# Untersuchung der embryonalen Muskelentwicklung und der Regeneration adulter Skelettmuskeln in der Maus





## **INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

- Doctor rerum naturalium -

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich für Biologie und Chemie (FB 08) der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Nicole Gensch** 

Gießen, 2012

#### Dekan:

Prof. Dr. Volkmar Wolters Institut für Tierökologie und Spezielle Zoologie Justus-Liebig-Universität Gießen Heinrich-Buff-Ring 58 35392 Gießen

#### Erstgutachter:

Prof. Dr. Adriaan Dorresteijn Allgemeine Zoologie und Entwicklungsbiologie Justus-Liebig-Universität Gießen Stephanstrasse 24 35392 Gießen

#### Zweitgutachter:

Prof. Dr. Dr. Thomas Braun Abteilung Entwicklung und Umbau des Herzens Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, W.G. Kerckhoff-Institut Ludwigstrasse 43 61231 Bad Nauheim Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, W.G. Kerckhoff-Institut in Bad Nauheim angefertigt.

#### Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht:

Nicole Gensch<sup>\*</sup>, Thilo Borchardt<sup>\*</sup>, André Schneider, Dieter Riethmacher, Thomas Braun *Different autonomous myogenic cell populations revealed by ablation of Myf5-expressing cells during mouse embryogenesis.* (2008), Development 135(9): 1597-1604.

\* Beide Autoren trugen gleichermaßen zu dieser Arbeit bei.

## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

"Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten."

Bad Nauheim, den 06.01.2012

#### ZUSAMMENFASSUNG

Die Entwicklung und Regeneration der Skelettmuskulatur basieren auf ähnlichen Prinzipien, zeigen aber auch diverse Unterschiede. In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde der Beitrag unterschiedlicher Zellpopulationen zur Entwicklung der Skelettmuskulatur sowie die Funktion von Proteinen, welche bei der asymmetrischen Zellteilung von Muskelstammzellen involviert sind, untersucht.

Die Entstehung von Vorläuferzellen der Skelettmuskulatur ist durch die Expression der myogenen Faktoren Myf5 und MyoD reguliert. Anhand bisheriger Arbeiten ist bekannt, die Anwesenheit mindestens einer dieser Faktoren für eine normale dass Muskelentwicklung notwendig ist. Bis zur Anfertigung dieser Arbeit war unklar, ob kompensatorische Aktivitäten dieser Faktoren innerhalb derselben oder von zwei unabhängigen Zellpopulationen erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein konditionales Zellablationsmodell in der Maus verwendet, das gezielt Myf5-exprimierende Zellen aus dem Gewebeverband der frühen entwickelnden Muskulatur entfernt. Die Analyse Myf5-defizienter Mausembryonen ergab eine verzögerte MyoD Expression in Muskelvorläuferzellen und eine weitgehend normal entwickelte Skelettmuskulatur in späteren Embryonalstadien. Damit konnte hier erstmalig gezeigt werden, dass mindestens zwei autonome Zellpopulationen an der Entstehung von Skelettmuskelvorläuferzellen beteiligt sind. Der Verlust von differenzierten Muskelfasern nach Ablation von Myogeninexprimierenden Zellen zeigt, dass Myogenin als Differenzierungsmarker in allen myogenen Zellpopulationen essentiell ist und der Verlust nicht kompensiert werden kann. Neben der Bereitstellung von myogenen Vorläuferzellen ist die Kontrolle der Selbsterneuerung dieser Zellen von großer Bedeutung. Ein Kandidat für die Regulation dieser Prozesse ist das zytoplasmatische Protein Numb. Die konditionale genetische Deletion von Numb in Myf5-exprimierenden Muskelzellen in der Maus führte zu einer Reduktion der Muskelstammzellen (Satellitenzellen) in juvenilen Tieren. Der Verlust von Numb in primären Satellitenzellen wie auch in der C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myoblastenvorläuferzelllinie führte zu einem verminderten Differenzierungsverhalten der Zellen. Gleichzeitig konnte eine erhöhte Proliferationsrate von Numb-defizienten Satellitenzellen nachgewiesen werden. Dies weist darauf hin. dass Numb an der Regulation von myogenen Proliferationsprozessen beteiligt ist und hierbei das Gleichgewicht zwischen dem Erhalt des Stammzellcharakters und der myogenen Differenzierung reguliert.

