTCCAAAGAAGAAGC	Lbx-Cla 5'new
GGGAGCATCGATGCCGCCCTCAGTCATCCACG	Lbx1 3'Ende Cla1
CCGGTATCGATACTCAGTCATCCACGTCGATCTCCAC	LBX1G Cla1
GGCCGCTCTAGAGTCATCCACGTCG	LBX1-OS-Xba1

3.1.8.3 In RT-PCR verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotidsequenz (5' -> 3')	Oligonukleotidsequenz (5' -> 3')	Bezeichnung PCR-Produktgröße
CTGAGTTTTCTGCTTTGACG	TGGAAGATATGAAGGGAAGA	Shh Chick 395 bp
CGTCCGGCGTCATCACCTT	TCCGGCCCTGTGTCATCTCC	Pax3 b Chick 138 bp
GCATCCGGCCCTGTGTCAT	CCGGTTCTCCTCGATTTTCTT	Pax3 a Chick 170 bp
TGGAGCCCACCACCACTGTC	AACACCAGCTTAACTTGAAG	Pax3 Chick 215 bp
CCTGGAACCCACGACCACGGTGTC	AACGTCCAAGGCTTACTTTG	Pax3 Mouse 183 bp
CGTGAGCAGGAGGATGCATA	GGGACATGTGGAGTTGTCTG	MyoD Chick 280 bp
AGCCTCAACCAGCAGGAG	TGCGCCAGCTCAGTTTTGGA	Myogenin Chick 284bp
CTGAGGAAGAGGAACACGTC	AGGTCTCGAATGCTTGGTTC	Myf5 Chick 174 bp
GATCCAGCTGAGCCATGCCA	GCTTCTGCTCAGCATCAACC	MHC Chick 616 bp
AGTCATCCCTGAGCTGAATG	AGGATCAAGTCCACAACACG	GAPDH Chick 330 bp
CGCCATTTCTTTTTGCTGAT	CGCCTGTTCCACTTGTTCTC	Dach2 Chick 308 bp
CTGGCCAGCAAACCTTCAA	AGCTCGTAGATCTGGTGGTT	Lbx1 Chick 148 bp
CTCCTTAGACGCCCCCTCTTC	CAGCGGTACTGCTGCCCCAC	ENVRAS(A)

3.1.8.4 Oligonukleotide zur Generierung gezielter Punktmutationen

Oligonukleotidsequenz (5' -> 3')	Bezeichnung
GAAAATCAACGAGTCCTTCGAGGCACTGAAGCGGCG	Myf6-up
CAGTGCCTCGAAGGACTCGTTGATTTTCTTTAGCC	Myf6-do
GTCTGATCTGGGCTTGCAAGACC	Myf6-P9
CTGTGACTGGTGACGCGTCAACCAAGTC	Sca1-Sel
GACCTGGGCGTTGGTGGGCCCAAGCTGCTGGGCG	Lbx1-mut-minus
CGCCCAGCAGCTTGGGCCCAACGCCCAGGTC	Lbx1-mut-plus

3.1.8.5 Sonstige Oligonukleotide

Oligonukleotidsequenz (5' -> 3')	Bezeichnung
CATACGATTTAGGTGACACTATAG	SP6-Primer
CGCGCGTAATACGACTCACTATAG	T7 Primer
ATTAACCCTCACTAAAG	T3 Primer

3.2 Molekularbiologische Methoden

Alle gentechnischen Arbeitsschritte wurden unter Beachtung der geltenden Sicherheitsvorschriften durchgeführt. Reagenzien, Enzyme und Proben wurden grundsätzlich auf Eis gekühlt. Verwendete Lösungen, Medien und Puffer wurden grundsätzlich mit bidestilliertem Wasser angesetzt und zur Sterilisation entweder autoklaviert oder steril filtriert.

Sofern nicht näher erwähnt, wurden folgende Standardtechniken der Molekularbiologie nach „Molecular Cloning“ (Sambrook et al. 1989) oder „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel et al. 1992) durchgeführt:

- Spaltung von doppelsträngiger DNA mittels Restriktionsendonukleasen
- Präzipitation von Nukleinsäuren
- Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren
- Generierung von „glatten“ Enden mittels dem Klenow-Fragment bzw. mittels der T4 DNA Polymerase
- Dephospholierung der 5'-endständigen Phosphatgruppen linearisierter Nukleinsäuren durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase
- Gelelektrophoretische Separation von Nukleinsäuren der Größe nach
- Elektroelution von DNA-Fragmenten aus Agarosestückchen
- Ligation von Nukleinsäuren mittels der T4 DNA Ligase
- Herstellung kompetenter E.coli Zellen
- Transformation von Plasmid DNA in kompetente XL1 Blue Bakterienzellen
- Präparation von Plasmid DNA aus E.coli Zellen im analytischen Maßstab
- Maxi-Präparation von Plasmid DNA mittels Cäsium-Chlorid-Gradienten
- Maxi-Präparation von Plasmid DNA durch Verwendung des Maxi-Prep. Systems der Firma Qiagen
- Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren
- Sequenzierung von Nukleinsäurefragmenten nach der Sanger Methode unter Verwendung des „Sequenase V2.0 DNA Sequencing Kit“ der Firma Amersham
- Automatische Sequenzierung von DNA am ABI 310 der Firma Perkin-Elmer
- Generierung radioaktiv markierter DNA-Sonden mittels Klenow-Fragment oder mittels der T4 DNA Polymerase (Endmarkierung)
- Durchsuchen von cDNA- und Genomischen Banken auf Filtern des RZPD (Berlin)
- Durchsuchen einer in λ -Phagen „verpackten“ cDNA-Bank
- Southern Blot Analyse
- Strangseparierende Polyacrylamidgele
- Kultivierung und Passagierung von eukaryontischen Zellen
- Trypsinisierung und Kryokonservierung von eukaryontischen Zellen
- Calciumphosphattransfektion von eukaryontischen Zellen

3.2.1 Whole-mount in situ Hybridisierung

Das Verfahren der in situ Hybridisierung erlaubt es spezifische Gentranskripte direkt in Zellen oder Gewebe ganzer Embryonen nachzuweisen (Wilkinson 1992). Dabei dient ein revers komplementär synthetisierter RNA Strang (die antisense RNA Probe) als Sonde. Zur Synthese dieser Sonde wird ein entweder Digoxigenin- oder Fluorescin-derivatisiertes Ribonucleotid eingesetzt, welches nach erfolgter Hybridisierung mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern immunhistochemisch nachgewiesen wird.

Diese Methode erlaubt es die Transkription spezifischer Gene, während der embryonalen Entwicklung bei Mäusen bis E12.5 und beim Hühnchen bis E6.5, darzustellen.

3.2.1.1 Synthese der Antisense RNA Probe

Die zu markierende cDNA-Probe wurde mit einem geeigneten Restriktionsenzym am 5'-Ende linearisiert und mit der entsprechenden RNA Polymerase in Gegenwart von einem Digoxigenin oder Fluorescin modifizierten Ribonucleotid transkribiert.

2 µl	Transkriptionspuffer [10x]
2 µl	DTT [0.1M]
2 µl	Ribonucleotidgemisch pH8.0 (inkl. Dig oder Fluorescin markiertem UTP)
1 µl	linearisierte DNA Matrize [1µg/µl]
0.5 µl	RNasin [40 U/µl]
1 µl	RNA-Polymerase
ad	bidest. H ₂ O
20 µl	Gesamtvolumen

Nach zweistündiger Transkription bei 37°C werden 2 µl DNase I (absolut RNase frei) zum Reaktionsansatz hinzugefügt. Nach 15 min. Inkubation bei 37°C sollte die DNA Matrize verdaut sein. Durch die anschließende Ethanol Präzipitation werden die nicht eingebauten Ribonucleotide und die gespaltene DNA Matrize abgetrennt.

Nach kurzem Vortexen wird die RNA Probe sofort abzentrifugiert, um das Copräzipitieren der freien Ribonucleotide zu vermeiden. Das nicht sichtbare Pellet wird zweimal mit eiskaltem 75% EtOH gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Nach dem Resuspendieren der nun aufgereinigten RNA Probe in 100 µl TE [1x] werden 5 µl auf einem Agarosegel aufgetrennt, um die Quantität und Qualität der synthetisierten RNA zu überprüfen.

3.2.1.2 Präparation der Embryonen

Die Embryonen werden präpariert und von ihren umgebenden Membranen befreit. Nachdem sie ü.N. in 4% PFA fixiert wurden, werden sie

22 µl	Transkriptionsansatz
100 µl	TE [1x]
10 µl	LiCl [4M]
300 µl	EtOH (abs.)

schrittweise aus wässrigem Medium in Methanol (25%, 50%, 75%, 100%) überführt. In 100% Methanol können die Embryonen über einen beliebig langen Zeitraum bei -20°C gelagert werden.

3.2.1.3 Hybridisierung der Antisense RNA Probe

Vor der eigentlichen Hybridisierung werden die Embryonen schrittweise wieder ins wässrige Medium (PBT) überführt (25%, 50%, 75%, 100%). Nach zusätzlichem zweimaligen Waschen in PBT werden die Embryonen durch Inkubation für 1 h in 6% H_2O_2 in PBT geblichen. Das Peroxid oxidiert die endogene alkalische Phosphatase, so dass später in der histochemischen Anfärbung die Hintergrundaktivität möglichst gering gehalten wird. Durch dreimaliges Waschen in PBT wird sämtliches Peroxid entfernt. Zur Permeabilisierung des Gewebes stehen die folgenden Ansätze zur Verfügung: eingeführt ist eine 15 min. Behandlung des Gewebes mit Proteinase K in PBT [10 $\mu\text{g}/\text{ml}$], mit anschließender Inaktivierung des Enzyms durch zweimaliges Waschen mit frischen Glycine in PBT [2 mg/ml]. Alternativ können die Embryonen für 1h bei 90°C „aufgekocht“ werden oder man permeabilisiert das Gewebe durch Waschen für 1h in einem Detergenzgemisch (DMix). Da das Permeabilisieren das Gewebe instabilisiert, werden die Embryonen für 20 min. in frischem 0.2% Glutaraldehyd (Quervernetzer) und 4% PFA in PBT nachfixiert. Zur Entfernung der Reagenzien wird das Gewebe wiederum zweimal in PBT gewaschen.

Für die Hybridisierung der RNA Probe muss das Gewebe in die Hybridisierungslösung überführt werden. Hierzu benetzt man die Embryonen zunächst mit der Hybridisierungslösung, bevor sie zur einstündigen Prähybridisierung bei 70°C vollständig in diese überführt werden. Anschließend wird die Prähybridisierungslösung verworfen und Hybridisierungsprobe zugesetzt. In der Regel wird die RNA Probe auf 1-2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hybridisierungslösung verdünnt – in einigen Fällen muss diese jedoch höher konzentriert zugegeben werden. Die Hybridisierung wird bei 70°C ü.N. durchgeführt.

Die Hybridisierungsprobe kann anschließend bei -20°C gelagert und bis zu fünf Mal wieder verwendet werden. In der Regel werden die Resultate bei Wiederverwendung der Proben qualitativ besser, da sich die Konzentration der freien Ribonukleotide immer weiter reduziert.

3.2.1.4 Nachbehandlung der Embryonen

Nach dem Entfernen der Hybridisierungsprobe folgen mehrere Waschschrte, um die unspezifisch oder nicht gebundenen RNA Transkripte zu eliminieren. Als Erstes werden die Embryonen zweimalig bei 70°C für 30 min. mit SolA inkubiert. Zur Überführung ins rein wässrige Medium werden sie für 10 min. bei 70°C mit einem 1:1

Gemisch aus SolA/SolB gewaschen, bevor sie dreimalig bei RT mit SolB inkubiert werden. Anschließend wird durch Zugabe von RNase A in SolB [100µg/ml] für zwei Mal 30 min. bei 37°C sämtliche nicht gebundene, d.h. einzelsträngige RNA verdaut. Nach einmaligem Nachwaschen in SolB wird das Gewebe wieder in das Formamid-haltige Medium SolC überführt. Durch zweimaliges Waschen in SolC bei 65°C für 30 min. sollen die durch die Hydrolyse der unspezifischen RNA Stränge entstandenen Bruchstücke ausgewaschen werden.

3.2.1.5 Histochemische Anfärbung

Für die histochemische Visualisierung der hybridisierten Antisense Transkripte werden die Embryonen durch dreimaliges Waschen in TBST wieder in wässriges Medium überführt. Vor der eigentlichen Zugabe des monoklonalen Antikörpers wird das Gewebe durch Inkubation von 10% Schafserum in TBST für 1-2 h gegen unspezifische Bindungen abgesättigt. Zusätzlich wird der anti-Digoxigenin bzw. anti-Fluorescein Antikörper (beide Boehringer Mannheim) preabsorbiert, um ebenfalls unspezifische Bindungen abzusättigen. Dies geschieht, indem man 3 mg Embryopulver (der gleichen Spezies) in 0.5 ml TBST für 30 min. auf 70°C erhitzt, auf Eis abkühlt und anschließend 1 µl des gewünschten Antikörpers und 5 µl Schafserum zugibt und diesen Absatz für 1-2 h bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation wird der Überstand mit TBST auf 2 ml aufgefüllt und mit 1% Schafserum versetzt. Die Inkubation der gegen unspezifische Bindungen abgesättigten Embryonen mit dem preabsorbierten Antikörper erfolgt bei 4°C ü.N..

Am nächsten Tag wird der nicht gebundene Antikörper abgewaschen. Zunächst wird das Gewebe fünf Mal kurz mit TBST gewaschen, wonach abschließend ebenfalls mindestens fünf Mal in TBST für 1h inkubiert wird. Für die Anfärbung werden die Embryonen durch fünfmaliges Waschen in NTMT überführt.

Der Antikörper ist konjugiert mit der Alkalische Phosphatase, so dass u.a. Fast Red (Sigma) oder das Gemisch aus NBT und BCIP (Boehringer Mannheim) als Substrate zur Farbreaktion zur Verfügung stehen.

Für den Fall, dass die Embryonen mit nur einer RNA Probe hybridisiert wurden, empfiehlt es sich bei RT im Dunkeln mit NBT/BCIP in NTMT [4.5µl/ml und 3.5µl/ml] anzufärben (violette Färbung), oder bei hoch transkribierten Genen lediglich mit BCIP in NTMT [4µl/ml] (himmelblaue Anfärbung). Die BCIP Färbung ist lichtunempfindlich, verläuft allerdings sehr langsam, so dass sie im 37°C Brutschrank beschleunigt werden kann.

Nach Abschluss der Färbung werden die Embryonen dreimalig in TBST gewaschen und abschließend in 4% PFA postfixiert.

3.2.1.6 Doppelfärbung

Zur spezifischen Anfärbung zwei verschiedener Gentranskripte innerhalb eines Embryos werden diese mit zwei verschiedenen Antisense RNA Proben hybridisiert (3.2.1.3 Hybridisierung der Antisense RNA Probe). Dabei wird die RNA Probe des vermutlich schwächer transkribierten Gen mit Digoxigenin markiert und die des hoch transkribierten Gens mit Fluorescein (3.2.1.1 Synthese der Antisense RNA Probe). Nach erfolgter Hybridisierung werden alle Waschschrte, wie oben beschrieben, durchgeführt und die erste Färbung mit dem anti-Fluorescein Antikörper und Fast Red als Farbsubstrat durchgeführt. Ist die Färbung intensiv genug, werden die Embryonen mehrfach in TBST gewaschen, für 10min. bei RT in 0.1M Glycin pH2.2 mit 0.1% Tween-20 in TBST inkubiert und noch dreimal in TBST gewaschen. Durch den Waschschrte im Glycin-Puffer bei pH2.2 wird die Bindung des ersten Antikörpers gelöst.

Für die zweite Antikörperreaktion ist es nicht nötig die Embryonen erneut mit Schafserum abzublocken. Nach der ü.N. Inkubation mit dem zweiten anti-Digoxigenin Antikörper (wiederum konjugiert mit alkalischer Phosphatase) werden alle TBST und NTMT Waschschrte erneut ausgeführt, bevor die Transkripte der zweiten RNA Probe mit NBT/BCIP bzw. nur mit BCIP als Substrat angefärbt werden (3.2.1.5 Histochemische Anfärbung).

3.2.2 Photodokumentation von whole-mount hybridisierten Embryonen

Für die Photographie der gefärbten Embryonen unter dem Binokular wurden 64 ASA Kunstlicht Diafilme (64T Kodak) verwendet. Der zu fotografierende Embryo wird in eine Petrischale mit einer 2 mm starken Silikon- oder Agaroseschicht (2.5%) überführt und mit PBS [1x] überschichtet, bis er sich vollständig unter der Oberfläche befindet, so dass eine glatte wässrige Oberfläche sichtbar ist. Der Embryo wird in die gewünschte Lage gebracht, evtl. unter Zuhilfenahme feiner Insektennadeln (Plano). Die Petrischale wird auf eine schwarze oder blaue Unterlage positioniert und der Embryo mit Kaltlichtquellen möglichst so angeleuchtet, dass sich weder Lichtreflexe noch Schatten ergeben.

3.2.3 Schnitte von Geweben und Embryonen

3.2.3.1 Beschichtung von Objektträgern

Zur Haftbarmachung von Gewebeschnitten für die anschließenden Waschschrte und immunhistochemischen Anfärbungen wurden die Objektträger in 2% Aminopropyltriethoxysilan in Aceton (Vektarbound, Alexis) vorbehandelt.

Die Objektträger wurden 5 min. in reinem Aceton, 5 min. im 2% Silanreagenz in Aceton und 30 sek. in bidest. H₂O gewaschen und ü.N. im Brutschrank bei 37°C getrocknet.

3.2.3.2 Paraffinschnitte

Die einzubettenden Embryonen oder Gewebe wurden in PBS präpariert und ü.N. in 4% PFA fixiert. Zur Entfernung des Formaldehyd wurden die Gewebe zweimal mit PBS gewaschen. Bei Embryonen, welche in situ hybridisiert werden sollten, wurde ein zusätzlicher Waschschrift mit 0.85% NaCl in PBS durchgeführt. Die anschließende schrittweise Dehydratisierung der Embryonen erfolgte in einer aufsteigende EtOH-Reihe in PBS (beginnend mit 2x 50%, dann 2x 70%, 2x 85%, 2x 95%, 2x 100%). Bei Embryonen, welche in situ hybridisiert werden sollten, wurde der Anteil von 0.85% NaCl in PBS konstant gehalten. Zur Entfernung des EtOH wurden die Embryonen danach mehrfach in Xylol gewaschen. Die Überführung der Gewebe in das Paraffin wurde bei 60°C im Trockenschrank über einen Zwischenschritt für 1h in einem 1:1 Gemisch aus Xylol und Paraffin vollzogen. Das Paraffin wurde über einen Zeitraum von zwei Tagen mindestens dreimal ausgewechselt, um zu gewährleisten, dass keine Xylol Reste mehr vorhanden waren.

Die Embryonen wurden unter Verwendung eines Heizblockes in Metallformen eingebettet. Nach entsprechender Ausrichtung der Gewebe wurden die Metallformen zur Erstarrung des Paraffin auf Eis gestellt. Dabei musste mit großer Sorgfalt flüssiges Paraffin nachgegossen werden, um zu verhindern dass um das Gewebe herum zwei Phasen entstanden. Bis zur weiteren Verwendung konnten die erstarrten Paraffinblöcke bei RT gelagert werden.

Das Schneiden der Gewebe-Paraffinblöcke erfolgte mit einem Mikrotom der Firma Leica. Es wurden je nach Erfordernis Schnitte im Bereich von 5-20 µm erstellt.

3.2.3.3 Kryoschnitte

Die einzubettenden Embryonen oder Gewebe wurden in PBS präpariert und ü.N. in 4% PFA fixiert. Zur Entfernung des Formaldehyd wurden die Gewebe zweimal mit PBS gewaschen. Zur Vermeidung eines Aufplatzen der Zellen beim Einfrieren wurde das einzubettende Gewebe solange in 30% Sucrose in PBS gewaschen, bis es schwerer als die Lösung selbst, auf den Grund abgesunken war.

Danach wurden die Embryonen in Einbettformen in das Einfriermedium OCT (Miles, Naperville) überführt, ausgerichtet und auf Trockeneis eingefroren. So eingebettete Gewebe waren einige Tage bei -20°C haltbar.

Das Schneiden der Gewebelöcke erfolgte an einem Kryotom der Firma Leica. Es wurden je nach Erfordernis Schnitte im Bereich von 15-20 μm erstellt. Die Schnitte wurden 2 h bei RT getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.3.4 Vibratonschnitte

Bereits gefärbte Gewebe oder Embryonen wurden am Vibratom sektioniert, um eine detailliertere Analyse ermöglichen. Dazu wurden in einem kleinen Wägeschälchen 800 μl eiskaltes Gelatine-Albumin mit 80 μl 25% Glutaraldehyd vermischt und zügig in eine Einbettform überführt. Innerhalb von ca. 20 sek. musste dann der einzubettende Embryo in diese Matrix überführt und ausgerichtet werden. Am nächsten Tag erfolgte das Schneiden der Gewebelöcke an einem Vibratom der Firma Leica ja nach Gewebegröße und Intensität der Färbung im Bereich von 20-50 μm . Das Gewebeschnitte wurden auf einen Objektträger überführt und in 80% Glycerin in PBS „eingedeckelt“.

3.2.4 In ovo Mikromanipulation an Hühnchenembryonen

Der Modellorganismus des Hühnchens bietet verschiedene Vorteile gegenüber Säugetier-Modellorganismen. Zwar erlaubt das Hühnchensystem keine genetischen Ansätze wie eine Knock-out Analyse, aber die einfache Zugänglichkeit der Embryonen bietet die Möglichkeit zur Manipulation des sich entwickelnden Embryos. Die folgenden Unterpunkte beschreiben eine Methodik, die es ermöglicht, ein Gen mittels retroviralen Gentransfer temporal und spatial kontrolliert fehlzuexprimieren.

3.2.4.1 Brutbedingungen von befruchteten Hühncheneiern

Für die Methode des retroviralen Gentransfers durch einen replikationskompetenten RCAS Virus des Subtyps A wurden von der Firma Charles River (Exertal) virusfreie befruchtete SPF Eier bezogen. Nach der Befruchtung der Eier können diese ca. 6-8 Tage bei 12°C gelagert werden, ohne dass die embryonale Entwicklung voranschreitet. Je nach gewünschtem embryonalen Entwicklungsstadium, welche durch Hamburger-Hamilton Stages (HH) (Hamburger and Hamilton 1992) definiert sind, werden die Eier in einem Brutschrank bei 37.8°C und 100% Luftfeuchtigkeit bebrütet. Bei längerer Bebrütung als fünf Tage empfiehlt es sich, die Eier automatisch zu drehen, damit der sich entwickelnde Embryo nicht am höchsten horizontalen Punkt an die Eierschale anhaftet.

3.2.4.2 Vorbereitung der Hühnchenembryonen zur Mikromanipulation

Zur Freilegung des sich entwickelnden Hühnchenembryos wird das bebrütete Ei am höchsten Punkt markiert, da sich hier in der Regel der Embryo befindet. Das Ei wird mit einem herkömmlichen Eierspieker am hinteren Teil, wo sich die Luftblase befindet, angestochen. Mittels einer 5 ml Spritze und Kanüle werden 5 ml des Dotters abgezogen. Danach wird das Loch und die markierte obere Position großzügig mit Tesafilm abgeklebt. Mit Hilfe einer kleinen Rundschere wird ein Daumennagel großes Loch an der oberen markierten Stelle geschnitten. Da der Embryo mit bloßem Auge wegen fehlender Kontraste nicht sichtbar ist, wird mit Hilfe einer feinen Kanüle ca. 100 µl schwarze Tinte (Tusche A, Pelikan), 1:10 in Ringer Lösung verdünnt, direkt unter das Blastoderm gespritzt. Der nun unter dem Binokular sehr gut sichtbare Embryo wird durch Zählen der Somiten einem Entwicklungsstadium zugeordnet. Der Embryo ist noch bedeckt durch die Vitelline Membran, welche durch Anritzen mittels feiner Nadel an der gewünschten Stelle geöffnet wird, so dass der Embryo direkt zugänglich für die geplante Manipulation ist. Nach Abschluss der Manipulation oder Injektion werden ca. 200 µl Ringer Lösung (mit Zusatz von Penicillin und Streptomycin) auf die Vitelline Membran geträufelt, was ein Austrocknen des Embryos verhindert. Die Daumennagel große Öffnung wird vorsichtig mit Tesafilm zugeklebt und das Ei zurück in den Brutschrank gelegt. Dabei ist es unwesentlich ob das Ei 1h oder bis zu 8h bei RT temperiert war. Je nach Experiment wird das Ei beliebig weiter bebrütet.

3.2.4.3 Bead Implantierung

Zur Implantierung eines in Protein getränkten Heparin Kügelchen (Sigma) werden die zu manipulierenden Embryonen HH16 wie oben beschrieben freigelegt. Unter dem Binokular ausgewählte Heparin Kügelchen werden durch mehrfaches Waschen in Ringer Lösung äquilibriert und anschließend 2h bei RT in mit Protein versetzter Ringer Lsg. inkubiert. Am Embryo wird auf gewünschter Somitenhöhe, zwischen der Vorder- und Hinterextremität, mit einem geschärften Wolframdraht ein Schlitz in das dem paraxialen Mesoderm überliegende Ektoderm gesetzt. Mit Hilfe einer Pinzette werden die Kügelchen in diesen hineingedrückt.

Das Ei wird versiegelt und bis zur Analyse zurück in den Brutschrank gelegt.

3.2.5 Retroviraler Gentransfer

Rekombinierte Retroviren können als Vehikel benutzt werden, um fremde Gene in eukaryotischen Zellen zu exprimieren. Beim Gentransfer in Zellen durch retrovirale Vektoren werden die Besonderheiten des viralen Lebenszyklus genutzt. Der

genetische Bauplan der Retroviren erlaubt es, andere Gene zu insertieren, ohne den viralen Lebenszyklus außer Kraft zu setzen.

3.2.5.1 Darstellung eines konzentrierten RCASBP(A) Virus Stocks

Der virale Vektor pRCASBP(A) findet seinen Ursprung im Rous Sarcoma Virus (RSV), welcher zu der großen Familie der „Avian Sarcoma and Leukemia Viruses“ (ASLV) gehört. Obwohl alle Viren dieser Familie eine sehr große Sequenzhomologie verbindet, nimmt der Rous Sarcoma Virus eine Sonderstellung ein. Dieser Virus trägt neben den Sequenzen für die Virusproteine (*gag*, *pol*, *env*) zusätzlich die des Oncogens *src* (ca. 2.2 kb). Durch Deletion dieses vom Wirt rekombinierten *src* Gens und Einfügen von Splice-Akzeptor Sequenzen und einer Klonierungsstelle des Restriktionsenzym *Cla*1 (ATCGAT) wurde der RCASBP(A) Virus hergestellt (Petropoulos and Hughes 1991; Boerkoel et al. 1993). Durch Einklonieren des Gens der Wahl ist man in der Lage einen transgenen replikationskompetenten Retrovirus zu erhalten und mit diesem wirtszellspezifisch Hühnchengewebe oder Zellen zu infizieren.

Zur Herstellung eines transgenen Virusstocks werden CEF Zellen (chicken embryonal fibroblasten) präpariert und in 1x DMEM mit 15% FCS kultiviert (Fekete and Cepko 1993). In Vorbereitung zur Transfektion werden konfluente CEF Zellen 1:3 gesplittet und ü.N. kultiviert. Drei Stunden vor der Transfektion werden die Zellen mit frischem Medium versetzt. Die Transfektion wird nach der Calciumphosphat-Methode durchgeführt. Die transient transfizierten Zellen werden ca. 2 Wochen bzw. 5-7 Mal passagiert, um sicherzustellen, dass der Virus die gesamte Kultur infiziert hat. Nach dem letzten Splitten der infizierten CEF Zellen werden diese bis zu 80 % Konfluenz kultiviert. Danach wird das Normal Medium durch Medium mit niedrigem Serumgehalt (low serum media), d.h. 1x DMEM mit 2% FCS ersetzt. Nach 36 h wird der Mediumüberstand abgenommen, durch 0.45µm Cellulose Acetat Filter filtriert und gesammelt. Dieser zellfreie Überstand wird als nicht aufkonzentrierter Virusstocks verwendet und hat in der Regel einen Titer von 1.0×10^6 IU/ml (infection units pro milliliter). Zum Erhalt eines hochkonzentrierten Virusstocks wird der Überstand nach Filtration für 3 h bei 22.000 upm im Beckmann Ausschwingrotor SW-28 zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand vorsichtig abgezogen, so dass nur ein kleines Volumen das kaum sichtbare Pellet bedeckt. Unter leichtem Schwenken bei 4°C ü.N. wird dieses Viruspellet resuspendiert. Nach mehrmaligen vorsichtigen Auf- und Abpipettieren wird der aufkonzentrierte Virus zu 40 µl Aliquots aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Auf diese Weise erhaltene Virusstocks zeigen einen Titer bis zu 5.0×10^9 IU/ml.

3.2.5.2 Titerbestimmung des aufkonzentrierten RCASBP(A) Virus Stocks

Zur Bestimmung des Titers der erhaltenen Virusstock Lösungen werden CEF Zellen mit 40 % Konfluenz mit verschiedenen Virusstock Verdünnungen versetzt und für 48 h kultiviert (Fekete and Cepko 1993). Anschließend werden die Zellen in 4% PFA fixiert, mehrfach in 1x PBS gewaschen und in PBST geblockt (1x PBS mit 10% Pferdeserum und 0.1 % Triton X-100). Nach Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper 3c2 anti-MA erfolgte die immunhistochemische Anfärbung unter Verwendung des ABC Kits (Vecta Stain secondary detection kit, Vector Labs). Nach erfolgter Anfärbung wird der ursprüngliche Virustiter berechnet, in dem die infizierten Zellen der verschiedenen Verdünnungen ausgezählt werden.

3.2.5.3 Injektion des RCAS(A) Virus in ovo in Hühnchenembryonen

Zur Injektion benötigte Nadeln werden an einem Kapillarziehgerät (Sutter Puller) unter folgenden Parametern gezogen: Heat 318; Pull 090; Vel. 100; Time 005 (Ramp 303). Zur Injektion des Virusstocks werden befruchtete virusfreie Hühncheneier bebrütet, bis sie das erforderliche HH-Stadium der Embryonalentwicklung erreicht haben. Die Eier werden wie oben (3.2.4.2 Vorbereitung der Hühnchenembryonen zur Mikromanipulation) beschrieben, geöffnet.

Der Virusstock wird auf Eis aufgetaut und mit Hilfe von Eppendorf Spezialpipettenspitzen in die Injektionsnadel überführt. Die befüllte Injektionsnadel wird in den Mikromanipulator eingespannt und mit einer Pinzette am vorderen vorsichtig geöffnet. Mit Hilfe eines Eppendorf Microinjektors wird die Luft zwischen Öffnung und Viruslösung ausgeblasen. Durch gezielte Positionierung wird das Embryonalgewebe angestochen; je nach Experiment werden 0.1 – 2.0 µl des Virusstocks injiziert (siehe Abbildung 4).

Nach erfolgter Injektion wird das Ei weiter bebrütet, bis der manipulierte Embryo präpariert, fixiert und der Analyse unterzogen wird.

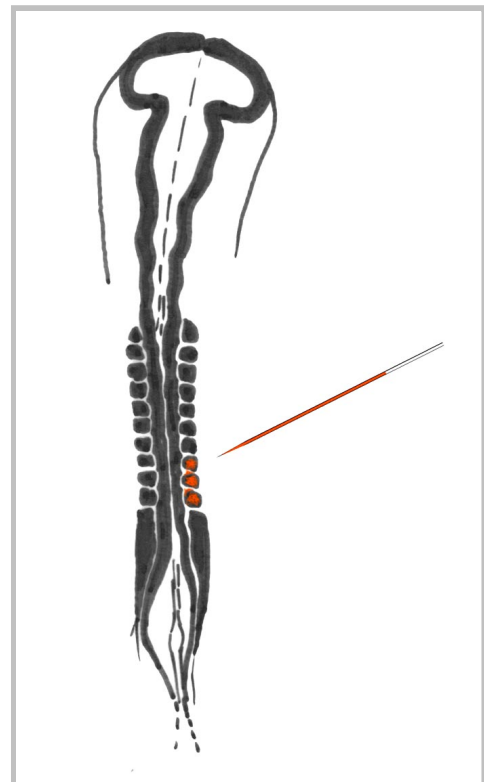


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Virusinjektion in Somiten eines Hühnchenembryos HH 10.

3.2.6 ex vivo Gewebekulturen

Die gezielte Analyse einer virusvermittelten Aktivierung anderer Gene kann in Kulturen explantierter Gewebe in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix durchgeführt werden. Der Vorteil in dieser Methodik besteht darin, dass im Gegensatz zur Whole-mount in situ Analyse von ganzen Embryonen, die Möglichkeit besteht mittels RT-PCR gleichzeitig die Veränderung der Transkription mehrerer Gene zu überprüfen. Dabei ist der Nachweis von Transkripten via RT-PCR im Vergleich zur Whole-mount in situ Analyse sehr viel sensitiver.

3.2.6.1 Präparation des Gewebes

Zur Präparation der Gewebe werden die Embryonen bis zum Erreichen des Stadiums HH10 (ca. 44h) bebrütet. Die Eier werden vorsichtig aufgeschlagen und ihr Inhalt komplett in eine Petrischale überführt. Um den Embryo wird großzügig mit einer Mikroschere die Ventillin Membran aufgeschnitten. Anschließend wird der Embryo mit einer Pinzette in eine silikonbeschichtete Petrischale überführt. Die mit einer 3 mm starken Silikonschicht vorbereitete Petrischale ist mit 1mg/ml Dispase in PC-Medium befüllt. Nachdem der Embryo mit der dorsalen Seite nach unten liegend mit Hilfe von Insektennadeln aufgespannt wird, kann das gewünschte Gewebe mittels Mikroskalpell und geschärften Wolframdrähten präpariert werden. Nach der Freilegung der Gewebe werden diese sofort in 5% FCS in PC-Medium überführt, um die Dispase-Aktivität zu stoppen. Bis zur Einbettung in die Kollagenkissen werden die Gewebestückchen bei 37°C im Brutschrank mit 10% CO₂ in 1x BME mit 10% FCS gelagert.

3.2.6.2 Einbettung der Explantate in Collagenkissen

Zur Einbettung der Explantatgewebe werden 9 mg Rattenschwanz Kollagen in 3 ml 0.2% (v/v) steriler Essigsäure pH 3.0 durch Schütteln ü.N. bei 4°C gelöst. Am Tag der Durchführung des Experimentes werden zu 1 ml dieser Kollagenlösung 125 µl 10 x BME Medium, 62,5 µl hitzeinaktiviertes FCS und 25 µl L-Glutamin [100x] gegeben. Von dieser erhaltenen Stammlösung werden 450 µl mit 50µl 10x BME Medium (inklusive Glutamin und Penicillin/Streptomycin) vermischt und zur Neutralisation mit 50 µl 7.5% (w/v) NaHCO₃ (pH 7.4) versetzt. Durch den pH Sprung beginnt das Kollagen mit einer Konformationsänderung, was zu einer Verfestigung des Kollagenkissens führt. Die Verfestigung läuft in Folge der Inkubation auf Eis nur sehr langsam ab.

5-10 μl der Kollagenlösung werden in die Mitte einer Schale pipettiert, zu einer runden Plattform ausgestrichen und 5 min. im 37°C Brutschrank inkubiert. Die gelierte Kollagenplattform sollte danach opaleszieren. Auf diese Plattform werden die vorbereiteten Explantate positioniert. Das Restmedium wird mit Hilfe einer gezogenen Pasteurpipette abgesogen. Nach dem Hinzufügen von ca. 40 μl weiterer Kollagenlösung werden die Kissen 10 min. im 37°C Brutschrank inkubiert, bis das gesamte Kollagen verfestigt ist, was sich durch eine opaleszierende Färbung erkennen lässt. Nun wird ein Minimum an 1x BME Medium mit 15% FCS inkl. P/S und Glu zugegeben, bis das Kissen gerade so eben bedeckt ist.

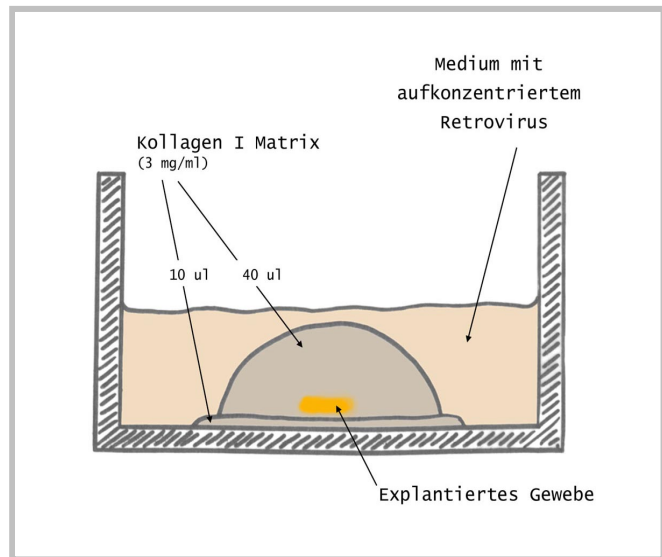


Abbildung 5: Schematische Darstellung einer Kollagen-Gewebe Kultur.

3.2.6.3 Kultur und Virusinfektion der Explantate

Nach erfolgter Einbettung der präparierten Gewebe werden diese in 1x BME Medium mit 15% FCS inkl. P/S und Glu im Brutschrank bei 37°C und 10% CO_2 kultiviert. Je nach Experiment werden die Explantate unterschiedlich lange kultiviert, wobei alle zwei Tage frisches Medium zugesetzt wird.

Ist es experimentell vorgesehen die Explantate mit einem Retrovirus zu infizieren, so werden die Gewebe nachdem sie in PC-Medium mit 5% FCS gewaschen wurden (zur Inaktivierung der Dispase), im Brutschrank in Kulturmedium (1x BME Medium mit 15% FCS inkl. P/S und Glu) zusätzlich mit 40 μl des Virusstocks [ca. 1.0×10^8 IU/ml] gehalten, bevor sie eingebettet werden. Nach erfolgter Einbettung wird dieses Medium inkl. Retrovirus benutzt, um das Kollagenkissen zu überschichten. Nach zwei Tagen wird das virushaltige Medium gegen normales Kulturmedium ausgetauscht.

3.2.6.4 Mitomycin C Behandlung der Explantate

Ist es experimentell erforderlich die in Kultur befindlichen Zellen an ihrer Zellteilung zu hindern, so wird dies durch Behandlung mit Mitomycin C erreicht. Das Mytomycin C verhindert die Neusynthese von DNA, so dass die Zellen nicht mehr proliferieren

können, ohne dass der DNA-Synthese unabhängige Haushaltsstoffwechsel beeinträchtigt wird. Dazu wird das Kulturmedium der Explantate abgesaugt und durch neues Kulturmedium mit Mitomycin C-Zusatz (1x BME Medium mit 15% FCS inkl. P/S und Glu und 10 ng/ml Mitomycin C) ersetzt. Nach Inkubation von 6-8 h wird das Mitomycin C haltige Medium abgesaugt und mehrfach jeweils 5 min. mit normalem Kulturmedium gewaschen, um das Mitomycin C auszuwaschen. Je nach experimenteller Fragestellung wird in normalem Kulturmedium weiter kultiviert, bis die Gewebe der Analyse unterzogen werden.

3.2.6.5 Präparation der gesamten Explantat-RNA

Die Gewebekulturen werden mehrfach mit eiskaltem 1x PBS gewaschen, bevor das Kollagenkissen inkl. der Explantate mit Hilfe einer Pinzette vom Kulturschalenboden abgelöst wird. Durch Inkubation der Kollagenkissen für 5 min. in Kollagenase Lösung (Kollagenasepuffer mit Kollagenase Typ V [1mg/ml]) wird die Kollagenmatrix angedaut. Anschließend werden die Gewebe in 100µl eiskalten Lysispuffer überführt, 30 sek. gevortext und 5 min. auf Eis inkubiert. Es werden 10 µl 2M Na-Acetat pH 4.0 und 120 µl wassergesättigtes Chlorophan hinzupipettiert, 30 sek. gevortext und für 15 min. auf Eis inkubiert. Nach erfolgter Zentrifugation bei 4°C wird der Überstand ohne organische Anteile in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Der proteinfreie Überstand wird nach Zugabe von 1 µl Glycogen [20µg/µl] und 240 µl eiskaltem hochreinem EtOH bei -80°C für 1h präzipitiert. Nach der Zentrifugation wird das sichtbare Pellet mit eiskaltem 80% EtOH gewaschen und an der Luft für ca. 15 min. getrocknet. Zur Hydrolyse der genomischen DNA wird das Pellet in 50 µl DNase Puffer resuspendiert und nach Zusatz von 1 µl RNasefreier RQ Dnase I (Promega) für 1h bei 37°C inkubiert. Nach erneuter Chlorophan-Extraktion wird der wässrige Überstand ohne organische Anteile in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Präzipitation erfolgt bei -80°C nach Zugabe von 1 ml Glycogen [20µg/µl], 1/10 des Volumens 3M Na-Acetat pH 4.0 und 2.5 Volumen eiskalten hochreinem EtOH. Der Zentrifugation anschließend wird das sichtbare Pellet mit 80% eiskalten EtOH gewaschen, an der Luft getrocknet und in 20 µl RNAsin haltigem 1x TE Puffer resuspendiert. Die Konzentration der RNA wird photometrisch bestimmt, bevor sie bei -80°C gelagert wird.

3.2.7 Immunhistochemische Anfärbung

Explantierte Gewebe, ganze Embryonen, in Kultur gehaltene Zellen, Kryoschnitte und Paraffinschnitte von Geweben können mit spezifischen Antikörpern

immunhistochemisch angefärbt werden. Dabei variiert lediglich die Vorbehandlung des Gewebes:

- **OCT-Kryoschnitte:** Die Gewebeschnitte werden 10 min. in 1x PBS gewaschen, bis zur vollständigen Ablösung des Gefriermediums. Anschließend wird das Gewebe in 4 % PFA in 1x PBS fixiert.
- **Paraffinschnitte:** Die Gewebeschnitte werden zweimal für 5 min. in 100 % Xylol gewaschen, bis zur vollständigen Ablösung des Paraffins. Anschließend wird das Gewebe schrittweise in wässriges Medium überführt, indem jeweils für 2 min. in einer EtOH Reihe (100%, 90%, 75%, 50%, 25%) gewaschen wird. Es wird einmal in reinem H₂O und anschließend in 1x PBS gewaschen, bevor in 4% PFA fixiert wird.
- **Kollagen-Gewebe-Kulturen:** Die Kollagenmatrix wird mit 1mg/ml Kollagenase Typ V in 10 mM KCl, 400 mM NaCl und 50 mM TRIS HCl pH 7.5 für 5 min. angedaut, um diese zu permeabilisieren. Anschließend wird das Gewebe Explantat in 4% PFA fixiert.
- **Embryonen:** Die Anfärbung von ganzen Embryonen erfolgt ähnlich wie im Protokoll der Whole-mount RNA in situ Hybridisierung beschrieben, wobei statt einer RNA-Probe ein Antikörper verwendet wird.

Die eigentliche immunhistochemische Anfärbung verläuft bei allen Präparaten gleich. Zunächst wird die endogene Peroxidase-Aktivität durch Inkubation für 30 min. mit 0.5% H₂O₂ in 1x PBS reduziert. Die Absättigung ist beendet wenn sich keine Sauerstoffbläschen mehr bilden. Nach zweimaligen Waschen des Gewebes mit 1 x PBS werden unspezifische Bindungsstellen des Gewebes durch Inkubation für 1h in 2% Pferdeserum, 1% BSA, 0.3% Triton X-100 in 1x PBS abgesättigt. Danach wird mit dem 1. Antikörper, der das spezifische Antigen bindet, in 1% BSA, 0.3% Triton X-100 in 1x PBS entweder 1-2 h bei RT oder bei 4°C ü.N. inkubiert. Der ungebundene 1. Antikörper wird durch zweimaliges Abwaschen in 0.3% BSA, 0.1% Triton X-100 in 1x PBS entfernt. Je nach Organismus, in dem der erste Antikörper produziert wurde, wird nun mit einem gegen den Erstantikörper gerichteten 2. biotinylierten Antikörper in 0.3% BSA, 0.1% Triton X-100 in 1x PBS (Vectastain-Kit: 1 Tropfen des 2.AB auf 30 ml) für 1h bei RT inkubiert. Anschließend wird der ungebundene 2. Antikörper durch mehrmaligen Waschen mit 0.3% BSA, 0.1% Triton X-100 in 1x PBS entfernt. Die Inkubation für 30 min. mit dem ABC-Reagenz (wird 30 min. vor Zugabe angesetzt: 1 Tropfen A und 1 Tropfen in 20 ml 0.3% BSA, 0.1% Triton X-100, 1x PBS) dient zur Ausbildung der Avidin/Peroxidase-Biotin-Komplexe. Die überschüssigen nicht komplexierten Avidin/Peroxidase Komplexe werden durch mehrmaliges Waschen mit 0.3% BSA, 0.1% Triton X-100 in 1x PBS entfernt. Vor der eigentlichen Färbung wird noch dreimal mit 1x BPS gewaschen. Anschließend wird die Substratlösung (in 10 ml 100 mM TRIS HCl pH 7.2 wird eine DAB-Tablette

gelöst, filtriert und mit 5 µl 30% H₂O₂ versetzt) auf das Gewebe gegeben. Die Färbung wird durch mehrmaliges Waschen mit 1x PBS abgestoppt und Behandlung mit 4% PFA in 1x PBS nachfixiert.

3.2.8 Polymerasekettenreaktion PCR

PCR-Anwendungen wurden angelehnt an Protokolle aus den Handbüchern PCR I und PCR II (Taylor et al. 1991; McPherson and Hames 1995). PCR Technologien wurden angewendet zur Generierung von cDNAs, zur Generierung von Restriktionsschnittstellen an cDNA-Enden, zum Nachweis seltener RNA-Transkripte (RT-PCR) und zur gezielten Mutagenese von cDNA-Fragmenten.

3.2.8.1 Primer Design

Das Design von Primer-Paaren ist für die PCR-Reaktion von entscheidender Bedeutung. Dabei wurde im allgemeinen auf folgende Regeln geachtet:

- in Standard-Anwendungen sollten beide Oligonukleotide zwischen 18 und 25 bp lang sein
- beide Oligonukleotide sollten eine möglichst nahe beieinander liegende Schmelztemperatur besitzen. Aus der Schmelztemperatur T_m wird die Annealing-Temperatur T_{an} abgeleitet, die in der Regel ca. 5°C unter der Schmelztemperatur liegt. Als Faustregel gilt:

$$T_{an} = T_m - 5 = 4x (G + C) + 2x (A + T)$$

- am 5'-Ende sollten Primer G/C reich sein
- das letzte Nukleotid am 3'-Ende sollte ein G oder C sein, wobei das 3'-Ende insgesamt eher A/T reich sein sollte

Bei PCR-Anwendungen mit bekannter Nukleotidsequenz wurde häufig das Programm „Primer-Select“ von DNA-Star Lasergene 99 zur Selektion von Primerpaaren eingesetzt.

3.2.8.2 Standard PCR

PCR-Reaktionen wurden in der Regel in 200µl Eppendorfgefäße in einem Thermocycler der Firma Eppendorf durchgeführt. Dabei wurden je nach Anwendung, entweder Nachweis von

100 ng	DNA-Matrize
10 µl	PCR Puffer [10x]
20 µl	Q-Solution (Firma Qiagen)
8µl	dNTPs [2.5mM]
0.25 µl	Taq-Polymerase [5u/µl]
50 nmol	spezifische Primer
ad	bidest. H ₂ O
100µl	Gesamtvolumen

RNA Transkripten (25µl) oder zur Amplifizierung zwecks Subklonierung (100 µl) verschiedene Reaktionsvolumen gewählt. Ein Standard PCR im 100 µl Ansatz entsprach in der Regel dem nebenstehenden Pipettierschema:

3.2.8.3 RT-PCR

Die RT-PCR ist eine Technik mit der sich spezifische Transkripte mit sehr hoher Sensitivität nachweisen lassen. Sie lässt sich in zwei Schritte unterteilen. Zunächst wird die präparierte RNA von Zellen, Geweben oder ganzen Embryonen mittels Reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Durch Zugabe von spezifischen Oligonukleotiden zum PCR Ansatz wird im zweiten Schritt die jeweilige cDNA amplifiziert und anghewiesen.

3.2.8.3.1 Reverse Transkription

Da die Quantität von den Explantaten präparierten Gesamt-RNA (total RNA) lediglich im Bereich von 50-100ng lag, wurde das für geringe RNA Mengen konzipierte SensiScript-System (Qiagen) verwendet. Der nebenstehende Ansatz wird für 30 min. bei 37°C und 30 min. bei 42°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Reverse

50 ng	total RNA
6 µl	RT Puffer [5x]
3 µl	DTT (Firma Qiagen)
1 µl	Randon Primer [250ng/µl]
1 µl	Oligo dT [250ng/µl]
4 µl	dNTPs [2.5mM]
0.5 µl	RNAsin [40u/µl]
1 µl	SensiScript [5u/µl]
ad	bideest. H ₂ O
30µl	Gesamtvolumen

Transkriptase wird die Reaktion anschließend für 5 min. bei 93°C inkubiert.

3.2.8.3.2 Reverse Transkription anschließende PCR

Die anschließende PCR zum Nachweis einzelner Transkripte wird wie eine Standard PCR durchgeführt, wobei 5 µl (von 30µl) aus der Reversen Transkription als DNA-Matrize eingesetzt werden. Die spezifischen Primerpaare wurden so gewählt, dass man PCR Produkte mit einer Länge von 100 - 500 bp erhält. Dabei ist es möglich Multiplex PCRs (Zugabe von mehreren spezifischen Primerpaaren zum Nachweis verschiedener Transkripte in einer Reaktion) durchzuführen, wenn gewährleistet ist, dass die Primer nicht gegeneinander oder intern hybridisieren und die PCR Produkte unterschiedlich groß sind.

3.2.8.4 Radioaktive PCR

Wenn ein Gen nur sehr schwach oder nur in wenigen Zellen transkribiert ist, so dass es in einer RT-PCR Reaktion kaum nachweisbar ist, kann die Zugabe von $1\mu\text{Ci}$ [α - ^{32}P] dCTP zum PCR Ansatz die Empfindlichkeit des Nachweises deutlich erhöhen. Nach erfolgter PCR Durchführung wird diese anschließend in einem hochauflösenden denaturierenden Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Polyacrylamid-Gel wird fixiert, auf Whatman-Papier überführt, getrocknet und ü.N. bei -80°C exponiert.

3.2.8.5 PCR-Mutagenese

Zur Einführung einer spezifischen Punktmutation in eine cDNA bietet die PCR Methodik mehrere Möglichkeiten.

Wie in Abbildung 6 dargestellt, besteht die Mutagenese aus drei PCR Reaktionen. Dabei werden zunächst zwei Subfragmente mit der gewünschten Punktmutation amplifiziert, welche anschließend miteinander verknüpft werden. Bei der Wahl der

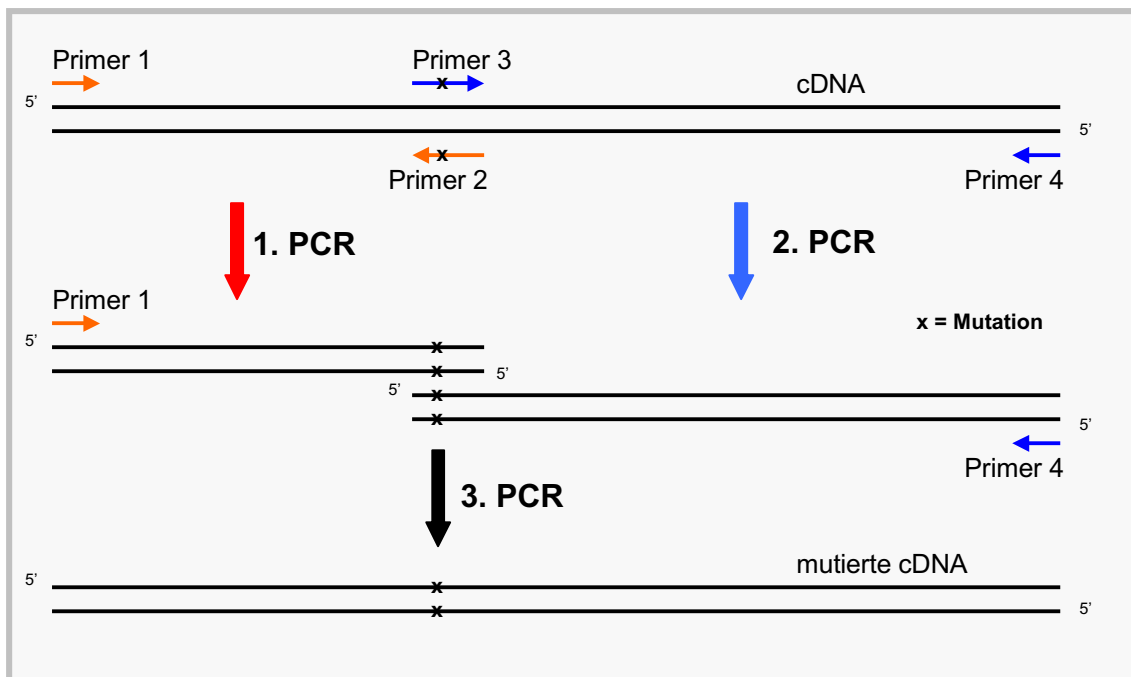


Abbildung 6: Schematische Darstellung der PCR vermittelten Mutagenese

Primer empfiehlt es sich folgende Aspekte zu beachten:

- Die Primer 2 und Primer 3 sollten vollständig überlappen (mindestens aber 20-25 bp).
- Die gewünschte Mutation sollte in Primer 2 und in Primer 3 nach Möglichkeit in der Mitte angeordnet sein.

- Ein entscheidender Punkt ist für das Gelingen der 3. PCR essentiell: Die Primer 2 und Primer 3 sollten so gewählt werden, dass sich auf ihrem DNA Strang, ihren 5'-Enden flussaufwärts liegend, die Base T befindet.
- Wenn es die Wildtypsequenz erlaubt, kann eine zweite Mutation eingefügt werden, ohne die Proteinsequenz zu verändern (die meisten Aminosäuren werden durch verschiedene Tripletts kodiert), um eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle zu generieren. Diese erlaubt es, die mutierte cDNA einfach von der Wildtypform zu unterscheiden.
- Die 3. PCR wird zunächst 3 Zyklen ohne die Primer 1 und Primer 4 durchgeführt, um die Extension der Subfragmente untereinander zu gewährleisten.

3.2.8.6 PCR-Klonierung

Die PCR Technologie bietet sich ebenfalls an, Klonierungsstrategien zu erleichtern. In dieser Arbeit wurde mehrfach die PCR genutzt, um an den Enden von DNA-Fragmenten zusätzliche Sequenzen (Kozak-Sequenz und Restriktionsschnittstellen) zu generieren.

Zur Klonierung einer vollständigen cDNA wurden Cla1 Schnittstellen und die Kozak-Sequenz an deren Enden generiert. Anschließend wurde diese über Cla1 Schnittstellen in das retrovirale Vektorplasmid pRCASBP(A) inkloniert. Die Wahl der modifizierenden Primer wurde wie folgt getroffen:

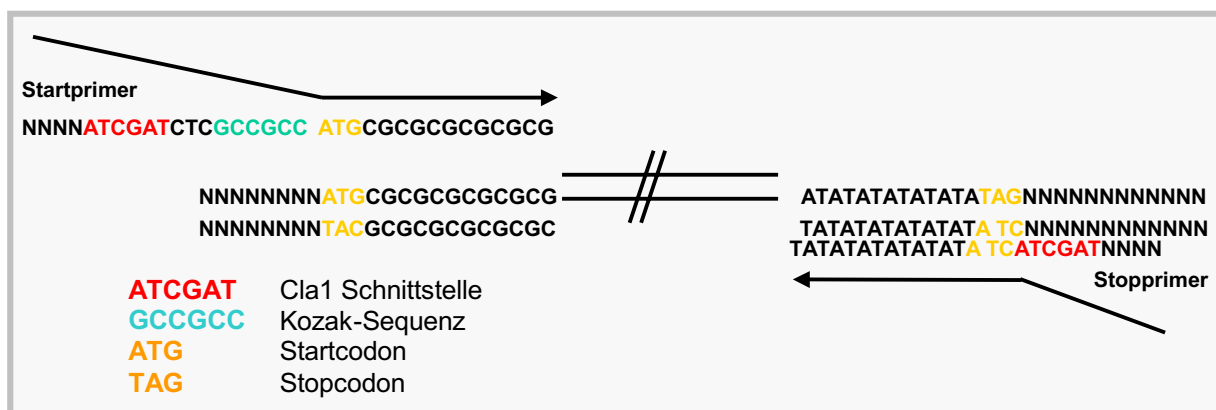


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Primerdesigns zur Generierung modifizierter cDNA-Enden.

Das erhaltene PCR-Produkt wurde in den pGEM-T Vektor (Promega) subkloniert, über einen Cla1 Restriktionsverdau isoliert und in den pRCASBP(A) Vektor inkloniert. Auf diese Weise können die Enden von DNA-Fragmenten nahezu beliebig modifiziert werden.

3.2.9 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation wird eingesetzt zur selektiven Präzipitation eines Proteins aus einem komplexen Proteingemisch durch Zugabe eines spezifisch bindenden Antikörpers. Wenn kein spezifischer Antikörper gegen das zu untersuchende Protein vorhanden ist, gibt es die Möglichkeit mit Expressionsvektoren zu arbeiten, welche die Sequenz für ein zusätzliches Antigen einführen. Das zu exprimierende cDNA-Fragment wird im korrekten Leseraster an die antigencodierende Sequenz kloniert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die cDNA des zu untersuchenden Proteins so kloniert, dass nach der Translation ein Fusionsprotein mit 111 zusätzlichen Aminosäuren am NH₂-Terminus erhalten wurde. Codierend für diese 111 AS ist die sechsfache Sequenz des „myc-tag“ Epitopes, wogegen ein monoklonaler Antikörper existiert, welcher aus Hybridoma-Zellen gewonnen wird.

3.2.9.1 Darstellung des Myc 1-9E10.2 Antikörpers

Der Hybridoma Zellstock ATCC CRL-1729 (**A**merican **T**ype **C**ulture **C**ollection) für die Darstellung des monoklonalen Antikörpers Myc 1-9E10.2 wird im Medium (1xDMEM/10% FCS) bei 37°C mit 5% CO₂-Gehalt im Brutschrank kultiviert. Nach 24 Stunden wird ein Mediumwechsel durchgeführt und für weitere fünf Tage im Brutschrank inkubiert. Der Kulturüberstand wird abgezogen und die restlichen Zellen abzentrifugiert. Der nun im Kulturüberstand enthaltene Antikörper kann unter Umständen direkt für weitere Experimente eingesetzt oder durch eine Ammoniumsulfat-Fällung und chromatographische Methoden konzentriert bzw. aufgereinigt werden. Der Antikörper wird bei 4°C gelagert.

3.2.9.2 In vitro Translation

Die gekoppelte in-vitro-Transkription und Translation ermöglicht die Herstellung von Proteinen von einer klonierten cDNA. Hierzu bedarf es der Klonierung der cDNA in spezielle Expressionsvektoren. Während dieser Arbeit wurde ein Kaninchen Reticulocyten Lysate System (TnT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System, Promega) verwendet. Aus Reticulocyten, d.h. unreifen Erythrocyten wurde der Zellextrakt gewonnen und zur zellfreien Synthese von

25 µl	TnT Reticulocyten Lysat
2 µl	TnT Puffer
1 µl	RNasin [39U/µl]
1 µl	AAM (-Met) [1mM]
1 µl	Met [1mM]
1 µl	lin. DNA Template [1µg/µl]
ad	bidest. H ₂ O
1 µl	RNA-Polymerase
50 µl	Gesamtvolumen

Proteinen verwendet.

Für die Transkription muss das Konstrukt in linearisierter Form vorliegen. Die benutzten Vektoren besitzen hierfür Erkennungssequenzen für selten schneidene Restriktionsenzyme im Polylinker am 3'-Ende der cDNA.

Nach photometrischer Konzentrationsbestimmung der linearisierten DNA wird nebenstehender Ansatz zusammenpipettiert. Die Reaktion wird je nach benötigter RNA-Polymerase (T3, T7 oder SP6) für 90 bzw. 120 min. bei 30°C inkubiert. Die Lagerung der translatierten Proteine erfolgt bei -20°C.

3.2.9.3 Immunpräzipitation der in vitro translatierten Proteine

Zur Überprüfung der Translation des Fusionsproteins bzw. der Präzipitation mit dem myc-Antikörper wird die Translation des Fusionproteins in Gegenwart von radioaktiv markierten α [³⁵S] Methionin durchgeführt. Bei der Präzipitation wird die Unlöslichkeit eines sich bildenden Immun-Komplexes, bestehend aus Protein und monoklonalen Antikörper, welcher an Protein A Sepharose-„Beads“ (Pharmacia) bindet, ausgenutzt. Die 50 μ l eines Translationsansatzes werden aufgeteilt in verschiedene Reaktionen (Positivkontrolle, Negativkontrolle und Immunpräzipitation):

- 5 μ l als Positivkontrolle der Translationsreinheit
- 20 μ l als Negativkontrolle Präzipitation mit pre-Immunsersum
- 25 μ l zur Immunpräzipitation mit monoklonalen anti-myc Antikörper

Die Protein A Sepharose-Beads werden durch dreimaliges Waschen mit Puffer A equilibriert und im Volumenverhältnis von 1:1 mit Puffer A versetzt. Die Präinkubation (nebenstehender Ansatz) mit Non-Immunsersum, für 30min. bei 4°C auf dem Drehrad, sättigt unspezifische Bindungsstellen ab.

Bei der Präzipitation wird dem Überstand des Präinkubationsansatzes 10 μ l Antikörper bzw. in

der Kontrolle 2 μ l Non-Immunsersum zugesetzt. Die Proben werden 30 min. bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 35 μ l Protein A Sepharose-Beads werden die Proben bei 4°C ü.N. auf dem Drehrad inkubiert. Die Sepharose-Beads werden 3x mit Puffer A, 2x Puffer B und einmal mit Puffer C gewaschen und abschließend in 25 μ l 2x Auftrags-Puffer aufgenommen. Die 5 μ l der Translationskontrolle werden mit 5 μ l 2x Auftrags-Puffer versetzt. Vor dem Auftragen, auf ein denaturierendes 12% Polyacrylamid-Proteingel, werden die Proben für 5 min. bei 95°C aufgeköcht. Nach der elektrophoretischen Trennung wird das Proteingel 30 min. in 40% MeOH / 10%

25 μ l	Translationsreaktion
bzw.	in Negativkontrolle
20 μ l	Translationsreaktion
25 μ l	Solubilisationspuffer
1 μ l	Non-Immunsersum
35 μ l	Protein A Sepharose
86 μl	Gesamtvolumen
bzw.	in Negativkontrolle
81 μl	Gesamtvolumen

CH₃COOH-Lösung fixiert, 30 min gewässert und 30 min. in 1M Na-Salicylat-Lösung inkubiert. Nach dem Trocknen wird das Gel über Nacht bei -80°C exponiert.

3.2.10 Gel-Retentionsanalyse (EMSA)

Die Gel-Retentionsanalyse (EMSA - Electrophoretic Mobility Shift Assay) beschreibt ein elektrophoretisches Untersuchungsverfahren, in dem die Interaktion zwischen DNA-bindenden Proteinen und einem DNA-Molekül mit einer für das betreffende Protein spezifischen Bindungsstelle analysiert wird. Protein-DNA-Komplexe wandern unter nicht-denaturierenden Bedingungen, bei der Verwendung von Puffern niedriger Ionenstärke, in die Gelmatrix eines Polyacrylamidgels hinein und bleiben, ohne zu dissoziieren, während der Elektrophorese als Komplexe erhalten.

Das Prinzip der Retentionsanalyse beruht auf den unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten von proteinfreien DNA Fragmenten und Protein-DNA-Komplexen. Durch radioaktive Markierung des DNA Fragments wird bei einer Komplex-Bildung das gebundene Protein indirekt durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

3.2.10.1 Radioaktive Markierung eines doppelsträngigen Oligonukleotids

Die komplementären Oligonukleotide wurden so synthetisiert, dass nach der Hybridisierung an den 5'-Enden jeweils zwei Guanine überhängen. Der Hybridisierungs-Ansatz wird 2 min. aufgekocht, 15 min. bei 65°C inkubiert und innerhalb von 40 min. auf RT abgekühlt und weitere 30 min. bei RT inkubiert.

1 µl	Oligo 1 [1µg/µl]
1 µl	Oligo 2 [1µg/µl]
1 µl	Annealing Puffer [10x]
7 µl	bidest. H ₂ O
10µl	Gesamtvolumen

Die radioaktive Markierung wird durch Auffüllung der 5'-überhängenden Enden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I in Gegenwart von radioaktivem α[³²P]-dCTP durchgeführt.

Dem Reaktionsansatz werden 2U Klenow-Enzym zugesetzt und anschließend 20 min. bei RT inkubiert. Um glatte Enden zu erhalten, werden anschließend zusätzlich 2 µl dCTP [2.5 mM] hinzupipettiert und 5 weitere Minuten inkubiert. Die Reaktion wird

1 µl	ds Oligo [100ng/µl]
2 µl	Klenow Puffer [10x]
4 µl	dNTPs (ohne dCTP) [2.5 mM]
5 µl	α[³² P]-dCTP [3 kCi/mmol]
1 µl	Klenow [2U/µl]
ad	bidest. H ₂ O
20 µl	Gesamtvolumen

durch Zugabe von 1 µl EDTA [0.5M] gestoppt und bei -20°C gelagert. Zur Abtrennung der nicht eingebauten radioaktiven Nukleotide und zur Reinigung des doppelsträngigen Oligonukleotids wird die Probe auf Sephadex G-25 Nap-5-Säulen (Pharmacia) aufgetragen und mit Na-Phosphat-Puffer [10mM] pH 6.8 eluiert.

Das für die Retentionsanalyse verwendete Fusionsprotein wird in Kaninchen Reticulocyten Lysaten in vitro translatiert.

3.2.10.2 Gel-Retentionsanalyse

Zunächst wird das in vitro translatierten Protein gegen unspezifische Bindungen an doppelsträngige DNA abgesättigt - durch Präinkubation mit dem Kompetitor poly dI/dC oder Heringsspermium DNA. Die Ansätze werden auf Eis pipettiert und 5 min. präinkubiert.

12.5 µl	Interaktions-Puffer [2x]
1 µl	Kompetitor [100ng/µl]
10 µl	in vitro translatiertes Protein
ad	bidest. H ₂ O
25 µl	Gesamtvolumen

Nach der Zugabe der radioaktiv markierten Oligonukleotide (40.000 cpm\Ansatz) und weiterer 20 minütiger Inkubation auf Eis werden die Reaktionsansätze über ein nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel (5%) elektrophoretisch aufgetrennt. Abschließend wird das Gel für 20 min. in 10% Essigsäure fixiert, getrocknet und über Nacht bei -80°C exponiert.

Je nach der Art der zu untersuchenden DNA-Proteininteraktionen wird die Konzentration der Ionen im Puffer während der Bindungsreaktion variiert.

3.2.11 CAT-Assay (Chloramphenicol-Acetyl-Tranferase Reaktion)

Die im Zellkern bzw. Cytoplasma stattfindenden regulatorischen Prozesse der Genexpression sind folgende: Regulation der Transkription, „Processing“ vom mRNA, Translation und post-translationale Modifikation sowie der Transport der Proteine. Hierbei ist der erste Schritt die Regulation der Transkription.

Die Hauptakteure der differentiellen Genexpression sind zum einen die Transkriptionsfaktoren und zum anderen die Erkennungssequenzen dieser Proteine auf der DNA. Transkriptionsfaktoren bestehen im allgemeinen aus zwei verschiedenen Domänen: aus einem DNA-bindenden Teil und einem Aktivator- bzw. Repressor-Teil, der den positiven oder negativen Effekt auf den Transkriptionsapparat ausübt.

Die Analyse der Regulation der Genexpression zielt auf die Identifizierung wichtiger Kontrollelemente des zu untersuchenden regulierten Promotors ab, sowie auf die Faktoren, die an den Strukturelementen dieses Promotors binden und transaktivierend bzw. trans-reprimierend auf das betreffende Gen wirken. Der Nachweis der Promotorelemente, als auch der zellspezifisch benötigten Transkriptionsfaktoren, kann mit Hilfe von DNA-Transfektionsexperimenten an Zellen in Kultur erfolgen. Bei diesen Untersuchungen werden Kontrollelemente (DNA-Bindungsstellen) isoliert und an ein Reporter-gen anstatt des authentischen Gens gekoppelt.

Um zu überprüfen, ob zwei Proteine interagieren und wie effizient spezifische Zielgene direkt transaktiviert werden können, werden Fibroblasten in Kultur mit entsprechenden Plasmiden transfiziert. Das verwendete Reporter-gen verfügt über einen Promotor mit spezifischen DNA Bindungssequenzen, der die Expression des Gens für das bakterielle Enzym Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT) kontrolliert. Der Nachweis der Enzymaktivität ist ein Indikator für die von Proteinen vermittelten Transaktivierung.

3.2.11.1 Kotransfektion

Wenn Expressionskonstrukte, die für einen Transkriptionsfaktor und dessen Cofaktoren codieren, mit einem entsprechenden Promotor-Reporter-Konstrukt in Zellen cotransfiziert wird, lässt sich die transkriptionelle Aktivität bzw. Repression der exprimierten Proteine messen.

In der Cotransfektion werden 20 µg Plasmid-DNA mit Hilfe der Calciumphosphat-Präzipitation in Maus Fibroblasten Zellen transfiziert. Dabei setzen sich je nach Experiment die 20 µg DNA anteilig aus einem Expressionskonstrukten für den Transkriptionsfaktor und dessen Cofaktor und einem Promotor-Reporter-Konstrukt zusammen.

3.2.11.2 Abernten und Lyse der Zellen

Das Medium wird vorsichtig abgesaugt und die Zellen werden zwei Mal mit 5 ml eiskaltem 1x PBS Puffer gewaschen. Nach weiterer Zugabe von 1.4 ml 1x PBS Puffer werden die Zellen mit einem Zellkratzer von der Platte abgelöst, in ein Eppendorfgefäß überführt und auf Eis gehalten. Die Zellsuspension wird 2 min. bei 10000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment in 100 µl 0.25M Tris pH 7.5 resuspendiert. Die Zellsuspension kann bei -20°C gelagert werden.

Die Lysis der Zellen erfolgt mechanisch durch wiederholtes Einfrieren auf Trockeneis und Auftauen im 37°C Heizblock und anschließendem Vortexen. Abschließend werden die lysierten Zellen 10 min. bei 14.000 x g in der Zentrifuge sedimentiert. Der Überstand (Proteinextrakt) wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

3.2.11.3 β-Galaktosidase Reaktion

Der β-Galaktosidase Test ist ein enzymatischer Nachweis, der die Bestimmung der Transfektionseffizienz ermöglicht. Die Zellen werden mit einem internen Standard cotransfiziert, der aus einem konstitutiv β-Galaktosidase exprimierenden Vektor (pRSV-β-Gal) besteht. Die enzymatische Aktivität des im Cytosol exprimierten

Proteins kann nun im Proteinextrakt der Zellen nach Zugabe eines geeigneten Substrates durch photometrische Messung nachgewiesen werden. Da die Konzentration des Enzyms im Proteinextrakt proportional zur transfizierten DNA-Menge ist, können die einzelnen Transfektionen untereinander abgeglichen werden. Das Volumen von Zellextrakt, das für weitere Versuche (CAT Reaktion) pipettiert wird, ist deshalb umgekehrt proportional zur Transfektionseffizienz.

Die direkte Messung der β -Galaktosidase Konzentration im Proteinextrakt ist nicht möglich – stattdessen wird die Aktivität über die enzymatische Spaltung eines Substrates (Chlorphenolrot- β -D-Galaktopyranosid CPRG) bestimmt. Es erfolgt ein Farbumschlag von gelb nach rot, der photometrisch quantitativ erfassbar ist. Die OD_{574} ist proportional zur β -Galaktosidase Konzentration. Dazu werden 20 μ l des Proteinextraktes werden mit 70 μ l Z-Puffer versetzt. Zusätzlich wird parallel ein Kontrollansatz ohne Proteinextrakt vorbereitet. Es werden jeweils 10 μ l CPRG zugesetzt und bei 37°C inkubiert, bis ein Farbumschlag zu sehen ist (bei effizienten Transfektionen nach ca. 2-3 min.). Die Reaktion wird durch Zugabe von 900 μ l 1M Na_2CO_3 Lösung terminiert. Die OD_{574} der Suspension wird gegen den Kontrollansatz bestimmt.

3.2.11.4 CAT-Reaktion

Die CAT Reaktion ermöglicht die Bestimmung der CAT-Aktivität in Proteinextrakten aus mit dem CAT-Reporter-Konstrukt transfizierten Zellen. Das Enzym acetyliert das Substrat Chloramphenicol unter Zugabe von Acetyl CoA zur mono- und triacetylierten Form. Die acetylierten Produkte werden von dem nicht acetylierten Chloramphenicol durch Anwendung von Dünnschichtchromatographie getrennt. Durch die Verwendung von radioaktiv markiertem [^{14}C]-Chloramphenicol als Substrat kann das Ergebnis autoradiographisch sichtbar gemacht werden. Eine hohe Umsatzrate des Chloramphenicol entspricht einer hohen Expression des Reporter-Gens (CAT).

Die Menge an Proteinextrakt, die für die Reaktion eingesetzt wird, errechnet sich nach den Ergebnissen des β -Galaktosidase Versuchs. Das entsprechende Volumen an Proteinextrakt wird in ein Eppendorfgefäß vorgelegt und mit 0.25M Tris pH 7.5 auf ein Gesamtvolumen von 60 μ l gebracht. Nach Zugabe von 10 μ l Acetyl CoA und 2 μ l [^{14}C]-Chloramphenicol werden die Ansätze gut durchmischt und 1-2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zusetzen von 500 μ l Ethylacetat terminiert. Anschließend werden die Proben durch Schütteln mit Ethylacetat extrahiert, d.h. das Chloramphenicol und seine acetylierten Derivate gehen quantitativ in die organische Phase des Ethylacetats über. Nach 10 minütiger Zentrifugation wird die organische

Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt und anschließend lyophilisiert. Das Lyophilisat wird in 15 µl Ethylacetat gelöst und auf eine mit Kieselgel (SiO₂) beschichtete Dünnschichtchromatographie-Platte aufgetragen. Die Dünnschichtchromatographie wird für eine Stunde in einem abgeschlossenen Gefäß mit einem Methanol / Chloroform Gemisch (Verhältnis 1:19) als Laufmittel durchgeführt. Abschließend wird die Platte 10 min. an der Luft getrocknet und bei RT über Nacht exponiert.

4 Ergebnisse

4.1 Klonierung des Hühnchenhomologs des Transkriptionsfaktors Lbx1

Die Entwicklung der Extremitätenmuskulatur bietet ein exzellentes System zur Untersuchung der Determinierung und Migration hypaxialer Muskelvorläuferzellen, sowie deren Differenzierung in der sich entwickelnden Extremität. Die Migration der hypaxialen Muskelvorläuferzellen wird u.a. durch die Expression des Gens *Lbx1* markiert, welches ein Orthologes zu den *Drosophila lady bird* (Jagla et al. 1997a; Jagla et al. 1998) Genen ist. Zur Nutzung des Modellsystems des Hühnchens, das weitgehende Manipulationen in ovo erlaubt, sollte das Hühnchenhomolog des Gens *Lbx1* kloniert und zur Funktion in der Muskelentwicklung untersucht werden.

In unserer Arbeitsgruppe wurde parallel das *Mus musculus* Homolog des Homöobox Gens *Lbx1* untersucht, so dass bereits ein Fragment der Maus cDNA subkloniert vorlag. Das cDNA Fragment stammte aus dem zweiten Exon des genomischen Klons, beinhaltete die gesamte Homöodomäne (180 bp) und hatte eine Länge von 680 Basenpaaren.

4.1.1 Durchsuchen einer cDNA Bank

Das 680 Basenpaare umfassende Fragment der *Lbx1* cDNA wurde mittels Restriktionsverdau, elektrophoretischer Auftrennung und Elektroelution isoliert. Nach radioaktiver Markierung durch α [³²P]-dCTP mit dem Klenow-Fragment wurde das cDNA Fragment als Sonde zum Durchsuchen einer Hühnchen cDNA Bank benutzt. Die aus Extremitätengewebe hergestellte Lambda-Phagen cDNA Bank wurde von Clontech bezogen. Die mittlere Fragmentgröße betrug laut Hersteller 0.9 bis 4.5 kb, wobei die cDNAs über *EcoRI* in die Phagenarme inkloniert waren. Das Durchsuchen der cDNA Bank wurde nach Standardmethoden durchgeführt (Sambrook et al. 1989).

Nach der ersten Runde der Hybridisierung wurden 30 unterschiedlich stark positiv reagierende Klone identifiziert, von denen 20 bei -80°C kryokonserviert wurden. Die restlichen 10 Klone wurden zur Isolierung der cDNAs in 2. und 3. Runde hybridisiert. Am Ende wurden 7 der ursprünglich 10 Klone isoliert. Die Konstruktion der Lambda-Phagen cDNA Bank erlaubte es, die einzelnen Phagenklone in vivo in einzelne Plasmidklone (pBS) zu überführen (in vivo excision). Abschließend wurden die 7 Plasmidklone *EcoRI* verdaut und einer Southern-Blot Analyse unterzogen, um die Identität der cDNA-Klone zu bestätigen.

4.1.2 Sequenzanalyse der Hühnchen *Lbx1* cDNA

Die Sequenzanalyse der sieben cDNA-Klone ergab folgendes: Die Klone #6 und #7 trugen die gesamte cDNA des Hühnchenhomologes *Lbx1*. Der Klon #3 enthielt ein Fragment eines Homöobox Gens der *Hox* Genfamilie. Die restlichen vier Klone trugen nur Subfragmente der Hühnchen *Lbx1* cDNA, die zum Teil an andere RNA Sequenzen fusioniert waren. Die Sequenzanalyse der kompletten *Lbx1* cDNA mittels der Sanger-Methode ergab folgende Basenabfolge:

```
CCCCCCCCTCCCGACGTGGCCGCGGCCGGACCCGGAGCTGCGCTTCAACTTTTGGCTCGCCGCTCCCGGAG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGGGGGGGAGGGGGCTGCACCGGCGCCGGCTGGGCCTCGACGCGAAGTTGAAAACGAGCGGCGGAGGGGCTC      72 bp
Startcodon

CTCTTCTCCCGCGGCAGCGCATCCCCGGAGCGGGTGGGGAAGGCAGCCCCGCGCCGCCCGGCCACCATG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAGAAGAGGGGCGCCGTCGCGTAGGGGCCTCGCCACCCCTTCGGTCTGGGGCGCGGCGGGCGGGGTGGTAC      144 bp
M

ACTTCAAAGAAGAAGCCAAGCCTTCTCGGGGAAGAACGACGGAGGAGCCCTTTGGATCACCTCCCGCCT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGAAGTTTCTTTCTTCGGTTCGGAAGGAGCCCTTCTTGTGCTCCTCTCGGAAACCTAGTGGAGGGCGGA
T S K E E A K P S S G E E R R R S P L D H L P P      216 bp

CCGGTAACTCCAACAACCCTCACCCCTTTCAGCATCGAGGACATCCTCAACAAGCCGTCGGTGCGGAGG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGCCGATTGAGGTTGTTTGGGAGTGGGAAAGTCGTAGCTCCTGTAGGAGTTGTTTCGGCAGCCACGCCTCC
P A N S N K P L T P F S I E D I L N K P S V R R      288 bp

AGTTACGCGCTGTGCGGGACGGCCACCTGCTGTCCGCCCGGAGAAGCACCCCGCGCCGGGCTGCCGCTG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCAATGCGCGACACGCCCTGCCGGGTGGACGACAGCGCGGCGCTCTTCGTGGGGCGCCGGCCGACGGCGAC
S Y A L C G T A H L L S A A E K H P A A G L P L      360 bp

TCGGGCCGGGCGCTGCTCTCGCAGACGTCGCCGCTGTGCGCCCTGGAGGAGCTGGCCAGCAAAACCTTCAAG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGCCCGGCCGCGACGAGAGCGTCTGCAGCGGCGACACGCGGACCTCCTCGACCGGTCTTTTGAAGTTTC
S G R A L L S Q T S P L C A L E E L A S K T F K      432 bp

GGGCTGGAAGTCAGCGTGTGCAGGCGGCCGAAGGAAGGGACGGGATGACGATCTTCGGGCAGCGGCAGACG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCCGACCTTCAGTCGCACGACGTCGCCGGCTTCTTCCCTGCCCTACTGCTAGAAGCCCGTCGCCGTCTGC
G L E V S V L Q A A E G R D G M T I F G Q R Q T      504 bp

CCGAAGAAGCGTCGGAAGTCTCGGACGGCTTACCAACCACCAGATCTACGAGCTGGAGAAGCGTTTCTCTC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGCTTCTTCGACGCTTTCAGAGCTGCCGGAAGTGGTTGGTGGTCTAGATGCTCGACCTCTTCGCAAAGGAG
P K K R R K S R T A F T N H Q I Y E L E K R F L      576 bp
Homöodomäne

TACCAAAAATACCTGTGCCGGCGGACCCGGGACCCAGATCGCCCAGCAGCTGGGGCTACCAACGCCAGGTC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATGGTTTTTATGGACAGCGCCGCTGGCCCTGGTCTAGCGGTCGTCGACCCGAGTGGTTGCGGGTCCAG
Y Q K Y L S P A D R D Q I A Q Q L G L T N A Q V      648 bp
```



Abbildung 8: cDNA-Sequenz des Hühnchen *Lbx1* Homöoboxgens. Die Aminosäuren der kodierenden Region (818 bp) sind eingezeichnet. Das Startkodon (ATG – Position 142) und das Stopkodon (TGA – Position 1058) sind rot gekennzeichnet. Die 180 bp bzw. 60 Aminosäuren umfassende Homöodomäne (Position 514 – 693) ist grau unterlegt dargestellt. Die cDNA kodiert für ein 272 Aminosäuren umfassendes, 29.954 kD schweres Protein.