## **INHALTSVERZEICHNIS**

| ZUSAMMENFASSUNGI |                                                                 |  |
|------------------|-----------------------------------------------------------------|--|
| INF              | HALTSVERZEICHNISII                                              |  |
| 1                | EINLEITUNG1                                                     |  |
| 1.1              | Muskelaufbau2                                                   |  |
| 1.2              | Muskelentwicklung5                                              |  |
| 1.3              | Regeneration des Skelettmuskels10                               |  |
| 1                | .3.1 Satellitenzellen                                           |  |
| 1                | .3.2 Faktoren zur Identifikation von Satellitenzellen           |  |
| 1                | .3.3 Bedeutung myogener Regulationsfaktoren in Satellitenzellen |  |
| 1.4              | Die Zellschicksalsdeterminanten Numb und Numblike18             |  |
| 1.5              | Zielsetzung der Arbeit23                                        |  |
| 2                | MATERIAL                                                        |  |
| 2.1              | Chemikalien und Enzyme24                                        |  |
| 2.2              | Geräte                                                          |  |
| 2.3              | Spezielle Verbrauchsmaterialien26                               |  |
| 2.4              | Gebrauchsfertige Reaktionssysteme                               |  |
| 2.5              | Puffer und Lösungen                                             |  |
| 2.6              | Nährmedien                                                      |  |
| 2.7              | Oligonukleotide                                                 |  |

| 2.8   | 8 Plasmide                                                            |    |  |  |  |
|-------|-----------------------------------------------------------------------|----|--|--|--|
| 2.9   | Antikörper                                                            |    |  |  |  |
| 2.10  | Zelllinien                                                            | 33 |  |  |  |
| 2.11  | Mauslinien                                                            | 33 |  |  |  |
| 2.12  | Software                                                              | 34 |  |  |  |
| 3 N   | IETHODEN                                                              | 36 |  |  |  |
| 3.1   | Tierexperimentelle Arbeiten                                           |    |  |  |  |
| 3.1.  | 1 Haltung von Versuchsmäusen                                          |    |  |  |  |
| 3.1.  | 2 Tötung von Versuchsmäusen                                           |    |  |  |  |
| 3.1.  | 3 Isolierung von Mausembryonen aus dem Uterus des Muttertieres        |    |  |  |  |
| 3.1.4 | 4 Untersuchung der Regeneration der Skelettmuskulatur adulter Mäuse   |    |  |  |  |
| 3.2   | Molekularbiologische Methoden                                         |    |  |  |  |
| 3.2.  | 1 Isolierung genomischer DNA aus murinen Schwanzbiopsien und murinem  |    |  |  |  |
|       | embryonalem Gewebe                                                    |    |  |  |  |
| 3.2.  | 2 Isolierung von Gesamt-RNA                                           |    |  |  |  |
| 3.2.  | 3 Polymerase Ketten Reaktion                                          |    |  |  |  |
| 3     | 2.3.1 Reverse Transkription zur Herstellung komplementärer DNA (cDNA) |    |  |  |  |
| 3     | 2.3.2 Quantitative Real-Time PCR                                      |    |  |  |  |
| 3.2.4 | 4 In situ Hybridisierung                                              | 41 |  |  |  |
| 3     | 2.4.1 In vitro Transkription und DIG-Markierung von RNA Sonden        | 41 |  |  |  |
| 3     | 2.4.2 Whole mount in situ Hybridisierung von Embryonen                | 41 |  |  |  |
| 3.3   | Biochemische Methoden                                                 | 43 |  |  |  |
| 3.3.  | 1 Proteinisolation aus kultivierten Zellen                            |    |  |  |  |
| 3.3.  | 2 Proteinbestimmung                                                   |    |  |  |  |
| 3.3.  | 3 SDS Polyacrylamid Gel Elektrophorese                                |    |  |  |  |
| 3.3.4 | 4 Western Blot Analyse                                                |    |  |  |  |
| 3.4   | Histologische Methoden                                                | 45 |  |  |  |
| 3.4.  | 1 Färbung von Knochen- und Knorpelsubstanzen                          |    |  |  |  |
| 3.4.  | 2 Herstellung von Gefrierschnitten                                    |    |  |  |  |
| 3.4.3 | 3 Hämatoxylin und Eosin Färbung                                       |    |  |  |  |
| 3.4.  | 4 Masson-Trichrom-Färbung                                             |    |  |  |  |

| 3.4.5                                                                                                                                                                                                                     | β-Galaktosidase Färbung                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 47                                                                          |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| 3.4.6                                                                                                                                                                                                                     | Alkalische Phosphatase Färbung auf Gewebeschnitten                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 48                                                                          |
| 3.4.7                                                                                                                                                                                                                     | Herstellung von Vibratomschnitten                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 48                                                                          |
| 3.4.8                                                                                                                                                                                                                     | Immunologische Färbungen                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 48                                                                          |
| 3.5 Z                                                                                                                                                                                                                     | Zellbiologische Methoden                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 49                                                                          |
| 3.5.1                                                                                                                                                                                                                     | Kultivierung von Zellen                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 49                                                                          |
| 3.5.2                                                                                                                                                                                                                     | Gefrierkonservierung und Auftauen von Zellen                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 50                                                                          |
| 3.5.3                                                                                                                                                                                                                     | Lentiviraler Gentransfer von shRNA-kodierenden Vektoren                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 50                                                                          |
| 3.5                                                                                                                                                                                                                       | .3.1 Kalziumphosphat-Transfektion                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 51                                                                          |
| 3.5                                                                                                                                                                                                                       | .3.2 Lentivirale Transduktion                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 51                                                                          |
| 3.5                                                                                                                                                                                                                       | .3.3 Selektionieren                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 53                                                                          |
| 3.5.4                                                                                                                                                                                                                     | Isolierung und Kultivierung von murinen Skelettmuskelzellen                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 53                                                                          |
| 3.5.5                                                                                                                                                                                                                     | Isolierung von murinen Muskelfasern                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 54                                                                          |
| 3.5.6                                                                                                                                                                                                                     | Bestimmung der Zellproliferation                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 55                                                                          |
| 3.5.7                                                                                                                                                                                                                     | Messung der Differenzierungsfähigkeit                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 56                                                                          |