4.1.2.1 Vergleich der Aminosäuresequenzen der orthologen *lady bird* Gene

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der Homöodomänen der bekannten *Lbx1* Orthologen zeigt eine sehr hohe Konservierung über verschiedene Spezies hinweg. Dabei fällt auf, dass bei Vergleich der Aminosäuresequenzen die Homöodomänen vom Hühnchen *Lbx1* (Mennerich et al. 1998) und Maus *Lbx1* (Jagla et al. 1995) zu 100% homolog sind. Auch die Sequenz des humanen *Lbx1* (Jagla et al. 1995) zeigt

mit nur einem konservativen Austausch der AS 59 von Asp zu Glu noch sehr hohe Homologie (98,4%) zum Hühnchen *Lbx1*. Die in *Drosophila melanogaster* zuerst klonierten Ladybird Gene *Lbl* und *Lbe* (Jagla et al. 1994; Jagla et al. 1997b) zeigen lediglich eine Sequenzhomologie von 86,9% zum Hühnchen *Lbx1*, wobei die Homologie dieser Gene untereinander 91,8% beträgt. Das erst kürzlich beschriebene Maus *Lbx2* (Chen et al. 1999) zeigt mit 72,1% die geringste Sequenzhomologie zum Hühnchen *Lbx1*.

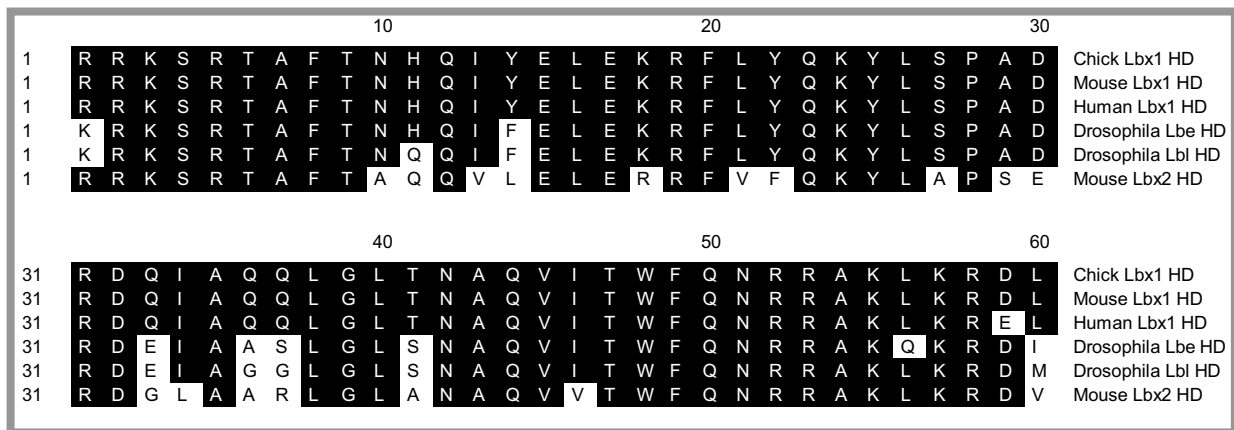


Abbildung 9: Aminosäuresequenzvergleich der Homöodomänen von Orthologen *Lbx* Genen.

Der Aminosäuresequenzvergleich der gesamten codierenden Region dieser Gene zeigt, dass das Hühnchen *Lbx1* Gen die höchste Homologie zu den Vertebraten Orthologen aufweist, zum humanen *Lbx1* 66,3% und zum Maus *Lbx1* zu 67,8%. Dabei besitzen das humane *Lbx1* und das Maus *Lbx1* mit 94,6% die höchste Homologie zum Hühnchen *Lbx1*.

Die Erstellung des phylogenetischen Stammbaums spiegelt diese Homologien wieder. Es wird sichtbar, dass das Mouse *Lbx2* Gen im Sequenzvergleich weder den Vertebraten *Lbx1* Genen, noch den *Drosophila Ladybird* Genen zuzuordnen ist.

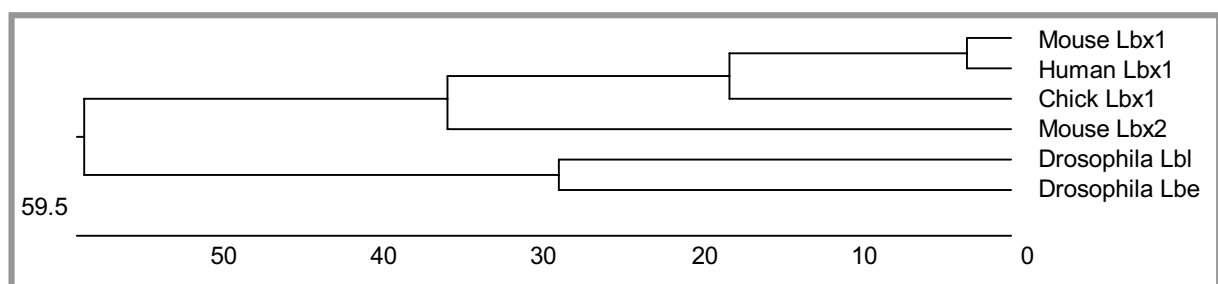


Abbildung 10: Phylogenetischer Stammbaum von Genen der ladybird-Familie. (Erstellt mit dem MegAlign Aufsatz des Programmes DNASTAR, Lasergene)

4.2 Expressionsanalyse des Homöobox Gens *Lbx1*

Zur Analyse des räumlichen und zeitlichen Musters der Genexpression wurden mittels Whole-mount in situ Hybridisierung die *Lbx1* RNA-Transkripte detektiert.

4.2.1 Hamburger Hamilton Stadium 14 (HH14)

Die *Lbx1* Transkription startet im sich entwickelnden Hühnchenembryo im Hamburger-Hamilton-Stadium 14 (22 Somiten).

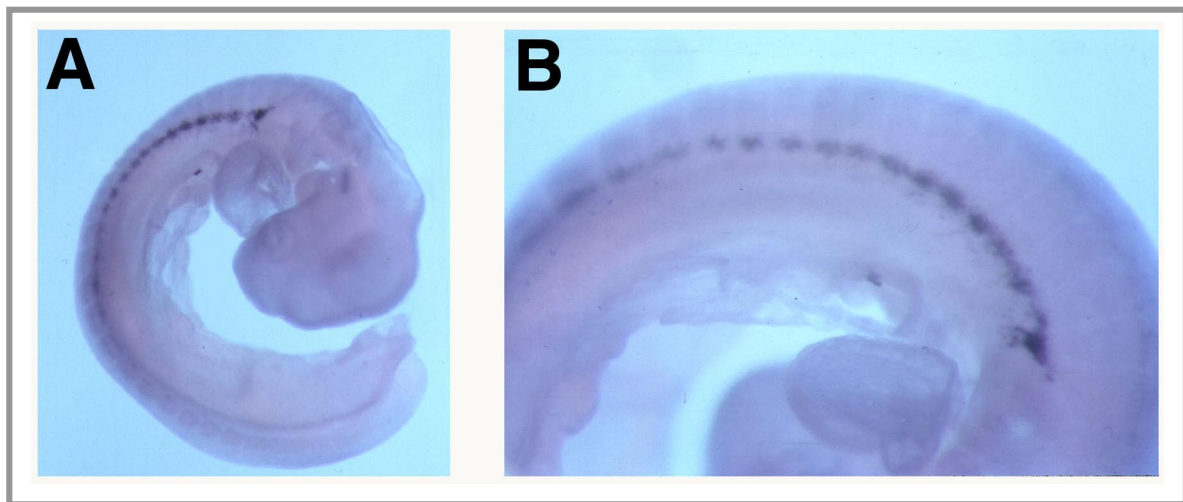


Abbildung 11: *Lbx1* Whole-mount in situ Hybridisierung im Hühnchen Embryo HH14 (A: Vollansicht; B: Detailausschnitt).

Die Transkription des *Lbx1* Gens ist im ventrolateralen Bereich der Somiten 7-22 lokalisiert (in Anlehnung an (Ordahl 1993) bezieht sich die Nummerierung der Somiten auf ihr Alter, d.h. der jüngste Somit wird als Somit 1 bezeichnet. Der nächste in rostraler Richtung als Somit 2, u.s.w.). Dabei ist die Transkription von *Lbx1* in den jüngeren Somiten sehr schwach und nimmt mit dem Alter der Somiten (ca. alle 90 min. kondensiert ein Somit) von caudaler in rostraler Richtung an Intensität zu (Abbildung 11). Transversale Schnitte der Embryonen (Abbildung 12) zeigen, dass die *Lbx1* Transkripte nur im ventrolateralen Ende des Dermamyotoms (DM) lokalisiert sind (A-C). In den jüngeren Somiten, welche noch keine Differenzierung zu Myotom und Dermamyotom durchlaufen haben, wird *Lbx1* nicht transkribiert (D). Die Entwicklung und Anordnung des Dermamyotoms (A-C) zeigt, dass die Lokalisierung der *Lbx1* Transkripte auf das ventrolaterale Ende begrenzt bleibt. Vor diesem Stadium konnte keine *Lbx1* Expression festgestellt werden.

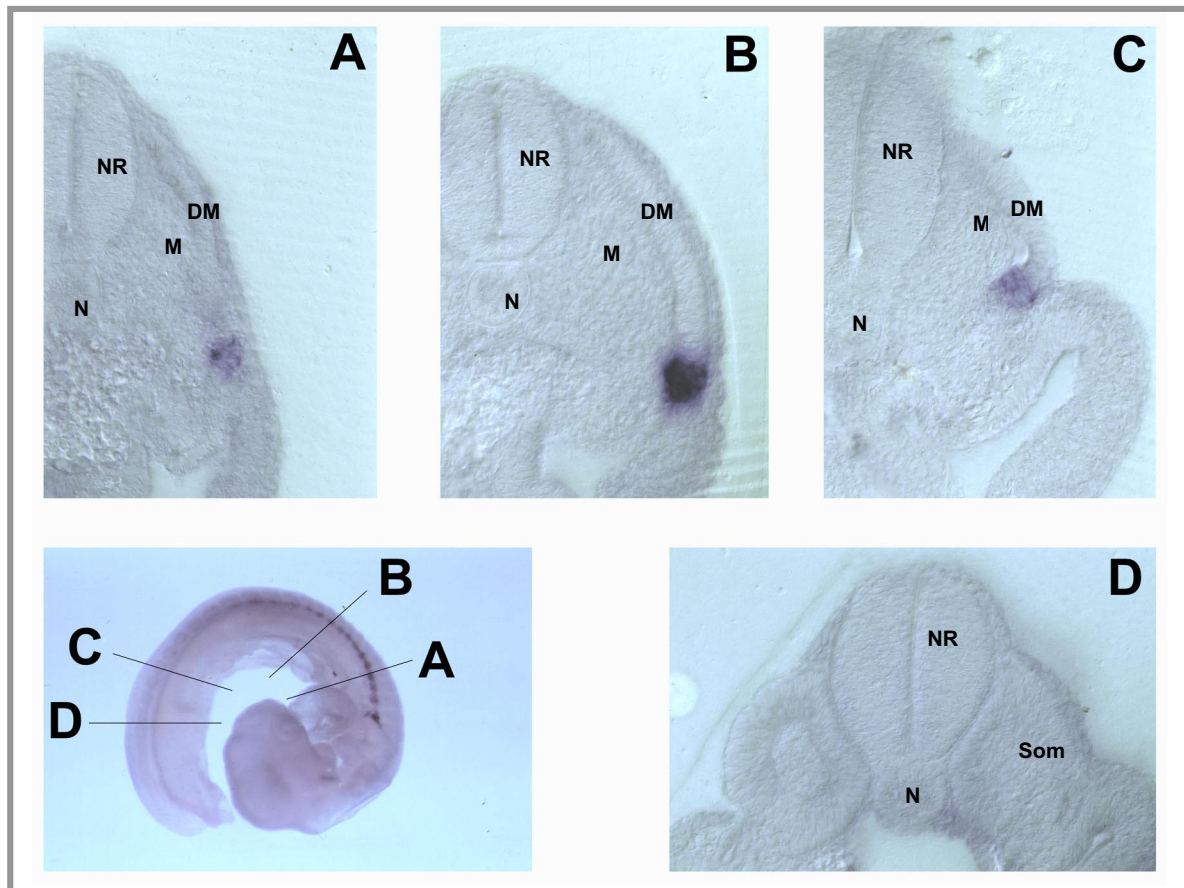
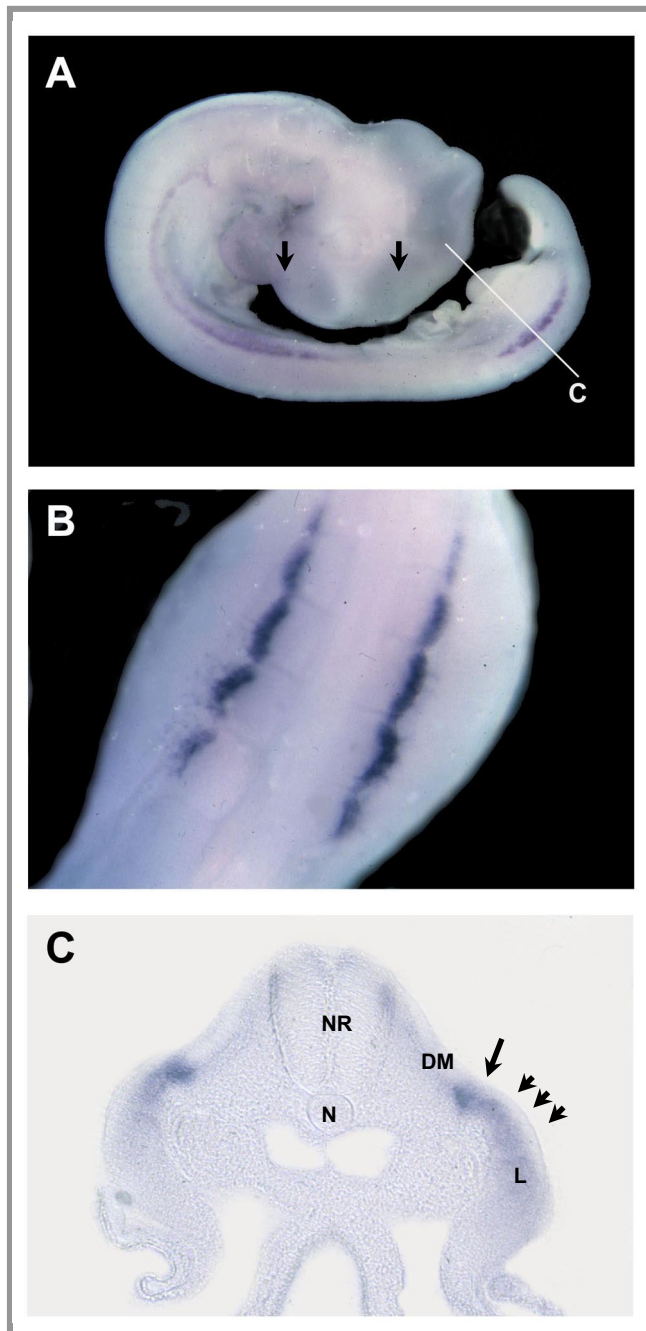


Abbildung 12: Transversale Schnitte von *Lbx1* Whole-mount *in situ* hybridisierten Hühnchenembryonen HH14. Die Schnitte **A-D** sind von rostraler in caudaler Orientierung, wie symbolisiert, angefertigt. (NR Neuralrohr; N Notochord; Som Somit; DM Dermamyotom; M Myotom)

4.2.2 Hamburger Hamilton Stadium 18 (HH18)

Im HH Stadium 18 (35 Somiten) reduziert sich die *Lbx1* Transkription auf die Somiten, die auf Höhe der auswachsenden Extremitäten (Vorderextremität: Somiten 15-20 und Hinterextremität: Somiten 26-32) liegen, während die Somiten, die zwischen den Extremitäten lokalisiert sind, keine detektierbare Transkription zeigen (Abbildung 13). Der transversale Schnitt durch die Hinterextremität (C) zeigt, dass die Muskelvorläuferzellen im ventrolateralen Ende des Dermamyotoms eine epitheliale-mesenchymale Transition durchlaufen. Die *Lbx1* positiven Zellen verlassen den epithelialen Zellverband des Dermamyotoms und migrieren in die auswachsende Extremitätenknospe ein (C: durch Pfeile symbolisiert). Wie in Bild A zu sehen ist, zeigen die rostral der Vorderextremität gelegenen Somiten weiterhin schwach eine *Lbx1* Transkription. In den rudimentären Kiemenbogenanlagen - rostral des ältesten Somiten - sind ebenfalls *Lbx1* positive Zellen detektierbar.



Zusätzlich wird im Stadium HH18 erstmals eine schwache dorsolaterale Lbx1 Transkription im Neuralrohr detektiert (C), die den ganzen Embryo durchzieht.

Abbildung 13: Lbx1 Whole-mount in situ Hybridisierung im Hühnchen Embryo HH18 (A: Vollansicht; B: Detailausschnitt). C zeigt einen transversalen Schnitt durch die auswachsende Hinterextremität. (NR Neuralrohr; N Notochord; DM Dermamyotom; L Extremitätenknospe)

4.2.3 Hamburger Hamilton Stadium 20 (HH20)

Nach drei Tagen der Bebrütung erreicht der Hühnchenembryo das HH Stadium 20 (42 Somiten). Es wird deutlich sichtbar, dass die Lbx1 positive Zellpopulation, die ihren Ursprung in den Somiten auf Extremitätenhöhe hatte, sich verbreitert hat und die Migration in die Extremitäten weiter fortgeschritten ist (Abbildung 14: A, B, D). Die Transkription im Neuralrohr ist intensiviert und durchzieht den gesamten Embryo von Kopf bis zum Schwanzbereich. Die ventrolaterale, rostral der Vorderextremität, im Dermamyotom lokalisierte Lbx1 Transkription ist weiterhin vorhanden und mündet auf Höhe der Kiemenbögen in den II. Aortenbogen.

Transversale Schnitte des Stadiums HH20 sind in den folgenden drei Abbildungen dargestellt. Abbildung 15 zeigt in den Bildern A, C und in der Übersicht B die Lbx1 Transkription im dorsolateralen Bereich des Neuralrohres. In den Bildern B ist zu sehen, dass die Lbx1 positiven Muskelvorläuferzellen nahezu die gesamte Extremität durchwandert haben, wobei die Zellen sich den entwickelnden dorsalen und ventralen Muskelkompartimenten entsprechend angeordnet haben. In den Schnitten C ist die Transkription im Kopfbereich sichtbar. Deutlich wird die Expression im noch nicht geschlossenen Neuralrohr und eine zusätzliche Domäne unterhalb der rechten und linken Anlage zur anterioren Kardinal Vene in der Nähe der Prächordalplatte.

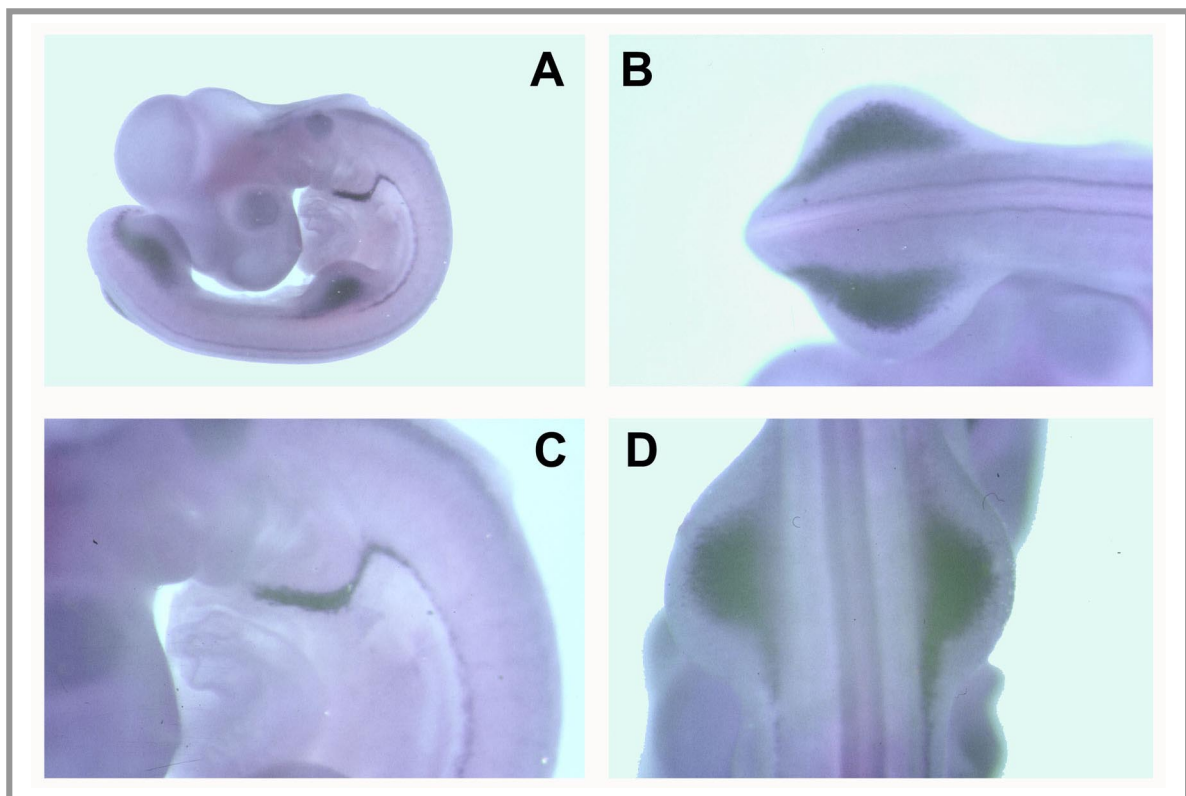


Abbildung 14: Lbx1 Whole-mount in situ Hybridisierung im Hühnchen Embryo HH20 (A: Vollansicht; B-D: Detailausschnitte).

Abbildung 16 zeigt eine hohe Lbx1 Transkription innerhalb des zweiten Pharyngelabogens (A, B, C). Außerdem ist eine sehr diffuse Detektion von Lbx1 positiven Zellen im linken Ventrikel sichtbar.

Eine weitere Lbx1 positive Domäne wurde im Hühnchen Embryo HH 20 im Bereich zwischen der Venenanlage (Abbildung 17: A, B) und dem Wolffschen Gang der Urnierenanlage beobachtet. Dieses sehr kleine Expressionsareal befindet sich lediglich auf der Höhe des 26. bzw. 27. Somiten. Weiter rostral oder weiter caudal sind keine Lbx1 Transkripte in dieser Region detektierbar.

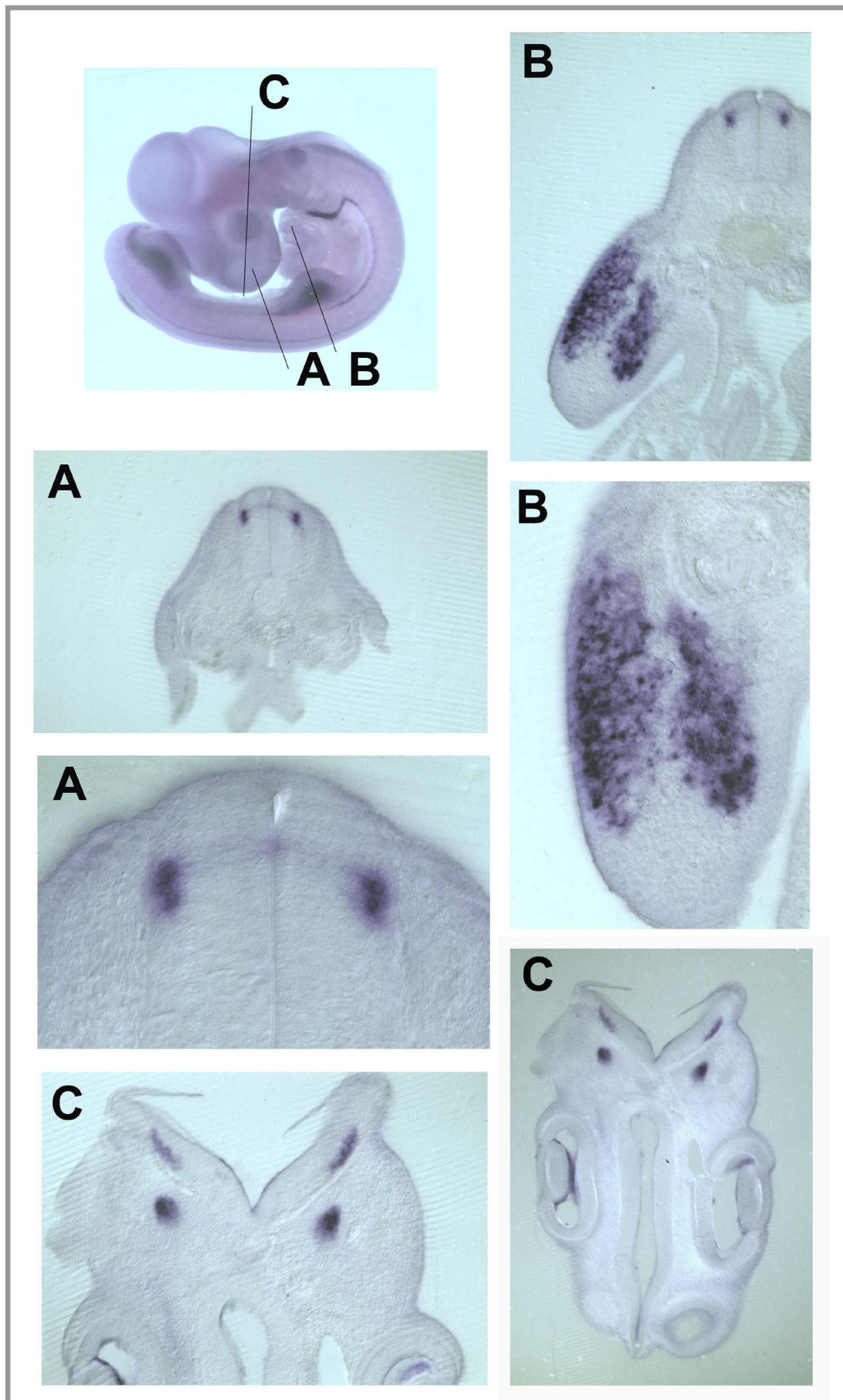


Abbildung 15: Transversale Schnitte von *Lbx1* Whole-mount in situ Hybridisierung im Hühnchen Embryo HH20. Die jeweiligen Schnittebenen in **U** symbolisiert dargestellt (**A-C**: Vollansichten und Detailausschnitte).

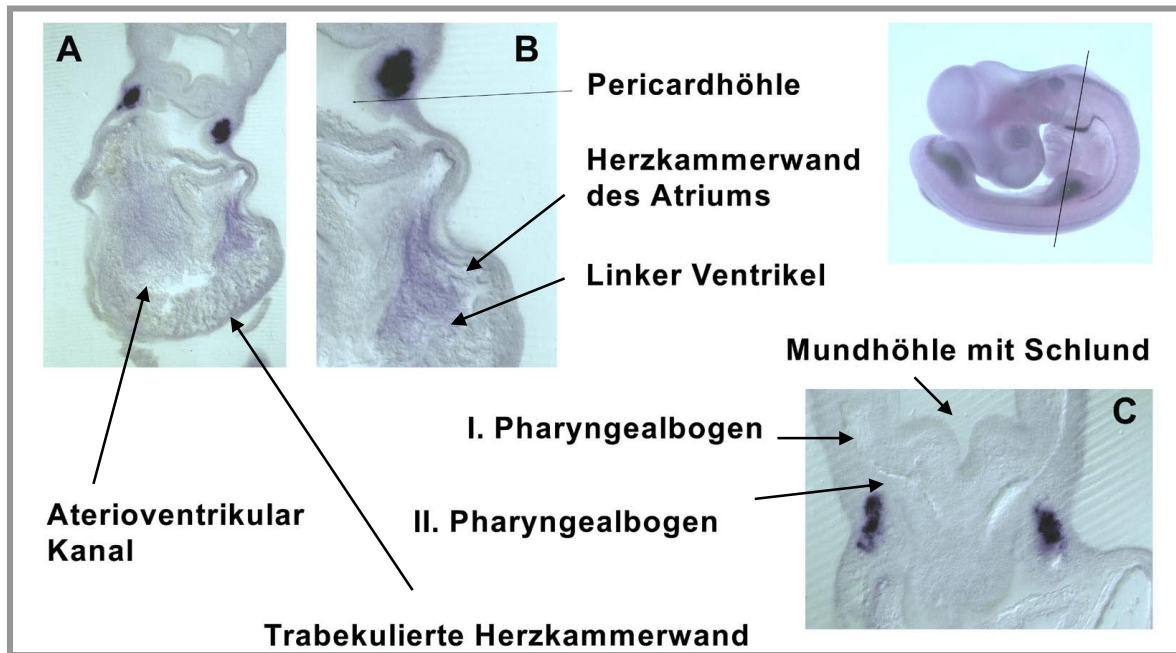


Abbildung 16: Transversaler Schnitt durch die Herzregion von *Lbx1* in situ hybridisiertem Hühnchen Embryo HH20. (A-C: Vollansichten und Detailausschnitte)

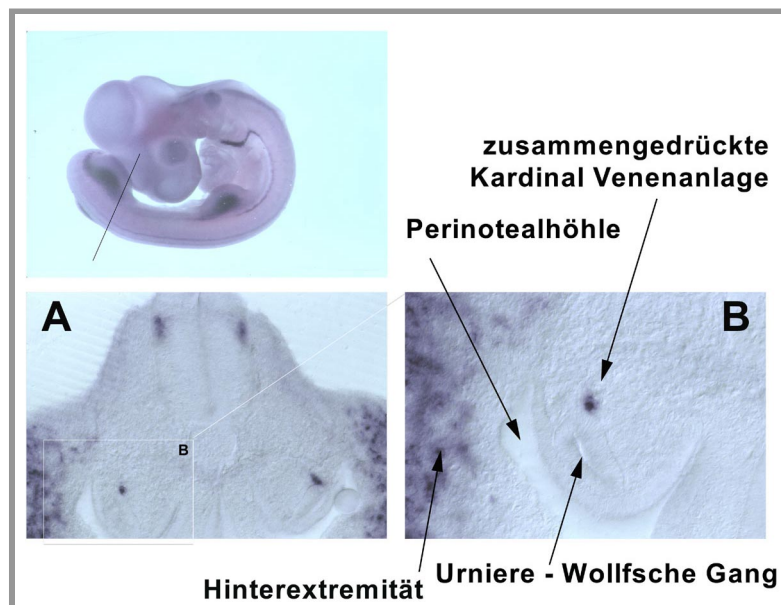


Abbildung 17 : Transversaler Schnitt durch die Urogenitalregion von *Lbx1* in situ hybridisiertem Hühnchen Embryo HH20. (A: Vollansicht und B Detailausschnitt)

4.2.4 Hamburger Hamilton Stadium 25 (HH25) und 28 (HH28)

In den älteren Stadien der embryonalen Entwicklung stößt man an die Grenzen der Whole-mount in situ Hybridisierung Methodik. Der Embryo wird zu groß und erlangt eine zu hohe Zelldichte, so dass sich oft eine hohe Hintergrundfärbung ergibt.

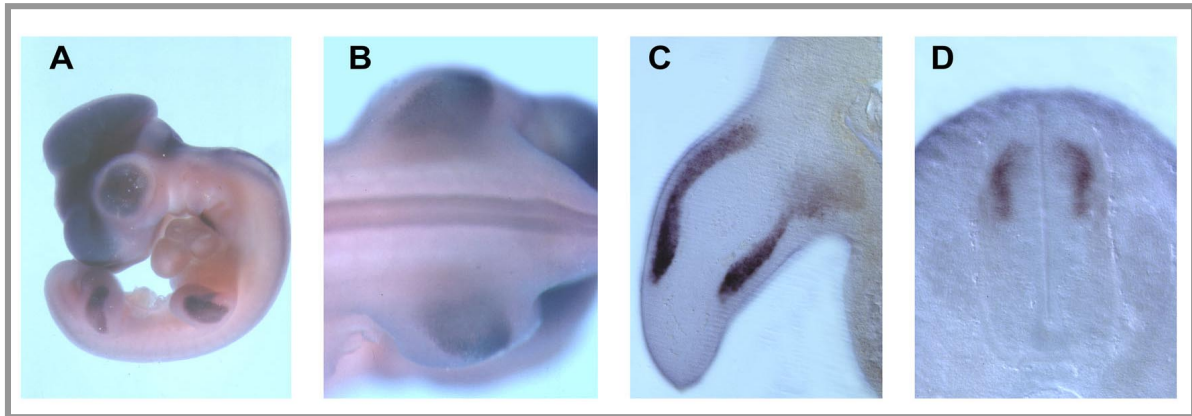


Abbildung 18: *Lbx1* Whole-mount in situ Hybridisierung im Hühnchen Embryo HH25 (**A**: Vollansicht; **B**: Detailausschnitt; **C** und **D** transversale Schnitte).

In Abbildung 18 wurden Hühnchenembryonen des Stadiums HH25 angefärbt. In A und B ist zu sehen, dass die *Lbx1* positiven Zellen vollständig in die Extremität eingewandert sind und dass im Rumpf des Embryos keine Transkripte zu detektieren sind. In diesem Stadium und besonders im Stadium HH28 (Abbildung 19 A, B) sind die *Lbx1* positiven Zellen in den einzelnen Muskeln der sich entwickelnden Extremitäten lokalisiert. In beiden Stadien HH25/28 bleibt die *Lbx1* Expression im dorsolateralen Neuralrohr unverändert nachweisbar. Der in Abbildung 18 A sehr stark gefärbte Kopfbereich zeigt keine *Lbx1* Transkription, sondern Hintergrundfärbung.

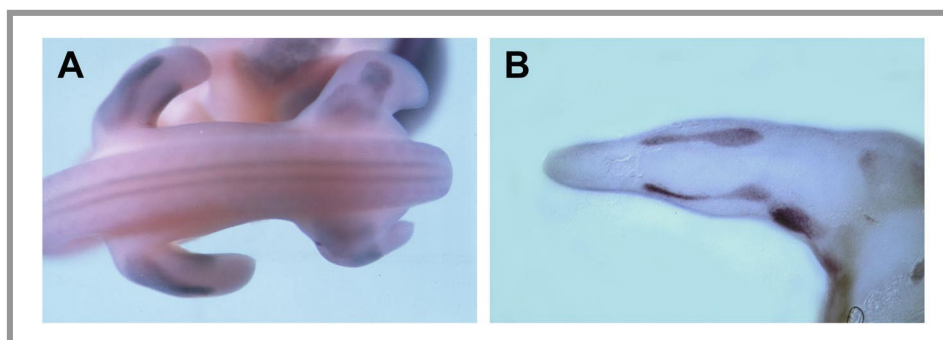


Abbildung 19: *Lbx1* Whole-mount in situ Hybridisierung im Hühnchen Embryo HH28 (**A**: Vollansicht; **B** transversaler Schnitt).

4.3 Protein beladene Bead-Implantationen induzieren Lbx1

Nach epithelialer-mesenchymaler Transition des ventrolateralen Dermamyotoms migrieren die Muskelvorläuferzellen der hypaxialen Muskulatur in die Zielgebiete der auswachsenden Extremitäten ein, um die Regionen späterer Muskeln zu besiedeln. Diese migrierenden Muskelvorläuferzellen werden durch die Expression von *Pax3* (Bober et al. 1994; Goulding et al. 1994), *Lbx1* (Mennerich et al. 1998; Schäfer and Braun 1999; Brohmann et al. 2000; Gross et al. 2000) und *c-met* (Bladt et al. 1995) markiert. Zur Untersuchung der Muskelvorläuferzellen eignet sich die natürlich entstandene Mausmutante *Spotch*, die kein funktionelles *Pax3* Protein exprimiert und infolgedessen einen schweren Defekt in der hypaxialen Muskulatur aufweist. Die Analyse der *Spotch* Mutanten zeigte, dass die Embryonen (E9.5 bis E11.5) nicht in der Lage sind, *Lbx1* in den Vorläuferzellen für die hypaxiale Extremitäten-Muskulatur zu exprimieren (Mennerich et al. 1998). Im Gegensatz zu *Lbx1*, konnten *c-met* positive Zellen in den Somiten der *Spotch* Mäuse nachgewiesen werden. Die *c-met* Expression scheint vermindert zu sein und die korrekte Anordnung dieser Zellen ist gestört.

Der komplette Verlust der *Lbx1* positiven Zellen in den Somiten der *Pax*-defizienten *Spotch* Mäuse ließ die Fragestellung aufkommen, ob *Pax3* in dieser Genkaskade eine direkte transaktivierende Wirkung zukommt, die *Lbx1* Transkription zu aktivieren. Unter physiologischen Bedingungen konnte *Pax3* jedoch nicht der alleinige Aktivator der *Lbx1* Transkription sein:

- In *Spotch* Mäusen fehlen zwar in den Somiten die *Lbx1* positiven Zellen, jedoch ist *Lbx1* im Neuralrohr weiterhin exprimiert.
- Die *Lbx1* Expression ist auf die Somiten neben den auswachsenden Extremitäten beschränkt, während *Pax3* im Dermamyotom sämtlicher von rostraler in kaudaler Richtung sich anordnenden Somiten exprimiert wird.
- *Pax3* Expression könnte aber hinreichend für *Lbx1* Aktivierung sein, wenn im Bereich zwischen den Extremitäten durch Wirkung zusätzlicher Faktoren eine Supprimierung der Aktivierung gegeben ist.

4.3.1 SF/HGF Bead Implantierung induziert keine Lbx1 Expression in den delaminierenden Muskelvorläuferzellen

Als potentieller Regulator von *Lbx1* konnte der vom Mesenchym der auswachsenden Extremität sekretierte Faktor *SF/HGF* (scatter factor / hepatocyte growth factor) (Heymann et al. 1996) angesehen werden. *SF/HGF* wird die Kontrolle der epithelial-mesenchymalen Transition zugeschrieben. D.h. die epithelialisierten Zellen des Dermamyotoms empfangen über *c-met* (Tyrosin Kinase Rezeptor für HGF) das vom

Extremitätenmesenchym sezernierte Signal, verlassen den epithelialen Zellverband und migrieren in die Extremität hinein.