| 4 ER                                                                                                                                                                                                                      | GEBNISSE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 58                                                                          |
|                                                                                                                                                                                                                           | latere velove a den Maff, okk än sinen en kreinelen. Okoletter velove helent vielduren                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 50                                                                          |
| 4.1 U                                                                                                                                                                                                                     | Intersuchung der Myf5-abhängigen embryonalen Skelettmuskelentwicklung                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 58                                                                          |
| <b>4.1 l</b><br>4.1.1                                                                                                                                                                                                     | Jntersuchung der Myf5-abhängigen embryonalen Skelettmuskelentwicklung<br>Das Expressionsmuster der Myf5 <sup>Cre</sup> Mauslinie                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <b> 58</b><br>58                                                            |
| <b>4.1 l</b><br>4.1.1<br>4.1.2                                                                                                                                                                                            | <b>Jntersuchung der Myf5-abhängigen embryonalen Skelettmuskelentwicklung</b><br>Das Expressionsmuster der Myf5 <sup>Cre</sup> Mauslinie<br>Myf5 <sup>Cre</sup> Rosa <sup>DTA</sup> Mäuse sterben perinatal aufgrund massiver Fehlentwicklung des<br>axialen Skelettes                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <b>58</b><br>58                                                             |
| <b>4.1 l</b><br>4.1.1<br>4.1.2                                                                                                                                                                                            | <b>Jntersuchung der Myf5-abhängigen embryonalen Skelettmuskelentwicklung</b><br>Das Expressionsmuster der Myf5 <sup>Cre</sup> Mauslinie<br>Myf5 <sup>Cre</sup> Rosa <sup>DTA</sup> Mäuse sterben perinatal aufgrund massiver Fehlentwicklung des<br>axialen Skelettes<br>Die Ablation Myf5-exprimierender Zellen führt zur verminderten Expression der                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | <b> 58</b><br>58<br>60                                                      |
| <b>4.1 U</b><br>4.1.1<br>4.1.2<br>4.1.3                                                                                                                                                                                   | Jntersuchung der Myf5-abhängigen embryonalen Skelettmuskelentwicklung         Das Expressionsmuster der Myf5 <sup>Cre</sup> Mauslinie         Myf5 <sup>Cre</sup> Rosa <sup>DTA</sup> Mäuse sterben perinatal aufgrund massiver Fehlentwicklung des axialen Skelettes         Die Ablation Myf5-exprimierender Zellen führt zur verminderten Expression der myogenen Marker MyoD und Myogenin in Somiten von E10.5. Myf5 <sup>Cre</sup> Rosa <sup>DTA</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <b> 58</b><br>58<br>60                                                      |
| <b>4.1 U</b><br>4.1.1<br>4.1.2<br>4.1.3                                                                                                                                                                                   | Jntersuchung der Myf5-abhängigen embryonalen Skelettmuskelentwicklung<br>Das Expressionsmuster der Myf5 <sup>Cre</sup> Mauslinie                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <b>58</b><br>58<br>60                                                       |
| <b>4.1 U</b><br>4.1.1<br>4.1.2<br>4.1.3                                                                                                                                                                                   | Jntersuchung der Myf5-abhängigen embryonalen Skelettmuskelentwicklung         Das Expressionsmuster der Myf5 <sup>Cre</sup> Mauslinie                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <b> 58</b><br>58<br>60<br>61                                                |
| <b>4.1 U</b><br>4.1.1<br>4.1.2<br>4.1.3<br>4.1.4<br>4.1.4                                                                                                                                                                 | Jntersuchung der Myf5-abhängigen embryonalen Skelettmuskelentwicklung<br>Das Expressionsmuster der Myf5 <sup>Cre</sup> Mauslinie                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 58<br>58<br>60<br>61<br>66<br>66                                            |
| <b>4.1 U</b><br>4.1.1<br>4.1.2<br>4.1.3<br>4.1.4<br>4.1.5<br>4.1.5                                                                                                                                                        | Jntersuchung der Myf5-abhängigen embryonalen Skelettmuskelentwicklung         Das Expressionsmuster der Myf5 <sup>Cre</sup> Mauslinie         Myf5 <sup>Cre</sup> Rosa <sup>DTA</sup> Mäuse sterben perinatal aufgrund massiver Fehlentwicklung des         axialen Skelettes         Die Ablation Myf5-exprimierender Zellen führt zur verminderten Expression der         myogenen Marker MyoD und Myogenin in Somiten von E10.5 Myf5 <sup>Cre</sup> Rosa <sup>DTA</sup> Embryonen         Unveränderte fetale Muskelbildung in Myf5 <sup>Cre</sup> Rosa <sup>DTA</sup> Mäusen         Verspätete Myf5-unabhängige Expression von MyoD         Die Myogenin-exprimierende Zellpopulation ist während der Myogenese                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 58<br>60<br>61<br>66<br>67                                                  |