Zur Untersuchung, ob Lbx1 Transkription in delaminierenden Muskelvorläuferzellen durch Gabe von exogenen SF/HGF Protein in Verbindung mit endogener Pax3 Expression initiiert werden kann, wurden Heparin Kügelchen - beladen mit SF/HGF Protein - in die Flanke von Hühnchenembryonen HH16 implantiert. Nach 24 bzw. 48 h weiterer Inkubation wurden die in ovo manipulierten Hühnchenembryonen präpariert, fixiert und in Whole-mount in situ Hybridisierungen gegen Lbx1 oder Pax3 gefärbt.

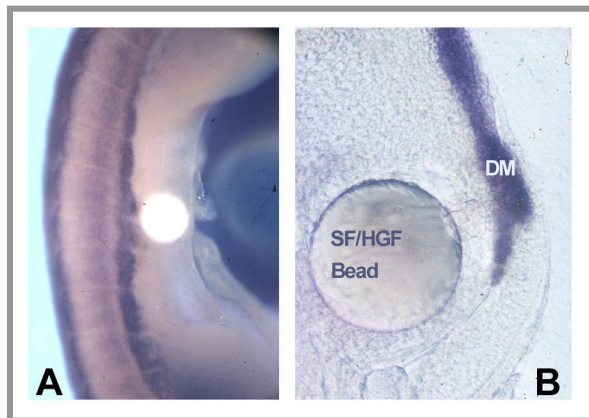
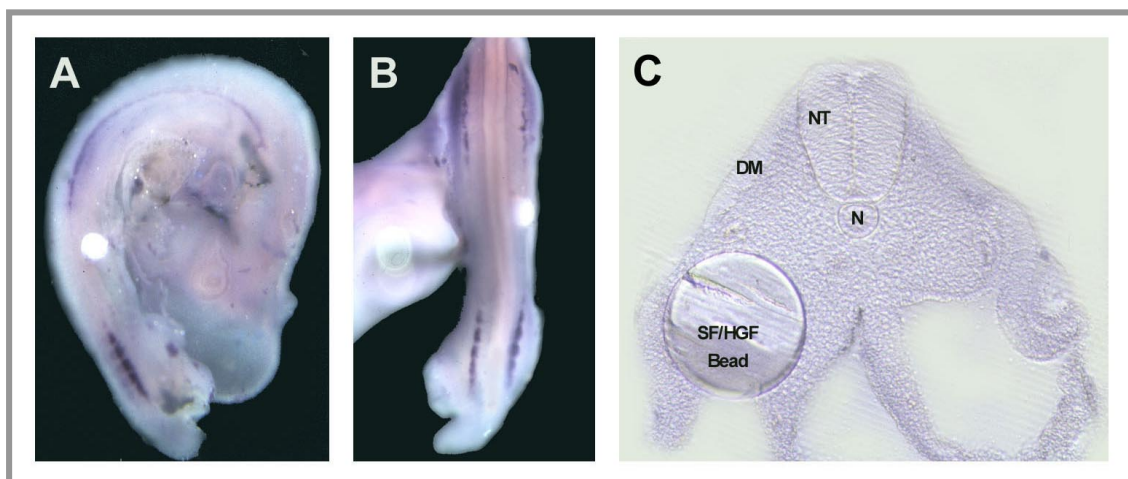


Abbildung 20: Pax3 in situ Hybridisierung von SF/HGF Kügelchen implantierten Embryonen (A: Whole mount; B: transversaler Schnitt durch die Kugelregion; DM Dermamyotom)

Abbildung 20 zeigt, dass nach dem Implantieren von SF/HGF Kügelchen in die Flanke der Embryonen, die Zellen der direkt benachbarten Somiten beginnen zu delaminieren. Die Delamination der Muskelvorläuferzellen wird durch die Anfärbung der Pax3 Transkripte visualisiert (A, B) (Heymann et al. 1996). Ob die Zellen durch die exogene SF/HGF Protein vermittelte Delamination der Somiten und die



endogene

Abbildung 21: Lbx1 in situ Hybridisierung von SF/HGF Kügelchen implantierten Embryonen (A und B: Whole mount; C: transversaler Schnitt durch die Kugelregion; DM Dermamyotom; NT Neuralrohr; N Notochord)

Pax3 Expression in der Lage sind, unmittelbar Lbx1 Transkription zu aktivieren, ist in Abbildung 21 dargestellt. Die Bilder A und B zeigen die Lbx1 in situ Hybridisierungen der mit den Kügelchen versehenen Embryonen. In den Whole-mount Präparationen (A, B), als auch in transversalen Schnitten (C) dieser Embryonen wurde keine ektopische Expression von Lbx1 detektiert. Lediglich die endogene Transkription in den Somiten benachbart zu den Extremitäten ist sichtbar.

4.3.2 FGF-2 Bead-Implantierung induziert Lbx1 in der ektopischen Extremitätenbildung

Die fehlende Lbx1 Aktivierung in den delaminierenden Pax3 positiven dermamyotomalen Zellen deutet darauf hin, dass zusätzliche Signale notwendig sind, Lbx1 Transkription in den migrierenden Muskelvorläuferzellen zu aktivieren bzw. dass eine Inaktivierung möglicher supprimierender Faktoren stattfinden muss. Die Vermutung, notwendige Signale stammen aus der sich entwickelnden Extremität, kann durch Implantierung von FGF-2 Protein beladenen Heparin Beads überprüft werden. Denn die Implantierung von FGF-2 Protein zwischen die Extremitäten-Knospen führt während früher Entwicklungsstadien (HH14-16) zur ektopischen Extremitätenbildung (Cohn et al. 1995; Vogel et al. 1996). Die Lbx1 in situ Hybridisierung der ektopisch geformten Extremitäten zeigt eine deutliche Aktivierung der Lbx1 Transkription (Abbildung 22: A und B).

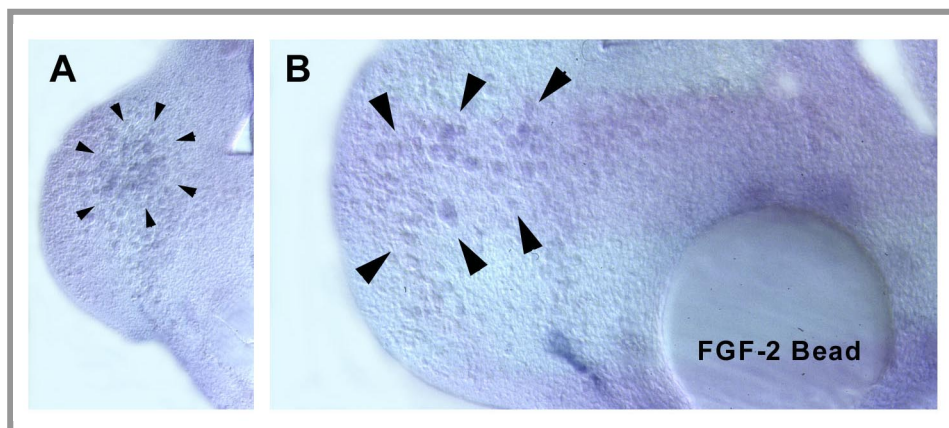


Abbildung 22: Lbx1 in situ Hybridisierung von FGF-2 Kügelchen implantierten Embryonen (A und B: transversale Schnitte durch in der Kugelregion induzierten ektopischen Extremitätenbildung).

4.4 Retroviraler Lbx1 Gentransfer

Rekombinierte Retroviren können als Vehikel benutzt werden, um fremde Gene in eukaryontischen Zellen zu exprimieren. Beim Gentransfer in Zellen durch retrovirale Vektoren wird die hohe Infektionsrate der Viruspartikel genutzt, was zu einer sehr hohen Effizienz des Gentransfers führt.

Alle Hühnchenwirtzell-spezifischen retrovirale Vektoren, die Verwendung in retroviralen Gentransfer-Experimenten finden, haben ihren Ursprung in natürlich vorkommenden Proviren. Dabei unterscheidet man grundsätzlich replikationskompetente und replikationsinkompetente Retroviren. Der Einsatz von replikationskompetenten Retroviren bietet einige Vorteile gegenüber den Replikationsinkompetenten (Fekete and Cepko 1993):

- Hochkonzentrierte Virusstock Lösungen können einfacher hergestellt werden, da kein Verpackungssystem benötigt wird.
- Es werden höhere Titer der Virusstocklösungen erreicht.
- Es sind mehrere Subtypen verfügbar (A, B, D, E).
- Es kann ein größerer Gewebebereich infiziert werden, je nach Dauer der Infektion.

Der nachfolgende retrovirale Gentransfer wurde mit dem replikationskompetenten RCASBP(A) Virus (Boerkoel et al. 1993) durchgeführt.

4.4.1 Klonierung des retroviralen Vektors pRCASBP(A)-Lbx1

Das freundlicher Weise von Prof. Dr. Dr. T. Braun zur Verfügung gestellte retrovirale pRCASBP(A) Plasmid enthält eine Cla1 Restriktionsschnittstelle zur Einklonierung des gewünschten Gens. Die Klonierung der Lbx1 cDNA wurde nach der unter 3.2.8.6 beschriebenen PCR-Klonierung durchgeführt. Das Plasmid diente zur Amplifizierung des retroviralen Konstruktes in prokaryontischen Zellen. Nach Sequenzierung der Lbx1 cDNA (zur Überprüfung der korrekten Orientierung) wurde eine DNA-Maxi-Präparation erstellt. Die hochreine retrovirale Plasmid DNA wurde mittels der Calcium-Phosphat-Präzipitation in embryonale Hühnchen Fibroblasten (CEF) transfiziert. Die transfizierten CEF Zellen konnten das retrovirale Konstrukt nach der Herstellung der Proteine (Reverse Transkriptase und Integrase) in ihr Genom integrieren, so dass ein Provirus entstand. In Abbildung 23 ist der RCASBP(A) Lbx1 Provirus schematisch dargestellt.

In der folgenden Arbeit wurden drei verschiedene Retroviren des Subtyps A verwendet:

- RCASBP(A) Lbx1
- RCASBP(A) HA-mPax3 (Maroto et al. 1997)
- RCASBP(A) hAP (Maroto et al. 1997)

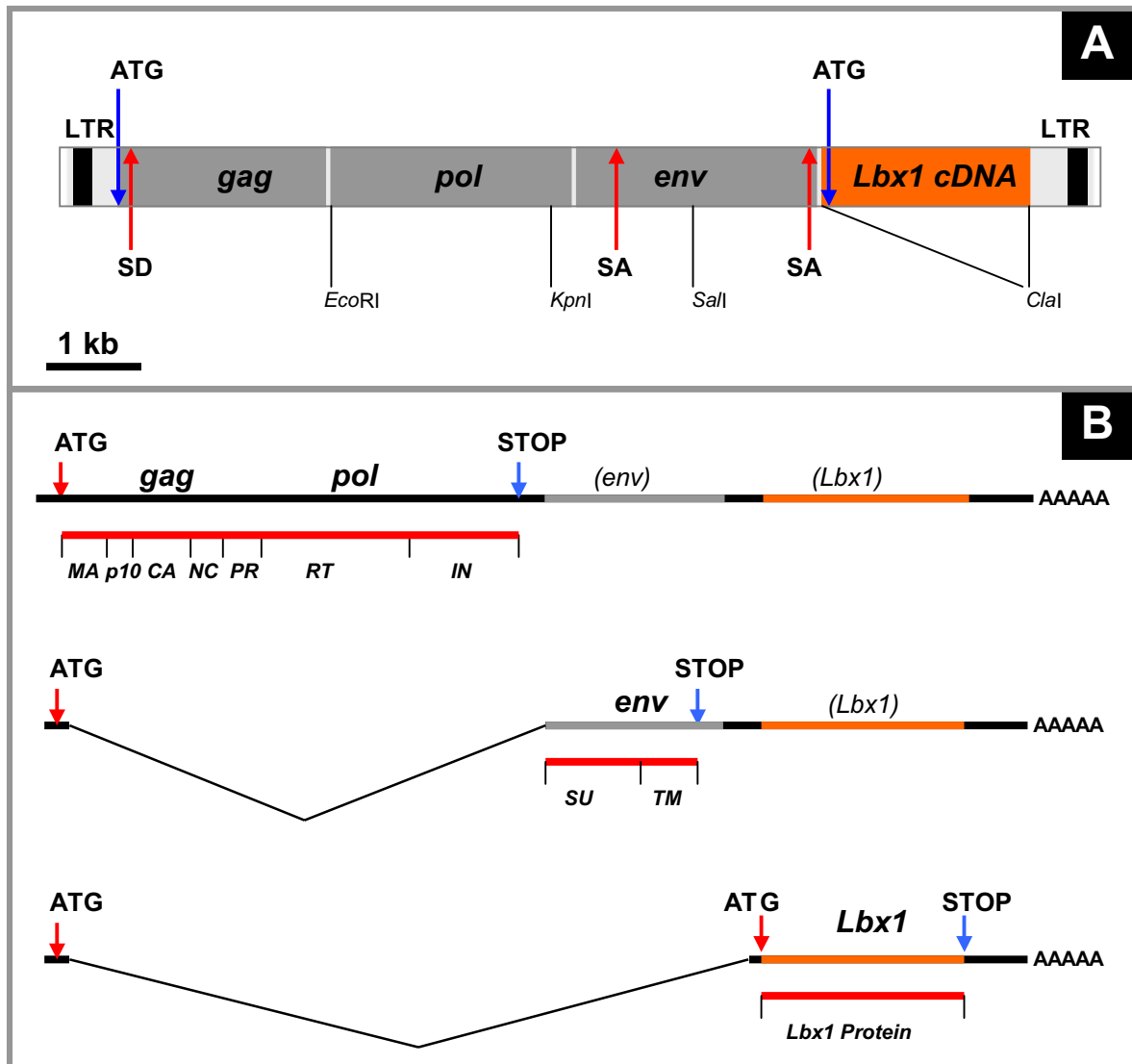


Abbildung 23: Schematische Darstellung des RCASBP(A) Vektors: **A** Struktur des rekombinierten Provirus (mit der in der *ClaI* Restriktionsschnittstelle inserierten *Lbx1 cDNA*) und **B** mit den drei resultierenden RNA Splice Varianten. In **A** beinhaltet das *EcoRI/KpnI* Fragment die hoch aktive Bryan Polymerase (Brayn high titer polymerase – BP). Das *KpnI/Sall* Fragment spezifiziert den Subtyp (*env A*). Das inserierte Gen *Lbx1* kann durch beliebige codierende Sequenzen ersetzt werden, wobei die maximale Größe des Inserts 2.4 kb nicht überschreiten sollte. (CA Capsid; IN Integrase; MA Matrixprotein; NC Nukleoprotein; PR Protease; RT Reverse Transkriptase; SU Oberflächenprotein (Receptor Bindung); TM Transmembranprotein; SD Splice-Donor-Sequenz; SA Splice-Akzeptor-Sequenz; LTR Long Terminal Repeat; ATG Startcodon für Methionin)

Nach mehrfachem Passagieren der transient transfizierten CEF Zellen wurde der Überstand der Kulturen filtriert und mittels Ultrazentrifugation aufkonzentriert.

4.4.1.1 Titerbestimmung der Retroviren RCASBP(A)-Lbx1, RCASBP(A)-HA-mPax3 und RCASBP(A)-hAP

Durch immunhistochemische Anfärbungen wurde nach der Aufkonzentration der Titer der erhaltenen Viruslösungen bestimmt. Hierzu stand der Hybridoma Überstand des monoklonalen 3C2 Antikörpers (Potts et al. 1987) zur Verfügung, welcher spezifisch gegen das *gag p19* Protein bindet. Der RCASBP(A)-HA-mPax3 Virus enthielt die Pax3 cDNA 3'-fusioniert an das HA-Epitop. Gegen das HA-Epitop war ebenfalls ein Hybridoma Überstand eines monoklonalen HA-Antikörpers vorhanden, so dass nicht nur der Titer überprüft und bestimmt werden konnte, sondern auch seine Fähigkeit rekombinantes Protein zu erzeugen.

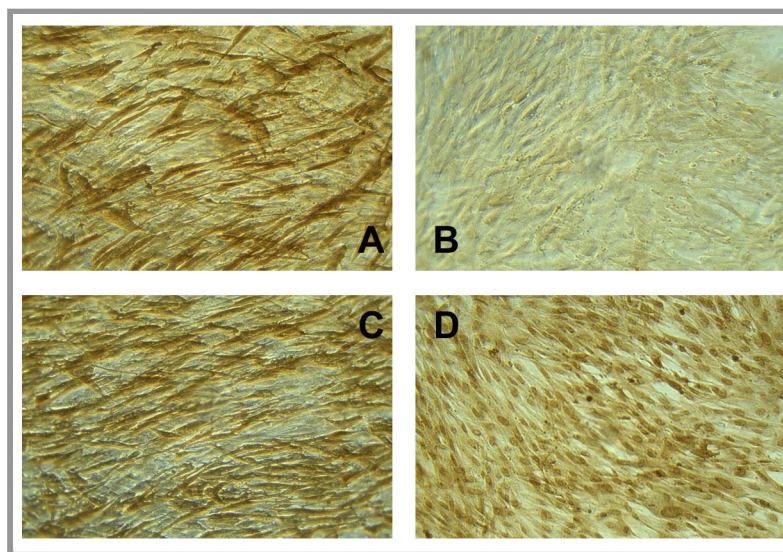


Abbildung 24: Immunhistochemische Anfärbung von RCASBP(A) Lbx1 und RCASBP(A) HA mPax3 infizierten CEF Zellen zur Titerbestimmung der Virusstocks. **A** zeigt RCASBP(A) Lbx1 infizierte Zellen, detektiert mit 3C2 monoklonalem Antikörper. **B** stellt die Negativkontrolle nicht retroviral infizierter CEF Zellen dar. **C** und **D** zeigen RCASBP(A) HA mPax3 infizierte Zellen, detektiert mit 3C2 monoklonalem Antikörper (**C** – cytoplasmatische Lokalisation), und detektiert mit monoklonalem anti-HA Antikörper (**D** – Kernlokalisierung).

CEF Zellen dar. **C** und **D** zeigen RCASBP(A) HA mPax3 infizierte Zellen, detektiert mit 3C2 monoklonalem Antikörper (**C** – cytoplasmatische Lokalisation), und detektiert mit monoklonalem anti-HA Antikörper (**D** – Kernlokalisierung).

Abbildung 24 zeigt die immunhistochemischen Anfärbungen: In B ist eine Negativkontrolle abgebildet, d.h. CEF Zellen, die nicht mit einem der Viren infiziert wurden, zeigten keinen Titer für eine endogene Virusinfektion. In A (RCASBP(A) Lbx1) und C (RCASBP(A) HA-mPax3) wurden die retroviralen Infektionen mit dem anti-*gag p19* 3C2 Antikörper nachgewiesen. Das *gag p19* Protein ist cytoplasmatisch lokalisiert, so dass die positiven Zellen ebenfalls eine cytoplasmatische Färbung zeigen. In D wurde der anti-HA Antikörper zur Detektion des fusionierten Pax3 Proteins dargestellt. Da Pax3 ein Transkriptionsfaktor ist, sollte das Protein kernständig lokalisiert sein, was durch die Anfärbung bestätigt wird. Diese Anfärbung zeigt, dass der rekombinierte Virus nicht nur seine zum Überleben wichtigen Proteine herstellt, sondern dass durch ein korrektes RNA Splicing auch eine funktionelle

mRNA und translatiertes Protein hergestellt wird. Die Titerbestimmung der verschiedenen Virusstocks ergab folgende Konzentrationen:

- RCASBP(A) hAP 8.6×10^7 IU/ml
- RCASBP(A) HA mPax3 1.2×10^8 IU/ml
- RCASBP(A) Lbx1 5.6×10^7 IU/ml

4.4.2 In ovo Injektion des RCASBP(A)-Lbx1 Virus induziert Myogenese

Nach der Produktion und Titerbestimmung der Virusstocks wurden diese, wie in Abschnitt 3.2.5.3 beschrieben, in Hühnchenembryonen des Stadiums HH10 (10 Somiten) injiziert. Nach der Bebrütung für weitere 4-5 Tage wurden die manipulierten Embryonen präpariert, fixiert und in Whole-mount in situ Hybridisierungen analysiert. In anderen Experimenten wurde nach retroviraler Überexpression von *Pax3* in explantierten Gewebekulturen die Induktion von Myogenese nachgewiesen (Maroto et al. 1997). Hierzu waren verschiedene embryonale Gewebe ex vivo in Collagenkulturen retroviral infiziert worden. Die *Pax3* vermittelte Induktion der Myogenese wurde mittels RT-PCR durch die myogenen Marker *Myf5*, *MyoD*, *Myogenin* und *MHC* (Myosin Heavy Chain) nachgewiesen.

Es stellte sich die Frage, ob *Lbx1* überexprimiert in paraxialem Mesoderm von Hühnchenembryonen HH10, ein ähnliches Potential zur Induktion von Myogenese besitzt und sogar evtl. dieselbe Funktion wie *Pax3* vermittelt. Einige Erkenntnisse ließen dies vermuten:

- *Lbx1* und *Pax3* sind in hypaxialen Muskelvorläuferzellen coexprimiert.
- In hypaxialen Muskelvorläuferzellen steht *Lbx1* unmittelbar unter der Kontrolle von *Pax3*, wie das Fehlen der *Lbx1* Expression in *Spotch* Mutanten beweist.
- Mit den Resultaten aus Abschnitt 4.3.1 zusammengefasst lässt sich sagen, dass *Pax3* notwendig – aber alleine nicht hinreichend ist, *Lbx1* zu aktivieren.

Zur Analyse der retroviral infizierten Embryonen wurden diese durch in situ Hybridisierungen mit zwei Proben doppelt angefärbt (3.2.1.6). Dabei wurde die vermutlich stärker transkribierte Probe (das retroviral überexprimierte Gen) mit Fast Red (rote Färbung) und ein myogener Marker (*MyoD* oder *Myogenin*) mit NBT/BCIP (violette Färbung) immunhistochemisch detektiert.

Obwohl die *Pax3* vermittelte myogene Induktion in ex vivo Kollagen-Gewebe-Kulturen mehrfach nachgewiesen werden konnte (Maroto et al. 1997; Heanue et al. 1999), zeigten die RCASBP(A) HA-mPax3 in ovo Infektionen keine detektierbare Induktion von myogenen Faktoren (n>55). Im Gegensatz dazu konnte nach retroviraler Überexpression von *Lbx1* in ovo eine signifikante Hochregulierung der myogenen Faktoren *MyoD* (17 von n>55) und *Myogenin* (21 von n>40) detektiert werden (Abbildung 25).

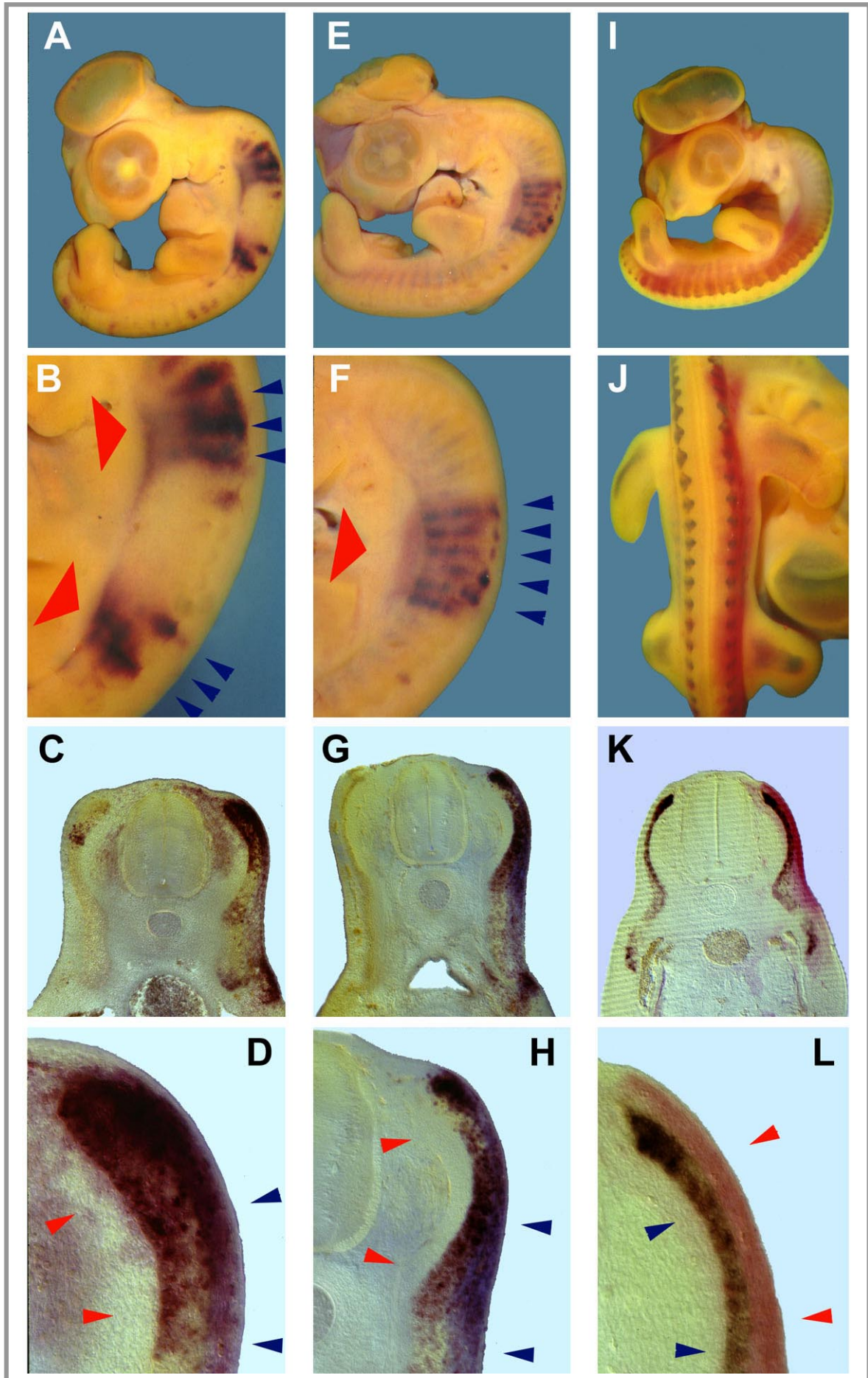


Abbildung 25: Doppelanfärbungen von Whole-mount in situ hybridisierten retroviral infizierten Hühnchenembryonen. **A-D** zeigt die retrovirale Lbx1 Überexpression (rote Färbung) und die vermittelte Induktion des myogenen Faktors MyoD (violette Färbung). In **E-H** ist die retrovirale Lbx1 Überexpression (rote Färbung) und die vermittelte Induktion des myogenen Faktors Myogenin (violette Färbung) dargestellt. Die Kontrolle **I-L** zeigt, dass der Kontrollvirus RCASBP(A) hAP (rot) nicht in der Lage ist, den myogenen Faktor MyoD (violett) fehlzuregulieren. (A, B, E, F, I, J zeigen Whole-mounts in Voll- und Detailansicht, wobei in C, D, G, H, K, L transversale Schnitte der Embryonen abgebildet sind.)

zur vorherigen Seite gehörend

Dabei wird deutlich sichtbar, dass die Virusinfektion (rote Anfärbung, durch rote Pfeile symbolisiert) homogen, über die Grenzen der segmentierten Somiten hinweg, stattgefunden hat (A, B, E, F, I, J). Die Lbx1 vermittelte Hochregulation der myogenen Faktoren MyoD und Myogenin (violette Färbung) ist hingegen nur in den Bereichen der endogenen Expressionsdomänen innerhalb der Segmentierungen hochreguliert (durch blaue Pfeile symbolisiert). In diesen Doppelfärbungen wurde nur kurz gefärbt, so dass die endogene Expression der myogenen Faktoren nur sehr schwach visualisiert ist, um eine Überfärbung in den virusinfizierten Bereichen zu vermeiden. Die transversalen Gewebeschnitte (C, D, G, H, K, L) lassen eine genauere Analyse zu: Es wird deutlich, dass die Hochregulation der myogenen Faktoren auf die lateralen Bereiche des Dermamyotoms begrenzt ist, während keine zusätzliche Induktion ausserhalb des Somiten detektiert wurde. Die Kontrollinfektion mit dem RCASBP(A) hAP Virus resultierte in keiner Veränderung der endogenen Expressionsmuster (MyoD I-L, Myogenin nicht abgebildet).

4.4.3 Retroviral exprimiertes Lbx1 und Pax3 induzieren Myogenese in ex vivo Kollagen-Gewebe-Kulturen

Obwohl die myogene Induktion in vivo für den RCASBP(A) Lbx1 Virus in Whole-mount in situ Hybridisierungen nachgewiesen werden konnte, führte das gleiche Experiment mit dem RCASBP(A) HA-mPax3 Virus zu keiner Induktion. Dies ist wahrscheinlich auf die relativ niedrige Sensitivität der Whole-mount in situ Hybridisierung zurückzuführen. Die Untersuchung der Induktion von Myogenese durch Pax3 und Lbx1 ließ aus verschiedenen Gründen die Verwendung eines in vitro Kultursystems als sinnvoll erscheinen:

- Ein ähnlicher Ansatz führte nach retroviraler Infektion mit dem *Pax3 Virus* zu myogener Differenzierung (Maroto et al. 1997; Heanue et al. 1999).
- Isolierung der kultivierten Gewebefragmente von regulierenden Einflüssen benachbarter Zellen.
- Bessere Manipulationsmöglichkeiten in der ex vivo Organkultur.

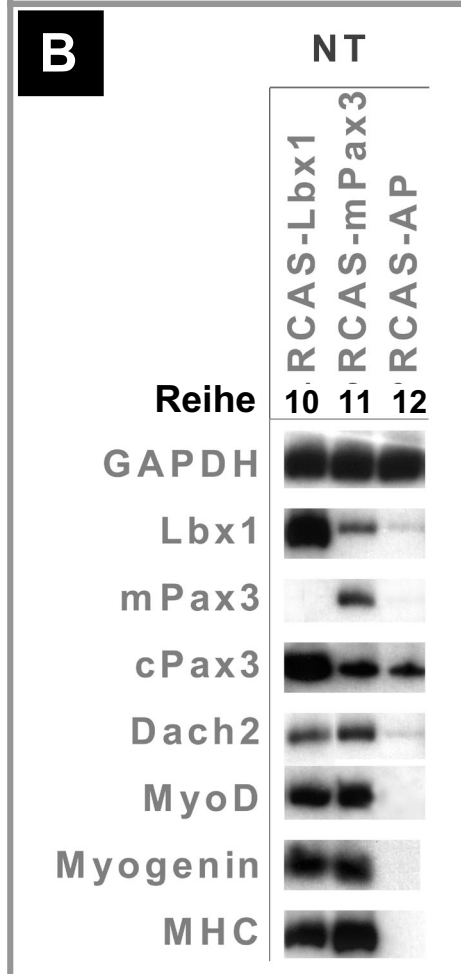
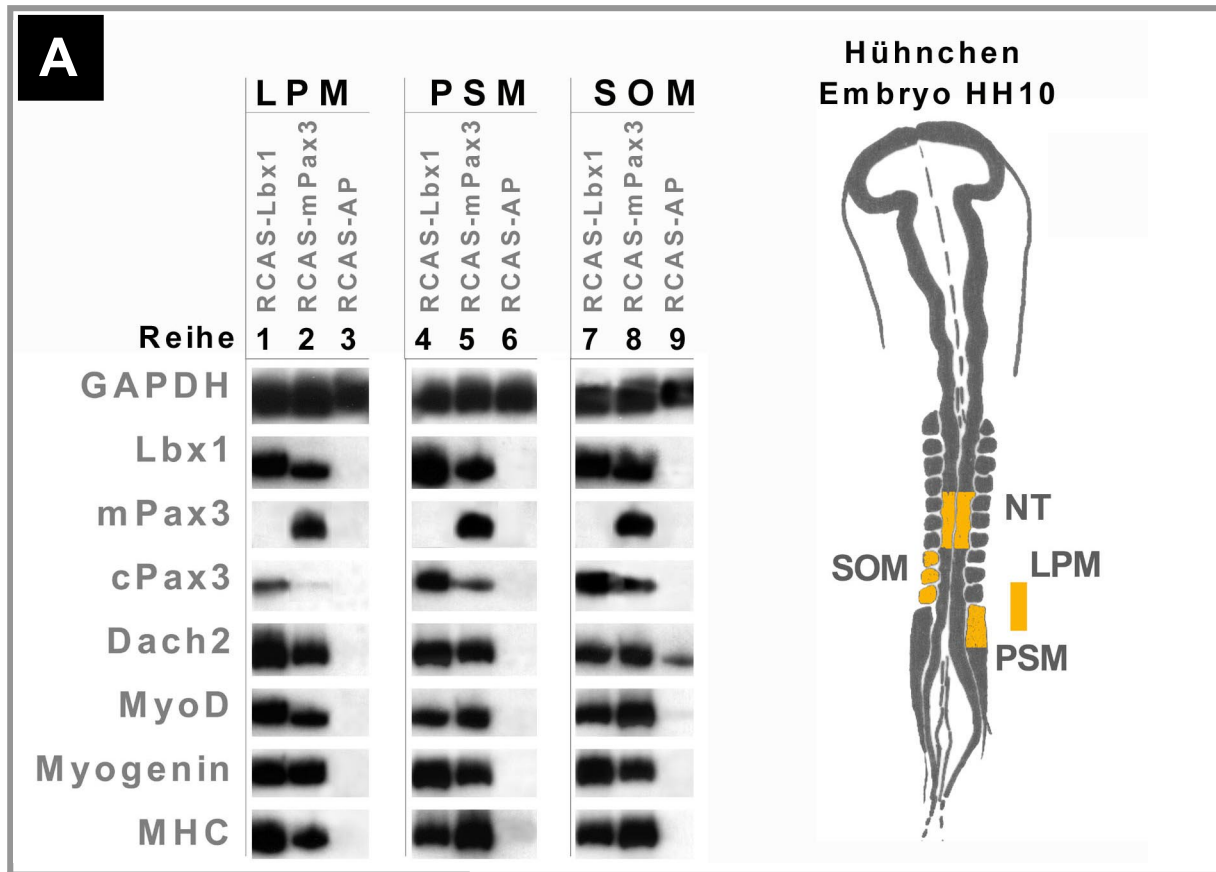


Abbildung 26: RT-PCR Analyse der retroviral infizierten explantierten Kollagen-Gewebe-Kulturen. Die im Embryo symbolisierten Gewebe wurden ex vivo in Kollagenkulturen mit den Retroviren RCASBP(A) Lbx1, RCASBP(A) HA - mPax3 und RCASBP(A) hAP infiziert. In RT-PCRs wurde die Aktivierung der myogenen Faktoren nachgewiesen. In **A** sind die RT-PCRs der mesodermalen Gewebe – in **B** des Neuralrohres dargestellt. In der ersten Reihe ist jeweils die Situation der Lbx1 infizierten Gewebe dargestellt. In der zweiten Reihe jeweils nach RCASBP(A) HA - mPax3 Infektion. Die dritte Reihe dient als Kontrolle mit der RCASBP(A) hAP Infektion (LPM laterales Plattenmesoderm, PSM paraxiales unsegmentiertes Mesoderm, SOM Somiten, NT Neuralrohr, mPax3 Maus Pax3 cDNA, cPax3 Hühnchen Pax3 cDNA, GAPDH Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase).

- Die Detektion einer eventuellen Aktivierung myogener oder anderer Faktoren ist in der RT-PCR Analyse um ein vielfaches sensitiver als in der Whole-mount Analyse.
- Die Analyse der RT-PCR bietet die Möglichkeit das infizierte Gewebe einer Kultur auf mehrere veränderte oder induzierte Gentranskriptionen zu überprüfen.

Die in Abbildung 26 symbolisierten Gewebe, bestehend aus lateralem Plattenmesoderm (LPM), paraxiales unsegmentiertes Mesoderm (PSM), Somiten I-III (SOM) und dem Neuralrohr (NT), wurden von Hühnchenembryonen HH10 präpariert und in ex vivo Kollagen-Gewebe-Kulturen mit den einzelnen Retroviren für Lbx1, Pax3 und humaner Alkalischer Phosphatase infiziert. Die Analyse der Lbx1, Pax3 oder hAP Überexpressionen wurde nach der Präparation der RNA mittels RT-PCR durchgeführt. In jedem Gewebe verhielt sich der Kontrollvirus der Alkalischen Phosphatase völlig inert, d.h. er veränderte die endogene Situation nicht (nicht abgebildet). Jeweils in dritter Reihe (A mesodermale und B neurales Gewebe) ist die endogene Transkription der betrachteten Gene dargestellt. Für die verschiedenen explantierten Gewebe ergaben sich hierbei ähnliche Resultate:

- **GAPDH** dient zur Kontrolle der Vitalität der Kulturen am Ende der Inkubationen und als Quantitätsmaß zum internen Abgleich der RNA-Konzentrationen der einzelnen Gewebe untereinander. Die Konzentrationen der GAPDH mRNA sollte daher in den verschiedenen Ansätzen gleich sein.
- **Lbx1** weist in der jeweils ersten Reihe der verschiedenen Gewebe (1,4,7,10) die stärkste Transkription auf, da diese Gewebe mit RCASBP(A) Lbx1 Virus infiziert wurden. Die Infektion der Gewebe mit dem RCASBP(A)HA-mPax3 Virus zeigt unabhängig vom mesodermalen Gewebe eine starke Induktion der Lbx1 Transkription (2,5,8). Einzig im neuralen Gewebe (NT, 11) scheint die Induktion, obwohl noch signifikant, quantitativ ein wenig niedriger einzuordnen zu sein. Dabei ist das neurale Gewebe das einzige, welches im endogenen Zustand ex vivo noch Lbx1 transkribiert (12).
- **mPax3** lässt sich nur in den mit dem RCASBP(A) HA-mPax3 Virus infizierten Geweben nachweisen (2,5,8,11), da in den Hühnchengeweben nur das Hühnchen Pax3 transkribiert wird.
- **cPax3** wird nach Überexpression von Lbx1 (1,4,7,10) in allen vier Geweben aktiviert. Zudem wird ebenfalls in allen Geweben eine stark schwankende Autoregulation des cPax3 durch überexprimiertes mPax3 detektiert (2,5,8,11). Der endogene ex vivo Zustand zeigt, wie bereits für Lbx1, lediglich im Neuralrohr eine Pax3 Transkription (12).
- **Dach2** wurde kürzlich mit Pax3 als synergistisches Regulatorsystem für myogene Differenzierung in hypaxialen Muskelvorläuferzellen beschrieben

(Heanue et al. 1999). Die beschriebene gegenseitige Regulierung durch Pax3 wurde in allen Geweben detektiert (2, 5, 8, 11). Zudem ist auch Lbx1 durch Überexpression in der Lage, Dach2 Transkription hochzuregulieren (1, 4, 7, 10). Wiederum zeigt die endogene ex vivo Situation eine schwache Transkription im Neuralrohr (12) und zusätzlich in den Somitengeweben (9), was für Lbx1 und Pax3 nicht detektiert werden konnte.

- **MyoD, Myogenin** und **MHC**: In allen vier Gewebe-Kulturen wurde nach retroviraler Lbx1- oder mPax3-Überexpression die Induktion myogener Differenzierung detektiert. Dabei wurden sowohl frühe Marker einer myogenen Differenzierung (MyoD und Myogenin), als auch MHC als terminaler Differenzierungsmarker gefunden. Die Transkription dieser Gene wurde in keinem der Gewebe-Explantate nach der Infektion mit RCASBP(A) hAP nachgewiesen (3,6,9,12).

Auf Grund der geringen Quantitäten der isolierten RNA (50–100ng) war es in diesem Experiment nicht möglich, die Analyse in einer vollständig quantitativen RT-PCR durchzuführen. Es wurden in einer ersten RT-PCR lediglich die Quantitäten des GAPDH Produktes untereinander abgeglichen, so dass das Ergebnis als semi-quantitativ angesehen werden kann.