| <ul> <li>4.1</li> <li>4.1.1</li> <li>4.1.2</li> <li>4.1.3</li> <li>4.1.4</li> <li>4.1.5</li> <li>4.1.6</li> </ul>                                                                                                         | Jntersuchung der Myf5-abhängigen embryonalen Skelettmuskelentwicklung         Das Expressionsmuster der Myf5 <sup>Cre</sup> Mauslinie                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <b> 58</b><br>60<br>61<br>66<br>67                                          |
| <ul> <li>4.1</li> <li>4.1.1</li> <li>4.1.2</li> <li>4.1.3</li> <li>4.1.4</li> <li>4.1.5</li> <li>4.1.6</li> </ul>                                                                                                         | Jntersuchung der Myf5-abhängigen embryonalen Skelettmuskelentwicklung         Das Expressionsmuster der Myf5 <sup>Cre</sup> Mauslinie                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <b>58</b><br>58<br>60<br>61<br>66<br>67<br>68                               |
| <ul> <li>4.1</li> <li>4.1.1</li> <li>4.1.2</li> <li>4.1.3</li> <li>4.1.4</li> <li>4.1.5</li> <li>4.1.6</li> </ul>                                                                                                         | Jntersuchung der Myf5-abhängigen embryonalen Skelettmuskelentwicklung<br>Das Expressionsmuster der Myf5 <sup>Cre</sup> Mauslinie                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <b>58</b><br>58<br>60<br>61<br>66<br>67<br>68<br>72                         |
| <ul> <li>4.1</li> <li>4.1.2</li> <li>4.1.3</li> <li>4.1.4</li> <li>4.1.5</li> <li>4.1.6</li> <li>4.2.1</li> </ul>                                                                                                         | Jntersuchung der Myf5-abhängigen embryonalen Skelettmuskelentwicklung Das Expressionsmuster der Myf5 <sup>Cre</sup> Mauslinie                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | <b>58</b><br>58<br>60<br>61<br>61<br>67<br>68<br>72<br>72                   |
| <ul> <li>4.1</li> <li>4.1.1</li> <li>4.1.2</li> <li>4.1.3</li> <li>4.1.4</li> <li>4.1.5</li> <li>4.1.6</li> <li>4.2.1</li> <li>4.2.1</li> <li>4.2</li> </ul>                                                              | Untersuchung der Myf5-abhängigen embryonalen Skelettmuskelentwicklung         Das Expressionsmuster der Myf5 <sup>Cre</sup> Mauslinie         Myf5 <sup>Cre</sup> Rosa <sup>DTA</sup> Mäuse sterben perinatal aufgrund massiver Fehlentwicklung des         axialen Skelettes         Die Ablation Myf5-exprimierender Zellen führt zur verminderten Expression der         myogenen Marker MyoD und Myogenin in Somiten von E10.5 Myf5 <sup>Cre</sup> Rosa <sup>DTA</sup> Embryonen         Unveränderte fetale Muskelbildung in Myf5 <sup>Cre</sup> Rosa <sup>DTA</sup> Mäusen         Verspätete Myf5-unabhängige Expression von MyoD         Die Myogenin-exprimierende Zellpopulation ist während der Myogenese         unverzichtbar         Jntersuchung der Funktion von Numb und Numblike in C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> Myoblasten         Die Zellschicksalsdeterminante Numb         .1.1 Unveränderte mRNA Expression von Numb während der Proliferation und                                                                                                                                                     | 58<br>58<br>60<br>61<br>66<br>67<br>68<br>72<br>72                          |
| <ul> <li>4.1</li> <li>4.1.1</li> <li>4.1.2</li> <li>4.1.3</li> <li>4.1.4</li> <li>4.1.5</li> <li>4.1.6</li> <li>4.2.1</li> <li>4.2.1</li> <li>4.2</li> </ul>                                                              | <ul> <li>Jntersuchung der Myf5-abhängigen embryonalen Skelettmuskelentwicklung</li> <li>Das Expressionsmuster der Myf5<sup>Cre</sup> Mauslinie</li> <li>Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Mäuse sterben perinatal aufgrund massiver Fehlentwicklung des axialen Skelettes</li> <li>Die Ablation Myf5-exprimierender Zellen führt zur verminderten Expression der myogenen Marker MyoD und Myogenin in Somiten von E10.5 Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen</li> <li>Unveränderte fetale Muskelbildung in Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Mäusen</li> <li>Verspätete Myf5-unabhängige Expression von MyoD</li> <li>Die Myogenin-exprimierende Zellpopulation ist während der Myogenese unverzichtbar</li> <li>Jntersuchung der Funktion von Numb und Numblike in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myoblasten</li> <li>Jntersuchung der Funktion von Numb und Numblike in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myoblasten</li> <li>Jie Zellschicksalsdeterminante Numb</li> <li>Unveränderte mRNA Expression von Numb während der Proliferation und Differenzierung von C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myoblasten</li> </ul> | <b>58</b><br>58<br>60<br>61<br>66<br>67<br>68<br>72<br>72                   |
| <ul> <li>4.1</li> <li>4.1.1</li> <li>4.1.2</li> <li>4.1.3</li> <li>4.1.4</li> <li>4.1.5</li> <li>4.1.6</li> <li>4.2</li> <li>4.2.1</li> <li>4.2</li> <li>4.2</li> <li>4.2</li> </ul>                                      | <ul> <li>Jntersuchung der Myf5-abhängigen embryonalen Skelettmuskelentwicklung</li> <li>Das Expressionsmuster der Myf5<sup>Cre</sup> Mauslinie</li></ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | <b>58</b><br>58<br>58<br>60<br>61<br>66<br>67<br>68<br>72<br>72<br>72<br>72 |
| <ul> <li>4.1</li> <li>4.1.1</li> <li>4.1.2</li> <li>4.1.3</li> <li>4.1.4</li> <li>4.1.5</li> <li>4.1.6</li> <li>4.2</li> <li>4.2</li> <li>4.2</li> <li>4.2</li> <li>4.2</li> <li>4.2</li> <li>4.2</li> <li>4.2</li> </ul> | <ul> <li>Jntersuchung der Myf5-abhängigen embryonalen Skelettmuskelentwicklung</li></ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | <b>58</b><br>58<br>60<br>61<br>66<br>67<br>68<br>72<br>72<br>72<br>73       |

| 4.2.3 | 3 F        | Repression von Numb und Numblike in C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> Myoblasten mittels RNAi                                  | . 75     |
|-------|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| 4     | .2.3.      | 1 Unterschiedlich effiziente shRNA-vermittelte Reduktion der endogenen Numb                                                 |          |
|       |            | und Numblike Proteinexpression                                                                                              | . 77     |
| 4     | .2.3.      | 2 Effiziente simultane Unterdrückung von Numb und Numblike                                                                  | . 78     |
| 4     | .2.3.      | 3 Verminderte Differenzierung der Myoblastenkulturen nach Repression von                                                    |          |
|       |            | Numblike, Numb und Numb/Numblike                                                                                            | . 79     |
| 4     | .2.3.      | 4 Der Notch Signalweg ist durch den Verlust von Numb und/oder Numblike nicht                                                |          |
|       |            | signifikant hochreguliert                                                                                                   | . 82     |
|       |            |                                                                                                                             |          |
| 4.3   | In v       | vivo Charakterisierung der Funktion von Numb/Numblike in Muskelgewebe und                                                   |          |
|       | Sat        |                                                                                                                             | . 84     |
| 4.3.  | 1 E        | Etablierung von Myf5 <sup>ore</sup> Numb <sup>ara</sup> Numblike <sup>7*</sup> Mäusen                                       | . 85     |
| 4     | .3.1.      | 1 Myf5 <sup>cre</sup> Rekombinase vermittelte Deletion in vivo führt zu einem kompletten                                    |          |
|       |            | Verlust von Numb in primären Myoblasten                                                                                     | . 86     |
| 4     | .3.1.      | 2 Immunologischer Nachweis von Numb und Numblike in Satellitenzellen                                                        | . 87     |
| 4.3.  | 2 F        | Homozygote Myf5 <sup>Cle</sup> Numb <sup>IMA</sup> Numblike <sup>-/-</sup> Tiere sind phänotypisch unauffällig              | . 89     |
| 4.3.  | 3 F        | Reduzierte Satellitenzellzahl in juvenilen Myf5 <sup>Cle</sup> Numb <sup>IMA</sup> Numblike <sup>7<sup>-</sup></sup> Mäusen | . 91     |
| 4.3.  | 4 E        | Erhöhte Proliferationsrate isolierter Myf5 <sup>Cre</sup> Numb <sup>Δ/Δ</sup> Numblike <sup>-/-</sup> Satellitenzellen im   |          |
|       | ١          | /ergleich zu Kontrollzellen                                                                                                 | . 93     |
| 4.3.  | 5 \        | /ermindertes Differenzierungsvermögen von Myf5 <sup>Cre</sup> Numb <sup>∆/∆</sup> Numblike <sup>-/-</sup> Myoblasten.       | . 95     |
| 4.3.  | 6 \        | /erzögerte Aktivierung von Myf5 <sup>Cre</sup> Numb <sup>∆/∆</sup> Numblike <sup>-/-</sup> Satellitenzellen auf isolierten  |          |
|       | Ν          | Auskelfasern                                                                                                                | . 97     |
| 4.3.  | 7 k        | Keine Beeinträchtigung des Regenerationsverhaltens nach Schädigung                                                          | 100      |
|       |            |                                                                                                                             |          |
| 5 D   | <b>NSK</b> | (USSION 1                                                                                                                   | 06       |
|       |            |                                                                                                                             |          |
| 5.1   | Му         | f5-abstammende Zellen sind uneingeschränkt für die Bildung der Rippen                                                       |          |
|       | ver        | antwortlich                                                                                                                 | 106      |
| 52    | Fin        | e Myf5-unabhängige Zellnonulation sorgt für eine normale Entwicklung der                                                    |          |
| 5.2   | Ska        | alettmuskulatur nach Ablation von Myf5-evprimierenden Zellen                                                                | 108      |
|       | UN         |                                                                                                                             | 100      |
| 5.3   | Nu         | mb, eine Determinante der myogenen Differenzierung?                                                                         | 111      |
|       |            |                                                                                                                             |          |
| 5.4   | Мо         | dell der binären Funktion von Numb in Muskelzellen                                                                          | 115      |
| 55    | Δ          | shlick                                                                                                                      | 117      |
| 5.0   | Au         | 55101                                                                                                                       |          |
| 6 I   |            |                                                                                                                             | 24       |
| υL    | 6          |                                                                                                                             | <b>∠</b> |