4.4.4 Gegenseitige Regulation von Lbx1, Pax3 und Dach2

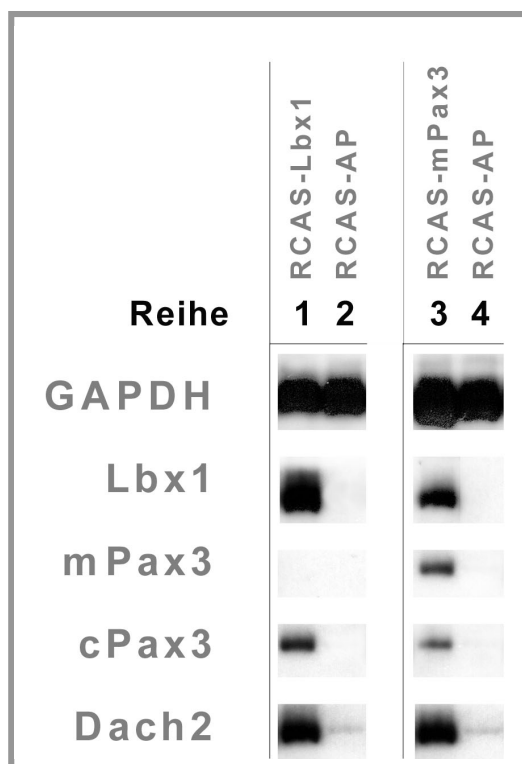


Abbildung 27: RT-PCR Analyse der retroviral infizierten explantierten Kollagen-Gewebe-Kulturen. Somitengewebe wurde ex vivo in Kollagenkulturen mit den Retroviren RCASBP(A) Lbx1, RCASBP(A) HA mPax3 und RCASBP(A) hAP infiziert. In RT-PCRs wurde die gegenseitige Aktivierung von Lbx1, Pax3 und Dach2 nachgewiesen.

Die in Abbildung 26 dargestellten gegenseitigen Aktivierungen der Markergene für hypaxiale Muskelvorläuferzellen Lbx1, Pax3 und Dach2 wurden nochmals in Somitenkulturen überprüft. Die Resultate der retroviralen Überexpressionen sind in Abbildung 27 dargestellt. Reihe 1 zeigt, dass der RCASBP(A) Lbx1 Virus in der Lage ist,

sowohl Pax3, als auch Dach2 in deren Transkription zu aktivieren. Umgekehrt wird durch die retrovirale Expression von mPax3, die Transkription von Lbx1, Dach2 und

cPax3 stimuliert. Dazu ist Dach2 retroviral Überexprimiert wiederum in der Lage Pax3 zu aktivieren (Heanue et al. 1999). Zusammengefasst sind die drei Gene in der Lage sich wechselseitig zu regulieren, wobei der Nachweis, dass überexprimiertes Dach2 Lbx1 hochreguliert, noch aussteht.

4.4.5 Retroviral überexprimiertes Lbx1 und Pax3 erhöhen die Zellproliferationsrate

Lbx1 und Pax3 sind Markergene für bereits determinierte – aber undifferenzierte - hypaxiale Muskelvorläuferzellen. Dass beide Gene zur Ausbildung der Extremitätenmuskulatur in Vertebraten notwendig sind, zeigen die *Spotch* Mäuse (Pax3 defizient) und die *Lbx1* Null-Mutanten. Beide Mausstämme weisen einen massiven Defekt in den Anlagen der hypaxialen Muskulatur auf (Bober et al. 1994; Schäfer and Braun 1999; Brohmann et al. 2000; Gross et al. 2000). Im Gegensatz zum Myotom des sich entwickelnden Somiten, wo zuerst die myogene Differenzierung post-mitotischer Zellen beginnt, werden Pax3 und Lbx1 ausschließlich im Dermamyotom exprimiert. Dabei bewirken die Gene vermutlich, dass die Muskelvorläuferzellen nicht in die myogene Differenzierung eintreten, sondern dass sie in einem hochproliferativen Zustand verbleiben und somit den „Pool“ der Muskelvorläuferzellen erhöhen.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden verschiedene mesodermale und neurale Gewebefragmente explantiert und in Kollagen-Kulturen zur Überexpression von Lbx1 und Pax3 retroviral infiziert. Am Ende der Inkubation wurden die Gewebe fixiert und mit dem monoklonalen PCNA Antikörper (proliferation cell nuclear antigen) immunhistochemisch angefärbt. Die sich im proliferativen Zustand befindlichen Zellen konnten so detektiert werden. Nach Auszählung der positiven Zellen wurde die Summe der Lbx1- oder Pax3-infizierten Gewebe mit den nichtbehandelten oder Kontrollvirus infizierten ins Verhältnis gesetzt (Abbildung 28).

Das Resultat der Auszählung der proliferativen Zellen bestätigte die vorher formulierte Hypothese, dass Lbx1 und Pax3 in der Lage sind, eine gesteigerte Zellproliferation in den Gewebe-Kulturen zu induzieren. Es fällt auf, dass beide Gene - retroviral überexprimiert – in der Lage sind, in allen Geweben (LPM, PSM, Som und NT) die Zellteilungsrate zu erhöhen. Die höchste Steigerungsrate wird in den Somiten-Kulturen beobachtet (11 und 12), welche der natürliche Ursprungsort der Muskelvorläuferzellen sind, in dem Lbx1 und Pax3 coexprimiert werden (Somiten auf Höhe der Extremitäten). Obwohl Lbx1 und Pax3 ebenfalls im dorsalen Neuralrohr coexprimiert werden, ist hier eine geringere Steigerungsrate detektiert worden (3 und 4).

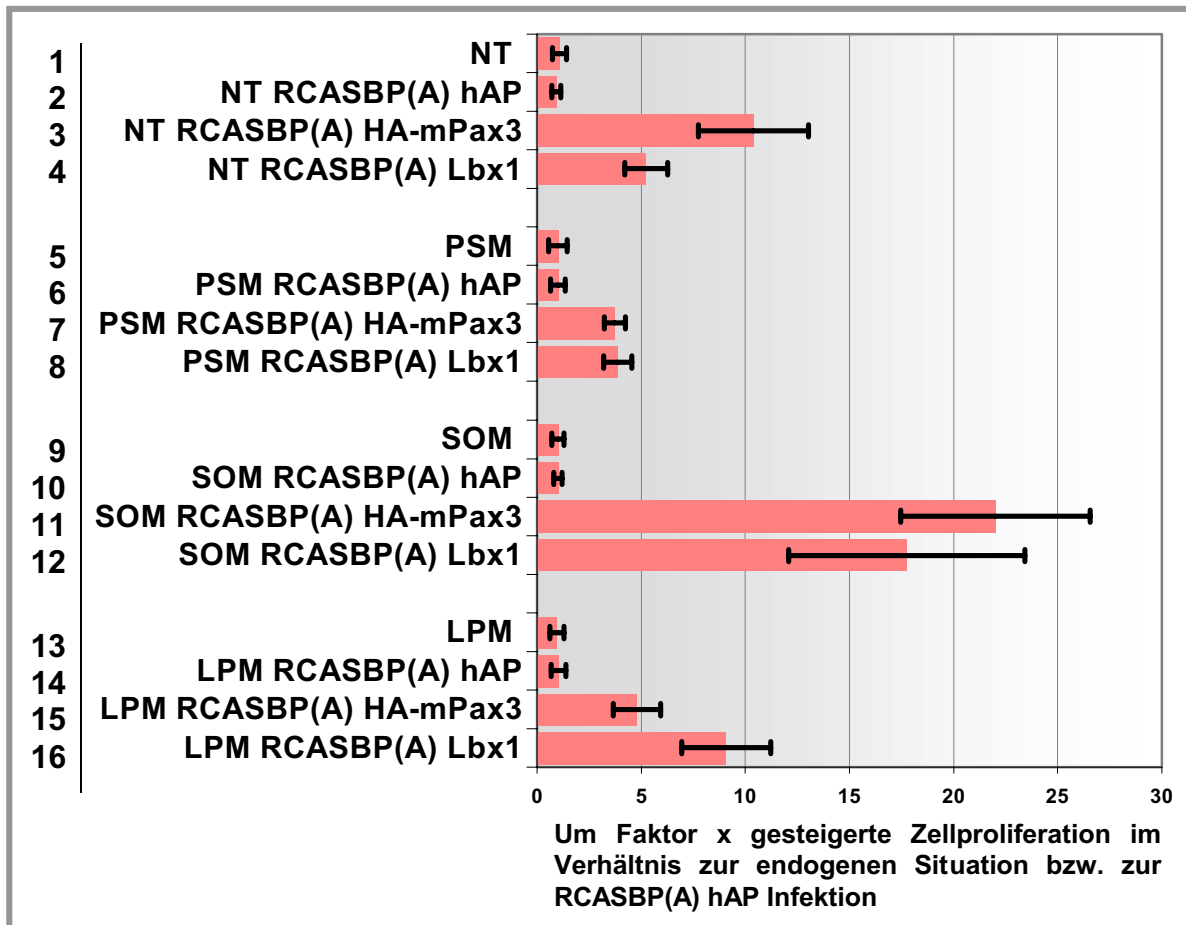


Abbildung 28: Graphische Darstellung der Lbx1 und Pax3 vermittelten Steigerung der Zellproliferationsrate. Die Abszisse zeigt die einzelnen Explantat-Kulturen der verschiedenen Gewebe, unterteilt in unbehandelt, hAP-, HA-mPax3- und Lbx1 retroviral infizierte Kulturen. Die Ordinatenwerte beschreiben den Faktor, um den die Zellproliferation gesteigert ist, im Verhältnis zu den unbehandelten oder RCASBP(A) hAP infizierten Gewebe-Kulturen.

4.4.6 Nach Blockierung der Zellproliferation sind Lbx1 und Pax3 nicht in der Lage myogene Differenzierung zu induzieren

Wie wird die myogene Differenzierung induziert nach retroviraler Überexpression von Lbx1 oder Pax3 ? Die beschriebenen Resultate ließen folgende Überlegungen zu:

- Lbx1 und Pax3 – retroviral überexprimiert - waren unabhängig voneinander in der Lage myogene Differenzierung zu induzieren.
- Lbx1, Pax3 und vermutlich auch Dach2 sind in der Lage sich wechselseitig zu regulieren, so dass eine unabhängige Induzierung der myogenen

Differenzierung nicht ganz korrekt ist, sondern dass evtl. erst eine Synergistik der Faktoren diese bewirkt.

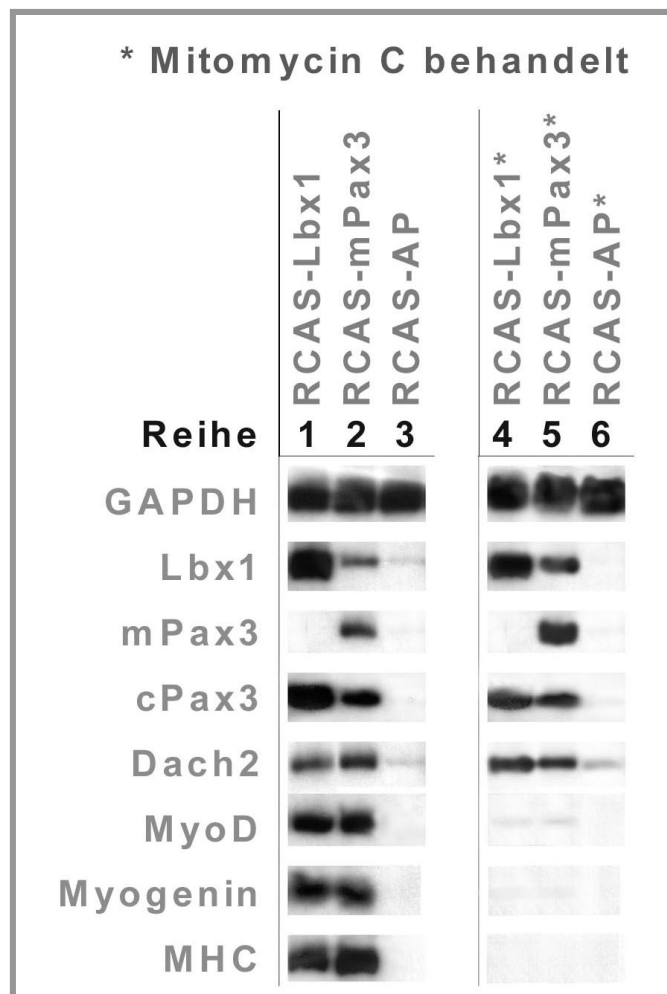
- Lbx1 und Pax3 - retroviral überexprimiert – sind in der Lage, vor allem in Somiten-Kulturen, die Proliferation der Muskelvorläuferzellen zu erhöhen.

Induzieren Lbx1 und Pax3 unabhängig von der Zellproliferation der Muskelvorläuferzellen die myogene Differenzierung, oder bedingt die Induzierung eine Erhöhung der Vorläuferzellzahl ?

Zur Klärung dieser Fragestellung wurden die Gewebe-Explant-Kulturen nach zwei Tagen retroviraler Infektion (durch die RCASBP(A) Lbx1, RCASBP(A) HA-mPax3 oder RCASBP(A) hAP Viren) mit Mitomycin C behandelt. Das Mitomycin C hemmt die DNA Replikation und die Zellteilung, ohne den Zellstoffwechsel, wie etwa die Transkription wesentlich zu beeinträchtigen. Die Analyse der Transkription verschiedener Markergene durch RT-PCR zeigte eine wesentliche Abhängigkeit der Induktion der Myogenese von der Zellproliferation. In Abbildung 29 sind in Reihe 1-3 die retroviralen Infektionen ohne Mitomycin C Behandlung dargestellt. Die RT-PCRs der Reihen 4-6 zeigen das Ergebnis der Mitomycin C Behandlung: nach retroviraler Überexpression von *Lbx1* oder *Pax3* sind die Gewebe nicht in der Lage myogene Differenzierung zu aktivieren (*MyoD*, *Myogenin* und *MHC* Transkription als Indikator). Hingegen ist keine Beeinträchtigung der wechselseitigen Regulierung der Gene *Lbx1*, *Pax3* und *Dach2* untereinander detektiert worden.

Abbildung 29: RT-PCR Analyse der retroviral infizierten explantierten Kollagen-Gewebe-Kulturen.

Somitengewebe wurde *ex vivo* in Kollagenkulturen mit den Retroviren RCASBP(A) Lbx1, RCASBP(A) HA-mPax3 und RCASBP(A) hAP infiziert. Die Gewebe in Reihe 4-6 wurden zwei Tage nach retroviraler Infektion mit Mitomycin C behandelt (*).



4.5 Lbx1 zeigt keine eindeutige transaktivierende Wirkung

Wie bereits beschrieben, gehört *Lbx1* zu der Genfamilie der Homöobox Transkriptionsfaktoren. Die Proteine von Transkriptionsfaktoren sind nach Empfangen spezifischer Signale kernlokalisiert und regulieren dort die Transkription spezifischer Zielgene. Dabei können sie als Aktivator oder als Repressor die Transkription stimulieren oder reprimieren. Ein Transkriptionsfaktor bindet alleine, oder nach Komplexbildung mit Cofaktoren, mittels der DNA-bindenden Homöodomäne direkt an spezifische DNA-Zielsequenzen und vermittelt seine transaktivierende oder –reprimierende Wirkung.

Zur Aufklärung der Funktionsweise von *Lbx1* während der frühen embryonalen Skelettmuskelentwicklung wurde untersucht, ob *Lbx1* ein Aktivatormolekül ist oder als Repressor wirkt. Da die spezifische DNA-Zielsequenz für *Lbx1* nicht bekannt ist, wurde das Gal4 Transaktivator-System verwendet, dieser Frage nachzugehen (Braun et al. 1989). *Gal4* ist ein Gen aus der Hefe *S.cerevisiae*, dessen Protein ein mittelstarker Aktivator ist. Das Protein besteht aus zwei Untereinheiten: der Transaktivatordomäne und der DNA-Bindungsdomäne. Zur Transaktivierung bindet die DNA-Bindungsdomäne spezifisch an seine UAS-Zielsequenzen (UAS upstream activator sequences), die Transaktivatordomäne vermittelt die Stimulation der Transkription. Zur Ausnutzung dieses Systems wurde die *Lbx1* cDNA 3' an die DNA-Bindungsdomäne des *Gal4* Gens fusioniert. Durch die Separierung der *Gal4* Transaktivatordomäne geht sämtliche transaktivierende Wirkung vom *Lbx1* Fusionsanteil aus, da die *Gal4* DNA-Bindungsdomäne kein transaktivierendes Potential besitzt. Durch Kotransfektionen mit spezifischen Reporterkonstrukten kann eine etwaige durch *Lbx1* vermittelte Aktivierung oder Repression bestimmt werden. Als Reportergen wurde das Chloramphenicol-Acetyl-Transferase Gen (CAT) verwendet, das durch den basalen Thymidin Kinase Promotor und den UAS Sequenzen reguliert wurde.

4.5.1 Klonierung des GAL4BD-Lbx1 Expressionsvektors

Zur Herstellung des Expressionskonstruktes pGal4-BD-Lbx1 wurde die komplette kodierende Region der *Lbx1* cDNA im passenden Leseraster 3' zur Sequenz der GAL4 Bindungsdomäne (welche die ersten 147 Aminosäuren des wildtyp GAL4 Proteins umfasst) einkloniert. Der Expressionsvektor wurde 3' der Aminosäure 147 mit dem Restriktionsenzym Cla I linearisiert. Die Cla I Enden vor dem Start- und nach dem Stopcodon der *Lbx1* cDNA wurden mittels der unter PCR-Klonierung beschriebenen Methodik (3.2.8.6) generiert. Das nach der Einklonierung des *Lbx1*-Fragmentes erhaltene Expressionsplasmid ist in Abbildung 30 dargestellt. Nach

Transfektion in 10T1/2 Fibroblasten wurde somit ein Fusionsprotein generiert, das aus der GAL4 DNA bindenden Domäne und dem Lbx1 Protein besteht.

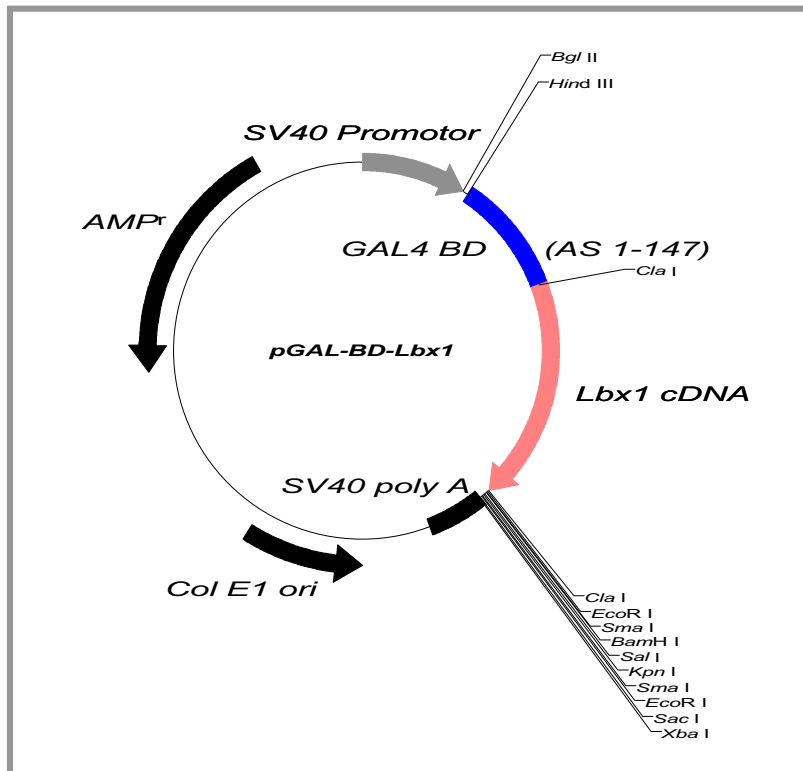


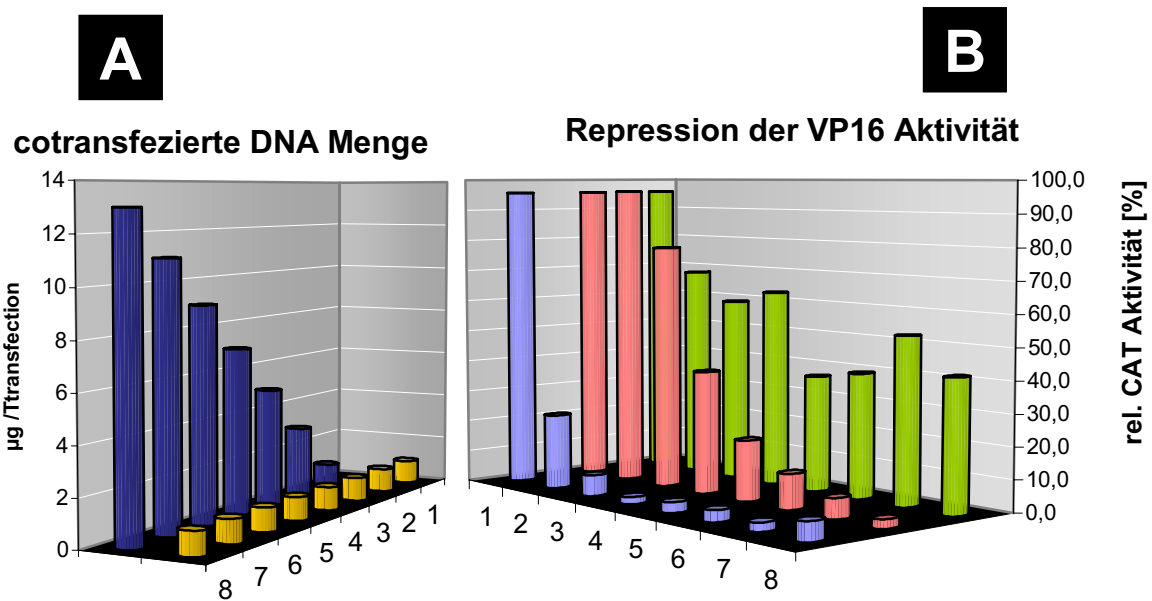
Abbildung 30: pGAL4-BD-Lbx1 Expressionsvektor. Die kodierende Region der Lbx1 cDNA wurde über die Cla1 Restriktionsschnittstelle 3' der Gal4 DNA bindenden Domäne fusioniert. Zur Amplifikation in prokaryontischen Zellen trägt das Plasmid das Ampecillin Resistenzgen. Die Transkription der fusionierten RNA wird über den SV40 Promotor reguliert.

4.5.2 Kompetitionen des starken Aktivators Gal4-BD-VP16 mit GAL4-BD-Lbx1

Die Cotransfektionen des fusionierten Gal4-BD-Lbx1 Expressionsvektors mit den 5xUAS-CAT und 2xUAS-CAT Reporterkonstrukten zeigte weder eine starke Transaktivierung, noch eine Repremierung des CAT Reporters (im Vergleich zum starken Aktivator Gal4BD-VP16 (VP16 Herpes Simplex Virus Protein) und mittelstarken Aktivator Gal4 WT). Jedoch lag die Lbx1 vermittelte CAT Aktivität über der des Gal4BD Proteins (Daten nicht abgebildet). Weitere Tansaktivierungsexperimente schienen sinnvoll, um zu klären, ob Lbx1 als Repressor wirkt. In einem Kompetitionsversuch wurden konstante Mengen des VP16 Aktivatorkonstruktes mit linear gesteigerten Mengen der Gal4-Konstrukte (pGal4BD, pGal4BD-Lbx1 und pGal4WT) und einer konstanten Menge an Reporterkonstrukt (p2UAS-CAT) cotransfiziert. Die Resultate sind in Abbildung 31 graphisch dargestellt. Wie oben beschrieben, wirkt Lbx1 nicht als Aktivator (zumindest nicht in der Kategorie des Gal4 Proteins). Die Vermutung Lbx1 wirkt als Repressor, kann nach den Kompetitionen des Aktivator VP16 ebenfalls ausgeschlossen werden, da die kompetitive Wirkung des Gal4BD Protein (B – blaue Säulen) höher ist, als die des Lbx1 Proteins (B – rosa Säulen) ist.

Das bedeutet, dass nach diesen Resultaten dem Transkriptionsfaktor Lbx1 keine eindeutige transagierende Wirkung zugeschrieben werden kann. Auf die Frage – warum – gibt es mehrere potentielle Erklärungen, die einige Experimente erfordern:

- Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Translation von funktionstüchtigem Protein nicht immer linear proportional zur transfizierten DNA-Menge ist.
- Der Transkriptionsfaktor Lbx1 fungiert in endogener Situation nur als DNA-bindender Partner eines Proteinkomplexes. Eine transagierende Wirkung auf die Transkription eines Zielgenes wird durch das Komplexpartner Protein vermittelt. Sollte diese Vermutung richtig sein, könnten potentielle Kandidaten in einem „Two-Hybrid-Screen“ isoliert werden.
- Das Protein des Transkriptionsfaktors Lbx1 besitzt neben seiner DNA-bindenden Homöobox mindestens zwei weitere Domänen die eine gegensätzliche transagierende Wirkung innehaben. Wenn eine als Aktivator und die andere als Repressor gleicher Stärke wirken würde, ergäben die oben beschriebenen Resultate einen Sinn. Dies zu klären, müsste man verschiedene Deletionskonstrukte herstellen und die Experimente wiederholen, um potentielle einzelne transagierende Domänen zu identifizieren.



■ pGAL4 constructs
■ pVP16

	1	2	3	4	5	6	7	8
■ pGal4-BD	95,7	23,7	6,6	2,3	3,3	3,6	2,7	5,9
■ pGal4-Lbx1	95,7	96,1	77,9	39,0	19,2	11,2	6,4	2,8
■ pGal4-WT	95,7	68,2	59,1	63,1	37,0	39,6	52,8	41,7

Abbildung 31: Bestimmung der transaktivierenden Wirkung von Lbx1 mittels kompetitiver Cotransfektionen und Bestimmung der CAT-Aktivität. Es wird die kompetitive Wirkung des Lbx1 Proteins auf einen sehr starken Aktivator VP16 gemessen, im Vergleich zu Kontrollproteinen (Gal4-Bindungsdomäne BD und Gal4wt). In A sind die jeweils cotransfizierten DNA Quantitäten der Expressionskonstrukte graphisch dargestellt (die Menge des zu kompetitierenden Aktivators VP16 wurde konstant bei 1µg gehalten (gelbe Säulen), während zur Konkurrenz die DNA-Menge (blaue Säulen) der Gal4-Konstrukte linear von 0µg (1), über 1µg (2) bis 13µg (8) erhöht wurde. In B sind die Resultate in Form der relativen CAT Aktivitäten aufgetragen. Die Gal4-Bindungsdomäne führt „schnell“ zur höchsten Konkurrenz des VP16, da von ihr keine transaktivierende Wirkung ausgeht (blaue Säulen). Das fusionierte Gal4-BD-Lbx1 Protein ergab ebenfalls eine hohe Konkurrenz mit annähernder linearer Proportionalität zur eingesetzten DNA-Quantität (rosa Säulen). Das Gal4 wildtyp Protein kompetiert den Aktivator VP16 bis der Überschuss des Protein in der eigenen Aktivität (5) mündet (grüne Säulen).

4.6 Analyse einer humanen heterozygoten Punktmutation in der bHLH-Domäne des myogenen Faktors Myf6

Die Familie der *Myf* Proteine (myogenic factor) umfasst die Gene *Myf5* (Braun et al. 1989), *MyoD* (Edmondson and Olson 1989), *Myogenin* (Wright et al. 1989) und *Myf6* (Braun et al. 1990; Bober et al. 1991) (auch als *Herculin* (Miner and Wold 1990) oder *MRF4* (Rhodes and Konieczny 1989) bezeichnet), welche auch als *MRFs* (myogenic regulatory factor) bezeichnet werden. Die Proteine dieser Gene gehören zu der Familie der bHLH Transkriptionsfaktoren (basische Helix-Loop-Helix Proteine). Die Notwendigkeit in der Skelettmuskelentwicklung von Vertebraten wurde in gezielten Geninaktivierungsexperimenten nachgewiesen (Arnold and Braun 1996). Dabei werden *Myf5* und *MyoD* eine Rolle während der frühen myogenen Differenzierung zugeschrieben, wobei *Myogenin* und *Myf6* eher bei der terminalen Differenzierung und bei der Regeneration von Muskelgewebe eine Rolle angedacht wird. Die vier bHLH Proteine sind ausschließlich in Skelettmuskeln exprimiert – nicht im Herzmuskel und auch nicht in Glattmuskeln (Darm, Magen).

Die vier Gene zeigen eine hohe Sequenzähnlichkeit zueinander und zwischen verschiedenen Spezies (Vertebraten und Invertebraten). Dabei ist die basische Helix-Loop-Helix Domäne das am stärksten konservierte Motif. Untersuchungen ergaben, dass der basische Part der Domäne direkt an spezifische DNA-Zielsequenzen bindet und dass die Helix I und II heterodimere Bindungen zu anderen ubiquitär exprimierten bHLH Proteinen (E2A-Protein) eingeht (Braun and Arnold 1991). Erst nach Bindung der Partnerproteine konnten diese Heterodimer-Komplexe die DNA-Zielsequenzen binden und die für Transkriptionsfaktoren übliche Transaktivierung oder -reprimierung von Zielgenen bewirken (Lassar et al. 1991; Weintraub et al. 1991).

Die embryonale Entwicklung sowie die adulte Regeneration von Muskelgewebe ist abhängig von der gezielten Kontrolle der Proliferation und Differenzierung von Zellen. Da den vier Mitgliedern der myogenen Faktoren in diesem Gleichgewicht die entscheidene Rolle zukommt, können Mutationen innerhalb dieser Faktoren vermutlich zu verschiedenen Myopathien führen.

4.6.1 Durchsuchen einer Patientengruppe mit Myopathien auf Mutationen in den myogenen Faktoren (MRF- myogenic regulatory factor)

In Zusammenarbeit mit Frau Dr. Birgit Kerst und Herrn Prof. Dr. Christoph Hübner (Klinik für Neuropädiatrie der Humboldt Universität Berlin) wurde eine Patientengruppe von 105 Personen mit verschiedenen Myopathien auf Mutationen in einem der myogenen Faktoren durchsucht. Mittels SSCP-PCR Analyse wurden die basischen Helix-Loop-Helix Domänen amplifiziert und hochauflösend

elektrophoretisch aufgetrennt (durchgeführt von Frau Dr. Birgit Kerst). Dabei wurde in der Familie von Patient P5 eine heterozygote Punktmutation detektiert (ein Basenaustausch 387: von G zu C in der Myf6 cDNA). Die detektierte Mutation resultierte in einem Aminosäureaustausch innerhalb der hochkonservierten basischen Helix-Loop-Helix Domäne (Position 112 von Alanin zu Serin). In Abbildung 32 ist die detektierte Punktmutation in der Helix I Region innerhalb eines Aminosäuresequenz-Vergleichs blau eingezeichnet.

	BASIC	HELIX I
MYF3 Human	ADRRKAATMRERRRLSK	VNEAFETLKRCT
MYF4 Human	VDRRRAATLREKRRRLK	VNEAFEALKRST
MYF5 Human	MDRRKAATMRERRRLK	VNOAFETLKRCT
MYF6 Human mut	TDRRKAATLRERRRLK	INSEAFEALKRRT
MYF6 Rat	TDRRKAATLRERRRLK	INEAFEALKRRT
MYF6 Mouse	TDRRKAATLRERRRLK	INEAFEALKRRT
MYF6 Chicken	TDRRKAATLRERRRLK	INEAFEALKRRT
MYF6 Notoph.	TDRRKAATLRERRRLK	INEAFEALKRRT
MYF6 Xenopus	TDRRKAATLRERRRLK	INEAFEALKRRT

Abbildung 32: Sequenzvergleich des basischen Bereichs und der Helix I der bHLH Domänen der vier humanen myogenen Faktoren und mehrerer orthologer Myf6 Proteine. Rot unterlegt sind jeweils die hochkonservierten basischen Bereiche und der hochkonservierte

Beginn der Helix I. Blau unterlegt ist die detektierte humane Myf6 Mutation.

Die Untersuchung weiterer Familienmitglieder des Patienten P5 ergab folgendes: Der Sohn P6 trägt die gleiche heterozygote Mutation wie sein Vater P5. Die Schwester von P6 und dessen Mutter hingegen tragen keine Mutation im Myf6 Gen. Interessanterweise leidet der Vater P5 an einer muskulären Dystrophie des Typs Becker (BMD) mit besonders schwerem Krankheitsverlauf. Diese ist durch eine In-Frame-Deletion der Exons 45-47 im Dystrophingen charakterisiert, die typisch ist für Dystrophinopathien des Becker Typs (Koenig et al. 1989; Bushby et al. 1993a; Bushby et al. 1993b). Normalerweise bewirkt diese In-Frame-Deletion einen relativ milden Krankheitsverlauf. Der Vater P5 beklagte jedoch bereits im Alter von 13 Jahren erste Muskelschwächen und wurde im Alter von 21 Jahren rollstuhlpflichtig. Eine Quadriceps Biopsie im Alter von 36 Jahren ergab schwere Fibrosis und gesteigerte Faseratropie.

Innerhalb einer Gruppe von 6 Patienten mit einer Dystrophinopathie des Typs Becker zeigte P5 (als einziger Träger der heterozygoten Myf6 Mutation) den mit Abstand schwersten Krankheitsverlauf.

Sein Sohn P6 ist nur Träger der heterozygoten Myf6 Mutation, aber nicht der In-Frame-Deletion im Dystrophingen. Er zeigte im Alter von neun Jahren erste Anzeichen einer leichten Myopathie und heute im Alter von 12 Jahren beklagt er Muskelkrämpfe und -schwäche in seinen Beinen. Die histologische Analyse einer

Muskelbiopsie ergab zentral lokalisierte Zellkerne und andere Anzeichen einer leichten Myopathie.

In den folgenden Untersuchungen wurde nach einer möglichen Erklärung dieser Befunde gesucht. Zunächst sollte zwischen zwei theoretischen Vermutungen unterschieden werden:

- Die heterozygote Myf6 Mutation resultiert in einem funktionsunfähigen Myf6 Protein. So dass die Myopathie durch eine haploide Insuffizienz zu erklären ist.
- Die heterozygote Myf6 Mutation resultiert in einem dominant-negativ wirkenden Myf6 Protein, dass das wildtyp Myf6 unterdrückt.

Prinzipiell kann die heterozygote Myf6 Mutation auf Proteinebene zu verändertem Dimerisierungspotential an die Partner Proteine, somit zu einer veränderten DNA Bindung und folglich zu einer modifizierten Transaktivierung von Zielgenen führen. Um diesen Fragestellungen nachzugehen, wurden die biochemischen Eigenschaften des mutierten Protein mit der des wildtyp Myf6 Proteins verglichen.

4.6.2 Biochemische Analyse des mutierten Myf6 Proteins

Zur Analyse der Proteininteraktion, DNA-Bindung und Transaktivierung des mutierten Myf6 Protein musste zunächst die detektierte Myf6 Mutation in ein Expressionskonstrukt eingeführt werden.

4.6.2.1 Einführung der humanen AS112 Mutation in die wildtyp Myf6 cDNA

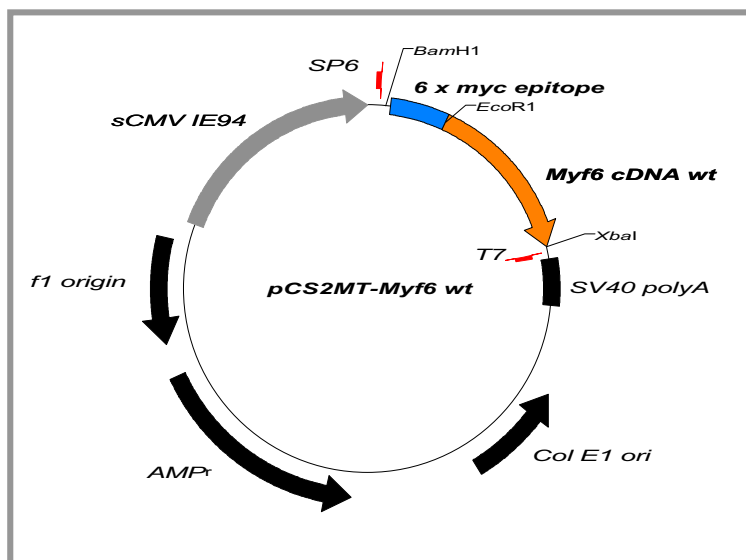
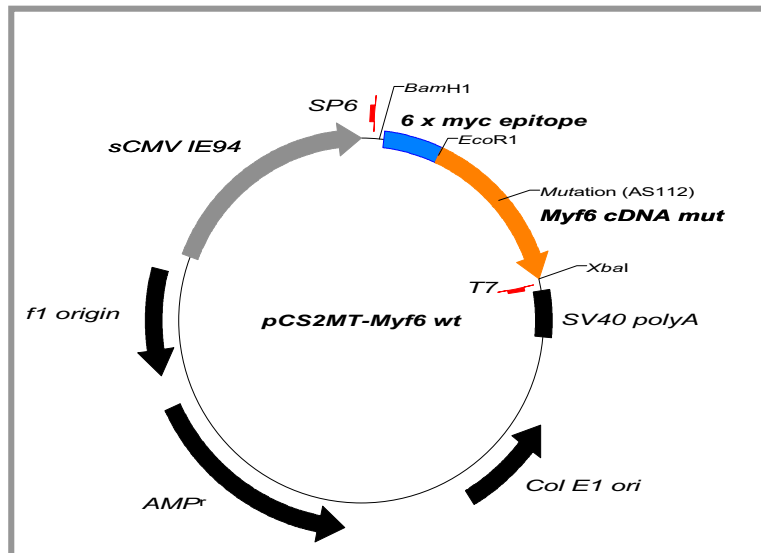


Abbildung 33: Wildtyp Myf6 Expressionskonstrukt. Die Myf6 wildtyp cDNA (orange) wurde als EcoR1/Xba1 Fragment in korrektem Leseraster 3' des myc-Epitops (blau) einkloniert. Zur in vitro Translation in Reticulocyten wird der SP6 RNA Promotor genutzt. In eukaryontischen Zellen wird die Transkription der fusionierten Myc-Myf6 RNA über den CMV-Promotor reguliert.

Von Herrn Prof. Dr. T. Braun wurde freundlicherweise die komplette wildtyp Myf6 cDNA, einkloniert im Plasmid pBS, zur Verfügung gestellt. Mittels PCR-Mutagenese

wurde der entsprechende Basenaustausch vollzogen. Zur Expression des mutierten und des wildtyp Myf6 Proteins in eukaryontischen Zellen mussten die cDNAs in ein eukaryontisches Expressionskonstrukt umkloniert werden.

Abbildung 34: Expressionskonstrukt mit entsprechender Punktmutation in der Myf6



cDNA. Das in Abbildung 33 dargestellte Expressionskonstrukt wurde durch PCR-Mutagenese (bp 690 von G zu C) verändert. Zur in vitro Translation in Reticulocyten wird der SP6 RNA Promotor genutzt. In eukaryontischen Zellen wird die Transkription der fusionierten Myc-Myf6 RNA über den CMV-Promotor reguliert.

Hierzu wurde das Expressionsplasmid pCS2MT (Roth et al. 1991) mit den Restriktionsenzymen EcoR1 und Xba1 geöffnet, um die via PCR synthetisierten cDNAs gerichtet und im korrekten Leseraster einzuklonieren. Die erhaltenen Expressionsplasmide sind in Abbildung 33 und Abbildung 34 dargestellt:

Die Klonierung wurde mittels PCR durchgeführt. Dabei wurde an das 5'-Ende der cDNAs das myc-Epitop in sechsfacher Kopie eingebaut, wodurch die in vitro in Reticulocyten translatierten Proteine mit einem anti-myc Antikörper detektierbar waren.

4.6.2.2 Das Myf6 Bindungspotential an die Dimerisierungspartner der E-Proteine ist stark reduziert

Wie alle myogenen Faktoren interagiert auch Myf6 mit den ubiquitär exprimierten HLH Proteinen *E12*, *E2-2* und *E2-5* (Braun and Arnold 1991). Das Dimerisierungsverhalten der myogenen Faktoren ist bereits mehrfach beschrieben (Lassar et al. 1991; Weintraub et al. 1991). Zur Analyse der Punktmutation wurden das wildtyp und das mutierte Protein in vitro translatiert und zum Vergleich mit dem HLH Protein *E2-2* immunpräzipitiert. Dabei wurde zum einen mit dem monoklonalen anti-myc Antikörper und zum anderen mit einem polyklonalen anti-*E12* Antikörper (Braun and Arnold 1991) (*E12* ist ein Teil des *E2-2* Proteins) immunpräzipitiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 35 dargestellt:

In den Reihen 2, 4 und 6 ist die deutliche Reduzierung des Heterodimerisierungspotentials des mutierten Myf6 Proteins zu erkennen. Dabei stellte sich heraus, dass die Fusion des Myf6 Proteins zum mehrfachen myc-Epitope keine signifikante Änderung im Bindungsverhalten der beiden Komplexpartner bedingt (Spur 1 und 2 zeigt die Immunpräzipitation der nichtfusionierten Proteine). In Konkurrenzexperimenten wurde untersucht, ob der stabile Heterodimerkomplex aus E2-2 und wildtyp Myf6 Protein durch Zugabe eines Überschusses des mutierten Myf6 Proteins beeinflusst werden kann und umgekehrt. Das Ergebnis (Spur 7-11) zeigt, dass der Heterodimerkomplex aus E2-2 und wildtyp Myf6 kaum beeinflusst wird. Im umgekehrten Experiment ist das wildtyp Myf6 Protein (wenn im deutlichen Überschuss zugesetzt) nicht in der Lage das mutierte Protein vollständig aus dem Komplex zu verdrängen.

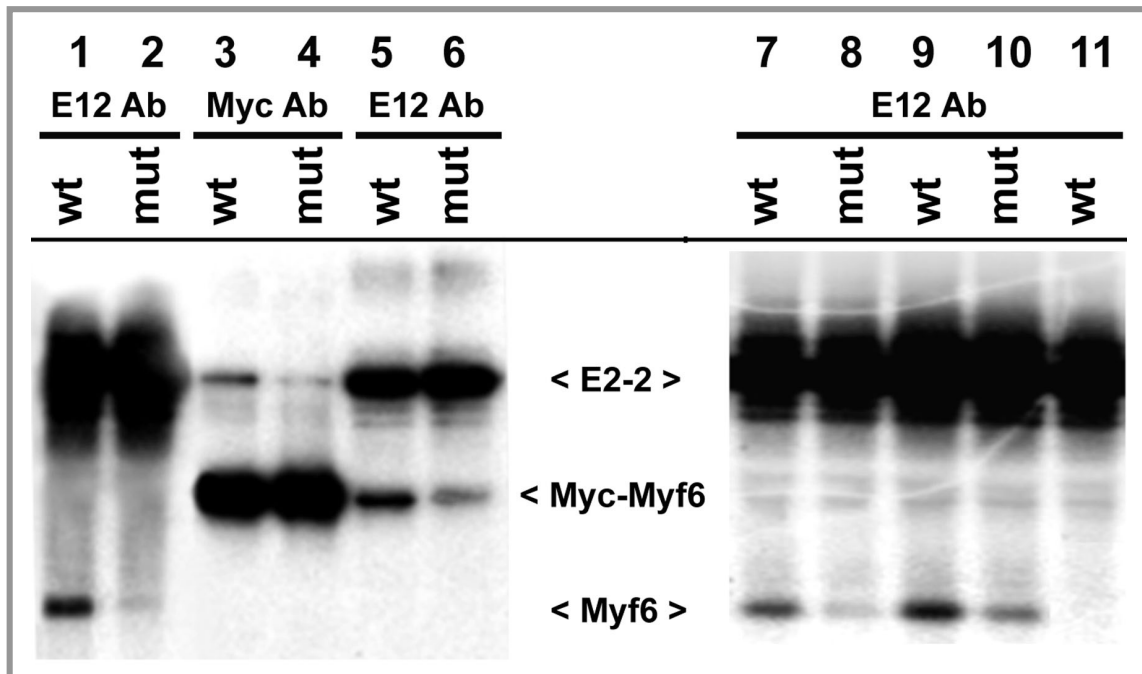


Abbildung 35: Die Immunpräzipitationen von wildtyp und mutierten Myf6 Proteinen mit dem HLH Protein E-2-2 zeigt ein verändertes Heterodimerisierungspotential. E2-2, humanes Myf6 mit (Spur 3-11) und ohne myc-Epitope (Spur 1 und 2) wurden *in vitro* translatiert und immunpräzipitiert mit Antikörper gegen E12 (Spur 1, 2, 5-11) und gegen das myc-Epitope (Spur 3 und 4). In Koimmunpräzipitationen von E2-2 mit wildtyp (Spur 7, 9, 11) oder mutierten Myf6 (Spur 9 und 10) in Anwesenheit eines Überschusses von nicht radiomarkierten mutierten (Spur 7) oder wildtyp Myf6 Protein (Spur 8) oder ohne Anwesenheit eines Kompetitors (Spur 9 und 10) beeinflusst die Affinitäten des E2-2 zum wildtyp Myf6 Proteins nicht. In Spur 11 wurde E2-2 ohne Zugabe von Myf6 Proteinen präzipitiert. (wt wildtyp; mut mutiertes Myf6 Protein; E12Ab Antikörper gegen E12; mycAb Antikörper gegen das myc Epitope)

4.6.2.3 Das mutierte Myf6 Protein ist nur stark vermindert in der Lage seine DNA-Zielsequenz zu binden

Da das mutierte Myf6 Protein nur stark vermindert an den Heterodimerisierungspartner E2-2 bindet, wurde als nächstes untersucht, ob dieser Komplex in der Lage ist, an seine DNA-Zielsequenz (E-Box) zu binden. Hierzu wurden die Heterodimerkomplexe in Gel-Retentionsanalyse mit radioaktiv markierten Zielsequenzen, der *E-Box* (isoliert aus dem Myosin Leichte Kette Enhancer MLC1/3) (Braun and Arnold 1991), inkubiert. Das Resultat (Abbildung 36) bestätigte die bekannte Bindung des Wildtypkomplexes an das E-Box Motiv, während für den Komplex aus E2-2 und dem mutierten Myf6 keine Bindung gezeigt werden konnte.

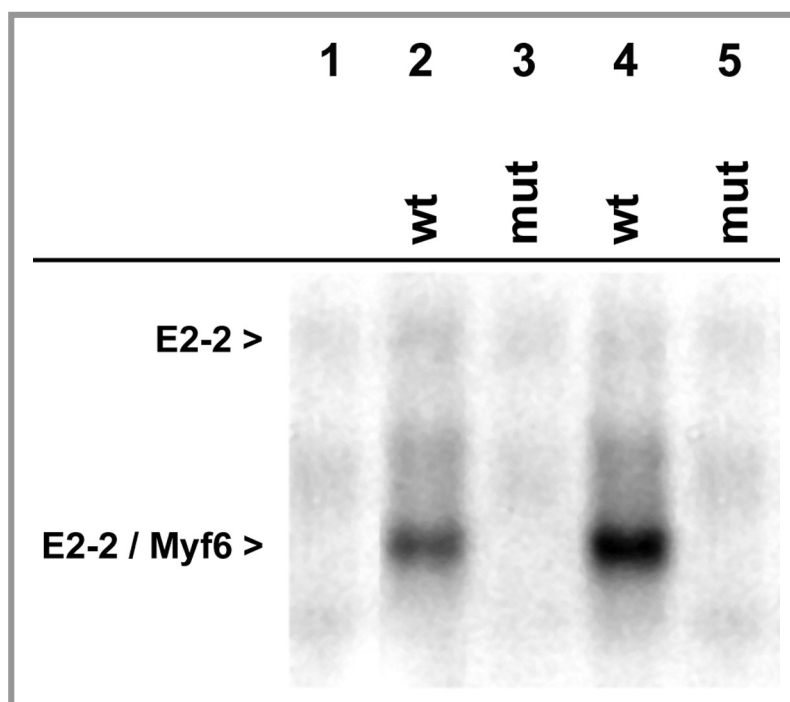


Abbildung 36: Gel-Retentionsanalyse des radioaktiv markiertem *E-Box* Sequenzmotiv mit E2-2 (Spur 1), mit E2-2 und wildtyp Myf6 (Spur 2 und 4) und E2-2 mit mutierten Myf6 Protein (Spur 3 und 5). In den Spuren 4 und 5 wurde die doppelte Quantität an Proteinen eingesetzt, wie in den Spuren 2 und 3. (wt wildtyp; mut mutiertes Myf6 Protein)

4.6.2.4 Das mutierte Myf6 Protein zeigt kein Transaktivierungspotential

Die Fähigkeit des wildtyp und des mutierten Myf6 Proteins zur Transaktivierung wurde zum Abschluss der biochemischen Analyse untersucht. Hierzu wurden die Expressionskonstrukte der jeweiligen Proteine mit Reporterkonstrukten in 10T1/2 Fibroblasten cotransfiziert. Die Reporterkonstrukte enthielten in ihren Promotoren das für die myogenen Faktoren spezifische *E-Box* Sequenzmotiv und trugen als Reporter das Chloramphenicol-Acetyl Transferase Gen. Das Experiment ergab einen deutlichen Verlust der transaktivierenden Wirkung des mutierten Myf6 Proteins (Abbildung 37). Im Vergleich zum wildtyp Myf6, welches beide Reporterkonstrukte stark aktiviert (Säule 2, 4, 7, 9), ist das mutierte Myf6 Protein nicht in der Lage eines der beiden Reporterkonstrukte zu transaktivieren (4R-CAT: Promotorkonstrukt enthält 4 Kopien des *E-Box* Motiv vor dem Thymidin Kinase Minimalpromotor; MLC-

CAT: Myosin Leichte Kette Promotor, mit mehreren E-Box Motiven) (Säulen 3 und 4, 8 und 9).

Die biochemische Analyse des mutierten Myf6 Protein zeigte, dass die Fähigkeit die Heterodimerpartner, die E-Proteine zu binden, stark reduziert war. Daraus resultiert vermutlich der Verlust der Bindungsaffinität an die spezifischen E-Box DNA Sequenzen. Zwangsläufig ist keine Transaktivierung der Zielpromotoren festzustellen.

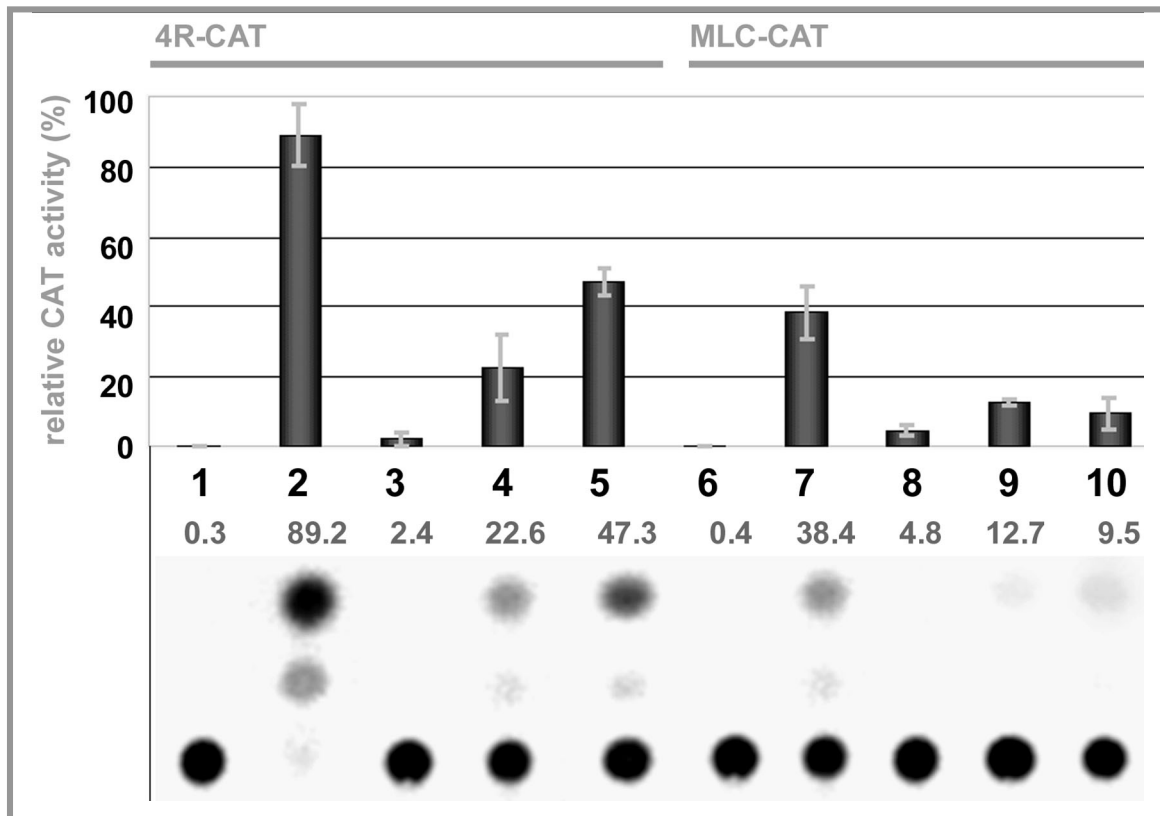
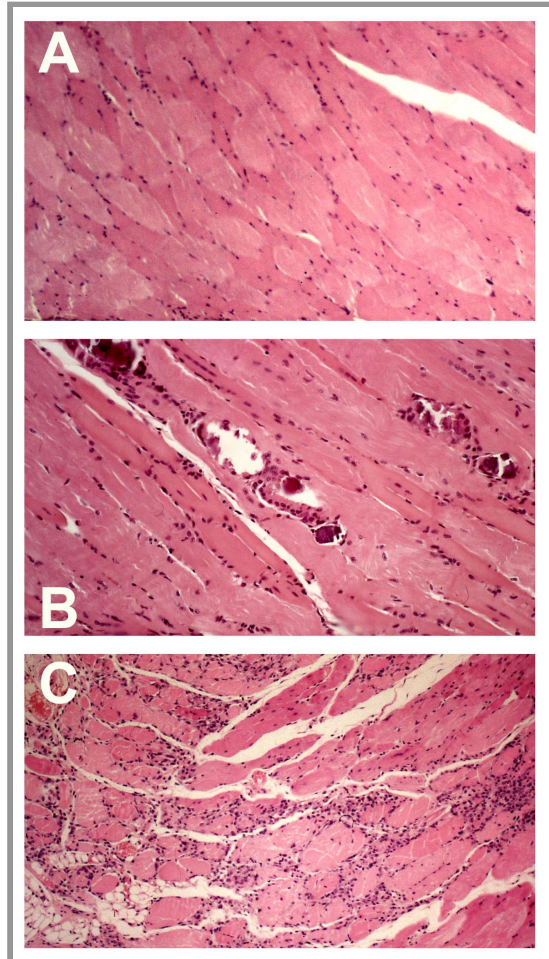


Abbildung 37: Transaktivierungs-Experiment: Mutiertes Myf6 Protein ist nicht in der Lage die Zielpromotoren des myogenen Faktors zu transaktivieren. Die Reporterplasmide 4R-CAT (Säule 1-5) und MLC-CAT (Säule 6-10) wurden zur Kontrolle (Säule 1) in 10T1/2 Fibroblasten transfiziert. In Cotransfektionen zusammen mit Plasmiden für wildtyp Myf6 (Säule 2 und 7) und mutiertes Myf6 (Säule 3 und 8), wobei die Expression der myogenen Faktoren über den CMV Promotor reguliert wurde. Zusätzlich als Kontrollen zusammen mit Plasmiden für wildtyp Myf6 (Säule 4 und 9) und wildtyp Myf5 (Säule 5 und 10), wobei die Expression der myogenen Faktoren über den EMSV Promotor reguliert wurde. Der CMV Expressionsvektor ohne Insert wurde als Kontrolle benutzt (Säule 6). Die Prozentzahlen des Chloramphenicol-Umsatzes sind über jedem Ansatz und als Säule mit Standardabweichung im Diagramm dargestellt. (CMV Cytomegalovirus; EMSV ecotroper Moloney Sarkoma Virus)

4.6.3 Analyse der Patientensituation P5 und P6 im Mausmodell

Die biochemische Analyse der Myf6 Mutation erlaubte die Schlussfolgerung, dass das mutierte Myf6 Protein nicht als dominant negatives Molekül wirkt (die Wettbewerbsversuche der Koimmunpräzipitationen zeigten keine Indizien dazu an), sondern lediglich seine biochemische Funktionalität eingebüßt hat. Vermutlich lassen sich die in den Patientensituationen beschriebenen myopathischen Defekte durch eine haploide Insuffizienz erklären. Um diese Hypothese zu verifizieren wurden im Mausmodell ähnliche genetische Voraussetzungen geschaffen. Die im Labor von Prof. Dr. T. Braun vorhandenen Mausstämme für die Mutation im Dystrophingen (*mdx* - Orthologes zum humanen Dystrophingen) und defizient für das Myf6-Gen wurden so verpaart, dass folgende Männchen generiert wurden:

- **Myf6 +/-** (heterozygot für Myf6; entspricht der Situation des Sohnes P6)
- **Myf6 +/- ; mdx -/.** (heterozygot für Myf6, hemizygot für *mdx*; entspricht der Situation des Vaters P5 – das Dystrophingen ist in Mäusen wie auch human x-chromosomal lokalisiert, d.h. männliche Individuen sind Träger von nur einem Dystrophin-Allel)
- **mdx -/.** (hemizygot für *mdx*)
- Wildtyp Kontrolle (**wt**)



Von adulten Männchen dieser Genotypen wurde der Quadriceps Muskel präpariert und histologisch analysiert. In Abbildung 38 sind die gefärbten Schnitte von der wt Kontrolle (A), der hemizygoten *mdx* Maus (B) und der heterozygoten Myf6 / hemizygoten *mdx* Maus (C) dargestellt.

Abbildung 38: Hematoxylin-Eosin-Färbung von Quadriceps-Muskelfaserquerschnitten von Mäusen verschiedener Genotypen (A wt Kontrolle; B mdx -/. und C Myf6 +/-, mdx -/.) Im Gegensatz zum Kontrollgewebe (A) sind ein Teil der Zellkerne nicht peripher sondern zentral in den Muskelfasern (B, C) lokalisiert. Zu dem sind Unterschiede in der Fasergröße (B, C), nekrotische oder proliferative Geweberegionen und Anzeichen einer atrophischen Hypertrophie zu erkennen.

Das Gewebe der heterozygoten Myf6 Maus (entspricht P6) ist nicht dargestellt. Es zeigte eine leicht gesteigerte Anzahl zentral lokalisierter Zellkerne und eine geringe Variation der Fibergrößen. Die hemizygoten mdx Mäuse (B) zeigen eine drastisch erhöhte Zahl der Zellkerne, welche z.T. ebenfalls zentral lokalisiert sind und eine deutliche Variation der Fibergrößen.

Die Doppelmutanten (C) sind mit der dramatisch gesteigerten Zellkernzahl, die größten Teils nicht peripheral lokalisiert sind, mit proliferativen Fibroblasten und einer hypertrophischen Atrophy phänotypisch am stärksten betroffen.

Die Auswertung der durchschnittlichen Fibergröße ist in Abbildung 39 graphisch dargestellt. Die vermutlich haploide Insuffizienz des Myf6 führt zu einer signifikanten Verkleinerung der Fiberquerschnitte. Gepaart mit einem Defekt im Dystrophingen verstärkt den Grad der Myopathie.

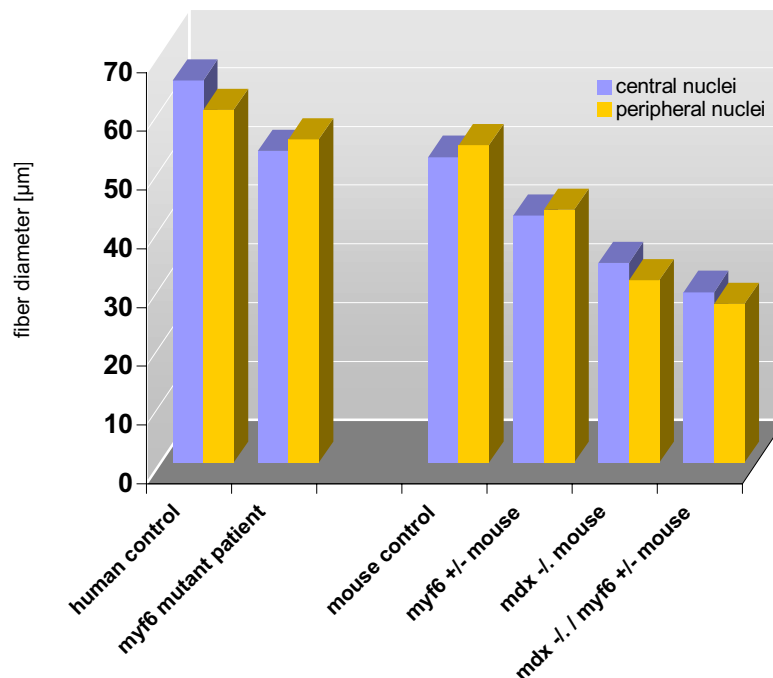


Abbildung 39: Die durchschnittliche Fibergröße [µm], unterteilt nach zentraler und peripheraler Lokalisation der Zellkerne, ist bei der heterozygoten Mutation im Myf6 Gen deutlich erniedrigt. Links: Patient P6 mit einem gleichaltrigen gesunden Jungen. Rechts: Vergleich der untersuchten Genotypen im Mausmodell.

Die biochemische Analyse und die Histologie der Muskelgewebe deuten auf einen Verlust der Funktion des mutierten Myf6 Proteins hin. Dies resultiert offenkundig im Mensch und Maus in einer haploiden Insuffizienz und einer leichten Myopathie.

5 Diskussion

5.1 Überblick

In der vorliegenden Arbeit wurden Studien zur Skelettmuskelentwicklung in Vertebraten vorgestellt. Ein Schwerpunkt der Arbeit lag in der Untersuchung der embryonalen Muskelentwicklung. Es wurde die zentrale Rolle der Transkriptionsfaktoren *Lbx1* und *Pax3* während der Spezifizierung und Differenzierung hypaxialer Muskelvorläuferzellen untersucht. Es konnte in vivo gezeigt werden, dass *Pax3* notwendig für die Aktivierung der *Lbx1* Transkription ist. Nach retroviraler Überexpression war *Lbx1*, im Gegensatz zu *Pax3*, in der Lage die myogenen Differenzierungsgene *MyoD* und *Myogenin* in vivo zu induzieren. Nach Explantierung von mesodermalen und neuralen embryonalen Geweben wurde in ex vivo Kulturen eine wechselseitige Regulation der Gene *Lbx1*, *Pax3* und *Dach2* beobachtet. Im Gegensatz zur in vivo Untersuchung war *Pax3* in supraphysiologischen Konzentrationen (genauso wie *Lbx1*) in der Lage myogene Differenzierung in ex vivo Kulturen zu induzieren. In Somiten-Kulturen wurde nach retroviraler Überexpression von *Lbx1* oder *Pax3* eine starke Steigerung der Proliferationsrate detektiert. Daraufhin wurde der Zusammenhang der gesteigerten Proliferation und der induzierten myogenen Differenzierung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Blockade der Proliferation zum Verlust der Induktion der myogenen Differenzierung führt, wobei die wechselseitige Regulierung der Faktoren *Lbx1*, *Pax3* und *Dach2* nicht beeinflusst wurde.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Analyse einer heterozygoten Punktmutation im humanen myogenen Differenzierungsgen *Myf-6*. Die biochemische Analyse des mutierten Proteins offenbarte ein vermindertes Bindungspotential an den Heterodimerisierungspartner *E2-2*. Dies führte zu einem nahezu vollständigen Verlust der DNA-Bindungsaffinität. Folglich wurde im CAT-Versuch für das mutierte *Myf-6* Protein keine transaktivierende Wirkung gemessen. Infolge dessen war das mutierte *Myf-6* nicht mehr in der Lage Zielgene zu aktivieren. Die Resultate der biochemischen Analyse ließen den Schluss zu, dass das mutierte *Myf-6* Protein vermutlich nicht als dominant negatives Molekül wirkt. Patienten, die heterozygot für die Punktmutation waren, entwickeln eine milde Myopathie. Die erhobenen Daten ließen die Vermutung zu, dass diese auf eine Haploinsuffizienz auf Grund des mutierten *Myf6* Gens basiert. Im Zuge der Untersuchungen wurden im Mausmodell die Genotypen der human Patienten P5 (heterozygote *Myf-6* Mutation gepaart mit einer In-Frame-Deletion im *Dystrophin*) und P6 (heterozygote *Myf-6* Mutation) nachgestellt und analysiert. Die heterozygote *Myf6* Mutation zeigt im humanen sowie

im Mausmuskel pathologisch nur Anzeichen einer leichten Myopathie. Das Zusammentreffen der Dystrophinopathie und der Myf-6 Mutation erklärt das schwere Krankheitsbild der von beiden Mutationen betroffenen Patienten.

5.2 Lbx1 und Pax3 spezifizieren hypaxiale Muskelvorläuferzellen und induzieren deren myogene Differenzierung

Sämtliche hypaxiale Muskelvorläuferzellen stammen aus dem epithelialisierten hochproliferativen Zellen des Dermamyotoms. Die Muskelvorläuferzellen verbleiben im proliferativen und undifferenzierten Zustand, bis sie umgebende Signale empfangen, die ihnen fortentwickelnde Mechanismen aufdrängen. In den beschriebenen Untersuchungen galt es, die Frage nach der Induktion myogener Differenzierung zu beantworten.

Mehrere Studien haben in der Vergangenheit gezeigt, dass von der Umgebung (axiale Strukturen wie das Notochord und Neuralrohr oder das lateral lokalisierte Oberflächen-Ektoderm) sekretierte Signalmoleküle die Induktion und Aufrechterhaltung myogener Differenzierung zu vermitteln in der Lage sind. Es wurde beschrieben, dass *Shh*, sekretiert vom Notochord und der Bodenplatte des Neuralrohres, sowie einige *Wnt*-Signalmoleküle, sekretiert vom dorsalen Neuralrohr, die Proliferation und anschließende myogene Differenzierung epaxialer Muskelzellen des Myotoms kontrollieren (Munsterberg et al. 1995; Munsterberg and Lassar 1995; Pownall et al. 1996; Duprez et al. 1998; Tajbakhsh et al. 1998). Als Antagonist einer myogenen Differenzierung wird *BMP4* sehr hoch im lateralen Plattenmesoderm exprimiert. Die *Bmp4* Funktion wird u.a. in der Unterdrückung der myogenen Differenzierung und zum Erhalt des Zellzyklusses gesehen (Pourquie et al. 1995; Pourquie et al. 1996). Die so gegenseitig ausgebildeten Gradienten spezifizieren die unterschiedlichen Zellschicksale des dorsalen Somiten - resultierend im epaxialen Myotom (differenzierende post-mitotische Muskelzellen) und im hypaxialen Dermamyotom (undifferenzierte und proliferative Muskelvorläuferzellen).

Die hypaxialen Muskelvorläuferzellen werden u.a. durch die frühe Expression des Transkriptionsfaktors *Pax3* markiert (Goulding et al. 1991). Im sich entwickelnden Hühnchenembryo wird *Pax3* zuerst im gesamten unsegmentierten paraxialen Mesoderm exprimiert. Nach der Segmentierung der Somiten und deren Differenzierung in Sklerotome, Myotom und Dermamyotom bleibt die *Pax3* Expressionsdomäne auf den dorsalen Somiten, das Dermamyotom beschränkt. Die über lange Zeit in das Myotom delaminierenden Muskelvorläuferzellen zeigen keine Aufrechterhaltung der *Pax3* Transkription (Bober et al. 1994; Goulding et al. 1994). Die delaminierenden Muskelvorläuferzellen, die aus der ventro-lateralen Lippe des Dermamyotoms delaminieren und in die Zielgebiete zukünftiger

Muskelkompartimente der auswachsenden Extremität migrieren (Ordahl and Le Douarin 1992), coexprimieren neben *Pax3* auch *Lbx1* (Bober et al. 1994; Mennerich et al. 1998). Erst nach Erreichen der Zielorte ist in diesen Muskelvorläuferzellen myogene Differenzierung detektierbar, durch die Transkriptionsaktivierung der Gene *Myf-5* und *MyoD* (Williams and Ordahl 1994). Die aus dem Dermamyotom delaminierenden Zellen exprimieren ebenfalls den Tyrosine-Kinase-Rezeptor *c-met* (Bladt et al. 1995). Dieser Rezeptor mit seinem Liganden *SF/HGF* (exprimiert in der auswachsenden Extremität) scheint, über eine Grb-2 abhängige Signalkaskade, verantwortlich für die epitheliale-mesenchymale Transformation und Mobilität der migrierenden Muskelvorläuferzellen zu sein (Maina et al. 1996). In Abbildung 40 sind diese beschriebenen Transkriptionsfaktoren und Signale in einem mechanistischen Zusammenhang dargestellt.

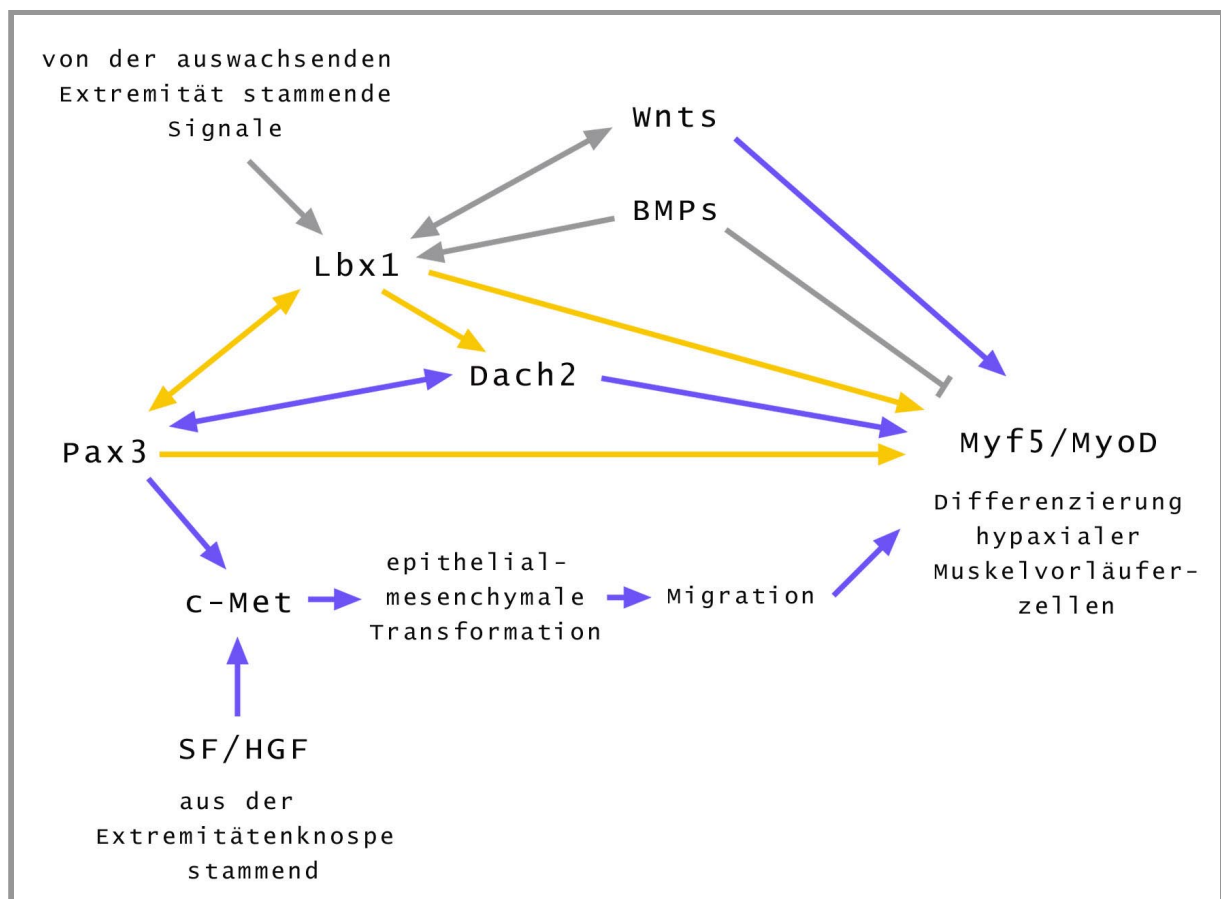


Abbildung 40: Schema der Genkaskade für die Spezifizierung und Differenzierung hypaxialer Muskelvorläuferzellen. Die blauen Pfeile symbolisieren die resultierenden Zusammenhänge früherer Untersuchungen. Die gelben Pfeile zeigen die aus den hier präsentierten Untersuchungen interpretierten Induzierungen an, während die grauen Pfeile nicht belegbare Vermutungen von Regulationen andeuten.

5.2.1 *Pax3* ist notwendig zur in vivo Aktivierung von *Lbx1*

Lbx1 wird von Beginn der epithelial-mesenchymalen Transformation (HH16) bis über die Induzierung der myogenen Differenzierung hypaxialer Muskelzellen hinaus zu jeder Zeit in den Vorläuferzellen der Extremitätenmuskulatur exprimiert. Im Zuge der Untersuchungen stellte sich heraus, dass die Aktivierung der Transkription von *Lbx1* von mehreren Faktoren abhängig ist. Die *Lbx1*-Expressionsstudie in *Spotch* Mäusen (natürlich vorkommende Mutation im *Pax3* Gen der Mäuse (Bober et al. 1994; Daston et al. 1996), welche über kein funktionelles *Pax3* Protein verfügen) ergab, dass in lateralen Somiten und in den migrierenden Muskelvorläuferzellen eine *Pax3* Abhängigkeit der *Lbx1* Aktivierung vorliegt, da in diesen Bereichen keine *Lbx1* Transkription detektiert werden konnte. Jedoch kann *Pax3* nicht der alleinige Regulator von *Lbx1* sein, da in wildtyp Mäusen *Pax3* in den Somiten zwischen den Extremitäten in gleicher Quantität exprimiert wird, wie auf Höhe der Extremitäten. *Lbx1* ist jedoch nur in den Somiten auf Extremitätenhöhe exprimiert. Zudem ist die *Lbx1* Expressionsdomäne des dorsalen Neuralrohrs in *Spotch* Mäusen vorhanden.

Es lässt sich vermuten, dass *Lbx1* zur Aktivierung zusätzliche Faktoren aus der sich entwickelnden Extremität benötigt. Als potentieller Kandidat schied der sekretierte Faktor *SF/HGF* aus, nachdem eine HGF proteinbeladene Kügelchen-Implantierung die Delamination von hypaxialen Muskelvorläuferzellen (*Pax3* positiv) zwischen den Extremitäten auslösen kann, aber in diesen Zellen keine *Lbx1* Transkripte nachweisbar waren. Die Bestätigung der Hypothese zeigte die Implantierung von FGF-2 proteinbeladenen Kügelchen: die induzierte ektopische Extremität aktivierte *Lbx1* positive Muskelvorläuferzellen zur Delamination und Migration in die zusätzliche Extremitätenknospe. Diese Beobachtung bestätigte die Vermutung eines (oder mehrerer) notwendiger Faktoren aus der Extremität, ließ aber *FGF-2* als potentiellen Kandidaten nicht zu. Die *Lbx1* positiven Zellen migrieren von den benachbarten Somiten in die ektopische Extremität hinein, ohne dass sich *Lbx1* positive Zellen direkt an der FGF-2 Quelle lokalisiert anhäufen.

Die Resultate dieser Untersuchungen ließen den Schluss zu, dass *Pax3* für die Aktivierung der *Lbx1* Transkription in hypaxialen Muskelvorläuferzellen notwendig, aber in physiologischen Konzentrationen in vivo nicht hinreichend ist. Es existieren zusätzliche Faktoren, die vermutlich aus der Extremität stammen.

Eine Studie, in der Gewebereiche der hypaxialen Vorläuferzellen von *Spotch* Mäusen in die Extremitäten von Hühnchen Embryonen transplantiert wurden, zeigte dass der Grossteil der murinen Muskelvorläuferzellen in der Lage ist, zu Muskelzellen zu differenzieren (Daston et al. 1996). Dieses Ergebnis interpretiert den Transkriptionsfaktor *Pax3* und somit auch *Lbx1* (in Muskelvorläuferzellen von *Spotch* Mutanten transkriptionell nicht aktiv) als nicht notwendig für eine myogene

Differenzierung, sondern lässt deren Bedeutung eher innerhalb der Zellmigration vermuten.

Die Analyse der homozygoten *Spotch* Mäuse (die Mutation ist im homozygoten Genotyp letal) zeigt neben massiven Defekten in den Derivaten der Neuralleistenzellen (Herz und Wirbelsäule), einen annähernd vollständigen Verlust hypaxialer Muskulatur (Chalepakakis et al. 1992; Bober et al. 1994). Wie bereits beschrieben ist keine *Lbx1* Transkription in Muskelvorläuferzellen detektierbar. Die Transkription von *c-met*, als weiterer Marker migrierender hypaxialer Muskelvorläuferzellen, ist deutlich reduziert (Yang et al. 1996). Die wenigen *c-met* positiven Zellen delaminieren aus der ventrolateralen Lippe des Dermamyotoms aus, scheinen aber desorientiert, so dass sie keine gezielte Migration in die auswachsenden Extremitäten ausführen. Dabei ist die Reduzierung der *c-met* positiven Zellen und deren Desorientierung an der Hinterextremität massiver ausgeprägt, als auf Höhe der Vorderextremitäten (Daston et al. 1996). Obwohl die hypaxialen Muskelvorläuferzellen in *Spotch* Mutanten angelegt werden, kommt es nicht zu einer gezielten Migration dieser Zellen, so dass in den Extremitäten keine Muskeln angelegt werden.

Die durch homologe Rekombination generierten *Lbx1* defizienten Mäuse (postnatal letal) zeigen einen ähnlichen Phänotyp (Schäfer and Braun 1999; Brohmann et al. 2000; Gross et al. 2000). Neben einem nicht näher analysierten Herzdefekt ist vor allem die Ausbildung der hypaxialen Extremitätenmuskulatur gestört. *Lbx1* ^{-/-} Mäuse offenbaren den Verlust der Streckermuskeln in der Vorderextremität und die totale Abwesenheit sämtlicher Muskeln in der Hinterextremität. Die Expressionsstudien von *Pax3* und *c-met* ergeben ein ähnliches Bild wie in den *Spotch* Mutanten: Im Embryonalstadium E9.5 delaminieren die Muskelvorläuferzellen und migrieren desorientiert von dorsal nach ventral, ohne dabei die auswachsende Extremität zu „besiedeln“. Die Expression von *Pax3* und *c-met* ist zum Zeitpunkt der Delamination ähnlich hoch wie die in wildtyp Mäusen. Während des Embryonaltags E11.0 sind keine *c-met* positiven Zellen in den Extremitäten *Lbx1* defizienter Mäuse zu finden. Gleiches Bild zeigt sich für die *Pax3* Expression. Lediglich im Dermamyotom ist die endogene Transkription erhalten (Schäfer and Braun 1999).

Die Phänotypen der *Lbx1* oder *Pax3* defizienten Mäuse lassen eine korrekte Spezifikation von hypaxialen Muskelvorläuferzellen vermuten, welche auch in der Lage sind, aus dem epithelialen Zellverband des Dermamyotoms zu delaminieren. Gestört ist hingegen die gezielte Migration der Muskelvorläuferzellen. Diese Ergebnisse zusammen mit der Transplantation von *Spotch* Somitengeweben in Hühnchenextremitäten scheinen die Hypothese zu stützen, dass *Lbx1* und *Pax3* ihre Funktion während der hypaxialen Muskelentwicklung in der Regulation der Migration besitzen und für die eigentliche myogene Differenzierung nicht essentiell sind.

Andere Studien wiesen jedoch darauf hin, dass zumindest Pax3 aktiv die myogene Differenzierung induzieren konnte. So konnte gezeigt werden, dass *Pax3* retroviral überexprimiert in mesodermalen ex vivo Gewebe-Kulturen in der Lage ist, myogene Differenzierung zu induzieren (Maroto et al. 1997; Heanue et al. 1999).

5.2.2 Retrovirale Überexpression von Lbx1 oder Pax3 induziert in vivo bzw. ex vivo myogene Differenzierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Überexpression des Homöoboxgens *Lbx1* die myogene Differenzierung im Dermamyotom induziert. Durch in situ Hybridisierungen wurde die Induktion der myogenen Faktoren *MyoD* und *Myogenin* nachgewiesen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Pax3 vermittelten Induzierung myogener Differenzierung (Maroto et al. 1997; Heanue et al. 1999) und weist daraufhin, dass die Funktion von *Lbx1* und *Pax3* nicht nur auf die Regulation der spezifischen Zellmigration beschränkt zu sein scheint.

Im Gegensatz zu *Lbx1* konnte nach Überexpression von *Pax3* keine in vivo Induzierung der Myogenese detektiert werden. Hingegen ergab die retrovirale Überexpression von *Lbx1* oder *Pax3* in ex vivo Gewebe-Kollagen-Kulturen für beide Transkriptionsfaktoren ähnliche Resultate: Beide Gene induzieren myogene Markergene in mesodermalen und neuralen Explantaten.

Zur Erklärung der myogenen Induzierung existieren zwei Modelle:

- Pluripotente mesodermale Zellen erfahren eine myogene Determinierung als Antwort auf Signale, die sie von umgebenden Gewebe erhalten. Man könnte diesen Mechanismus als „aktive Induzierung“ bezeichnen.
- Alternativ könnten mesodermale Zellen schon sehr früh, vor oder während der Gastrulation, ein myogenes Differenzierungspotential vermittelt bekommen, welches während der embryonalen Entwicklung durch spezifische Faktoren supprimiert wird. In einem weiteren Schritt könnte die Repression dann aufgehoben werden (Derepression), so dass eine myogene Differenzierung möglich wird. Man könnte diesen Mechanismus als „spezifische Supprimierung“ bezeichnen.

Für das Modell der spezifischen Supprimierung sprechen einige Indizien aus der Entwicklung niederer und höherer Vertebraten. Die frühe Determinierung mesodermaler Zellen wird durch die Expression von *MyoD* in verschiedenen Spezies markiert. Im Hühnchenembryo ist eine frühe *MyoD* Expression im Epiblastgewebe detektierbar, noch bevor es zur Ausbildung des Primitivstreifens kommt (Holtzer et al. 1990). In nicht-fertilisierten *Xenopus laevis* Oozyten wird *MyoD* mütterlicherseits exprimiert und wird während der embryonalen Entwicklung nicht nur an den

zukünftigen Muskelkompartimenten lokalisiert exprimiert (Harvey 1990; Rupp and Weintraub 1991). Auch in den Nematoden *C. elegans* wird sehr früh in der Entwicklung eine breite MyoD Expression detektiert, welche sich erst im 90-Zell-Stadium auf die Zellen der zukünftigen Muskeln beschränkt (Krause et al. 1992). Ebenfalls für die Theorie der spezifischen Supprimierung sprechen Daten, dass Blastomere (präpariert von noch nicht gastrulierten Embryonen verschiedener Spezies) in der Lage sind, in vitro kultiviert eine myogene Differenzierung zu aktivieren. Dieses Experiment konnte an Blastomeren von Hühnchen-, Xenopus- und Zebrafischembryonen via RT-PCR Nachweis von *Myogenin* und *Myosin Heavy Chain (MHC)* durchgeführt werden (Choi et al. 1990; Holtzer et al. 1990; Godsave and Slack 1991). Die frühe MyoD Expression, die über die zukünftigen Muskelzellen hinaus geht, wird in verschiedenen Spezies beobachtet. Da der Transkriptionsfaktor *MyoD* als Differenzierungsaktivator wirkt, muss das embryonal früh vermittelte myogene Potential spezifisch unterdrückt – supprimiert werden.

Die Analyse einer Zebrafisch Mutane *floating head (flh)* lässt die Notochordbildung durch Supprimierung der Differenzierung der myotomal determinierten Zellen des zentralen Mesoderms vermuten (Halpern et al. 1995; Talbot et al. 1995). Nach dem Verlust der Transkription des *flh* Homöoboxgens während der Gastrula zeigt die Mutante einen Verlust des Notochords. Neben dem Verlust des Notochord kommt es zu einer axialen Fusion von den Myotomen beider Seiten über die Mittellinie hinaus. Vor der Ausbildung des Myotoms wird in den axialen mesodermalen Zellen die Expression von Markergenen einer Notochordanlage neben den Markergenen der myogenen Differenzierung detektiert. Durch den Verlust der *flh* Aktivität setzt sich vermutlich die myogene Tendenz der Zellen durch, so dass es zum Verlust der Notochordanlage kommt. Die Funktion des *flh* Homöoboxgens kann daher als spezifische Supprimierung einer myogenen Differenzierung innerhalb des axialen Mesoderms interpretiert werden (Halpern et al. 1995; Talbot et al. 1995).

Ein weiterer interessanter Ansatz lässt vermuten, dass die zunächst globale Supprimierung des myogenen Potentials über Zell-Zell-Kontakte bewältigt wird: Nach Präparation von Hühnchen Epiblasten und deren Dispersion zu einer homogenen Zelllösung, differenzieren alle plattierten Zellen in Kultur zu Skelettmuskeln aus (Holtzer et al. 1990). D.h. durch Auflösung der Zell-Zell-Kontakte geht die Supprimierung verloren und die determinierten Zellen aktivieren die myogene Differenzierung.

Das Modell der spezifischen Supprimierung des in mesodermalen Zellen globalen myogenen Differenzierungspotentials verlangt nach Mechanismen einer globalen Unterdrückung der myogenen Tendenz. Wie könnte ein Netzwerk beschaffen sein, das zur Aufhebung der Supprimierung führt und die Induktion epaxialer und hypaxialer Muskeldifferenzierung auslöst? In vitro konnte für verschiedene Faktoren

der *FGF* (fibroblast growth factor) und *TGF β* -Familie (transforming growth factor) nachgewiesen werden, dass sie aktiv myogene Differenzierung von Myoblasten Primärkulturen verhindern können und die Zellen im proliferativen Zustand halten (Olwin et al. 1994). In vivo ist die Situation wesentlich komplizierter: das zeitliche und örtliche Auftreten spezifischer Faktoren ist notwendig zur Verbreiterung der Zellgruppe von Muskelvorläuferzellen und ein differenziertes Senden und Empfangen von Signalen muss vorausgesetzt werden, um eine unterschiedliche Entwicklung von epaxialer und hypaxialer Muskulatur zu gewährleisten.

Wie in allen Vertebraten stammen auch im Hühnchenembryo alle Zellen mit myogener Determinierung aus dem Mesoderm (Ordahl and Le Douarin 1992; Ordahl 1993; Christ and Ordahl 1995; Ordahl 2000a) und werden zuerst durch *Pax3* Expression markiert (Bober et al. 1994; Goulding et al. 1994). Noch vor der Bildung des Mesoderms waren Zellen des Primitivstreifens in der Lage zu Skelettmuskel zu differenzieren, nachdem sie in die Extremität älterer Embryonen transplantiert wurden (Krenn et al. 1988). Interessanterweise konnte in diesen Zellen *Pax3* Transkription nachgewiesen werden. Es lässt sich daher vermuten, dass *Pax3* und *Lbx1* auf Muskelvorläuferzellen wirken, um diese in einem undifferenzierten proliferativen Zustand zu halten. Die durch *Lbx1* und *Pax3* vermittelte myogene Induktion könnte folgendermaßen erklärt werden: Die Überexpression führt zu einer Stimulation der Zellproliferation der Zellen mit myogenem Potential. Erst in einer zweiten Phase wird durch die Vermehrung der Muskelvorläuferzellen das myogene Potential, welches sich als Ganzes mit amplifiziert, so hoch, dass eine kritische Potentialhöhe erreicht wird, welche die myogene Differenzierung erlaubt.

Die hypaxialen Muskelvorläuferzellen des Dermamyotoms werden durch die Expression von *Pax3* (und in den Somiten auf Höhe der Extremitätenknospen auch durch *Lbx1*) markiert. Das darüber liegende Ektoderm exprimiert wie bereits erwähnt *BMP4*. Die Faktoren bewirken, dass die Muskelvorläuferzellen in einem undifferenzierten proliferativen Zustand verbleiben (Pourquie et al. 1996; Amthor et al. 1998; Amthor et al. 1999). Nach Ablation des Oberflächen-Ektoderms wird im Dermamyotom die *Pax3* Transkription herunterreguliert und nach dem Fehlen der stimulierenden Signale verlassen die hypaxialen Muskelvorläuferzellen den Zellzyklus und aktivieren die myogene Differenzierung (Heanue et al. 1999).

Diese Untersuchungen weisen auf die Bedeutung des kritischen Gleichgewichts aus Proliferation und Differenzierung während der Skelettmuskelentwicklung hin. Bei der Regulierung des Gleichgewichtes wird der Kontrolle des Zellzykluses entscheidene Bedeutung zugeschrieben. Die Zellproliferation wird reguliert durch ein Netzwerk von extra- und intrazellulären Signalkaskaden. Im Mittelpunkt stehen die Mitglieder der Gen-Familie von Cyclin-abhängigen Kinasen (cdk). Die Aktivität der cdk's ist zum einen abhängig von der Bindung spezifischer Cycline und zum anderen von der

Phosphorylierung dieser cdk/Cyclin-Komplexe durch die cdk-aktivierende Kinase (CAK) (Sherr 1994; Sherr et al. 1994). Aktivierte cdk/Cyclin-Komplexe regulieren den Zellzyklus positiv, indem sie ihrerseits das Retinoblastoma-Protein (pRB) phosphorylieren, wodurch dessen Aktivität als Zellzyklusinhibitor aufgehoben wird (Weinberg 1995). Die Regulation des Zellzyklus wird im wesentlichen durch Proteine gesteuert, die an cdk/Cyclin Komplexe binden und diese inaktivieren (Sherr 1995; Sherr and Roberts 1995).

In verschiedenen Studien ist der Einfluss des myogenen Differenzierungsfaktors MyoD auf die Regulation des G1-Kontrollpunktes während der myogener Differenzierung intensiv untersucht worden. Es konnte u.a. gezeigt werden, dass in proliferierenden Zellen die Aktivität myogener bHLH Proteine durch die Überexpression von cdk/Cyclin Komplexen inhibiert wird (Guo et al. 1995; Guo and Walsh 1997). Zur Erklärung dieser Inhibierung myogener Differenzierung existieren unterschiedliche Modelle: aufgrund der Überexpression von cdk/Cyclin Komplexen wird eine Hyperphosphorylierung von MyoD postuliert, die zur Inaktivierung von MyoD führt (Skapek et al. 1995). Andere Arbeiten weisen auf eine CyclinD1 abhängige direkte Interaktion von cdk4 und MyoD hin (Zhang et al. 1999a; Zhang et al. 1999b). Postuliert wird ein mitogen abhängiger Mechanismus: die Differenzierung wäre auf die Zellen beschränkt, die unter Mitogenentzug in die G0-Phase eingetreten sind. Da MyoD als Transkriptionsfaktor kernlokalisiert wirkt und cdk4 nur in Abhängigkeit von CyclinD1 in den Kern gelangt, wird hier ein CyclinD1 sensibler Mechanismus zur Inaktivierung von MyoD postuliert (Zhang et al. 1999a; Zhang et al. 1999b).

In anderen Arbeiten werden Bindungen von Cki-Proteinen (Zellzyklusinhibitoren) an myogene bHLH Proteine beschrieben. Insbesondere für p57 (spezifische Transkripte dieses Gens werden ausschließlich in Skelett- und Herzmuskel exprimiert) konnte gezeigt werden, dass es in der Lage ist an MyoD zu binden und infolge dessen die transaktivierende Wirkung zu inhibieren .

Neben der Wechselwirkung von myogenen Differenzierungsfaktoren mit cdk- und Cki-Proteinen wurden eine Reihe anderer Interaktionen mit Proteinen beschrieben, die eine Rolle bei der Steuerung des Zellzyklus spielen.

Neben den Protein-Protein Interaktionen konnte gezeigt werden, dass MyoD überexprimiert in der Lage ist, den cdk Inhibitor p21 zu induzieren (Guo et al. 1995; Halevy et al. 1995; Parker et al. 1995).

Es lässt sich vermuten, dass die bHLH Proteine der myogenen Differenzierungsfaktoren bei der Koordinierung des Zellzyklusaustritts und dem Start terminaler Differenzierung eine kritische Rolle spielen. In wie weit die Transkriptionsfaktoren Lbx1 und Pax3 in diesem Prozess, neben ihrer Notwendigkeit während der Zellmigration, einen Part übernehmen, lässt sich nur vermuten. Ihre überlappende Expression im Dermamyotom und in den migrierenden hypaxialen

Muskelvorläuferzellen markiert evtl. die Proliferation undifferenzierter Zellen (wie bereits oben erwähnt). Ob durch Pax3 und Lbx1 regulierte Zielgene eine Funktion in der Inhibierung myogener bHLH Proteine besitzen, oder ob sie einer myogenen Differenzierungstendenz entgegenwirken, indem sie mitogene Signale regulieren, ist reine Spekulation.

Es lässt sich festhalten, dass Lbx1 und Pax3 überexprimiert in der Lage sind, die Zellproliferation zu stimulieren und Markergene einer myogenen Differenzierung zu aktivieren. Ob die Induktion myogener Differenzierung durch Lbx1 bzw. Pax3 direkt induziert wird, oder ob Lbx1 und Pax3 lediglich die Proliferation hypaxialer Muskelvorläuferzellen stimulieren und diese dann autonom die myogene Differenzierung initiieren, bleibt ungeklärt.

5.2.3 Pax3 und Lbx1 – eine wechselseitige Regulation ?

Die Expressionsmuster von *Lbx1*, *Pax3* und *Dach2* sind innerhalb der hypaxialen Skelettmuskelentwicklung identisch. Alle drei Faktoren markieren die delaminierenden, migrierenden und differenzierenden hypaxialen Muskelvorläuferzellen, die die Extremitäten besiedeln. Die Vermutung nach wechselseitiger Regulation der Faktoren untereinander wurde z.T. innerhalb der vorgestellten Untersuchungen bestätigt. Retroviral überexprimiertes Lbx1 induzierte in ex vivo Kollagen-Gewebe-Kulturen die Transkription von Pax3 und Dach2. In ähnlicher Weise wurde Lbx1 und Dach2 nach Überexpression von Pax3 hochreguliert. Vergleichbare Experimente zeigten, dass Dach2 ebenfalls in der Lage ist die Pax3 Transkription zu aktivieren (Heanue et al. 1999). Die zitierte Studie identifizierte einen über *Pax3* und *Dach2* vermittelten Mechanismus von Genregulationen und Proteininteraktionen zur Aktivierung der hypaxialen myogenen Differenzierung. Die Proteine *Eya2* und *Six1*, welche z.T. mit der Expression von *Pax3* und *Dach2* überlappen, wurden dabei als zusätzliche wichtige Faktoren identifiziert (Heanue et al. 1999).

Die Ergebnisse der gegenseitigen Aktivierung resultieren aus der Untersuchung von ex vivo Gewebe-Kulturen. Sie lassen eine gegenseitige Regulation der Faktoren *Lbx1*, *Pax3* und *Dach2* vermuten. Jedoch zeigten diese Experimente auch, dass die Bedingungen von ex vivo Kulturen nicht unbedingt der in vivo Situation entsprechen. So zeigen Mox-2 defiziente Mäuse u.a. massive Störungen in der Entwicklung hypaxialer Extremitätenmuskulatur. Den Extremitäten fehlen einige Muskeln vollständig und die restlichen Muskelkompartimente sind in ihrer Größe bedeutend reduziert. Die gezielte Analyse der Mutanten offenbarte u.a. den Verlust der Pax3 Transkription in den migrierenden Muskelvorläuferzellen und eine Reduzierung von

Myf-5 positiven differenzierenden hypaxialen Myoblasten. Dagegen konnte die Expressionen von *Lbx1* in den migrierenden Zellen und *MyoD* in differenzierenden Myoblasten, als annähernd dem endogenen Muster entsprechend, detektiert werden (Mankoo et al. 1999).

Der Verlust von *Pax3* positiven Zellen bei annähernd normaler *Lbx1* Transkription in der sich entwickelnden Extremität spricht für eine komplexe stadienspezifische wechselseitige Regulation von *Lbx1* und *Pax3*. Unter ex vivo Konditionen fehlen wahrscheinlich Faktoren und Signalmoleküle von umgebenden Geweben. Aus diesem Grund kann z.B. explantiertes Mesodermgewebe unter ex vivo Bedingungen keine Signale vom Notochord, Neuralrohr oder Oberflächenektoderm empfangen und interpretieren. Es lässt sich daher festhalten, dass die Transkriptionsfaktoren *Lbx1* und *Pax3* unter gegebener Situation eine wechselseitige Regulation aufweisen, die Gene aber vermutlich trotzdem unterschiedliche Stationen verschiedener Genkaskaden sind, und in Folge dessen als Antwort verschiedener Signale unterschiedliche Aktivierungen erfahren. Die ursprüngliche Annahme *Pax3* stehe innerhalb einer Genkaskade über *Lbx1* und *Dach2* konnte mehrfach widerlegt werden: In *Spotch* Mäusen (*Pax3* defizient) ist in hypaxialen Muskelvorläuferzellen keine *Lbx1* Transkription detektierbar (Mennerich et al. 1998), während *Dach2* normal exprimiert wird (Heanue et al. 1999). Das bedeutet, zumindest für *Dach2* existieren sowohl für die initiale Aktivierung als auch für die Aufrechterhaltung der Expression andere Mechanismen. Die Situation für *Lbx1* scheint differenzierter zu sein. Das Fehlen der *Lbx1* Expression in *Spotch* Mutanten und die in dieser Arbeit beschriebene sehr frühe *Lbx1* Expression (HH14) im ventro-lateralen Somiten deutet auf eine durch *Pax3* induzierte initiale *Lbx1* Transkription hin. Nach erfolgter initialer *Lbx1* Aktivierung kommt es dann zu einer wechselseitigen Regulation der beiden Faktoren in hypaxialen Muskelvorläuferzellen. Diese Theorie wird gestützt durch die Situation der ventro-lateralen hypaxialen Muskelvorläuferzellen in der *Lbx1* defizienten Maus. Hier delaminieren die *Pax3* positiven Zellen zunächst noch aus, zeigen aber dann aufgrund des fehlenden *Lbx1*-Proteins kein orientiertes Migrationsverhalten und eine signifikante Herunterregulation von *Pax3* (Schäfer and Braun 1999; Brohmann et al. 2000; Gross et al. 2000). Dagegen spricht die annähernd normale *Lbx1* Expression in den *Mox-2* Mutanten, während *Pax3* in der Extremität nicht detektiert wurde (Mankoo et al. 1999). Vermutlich genügt die im Dermamyotom dieser Mäuse vorhandene normale *Pax3* Expression aus, um *Lbx1* zum Zeitpunkt der Delamination der Vorläuferzellen initial zu aktivieren.

Zusätzlich wird für die Aktivierung und Aufrechterhaltung der *Lbx1* Transkription zumindest ein weiterer Faktor benötigt. Dieser könnte, zur Erklärung der frühen *Lbx1* Expression, in allen ventro-lateralen Somiten (HH14), zunächst parallel aller Somiten (ob laterales Plattenmesoderm oder Oberflächenektoderm ist reine Spekulation) exprimiert werden, und nach der Knospung der Extremitäten sich auf diese Bereiche

beschränken. Diese Vorstellung erweitert die ursprüngliche Feststellung „*Pax3* ist notwendig zur *in vivo* Aktivierung von *Lbx1*“. Sie würde für die initiale *Lbx1* Aktivierung gelten. Dagegen scheint für Aufrechterhaltung der *Lbx1* Transkription in Muskelvorläuferzellen zu gelten, dass *Pax3* ist nicht notwendig (*Mox-2* *-/-*) aber hinreichend (*ex vivo* Explantate dieser Arbeit) für die Aufrechterhaltung einer *Lbx1* Transkription ist.

Es ist klar, dass *Pax3* in der Lage ist, die *Lbx1*-Transkription initial zu aktivieren. Bestätigung hierfür zeigen die Resultate der induzierten *Lbx1* Aktivierung in den *ex vivo* Gewebe-Explantat Kulturen und die frühembryonale überlappende Expression (HH14) von *Pax3* und *Lbx1* im ventrolateralen Bereich aller Somiten. Mit fortlaufender embryonaler Entwicklung könnte *Lbx1* reprimiert werden, entgegen der durch *Pax3* vermittelten Aktivierung, was zu einer Ausschaltung des *Lbx1* Gens in den entsprechenden Bereichen führt. *Lbx1*-reprimierende Faktoren könnten aus dorsalen Bereichen der Somiten oder aus dem überliegenden Ektoderm stammen. Lediglich in den Somiten auf Höhe der auswachsenden Extremitäten kommt es zu einer Derepression von *Lbx1*, so dass die hypaxialen Muskelvorläuferzellen in der Lage sind, *Lbx1* zu exprimieren und die gezielte Migration auszuführen.

Weder durch die *Pax3* unabhängige *Lbx1* Expression in den Extremitäten der *Mox-2* Mutanten, noch die Erkenntnisse der wechselseitigen *ex vivo* Aktivierungen lassen eine Festlegung auf eine der Modellvorstellungen zu. Ob es zu einer *Lbx1*-Repression mit regionaler Derepression in den Somiten auf Höhe der Extremitäten kommt, oder ob ein zusätzlich aktivierender Faktor existiert, welcher zunächst lateral in allen Somiten vorliegt und sich nach Knospung der Extremitäten auf diese beschränkt, lässt sich anhand der vorliegenden Untersuchungen nicht vorhersagen.

5.2.4 Der „community effect“

Die *ex vivo* Gewebe-Kollagen-Kulturen zeigten nach retroviraler Überexpression von *Lbx1* oder *Pax3* neben der Induktion myogener Differenzierung auch eine gesteigerte Zellproliferationsrate. Besonders in den Somiten-Kulturen wird eine um ein vielfaches gesteigerte Proliferationsrate, im Vergleich zu den unbehandelten oder mit dem Kontrollvirus (RCASBP(A)-hAP) infizierten Kulturen, detektiert. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Situation im Dermamyotom: dermamyotomale Zellen sind proliferierende undifferenzierte Muskelvorläuferzellen, welche u.a. durch *Pax3* (und *Pax7*), *c-met*, *Dach2* und *Lbx1* markiert werden. In den bereits erwähnten Ablationsexperimenten wird z.B. durch Entfernen des Ektoderms die *BMP4* Quelle entzogen, so dass es zur Herunterregulierung von *Pax3* kommt und die

dermamyotomalen Zellen aus dem Zellzyklus heraustreten und die myogene Differenzierung starten (Pourquie et al. 1995; Pourquie et al. 1996).

Zur Überprüfung des Zusammenhanges von Proliferation und myogener Differenzierung wurden die ex vivo Gewebe-Kulturen nach retroviraler Infektion mit Mitomycin C behandelt. Obwohl die Muskelvorläuferzellen nach retroviraler Überexpression von Lbx1 oder Pax3 Signale zur Proliferation vermittelt bekommen, sind sie nach der Mitomycin C Behandlung nicht in der Lage, den Zellzyklus zu durchlaufen. Die RT-PCR Analyse ergab, dass die Faktoren *Pax3*, *Lbx1* und *Dach2* sich weiterhin in ihrer Transkription wechselseitig regulieren, während die Zellen keine myogene Differenzierung (*MyoD*, *Myogenin*, *MHC*) zeigten. Die Resultate dieser Untersuchung stimmen mit der Hypothese eines kritischen Schwellenwertes überein, den es zu erreichen gilt: Die Überexpression von Lbx1 oder Pax3 führt zunächst zu einer Stimulation der Proliferation der Zellen mit myogenen Potential. In einer zweiten Phase wird durch die Vermehrung der Muskelvorläuferzellen das myogene Potential so erhöht, dass eine kritische Grenze überschritten wird, von der ab die myogene Differenzierung autonom abläuft. Da mit der Blockierung der Proliferation die Erhöhung der Muskelvorläuferzellzahl und somit die Amplifikation des myogenen Potentials verloren geht, wird die myogene Differenzierung nicht aktiviert.

Studien an determinierten Muskelvorläuferzellen während der Embryonalentwicklung des Krallenfrosches *Xenopus laevis* wiesen auf das Phänomen hin, dass Muskelvorläuferzellen nur dann in der Lage sind, als Antwort auf induktive Signale die myogene Differenzierung zu aktivieren, wenn sie sich in einer Zellgruppe mit ausreichender Größe befanden. Dieses Phänomen wurde als „community effect“ beschrieben (Gurdon 1988). Er besagt, dass Zellen nur dann in die myogene Differenzierung eintreten, wenn sie sich in einer Gruppe mit kritischer Mindestgröße befinden. Spätere Experimente konnten diese Theorie bestätigen: Transplantiert man eine Zelle mit myogener Determinierung aus Embryonen im Gastrulastadium in ektopische Regionen, so differenziert sie nicht zur Skelettmuskelzelle. Verpflanzt man dagegen im gleichen Experiment eine Gruppe von Zellen, so differenzieren sie an ektopischer Lokalisation zu Skelettmuskelzellen. Entsprechend konnte gezeigt werden, dass mesodermale Muskelvorläuferzellen, präpariert aus Somiten und Extremitätenknospen von Mausembryonen, nur nach Erlangen einer minimalen Zellzahl zu Muskel differenzieren können (Cossu et al. 1995; Cossu et al. 1996). Resultate wie diese und die beschriebenen ex vivo Untersuchungen weisen auf die wichtige Funktion des Gruppeneffektes hin. Demnach sind Muskelzellen in der Lage, entgegen vorhandenen mitogene Signale zu differenzieren, wenn sie ein kritisches myogenes Gesamtpotential erreicht haben. Dabei könnten die proliferativen Signale durch das Auftreten wirksamer Antagonisten oder durch Herunterregulation ersetzt werden (Amthor et al. 1999).

Die Analyse der *Spotch* *-/-* und *Pax7* *-/-* Doppelmutanten (pränatal letal) offenbarte eine verkümmerte Entwicklung des Dermamyotoms und des Myotoms. Die noch differenzierten Skelettmuskelzellen waren in ihrer Anzahl deutlich reduziert, wobei im Myotom ein annähernd kompletter Verlust myogener Differenzierung detektiert wurde (mündliche Mitteilung durch Herrn Dr. Ahmed Mansouri). Diese Doppelmutanten exprimieren demnach kein *Pax3*, kein *Pax7* und auch kein *Lbx1* (wird in hypaxialen Muskelvorläuferzellen von *Spotch* Mäusen nicht exprimiert (Mennerich et al. 1998). Jedoch markieren die Faktoren *Lbx1*, *Pax3* und *Pax7* im Dermamyotom die Muskelvorläuferzellen, um diese in einem undifferenzierten und proliferativen Zustand zu halten. Nach dem Verlust dieser Transkriptionsfaktoren sind die Zellen des Dermamyotoms in der Lage zu proliferieren und so ihr myogenes Potential zu verstärken, so dass durch den „community effect“ der Verlust des Großteils der epaxialen und hypaxialen Muskeln zu erklären ist.

Bei den hier beschriebenen Interpretationen sollte nicht unerwähnt bleiben, dass erhebliche experimentelle Unterschiede zwischen einer in vivo, ex vivo und in vitro Situation existieren. So lässt sich die Interpretation des „Community effect“ wiederum nicht mit den Beobachtungen der in vitro Dispersion von Hühnchen-Epiblastzellen, welche in Kultur myogen differenzieren (Holtzer et al. 1990), in Einklang bringen.

Abschließend lässt sich nur schwer entscheiden, welcher Modellmechanismus die hypaxiale und epaxiale Skelettmuskelentwicklung am nächsten beschreiben. Existiert eine „aktive Induzierung“ oder eine „spezifische Supprimierung“? Spielt der „community effect“ in diesem Zusammenhang eine Rolle oder nicht? Wenn ja, zu jedem Zeitpunkt der embryonalen Muskelentwicklung oder nur in einem begrenzten Zeitfenster?

Klar ist jedoch, dass die Skelettmuskelentwicklung ein von positiv und negativ wirkenden Faktoren und Signalen gesteuertes Netzwerk ist, welches sich vermutlich nicht durch auf von zwei bis drei Modellvorstellungen reduzieren lässt. Die hier beschriebenen Untersuchungen und Interpretationen integrieren lediglich einen Teil der Erkenntnisse der embryonalen Skelettmuskelentwicklung von Vertebraten. Dabei ist versucht worden, die kritische Rolle der Transkriptionsfaktoren *Lbx1* und *Pax3* in das Geflecht von Beteiligungen verschiedenster Moleküle einzuordnen.

Es ist unumstritten, dass Transkriptionsfaktoren bei den verschiedenen Entwicklungen von Zellen grundsätzlich wichtige Schritte steuern. Verschiedene Studien weisen daraufhin, dass während der embryonalen Entwicklung und adulter Regeneration unterschiedlichster Zelltypen dieselben Mechanismen und Faktoren involviert sind.

So konnte gezeigt werden, dass die bHLH-Proteine myogener Differenzierungsfaktoren neben ihrer Schlüsselrolle während der embryonalen Entwicklung von Skelettmuskulatur, auch während der Regeneration von Muskelverletzungen von entscheidender Wichtigkeit sind. Wie während der

embryonalen Myogenese so kommt es auch während der Regeneration zu einem kontrollierten Gleichgewicht aus Proliferation von Muskelvorläuferzellen und deren terminaler myogener Differenzierung.

Auf den folgenden Seiten wird die Rolle des bHLH Transkriptionsfaktors *Myf-6* während der embryonalen Myogenese und dessen Notwendigkeit während der Muskelregeneration im adulten Organismus beschrieben.

5.2.5 Ein heterozygoter Myf6 Genotyp führt zu einer leichten Myopathie und gepaart mit einer Dystrophinopathie des Typs Becker erschwert sie den Krankheitsverlauf massiv

Die in Patient P6 detektierte heterozygote Mutation im myogenen Differenzierungsfaktor *Myf-6* wurde mit einer milden Myopathie korreliert. Die Beschwerden des Jungen (Muskelschwäche und Krampfneigung) manifestierte sich in der Muskelbiopsy-Untersuchung durch eine leicht erhöhte Zahl zentral lokalisierter Zellkerne in den Muskelfasern, durch vereinzelte Ringfasern, Faserdegenerationen und Fetttröpfcheneinlagerungen. Der bedeutend schwerere Krankheitsverlauf des Vaters P5, der ebenfalls Träger der heterozygoten *Myf6* Mutation ist, begründet sich mit höchster Wahrscheinlichkeit mit der genetischen Kombination der zusätzlichen In-Frame-Deletion im Dystrophingen. Die pathologische Analyse des Quadriceps zeigt massive Defekte: massiv erhöhte Zahl zentral lokalisierter Zellkerne, vereinzelte Fettablagerungen, Faseratropie und eine Fibrose.

In einer Muskelfaser sind die einzelnen Myofibrillen durch ein System aus Desmin-Intermediärfilamenten untereinander verbunden. Diese Anordnung aus Myofibrillen ist über verschiedene Proteine an der Plasmamembran der Muskelfaser verankert. Dystrophin ist eines dieser Proteine (Alberts 1994). Sowohl im Menschen (Bushby et al. 1993a; Bushby et al. 1993b), als auch in der Maus (Bhagwati et al. 1996) sind natürlich vorkommende Mutationen im Dystrophingen beschrieben .

Die humane In-Frame-Deletion des Dystrophingens begründet in der Regel einen milden Krankheitsverlauf und wird als Dystrophinopathie des Typs Becker (BMD) bezeichnet (Morandi et al. 1995a). Neben dieser Variante existiert ein weitaus schwerwiegender Krankheitsverlauf bei der Dystrophinopathie des Typs Duchenne (DMD) (Bushby et al. 1993b; Morandi et al. 1995b). Hier liegt eine Leseraster-Verschiebung vor, so dass im Gegensatz zur BMD kein verkürztes Protein, sondern ein nicht funktionelles Restprotein produziert wird.

Obwohl der Patient P5 genotypisch der BMD entspricht, zeigte er einen Krankheitsverlauf der dem des DMD Typs ähnelte. Unter einer Gruppe von sechs bekannten Dystrophinopathie Patienten des Typs Becker zeigte der Patient P5 mit

Abstand den schwersten Krankheitsverlauf. Es lag nahe, die in Patient P5 zusätzliche heterozygot vorliegende *Myf6* Mutation als mögliche Ursache, für den nicht zu erwartenden Verlauf verantwortlich zu machen.

Der beschriebene biochemische Funktionsverlust des mutierten *Myf-6* Proteins lässt vermuten, dass das mutante *Myf-6* Protein nicht als dominant negatives Molekül agiert, sondern dass die Krankheitsverläufe sich durch eine haploide Insuffizienz des wildtyp Proteins erklärt.

Das *Myf-6* Gen ist das am wenigsten charakterisierte Protein der *MyoD*-Familie. Das *Myf-6* Expressionsmuster unterscheidet sich deutlich von dem der Gene *Myf-5*, *MyoD* und *Myogenin*. Im sich entwickelnden Mausembryo wird *Myf-6* lediglich transient von Embryonaltag E9.0 bis E11.5 im Myotom transkribiert und anschließend wieder herunterreguliert (Bober et al. 1991; Braun and Arnold 1995). Erst spät innerhalb der fötalen Phase und nach der Geburt wird *Myf-6* massiv hochreguliert (Zhang et al. 1995).

Myf-6 ist der am stärksten exprimierte myogene Differenzierungsfaktor während der Reifung von Skelettmuskeln in adulten Vertebraten (Ordahl 2000b). *Myf-6* defiziente Mäuse, die parallel von drei Laboratorien generiert wurden, brachten in dieser Hinsicht wenig Aufschluss (Braun and Arnold 1995; Patapoutian et al. 1995; Zhang et al. 1995). Neben dem unterschiedlich ausgeprägten Rippenphänotyp (, welcher sich vermutlich nicht auf die Ausschaltung des *Myf-6* Gen begründet)(Kaul et al. 2000) wurde eine jeweils retardierte und z.T. reduzierte Myogenese im Myotom der Embryonen beobachtet. Die einzig lebensfähige Mauslinie zeigt im adulten Muskel keine morphologischen Defekte, jedoch konnte eine signifikante Hochregulierung von *Myogenin* detektiert werden (Zhang et al. 1995). Interpretiert wurde dieser Effekt durch das Fehlen von *Myf-6*, welches verantwortlich für die *Myogenin* Herunterregulation ist, bzw. durch eine kompensatorische Erhöhung von *Myogenin*.

Bei Betrachtung der humanen Krankheitsverläufe lässt sich eine *Myf-6* Funktion im adulten Muskel vermuten, wie sie bereits für den myogenen Differenzierungsfaktor *MyoD* beschrieben wurde. *MyoD* defiziente Mäuse weisen während der Skelettmuskelregeneration eine Proliferation der an der Basallamina befindlichen Satellitenzellen auf, welche jedoch nur in reduziertem Maße fähig sind zu differenzieren, so dass nach Verletzungen lediglich eine inkomplette Regeneration zu Stande kommt (Megoney et al. 1996). *MyoD*^{-/-}, *mdx*^{-/-}. Doppelmutanten (das murine *mdx* Gen entspricht dem humanen Dystrophingen und ist in beiden Organismen auf dem X-Chromosom lokalisiert, so dass Männchen nur ein Allel tragen und die männlichen Nullmutanten als hemizygoter Genotyp *-/-*. bezeichnet werden) zeigen eine deutlich ausgeprägte Myopathie. In *MyoD* defizienten Muskeln kommt es nach Verletzung zur induzierten Proliferation der Satellitenzellen, jedoch können die entstehenden Muskelvorläuferzellen aufgrund des Fehlen des

Differenzierungsfaktors nicht aus dem Zellzyklus heraustreten, um die myogene Differenzierung zu vollenden (Megeney et al. 1996).

Die Analyse der im Mausmodell nachgestellten Patientengenotypen lässt eine ähnliche Interpretation zu. Die Annahme, dass Myf-6 ebenfalls ein wichtiger Faktor innerhalb der adulten Maturation und Regeneration von Skelettmuskelzellen sei, könnte eine vorliegende haploide Insuffizienz den milden myopathischen Krankheitsverlauf des Sohnes P6 erklären. Erst die Kombination aus einem fehlenden funktionellen Allel des *Myf-6* Gens mit einer Dystrophinopathie des Genotyps Beckers potenziert die Phänotypen zu den massiven Defekten in der Regeneration, wie sie beim Vaters P5 beobachtet wurden.

Allerdings lassen sich die im Mausmodell nachgestellten Patienten-Genotypen nur bedingt mit der humanen Situation vergleichen. Die Skelettmuskulatur eines größeren Säugers, wie dem Menschen, ist nicht direkt mit der eines kleinen Säugers, wie der Maus, vergleichbar. Deutlich wird dies z.B. bei der Länge der Muskelfasern. Die Muskeln der Maus und des Menschen sind unterschiedlich starken Belastungen ausgesetzt. Bei den Interpretationen der Untersuchungen müssen diese Unterschiede berücksichtigt werden, was die Übertragbarkeit der Resultate von der Maus auf den Menschen relativiert.

5.3 Ausblick

Die hier vorgestellten Untersuchungen und Interpretationen geben einen Einblick in die Entwicklungs- und Regenerationsmechanismen der Skelettmuskeln in Vertebraten. Heutige Forschungsanstrengungen konzentrieren sich besonders auf die Analyse der Funktion und Regulation einzelner Moleküle, die die Zelldifferenzierung, die Proliferation und Musterbildung von Muskelzellen steuern. Dabei ist es zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht gelungen alle Aspekte bis ins Detail aufzuklären.

Einen methodischen Vorteil bei der Erforschung von Entwicklungsphänomenen stellt die Nutzung verschiedener Modellorganismen dar. Je nach Experiment bieten verschiedene Organismen unterschiedlich gute Untersuchungsansätze. So bleibt das „Königsexperiment“ der gezielten Geninaktivierung (Knock out) in der Maus das zur Zeit wohl aussagereichste Experiment, um die Funktion einzelner Transkriptionsfaktoren oder Signalproteine zu erschließen. Da aber oft nicht alle Fragen innerhalb eines Knock-out Experimentes gelöst werden können, oder der Phänotyp erst neue Fragestellungen aufwirft, bieten die unterschiedlichen Modellorganismen verschiedene Ansätze an. So zeigte die gezielte *Lbx1* Geninaktivierung in der Maus (Schäfer and Braun 1999; Brohmann et al. 2000;

Gross et al. 2000) die Notwendigkeit von Lbx1 für die gezielte Migration der hypaxialen Muskelvorläuferzellen auf. Jedoch konnte man über den Mechanismus der Wirkung des Transkriptionsfaktors nur spekulieren. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch die retrovirale Überexpressionen von Lbx1 ein anderer Aspekt beleuchtet werden.

Es stellt sich die Frage, ob sich der komplexe Ablauf der Muskelentwicklung durch eine singuläre Abfolge von Regulationsphänomenen darstellen lässt – wahrscheinlich nicht. Es lässt sich vermuten, dass mehrere parallele Genkaskaden und Prozesse involviert sind, die zusammen die Entwicklung einer pluripotenten Zelle zum Skelettmuskel steuern. Es erscheint vordringlich, die direkten Zielgene der einzelnen Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, um die einzelnen Aspekte der hintereinander oder parallel verlaufenen Aktivierungen zu verstehen.

Innerhalb der *MyoD* Genfamilie ist man relativ weit fortgeschritten: man kennt synergistisch wirksame Transkriptionsfaktoren wie *Mef-2*, die durch MyoD aktiviert werden (Cheng et al. 1993; Buchberger et al. 1994), sowie auf Proteinbasis ihre zur Transaktivierung benötigten Kofaktoren, wie die bHLH E-Proteine und Antagonisten wie *ID-1*, *Twist* und *Hes-1*. Verschiedene Zielsequenzen und -gene der *MyoD* Transkriptionsfaktoren sind beschrieben, wie der Myosin-Light-Chain Enhancer (MLC). Jedoch bezieht sich dieses Wissen fast ausschließlich auf die myogene Differenzierung, wobei die Proliferation der nicht differenzierenden Muskelvorläuferzellen und deren programmierter Wechsel zur Differenzierung noch relativ wenig verstanden ist. Es sind einzelne Faktoren bekannt, die auf diese Prozesse Einfluss nehmen, wie z.B. *Pax3*, *Pax7*, *Lbx1*, *Mox-2*, *Tbx1*, *Sim-2* u.s.w. Aber es ist noch unerforscht wie diese Gene selbst reguliert werden, und welche Gene sie in der Lage sind zu aktivieren oder reprimieren.

Vermutlich lässt sich erst eine endgültige Bewertung der Modelle wie „aktive Induktion“, „spezifische Supprimierung“ oder die Interpretation des „community effects“ vornehmen, wenn sämtlich involvierte Faktoren charakterisiert sind.

Durch die Vorgehensweise der reversen Genetik, wie am Beispiel der humanen Myf-6 Mutationen praktiziert, wo gezielt nach der Ursache eines genetischen Defektes gesucht wird, gelangt man zu Diagnosen oder möglichen Funktionserklärungen, jedoch ohne die Details oder konkreten Mechanismen erklären zu können.

6 Anhang

6.1 Abkürzungen

A	Adenin
bp	Basenpaar
BMD	Dystrophinopathie des Typs Becker
BSA	Bovine serum albumine
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CAT	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase
cDNA	zur RNA komplementäre DNA
CEF	Chicken Embryonal Fibroblasten
CMV	Cytomegalovirus
Dig	Digoxigenin
DMD	Dystrophinopathie des Typs Duchenne
E10.0	Embryonaltag 10
EMSV	ekotropher Moloney Sarkoma Virus
EtOH	Ethanol
FCS	Fötale Kälberserum
FGF	fibroblast growth factor
G	Guanin
HH	Hamburger-Hamilton-Stadium
h	Stunde
HGF	hepatocyte growth factor
IU/ml	Infektionseinheiten pro Milliliter
Kb	Kilo-Basepaare
KDa	Kilo-Dalton
LacZ	β -Galaktosidase
Lsg.	Lösung
MHC	myosin heavy chain
min.	Minute
mut	Mutante
myf	myogenic factor
NL	Niederlande
p.a.	per analysis
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SF	Scattor factor
T	Thymin
TGF	transforming growth factor
ü.N.	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
wt	wildtyp

6.2 Lösungen und Medien

10x PBS	80.0 g NaCl, 2.0 g KCl, 14.4 g Na ₂ HPO ₄ (2H ₂ O), 2.0 g KH ₂ PO ₄ , ad 1000 ml H ₂ O, autoklavieren
10x TBE	121.4 g Tris Base, 51.32 g Borsäure, 3.68 EDTA, ad 1000 ml H ₂ O, pH 8.0, autoklavieren
10x TE	100 ml 1M Tris Base, 20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0), ad 1000 ml H ₂ O, autoklavieren
10xTBST	(100ml): 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl 25 ml Tris HCl pH 7.5, 10% Tween-20, autoklavieren. Zum Gebrauch verdünnen auf 1x TBST und Levimasole auf 2mM zugeben (50 ml = 24 mg Levimasole)
20x SSC	87.65 g NaCl, 4.41 g Na-Citrat, 400 ml H ₂ O, pH mit NaOH o. Citricacid einstellen, ad 500 ml H ₂ O, autoklavieren
2x Binding Puffer	20 mM Hepes pH 7.9, 34 % Glycerin, 0.2 mM EDTA, 100 mM KCl, 8 mM Spermidin, 4 mM MgCl ₂
2xSDS Ladepuffer	40 ml H ₂ O, 1.52 g Tris Base, 20 ml Glycerol, 2.0 g SDS, 2 ml β-Mercaptoethanol, 1 mg Bromphenolblau, pH 8.0 mit HCl einstellen, ad 100 ml H ₂ O
4% PFA	40.0 g Paraformaldehyd, ad 800ml H ₂ O, auf 60°C erhitzen, mit 2N NaOH klären, 100ml 10x PBS zugeben, pH 7.0, ad 1000 ml H ₂ O, steril filtrieren
50x TAE	242.0 g Tris Base, 57.1 ml konz. Essigsäure, 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0), ad 1000 ml H ₂ O, autoklavieren
5x Annealing Puffer	200 mM Tris pH 7.4, 100 mM MgCl ₂ , 250 mM NaCl, autoklavieren
DIGMix	25 µl DIG-11-UTP [10mM], 4.6µl UTP [100mM], 7.1 µl rGTP [100mM], 7.1 µl rATP [100mM], 7.1 rCTP [100mM], 20.5 µl 10 mM TrisBase pH 7.5
DMix	1% IGEPAL (or NP-40), 1% SDS, 0.5% Deoxycholate, 50 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl
DNase Puffer	40 mM Tris Base pH 8.0, 10 mM NaCl, 6 mM MgCl ₂ , DEPC H ₂ O inkl. RNasin
Embryopuder	Homogenisieren von 12.5-14.5d Embryonen (Maus) in minimalen Volumen PBS, 4 Volumen eiskaltes Aceton zugeben, mischen und 30 min. auf Eis inkubieren, 10 min bei max Drehzahl zentrifugieren, Überstand verwerfen, Pellet mit eiskaltem Aceton waschen, erneut fügen, Pellet fein zerkleinert auf Filterpapier ausstreichen, Luft trocknen lassen, zermörsern, bei 4°C in Eppi lagern.
Hybridisierungslösung	50% Formamid, 5x SSC pH 4.5 (pH mit citric acid einstellen), 50µg/ml yeast-bzw. t-RNA, 1% SDS, 50µg/ml Heparin (und für die Hybridisierung : 1µg/ml RNA-Probe)
NTMT	100 mM NaCl, 100 mM Tris HCl pH 9.5, 50 mM MgCl ₂ , 0,1 % Tween-20 und frische Zugabe von Levimasole 2mM (=24 mg pro 50 ml)
PBT	1000ml 1x PBS, 1 ml TWEEN-20
PC-Medium	A: 121.0 g NaCl, 15.42 g CaCl ₂ (2H ₂ O), 12.7 g MgCl ₂ (6H ₂ O), ad 1000 ml H ₂ O, autoklavieren; B: 2.4 g Na ₂ HPO ₄ (2H ₂ O), 0.19 g NaH ₂ PO ₄ (2H ₂ O), 1000 ml H ₂ O, autoklavieren; wie folgt zusammengeben: 40 ml A, 900 ml H ₂ O, 60 ml B
Ringer	7.2 g NaCl, 0.23 g CaCl ₂ (2H ₂ O), 0.37 KCl, ad 1000 ml H ₂ O, pH 7.2, autoklavieren
RNA-Lysispuffer	25.0 g Guanidiumthiocyanate, 1.76 ml 0.75 M Na-Citrat (pH 7.0), 2.64 ml 10% Sarkosyl, 38 µl β-Mercaptoethanol, ad 50 ml DEPC H ₂ O
SolA	50 % Formamid, 5x SSC pH 4.5, 1 % SDS
SolB	0.5 M NaCl, 10 mM Tris HCl pH 7.5, 0,1 % Tween-20
SolC	50 % Formamid, 2x SSC pH 4.5
Solubilisierungs Puffer	50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP 40, 4 µg/ml PMSF
Waschpuffer A	10 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.2 % NP 40, 2 mM EDTA, autoklavieren
Waschpuffer B	10 mM Tris pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.2 % NP 40, 2 mM EDTA, autoklavieren
Waschpuffer C	10 mM Tris pH 7.5, autoklavieren
Z-Puffer	0.06 M Na ₂ HPO ₄ , 0.04 M NaH ₂ PO ₄ , 0.01 M KCl, 1 mM β-Mercaptoethanol

6.3 Curriculum vitae

Persönliche Angaben

Dipl.Chem. Detlev Mennerich



Telefon 0171-4316360
 Fax 0345-2904572
 e-Mail detlevmennerich@gmx.de

Geburtstag / -ort 23.12.1969 in Veerßen (jetzt Uelzen)
 Familienstand ledig

Schulbildung

08.76 – 06.80 Grundschule Himbergen, Samtgemeinde Bad Bevensen
 09.80 – 05.90 Lessing-Gymnasium, Uelzen
 07.05.90 Abitur – Allgemeine Hochschulreife (Gesamtnote 2,6)

Grundwehrdienst

10.90 – 09.91 Grundwehrdienst, Munster

Studium

10.91 – 05.97 Studium der Chemie, Technische Universität Braunschweig
 04.94 – 07.94 Wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Biochemie und Biotechnologie („Screening und Sequenzierung von Transkriptionsfaktoren der Nk - Genfamilie“)
 09.94 – 07.95 Auslandsstudium, Université de Bordeaux I, Frankreich, Laboratoire de Cristallographie et de Physique Cristalline, Prof. Dr. M. P. Marsau <<Élaboration et purification des siderophores et détermination de la structure moléculaire et cristalline d'un Endoperoxide-diphényle-tetraméthylantracène>>
 10.95 – 04.96 Wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Biochemie und Biotechnologie („Klonierung und Charakterisierung von Transkriptionsfaktoren der Nk - Genfamilie“)
 09.96 – 05.97 Diplomarbeit bei PD Dr. Eva Bober, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Zell- und Molekularbiologie, TU Braunschweig „Funktionelle Analyse der Transkriptionsfaktoren Nkx5 -1 und Nkx5-2“
 09.05.97 Diplom der Chemie (Gesamtnote: sehr gut)

Promotion

ab 06.97 Doktorarbeit bei Prof. Dr. Dr. Thomas Braun, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Zell- und Molekularbiologie, TU Braunschweig „Regulation der Entwicklung und Regeneration von Skelettmuskelzellen durch die Transkriptionsfaktoren Lbx1 und Myf-6“
 seit 02.99 Wechsel an die Medizinische Fakultät der Martin -Luther Universität Halle-Wittenberg nach der Berufung von Prof. Dr. Dr. Thomas Braun an den Lehrstuhl der Physiologischen Chemie

6.4 Tagungsbeiträge und Publikationen

Tagungsbeiträge

- 30.10. – 31.10.1997 Vortrag „Screening and testing of candidate genes involved in pathfinding of limb muscle cells“, Workshop des SFB 271 (Molekulare Genetik morphoregulatorischer Prozesse), Volpriehausen
- 12.03. – 13.03.1999 Vortrag “Heterozygous mutation in myogenic factor Myf6 causes mild myopathy and aggravates the phenotype of Becker muscular dystrophinopathy”, Workshop des SFB 271 (Molekulare Genetik morphoregulatorischer Prozesse), Goslar
- 22.03. – 25.03.1999 Poster “Heterozygous A112S missens mutation in the helix I region of myogenic factor Myf6 associated with mild myopathy and phenotype modification of dystrophinopathy” 13. Tagung für Entwicklungsbiologie GfE, Freiburg
- 19.06. – 23.06.1999 Poster “Heterozygous A112S missens mutation in the helix I region of myogenic factor Myf6 associated with mild myopathy and drastically increased phenotype of dystrophinopathy”, The 1999 European Developmental Biology Conference, Oslo, Norwegen
- 21.05. – 26.05.2000 Poster “The transcription factor Lbx1 takes part in hypaxial muscle development”, The molecular biology of muscle development and disease, Monterey, USA

Publikationen

- Mai 1998 “Pax3 is necessary but not sufficient for Lbx1 expression in myogenic precursor cells of the limb”, **Mech.Del.**, Vol.73, pp 147-158
- im Druck “Heterozygous A112S missens mutation in the helix 1 region of myogenic factor myf6 is associated with mild myopathy and modifies dystrophinopathy” **Neuromuscular Disorders**
- in Vorbereitung “Ectopic expression of Lbx1 enables myogenic differentiation program in proliferating cells of embryonic mesoderm and neural tissue”

7 Literatur

- Alberts, B. 1994. Molecular biology of the cell. Garland Pub., New York.
- Amthor, H., B. Christ, and K. Patel. 1999. A molecular mechanism enabling continuous embryonic muscle growth - a balance between proliferation and differentiation. *Development* **126**: 1041-53.
- Amthor, H., B. Christ, M. Weil, and K. Patel. 1998. The importance of timing differentiation during limb muscle development. *Curr Biol* **8**: 642-52.
- Arnold, H.H. and T. Braun. 1996. Targeted inactivation of myogenic factor genes reveals their role during mouse myogenesis: a review. *Int J Dev Biol* **40**: 345-53.
- Ausubel, F., R. Brent, and S. K. 1992. Current Protocols in Molecular Biology. *Greene Publishing Associated and Wiley Interscience Volume I and II*.
- Bader, C.R., D. Bertrand, E. Cooper, and A. Mauro. 1988. Membrane currents of rat satellite cells attached to intact skeletal muscle fibers. *Neuron* **1**: 237-40.
- Benezra, R., R.L. Davis, A. Lassar, S. Tapscott, M. Thayer, D. Lockshon, and H. Weintraub. 1990a. Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. Control of terminal myogenic differentiation. *Ann N Y Acad Sci* **599**: 1-11.
- Benezra, R., R.L. Davis, D. Lockshon, D.L. Turner, and H. Weintraub. 1990b. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* **61**: 49-59.
- Bhagwati, S., A. Ghatpande, S.A. Shafiq, and B. Leung. 1996. In situ hybridization analysis for expression of myogenic regulatory factors in regenerating muscle of mdx mouse. *J Neuropathol Exp Neurol* **55**: 509-14.
- Bischoff, R. and H. Holtzer. 1969. Mitosis and the processes of differentiation of myogenic cells in vitro. *J Cell Biol* **41**: 188-200.
- Bladt, F., D. Riethmacher, S. Isenmann, A. Aguzzi, and C. Birchmeier. 1995. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud [see comments]. *Nature* **376**: 768-71.
- Blagden, C.S. and S.M. Hughes. 1999. Extrinsic influences on limb muscle organisation. *Cell Tissue Res* **296**: 141-50.
- Bober, E., T. Franz, H.H. Arnold, P. Gruss, and P. Tremblay. 1994. Pax-3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells. *Development* **120**: 603-12.
- Bober, E., G.E. Lyons, T. Braun, G. Cossu, M. Buckingham, and H.H. Arnold. 1991. The muscle regulatory gene, Myf-6, has a biphasic pattern of expression during early mouse development. *J Cell Biol* **113**: 1255-65.
- Boerkoel, C.F., M.J. Federspiel, D.W. Salter, W. Payne, L.B. Crittenden, H.J. Kung, and S.H. Hughes. 1993. A new defective retroviral vector system based on the Bryan strain of Rous sarcoma virus. *Virology* **195**: 669-79.

- Brand-Saberi, B. and B. Christ. 1999. Genetic and epigenetic control of muscle development in vertebrates. *Cell Tissue Res* **296**: 199-212.
- Braun, T. and H.H. Arnold. 1991. The four human muscle regulatory helix-loop-helix proteins Myf3-Myf6 exhibit similar hetero-dimerization and DNA binding properties. *Nucleic Acids Res* **19**: 5645-51.
- Braun, T. and H.H. Arnold. 1995. Inactivation of Myf-6 and Myf-5 genes in mice leads to alterations in skeletal muscle development. *Embo J* **14**: 1176-86.
- Braun, T., E. Bober, M.A. Rudnicki, R. Jaenisch, and H.H. Arnold. 1994. MyoD expression marks the onset of skeletal myogenesis in Myf-5 mutant mice. *Development* **120**: 3083-92.
- Braun, T., E. Bober, B. Winter, N. Rosenthal, and H.H. Arnold. 1990. Myf-6, a new member of the human gene family of myogenic determination factors: evidence for a gene cluster on chromosome 12. *Embo J* **9**: 821-31.
- Braun, T., G. Buschhausen-Denker, E. Bober, E. Tannich, and H.H. Arnold. 1989. A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *Embo J* **8**: 701-9.
- Braun, T., M.A. Rudnicki, H.H. Arnold, and R. Jaenisch. 1992. Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell* **71**: 369-82.
- Brohmann, H., K. Jagla, and C. Birchmeier. 2000. The role of Lbx1 in migration of muscle precursor cells. *Development* **127**: 437-45.
- Buchberger, A., K. Ragge, and H.H. Arnold. 1994. The myogenin gene is activated during myocyte differentiation by pre-existing, not newly synthesized transcription factor MEF-2. *J Biol Chem* **269**: 17289-96.
- Bulfield, G., W.G. Siller, P.A. Wight, and K.J. Moore. 1984. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 1189-92.
- Buscher, D. and J.C. Izpisua Belmonte. 1999. Muscle development during vertebrate limb outgrowth. *Cell Tissue Res* **296**: 131-9.
- Bushby, K.M., D. Gardner-Medwin, L.V. Nicholson, M.A. Johnson, I.D. Haggerty, N.J. Cleghorn, J.B. Harris, and S.S. Bhattacharya. 1993a. The clinical, genetic and dystrophin characteristics of Becker muscular dystrophy. II. Correlation of phenotype with genetic and protein abnormalities. *J Neurol* **240**: 105-12.
- Bushby, K.M., J.A. Goodship, L.V. Nicholson, M.A. Johnson, I.D. Haggerty, and D. Gardner-Medwin. 1993b. Variability in clinical, genetic and protein abnormalities in manifesting carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* **3**: 57-64.
- Chalepakis, G., P. Tremblay, and P. Gruss. 1992. Pax genes, mutants and molecular function. *J Cell Sci Suppl* **16**: 61-7.

- Chen, F., K.C. Liu, and J.A. Epstein. 1999. Lbx2, a novel murine homeobox gene related to the *Drosophila* ladybird genes is expressed in the developing urogenital system, eye and brain. *Mech Dev* **84**: 181-4.
- Chen, J.N. and M.C. Fishman. 1996. Zebrafish tinman homolog demarcates the heart field and initiates myocardial differentiation. *Development* **122**: 3809-16.
- Cheng, T.C., M.C. Wallace, J.P. Merlie, and E.N. Olson. 1993. Separable regulatory elements governing myogenin transcription in mouse embryogenesis. *Science* **261**: 215-8.
- Choi, J., M.L. Costa, C.S. Mermelstein, C. Chagas, S. Holtzer, and H. Holtzer. 1990. MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 7988-92.
- Christ, B. and C.P. Ordahl. 1995. Early stages of chick somite development. *Anat Embryol (Berl)* **191**: 381-96.
- Cleaver, O.B., K.D. Patterson, and P.A. Krieg. 1996. Overexpression of the tinman-related genes XNkx-2.5 and XNkx-2.3 in *Xenopus* embryos results in myocardial hyperplasia. *Development* **122**: 3549-56.
- Cohn, M.J., J.C. Izpisua-Belmonte, H. Abud, J.K. Heath, and C. Tickle. 1995. Fibroblast growth factors induce additional limb development from the flank of chick embryos. *Cell* **80**: 739-46.
- Cossu, G., R. Kelly, S. Di Donna, E. Vivarelli, and M. Buckingham. 1995. Myoblast differentiation during mammalian somitogenesis is dependent upon a community effect. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 2254-8.
- Cossu, G., S. Tajbakhsh, and M. Buckingham. 1996. How is myogenesis initiated in the embryo? *Trends Genet* **12**: 218-23.
- Daston, G., E. Lamar, M. Olivier, and M. Goulding. 1996. Pax-3 is necessary for migration but not differentiation of limb muscle precursors in the mouse. *Development* **122**: 1017-27.
- Denetclaw, W.F., Jr., B. Christ, and C.P. Ordahl. 1997. Location and growth of epaxial myotome precursor cells. *Development* **124**: 1601-10.
- Duprez, D., C. Fournier-Thibault, and N. Le Douarin. 1998. Sonic Hedgehog induces proliferation of committed skeletal muscle cells in the chick limb. *Development* **125**: 495-505.
- Edmondson, D.G. and E.N. Olson. 1989. A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program [published erratum appears in *Genes Dev* 1990 Aug;4(8):1450]. *Genes Dev* **3**: 628-40.
- Fekete, D.M. and C.L. Cepko. 1993. Replication-competent retroviral vectors encoding alkaline phosphatase reveal spatial restriction of viral gene expression/transduction in the chick embryo. *Mol Cell Biol* **13**: 2604-13.

- Fisher, S.A., E. Siwik, D. Branellec, K. Walsh, and M. Watanabe. 1997. Forced expression of the homeodomain protein Gax inhibits cardiomyocyte proliferation and perturbs heart morphogenesis. *Development* **124**: 4405-13.
- Gehring, W.J., Y.Q. Qian, M. Billeter, K. Furukubo-Tokunaga, A.F. Schier, D. Resendez-Perez, M. Affolter, G. Otting, and K. Wuthrich. 1994. Homeodomain-DNA recognition. *Cell* **78**: 211-23.
- Gilbert, S.F. 1997. *Developmental biology*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Godsave, S.F. and J.M. Slack. 1991. Single cell analysis of mesoderm formation in the *Xenopus* embryo. *Development* **111**: 523-30.
- Goulding, M., A. Lumsden, and A.J. Paquette. 1994. Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. *Development* **120**: 957-71.
- Goulding, M.D., G. Chalepakis, U. Deutsch, J.R. Erselius, and P. Gruss. 1991. Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *Embo J* **10**: 1135-47.
- Gross, M.K., L. Moran-Rivard, T. Velasquez, M.N. Nakatsu, K. Jagla, and M. Goulding. 2000. Lbx1 is required for muscle precursor migration along a lateral pathway into the limb. *Development* **127**: 413-24.
- Guo, K. and K. Walsh. 1997. Inhibition of myogenesis by multiple cyclin-Cdk complexes. Coordinate regulation of myogenesis and cell cycle activity at the level of E2F. *J Biol Chem* **272**: 791-7.
- Guo, K., J. Wang, V. Andres, R.C. Smith, and K. Walsh. 1995. MyoD-induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation. *Mol Cell Biol* **15**: 3823-9.
- Gurdon, J.B. 1988. A community effect in animal development. *Nature* **336**: 772-4.
- Halevy, O., B.G. Novitch, D.B. Spicer, S.X. Skapek, J. Rhee, G.J. Hannon, D. Beach, and A.B. Lassar. 1995. Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD [see comments]. *Science* **267**: 1018-21.
- Halpern, M.E., C. Thisse, R.K. Ho, B. Thisse, B. Riggleman, B. Trevarrow, E.S. Weinberg, J.H. Postlethwait, and C.B. Kimmel. 1995. Cell-autonomous shift from axial to paraxial mesodermal development in zebrafish floating head mutants. *Development* **121**: 4257-64.
- Hamburger, V. and H.L. Hamilton. 1992. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951 [classical article] [see comments]. *Dev Dyn* **195**: 231-72.
- Harvey, R.P. 1990. The *Xenopus* MyoD gene: an unlocalised maternal mRNA predates lineage-restricted expression in the early embryo. *Development* **108**: 669-80.
- Heanue, T.A., R. Reshef, R.J. Davis, G. Mardon, G. Oliver, S. Tomarev, A.B. Lassar, and C.J. Tabin. 1999. Synergistic regulation of vertebrate muscle development

- by Dach2, Eya2, and Six1, homologs of genes required for Drosophila eye formation. *Genes Dev* **13**: 3231-43.
- Heymann, S., M. Koudrova, H. Arnold, M. Koster, and T. Braun. 1996. Regulation and function of SF/HGF during migration of limb muscle precursor cells in chicken. *Dev Biol* **180**: 566-78.
- Holtzer, H., T. Schultheiss, C. Dilullo, J. Choi, M. Costa, M. Lu, and S. Holtzer. 1990. Autonomous expression of the differentiation programs of cells in the cardiac and skeletal myogenic lineages. *Ann N Y Acad Sci* **599**: 158-69.
- Jagla, K., P. Dolle, M.G. Mattei, T. Jagla, B. Schuhbaur, G. Dretzen, F. Bellard, and M. Bellard. 1995. Mouse Lbx1 and human LBX1 define a novel mammalian homeobox gene family related to the Drosophila lady bird genes. *Mech Dev* **53**: 345-56.
- Jagla, K., M. Frasch, T. Jagla, G. Dretzen, F. Bellard, and M. Bellard. 1997a. ladybird, a new component of the cardiogenic pathway in Drosophila required for diversification of heart precursors. *Development* **124**: 3471-9.
- Jagla, K., T. Jagla, P. Heitzler, G. Dretzen, F. Bellard, and M. Bellard. 1997b. ladybird, a tandem of homeobox genes that maintain late wingless expression in terminal and dorsal epidermis of the Drosophila embryo. *Development* **124**: 91-100.
- Jagla, K., I. Stanceva, G. Dretzen, F. Bellard, and M. Bellard. 1994. A distinct class of homeodomain proteins is encoded by two sequentially expressed Drosophila genes from the 93D/E cluster. *Nucleic Acids Res* **22**: 1202-7.
- Jagla, T., F. Bellard, Y. Lutz, G. Dretzen, M. Bellard, and K. Jagla. 1998. ladybird determines cell fate decisions during diversification of Drosophila somatic muscles. *Development* **125**: 3699-708.
- Jarriault, S., C. Brou, F. Logeat, E.H. Schroeter, R. Kopan, and A. Israel. 1995. Signalling downstream of activated mammalian Notch [see comments]. *Nature* **377**: 355-8.
- Jen, Y., H. Weintraub, and R. Benezra. 1992. Overexpression of Id protein inhibits the muscle differentiation program: in vivo association of Id with E2A proteins. *Genes Dev* **6**: 1466-79.
- Kaushal, S., J.W. Schneider, B. Nadal-Ginard, and V. Mahdavi. 1994. Activation of the myogenic lineage by MEF2A, a factor that induces and cooperates with MyoD. *Science* **266**: 1236-40.
- Koenig, M., A.H. Beggs, M. Moyer, S. Scherpf, K. Heindrich, T. Bettecken, G. Meng, C.R. Muller, M. Lindlof, H. Kaariainen, and et al. 1989. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet* **45**: 498-506.

- Kopan, R., J.S. Nye, and H. Weintraub. 1994. The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD. *Development* **120**: 2385-96.
- Krause, M., A. Fire, S. White-Harrison, H. Weintraub, and S. Tapscott. 1992. Functional conservation of nematode and vertebrate myogenic regulatory factors. *J Cell Sci Suppl* **16**: 111-5.
- Krenn, V., P. Gorka, F. Wachtler, B. Christ, and H.J. Jacob. 1988. On the origin of cells determined to form skeletal muscle in avian embryos. *Anat Embryol* **179**: 49-54.
- Lassar, A.B., R.L. Davis, W.E. Wright, T. Kadesch, C. Murre, A. Voronova, D. Baltimore, and H. Weintraub. 1991. Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell* **66**: 305-15.
- Maina, F., F. Casagrande, E. Audero, A. Simeone, P.M. Comoglio, R. Klein, and C. Ponzetto. 1996. Uncoupling of Grb2 from the Met receptor in vivo reveals complex roles in muscle development. *Cell* **87**: 531-42.
- Mankoo, B.S., N.S. Collins, P. Ashby, E. Grigorieva, L.H. Pevny, A. Candia, C.V. Wright, P.W. Rigby, and V. Pachnis. 1999. Mox2 is a component of the genetic hierarchy controlling limb muscle development. *Nature* **400**: 69-73.
- Maroto, M., R. Reshef, A.E. Munsterberg, S. Koester, M. Goulding, and A.B. Lassar. 1997. Ectopic Pax-3 activates MyoD and Myf-5 expression in embryonic mesoderm and neural tissue. *Cell* **89**: 139-48.
- McGinnis, W., M.S. Levine, E. Hafen, A. Kuroiwa, and W.J. Gehring. 1984. A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the Drosophila Antennapedia and bithorax complexes. *Nature* **308**: 428-33.
- McPherson, M.J. and B.D. Hames. 1995. PCR 2 : a practical approach. IRL Press at Oxford University Press, Oxford ; New York.
- Megeney, L.A., B. Kablar, K. Garrett, J.E. Anderson, and M.A. Rudnicki. 1996. MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes Dev* **10**: 1173-83.
- Mennerich, D., K. Schafer, and T. Braun. 1998. Pax-3 is necessary but not sufficient for lbx1 expression in myogenic precursor cells of the limb. *Mech Dev* **73**: 147-58.
- Miner, J.H. and B. Wold. 1990. Herculin, a fourth member of the MyoD family of myogenic regulatory genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 1089-93.
- Morandi, L., M. Mora, V. Confalonieri, R. Barresi, C. Di Blasi, R. Brugnoli, P. Bernasconi, R. Mantegazza, F. Dworzak, C. Antozzi, and et al. 1995a. Dystrophin characterization in BMD patients: correlation of abnormal protein with clinical phenotype. *J Neurol Sci* **132**: 146-55.

- Morandi, L., M. Mora, S. Tedeschi, C. Di Blasi, C. Curcio, P. De Leonardis, R. Brugnoli, P. Bernasconi, R. Mantegazza, V. Confalonieri, and et al. 1995b. DMD and BMD in the same family due to distinct mutations. *Am J Med Genet* **59**: 501-5.
- Munsterberg, A.E., J. Kitajewski, D.A. Bumcrot, A.P. McMahon, and A.B. Lassar. 1995. Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite. *Genes Dev* **9**: 2911-22.
- Munsterberg, A.E. and A.B. Lassar. 1995. Combinatorial signals from the neural tube, floor plate and notochord induce myogenic bHLH gene expression in the somite. *Development* **121**: 651-60.
- Nadal-Ginard, B. 1978. Commitment, fusion and biochemical differentiation of a myogenic cell line in the absence of DNA synthesis. *Cell* **15**: 855-64.
- Olwin, B.B., K. Hannon, and A.J. Kudla. 1994. Are fibroblast growth factors regulators of myogenesis in vivo? *Prog Growth Factor Res* **5**: 145-58.
- Ordahl, C.P. 1993. Myogenic lineages within the developing somite. *Molecular Basis of Morphogenesis*: pp. 165-176 Wiley-Liss, Inc.
- Ordahl, C.P. 2000c. Somitogenesis. Academic Press, San Diego.
- Ordahl, C.P. 2000a. Somitogenesis. Academic Press, San Diego.
- Ordahl, C.P. 2000b. Somitogenesis. Academic Press, San Diego, Calif.
- Ordahl, C.P. and N.M. Le Douarin. 1992. Two myogenic lineages within the developing somite. *Development* **114**: 339-53.
- Ott, M.O., E. Bober, G. Lyons, H. Arnold, and M. Buckingham. 1991. Early expression of the myogenic regulatory gene, myf-5, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. *Development* **111**: 1097-107.
- Parker, S.B., G. Eichele, P. Zhang, A. Rawls, A.T. Sands, A. Bradley, E.N. Olson, J.W. Harper, and S.J. Elledge. 1995. p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells [see comments]. *Science* **267**: 1024-7.
- Patapoutian, A., J.K. Yoon, J.H. Miner, S. Wang, K. Stark, and B. Wold. 1995. Disruption of the mouse MRF4 gene identifies multiple waves of myogenesis in the myotome. *Development* **121**: 3347-58.
- Petropoulos, C.J. and S.H. Hughes. 1991. Replication-competent retrovirus vectors for the transfer and expression of gene cassettes in avian cells. *J Virol* **65**: 3728-37.
- Potts, W.M., M. Olsen, D. Boettiger, and V.M. Vogt. 1987. Epitope mapping of monoclonal antibodies to gag protein p19 of avian sarcoma and leukaemia viruses. *J Gen Virol* **68**: 3177-82.
- Pourquie, O., M. Coltey, C. Breant, and N.M. Le Douarin. 1995. Control of somite patterning by signals from the lateral plate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 3219-23.

- Pourquie, O., C.M. Fan, M. Coltey, E. Hirsinger, Y. Watanabe, C. Breant, P. Francis-West, P. Brickell, M. Tessier-Lavigne, and N.M. Le Douarin. 1996. Lateral and axial signals involved in avian somite patterning: a role for BMP4. *Cell* **84**: 461-71.
- Pownall, M.E., K.E. Strunk, and C.P. Emerson, Jr. 1996. Notochord signals control the transcriptional cascade of myogenic bHLH genes in somites of quail embryos. *Development* **122**: 1475-88.
- Reznikoff, C.A., D.W. Brankow, and C. Heidelberger. 1973. Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division. *Cancer Res* **33**: 3231-8.
- Rhodes, S.J. and S.F. Konieczny. 1989. Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev* **3**: 2050-61.
- Roth, M.B., A.M. Zahler, and J.A. Stolk. 1991. A conserved family of nuclear phosphoproteins localized to sites of polymerase II transcription. *J Cell Biol* **115**: 587-96.
- Rudnicki, M.A., T. Braun, S. Hinuma, and R. Jaenisch. 1992. Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell* **71**: 383-90.
- Rupp, R.A. and H. Weintraub. 1991. Ubiquitous MyoD transcription at the midblastula transition precedes induction-dependent MyoD expression in presumptive mesoderm of *X. laevis*. *Cell* **65**: 927-37.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Sasai, Y., R. Kageyama, Y. Tagawa, R. Shigemoto, and S. Nakanishi. 1992. Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to *Drosophila* hairy and Enhancer of split. *Genes Dev* **6**: 2620-34.
- Sassoon, D., G. Lyons, W.E. Wright, V. Lin, A. Lassar, H. Weintraub, and M. Buckingham. 1989. Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis. *Nature* **341**: 303-7.
- Schäfer, K. and T. Braun. 1999. Early specification of limb muscle precursor cells by the homeobox gene Lbx1h. *Nat Genet* **23**: 213-6.
- Sherr, C.J. 1994. Growth factor-regulated G1 cyclins. *Stem Cells* **12**: 47-55; discussion 55-7.
- Sherr, C.J. 1995. Mammalian G1 cyclins and cell cycle progression. *Proc Assoc Am Physicians* **107**: 181-6.
- Sherr, C.J., J. Kato, D.E. Quelle, M. Matsuoka, and M.F. Roussel. 1994. D-type cyclins and their cyclin-dependent kinases: G1 phase integrators of the mitogenic response. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **59**: 11-9.
- Sherr, C.J. and J.M. Roberts. 1995. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* **9**: 1149-63.

- Sicinski, P., Y. Geng, A.S. Ryder-Cook, E.A. Barnard, M.G. Darlison, and P.J. Barnard. 1989. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* **244**: 1578-80.
- Skapek, S.X., J. Rhee, D.B. Spicer, and A.B. Lassar. 1995. Inhibition of myogenic differentiation in proliferating myoblasts by cyclin D1-dependent kinase [see comments]. *Science* **267**: 1022-4.
- Spicer, D.B., J. Rhee, W.L. Cheung, and A.B. Lassar. 1996. Inhibition of myogenic bHLH and MEF2 transcription factors by the bHLH protein Twist [see comments]. *Science* **272**: 1476-80.
- Tajbakhsh, S., U. Borello, E. Vivarelli, R. Kelly, J. Papkoff, D. Duprez, M. Buckingham, and G. Cossu. 1998. Differential activation of Myf5 and MyoD by different Wnts in explants of mouse paraxial mesoderm and the later activation of myogenesis in the absence of Myf5. *Development* **125**: 4155-62.
- Tajbakhsh, S. and M.E. Buckingham. 1994. Mouse limb muscle is determined in the absence of the earliest myogenic factor myf-5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 747-51.
- Talbot, W.S., B. Trevarrow, M.E. Halpern, A.E. Melby, G. Farr, J.H. Postlethwait, T. Jowett, C.B. Kimmel, and D. Kimelman. 1995. A homeobox gene essential for zebrafish notochord development. *Nature* **378**: 150-7.
- Taylor, G.R., P. Quirke, and M.J. McPherson. 1991. PCR, a practical approach. IRL Press at Oxford University Press, Oxford ; New York.
- Vogel, A., C. Rodriguez, and J.C. Izpisua-Belmonte. 1996. Involvement of FGF-8 in initiation, outgrowth and patterning of the vertebrate limb. *Development* **122**: 1737-50.
- Weinberg, R.A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**: 323-30.
- Weintraub, H., V.J. Dwarki, I. Verma, R. Davis, S. Hollenberg, L. Snider, A. Lassar, and S.J. Tapscott. 1991. Muscle-specific transcriptional activation by MyoD. *Genes Dev* **5**: 1377-86.
- White, T.P. and K.A. Esser. 1989. Satellite cell and growth factor involvement in skeletal muscle growth. *Med Sci Sports Exerc* **21**: S158-63.
- Wilkinson, D.G. 1992. In situ hybridization : a practical approach. IRL Press at Oxford University Press, Oxford ; New York.
- Williams, B.A. and C.P. Ordahl. 1994. Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification. *Development* **120**: 785-96.
- Williams, B.A. and C.P. Ordahl. 1997. Emergence of determined myotome precursor cells in the somite. *Development* **124**: 4983-97.
- Wright, W.E., D.A. Sassoon, and V.K. Lin. 1989. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* **56**: 607-17.

-
- Yaffe, D. and O. Saxel. 1977. A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation. *Differentiation* **7**: 159-66.
- Yang, X.M., K. Vogan, P. Gros, and M. Park. 1996. Expression of the met receptor tyrosine kinase in muscle progenitor cells in somites and limbs is absent in Splotch mice. *Development* **122**: 2163-71.
- Zhang, J.M., Q. Wei, X. Zhao, and B.M. Paterson. 1999a. Coupling of the cell cycle and myogenesis through the cyclin D1-dependent interaction of MyoD with cdk4. *Embo J* **18**: 926-33.
- Zhang, J.M., X. Zhao, Q. Wei, and B.M. Paterson. 1999b. Direct inhibition of G(1) cdk kinase activity by MyoD promotes myoblast cell cycle withdrawal and terminal differentiation. *Embo J* **18**: 6983-93.
- Zhang, W., R.R. Behringer, and E.N. Olson. 1995. Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies. *Genes Dev* **9**: 1388-99.

8 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt zwei Projekte, in denen die Funktion und Wirkung von Transkriptionsfaktoren während der embryonalen Entwicklung und adulten Regeneration von Skelettmuskeln in Vertebraten untersucht wurde.

Während der embryonalen Spezifizierung hypaxialer Skelettmuskulatur kommt es zur Delamination, Migration und zur myogenen Differenzierung von Muskelvorläuferzellen. Die Muskelvorläuferzellen werden während der Entwicklung durch die Expression der Transkriptionsfaktoren Lbx1 und Pax3 markiert und wahrscheinlich auch spezifiziert. Die transkriptionelle Aktivierung und der Einfluss dieser beiden Transkriptionsfaktoren auf die Proliferation undifferenzierter und auf die myogene Differenzierung post-mitotischer Muskelvorläuferzellen wurde durch retrovirale Überexpression im Modellorganismus *Gallus gallus* untersucht. Anhand von bereits bekannten Genaktivierungen in *Mus musculus*, durch ektopische Extremitäteninduktionen (nach Implantation von Wachstumsfaktoren) und durch retrovirale Überexpressionen konnten die Transkriptionsfaktoren Lbx1 und Pax3 als Aktivoren myogener Differenzierung in hypaxialen Muskelvorläuferzellen identifiziert werden. Nach Überexpression in ex vivo Gewebe-Kulturen waren Lbx1 und Pax3 in der Lage, die Transkription von MyoD, Myogenin und MHC zu induzieren. Zusätzlich wurde eine wechselseitige Regulation von Pax3 und Lbx1 festgestellt. Pax3 konnte als notwendiger Faktor zur transkriptionellen Aktivierung von Lbx1 identifiziert werden. Nach erfolgter Lbx1 Aktivierung konnte Pax3 als hinreichender – aber nicht weiter notwendiger Faktor zur Aufrechterhaltung der Lbx1 Transkription ermittelt werden. Weitere Untersuchungen an ex vivo Gewebe-Kulturen identifizieren Lbx1 und Pax3 als Aktivoren der Proliferation undifferenzierter Muskelvorläuferzellen. In Somiten-Kulturen steigern Lbx1 und Pax3, retroviral überexprimiert, die Proliferationsrate um ein vielfaches. Die Blockierung des Zellzyklusses bei gleichzeitiger retroviraler Lbx1 oder Pax3 Infektion führte zu einem Verlust der Induktion der myogenen Differenzierung. Somit konnte bewiesen werden, dass Lbx1 und Pax3 eine Funktion in der Migration und in der Verbreiterung der Muskelvorläuferzellzahl besitzen. Erst die Verbreiterung der Muskelvorläuferzellen führt zur Steigerung des myogenen Potentials, welches an einer kritische Höhe angelangt, die myogene Differenzierung induziert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine heterozygot vorliegende Mutation des Transkriptionsfaktors und myogenen Differenzierungsgens Myf-6 des Menschen analysiert. Die biochemische Mutationsanalyse und die im Mausmodell nachgestellten Genotypen deuten auf eine haploide Insuffizienz des Myf-6 Gens hin, die zur Ausbildung einer milden Myopathie führt. Dagegen zeigt die Kombination aus heterozygoter Myf-6 Mutation und einer Dystrophinopathie des Typs Becker (BMD) einen Synergismus beider Mutationen auf, durch den die resultierenden massiven Regenerationsdefekte einen besonders schweren Krankheitsverlauf aufweisen.