| 7   | ANHANG 127                |
|-----|---------------------------|
| 7.1 | Abkürzungsverzeichnis 127 |
| 7.2 | Abbildungsverzeichnis     |
| 7.3 | Tabellenverzeichnis       |
| 7.4 | Danksagung133             |

#### **1 EINLEITUNG**

Aktive Bewegung ist die wichtigste und auffälligste Eigenschaft des Lebens. Einzeller bewegen sich häufig mit Hilfe von Geißeln oder Flagellen voran, während die Muskelkontraktion für die Fortbewegung von Vielzellern verantwortlich ist. Nur über die Bewegung können Lebewesen auf die Umwelt einwirken und sich mit ihr auseinandersetzen (Bayrhuber et al., 1989; Eckert et al., 2000). Alle Tiere mit Ausnahme der Einzeller besitzen einkernige Muskelzellen und meist auch vielkernige Muskelfasern. Diese bilden zusammen mit dem Bindegewebe das Muskelgewebe, wobei die Gesamtheit der Muskeln eines Organismus als Muskulatur bezeichnet wird (Liebisch, 2000). Neben den Muskeln bedarf es ein leistungsfähiges Nervensystem, um eine Bewegung auszuführen. Die meisten Muskeln kontrahieren aufgrund von Signalen, die von Neuronen zum Muskel geleitet werden und schließlich zur Verkürzung des Muskels führen. Das Zusammenspiel aus Kontraktion und Erschlaffen des Muskels ist sowohl Grundlage der aktiven Bewegung als auch zahlreicher innerer Körperfunktionen. Beispielsweise ist das Herz ein muskuläres Hohlorgan, dessen ständige Kontraktion für das Überleben des Individuums essentiell ist. Die Verdauung funktioniert nur über die Kontraktion der einzelnen Hohlmuskeln wie Speiseröhre, Magen und Darm. Die Skelettmuskulatur ist das am stärksten ausgebildete Organ des Menschen (Eckert et al., 2000). Rund ein Drittel des Gesamtkörpergewichts einer durchschnittlich gebauten Frau sind Muskeln. Skelettmuskeln können ihre Fähigkeit den Erfordernissen anpassen, sie können sich schnell bewegen und auch eine beträchtliche Kraft entwickeln. Durch Training vergrößern sich die einzelnen Zellen und der Muskel wächst. Dagegen hat fehlende Beanspruchung eine Verminderung der Skelettmuskelmasse (Muskelatrophie) zur Folge. Dank der guten Muskeldurchblutung dient der Muskel als Wärmespeicher und durch verschiedene Stoffwechselprozesse in den Muskelzellen als Wärmebildner (Eckert et al., 2000; Schmidt & Thews, 1997). Muskelerkrankungen, wie die Muskeldystrophie vom Typ Duchenne (DMD), führen zu einem progressiven Muskelschwund mit letalem Ausgang. Durch die fortlaufende Degeneration von Muskelzellen sind die Betroffenen nach und nach nicht mehr in der Lage zu atmen, zu sprechen und zu essen. Obwohl die Heilung dieser Krankheiten noch nicht möglich ist, konnte die Grundlagenforschung im Bereich der Entwicklung der Muskulatur (Myogenese) zum besseren Verständnis des komplexen Krankheitsbildes beitragen. Um neue Erkenntnisse über Krankheiten zu gewinnen ist es erforderlich die

Grundlagen des Ursprungs als auch des Regenerationsverhaltens der Muskulatur besser zu verstehen.

#### 1.1 Muskelaufbau

Aufgrund morphologischer und funktioneller Eigenschaften teilt man Muskeln in zwei Haupttypen ein: glatte und quergestreifte Muskeln (Schmidt & Thews, 1997). Grundlegend besteht ein Muskel von Wirbeltieren entweder aus glatten Muskelzellen oder quergestreiften Muskelfasern, denen die Fähigkeit der Kontraktion gemeinsam ist. Die Muskeln der Gefäße und der Hohlorgane, mit Ausnahme des Herzens, setzen sich aus glatten, spindelförmigen Muskelzellen zusammen. Jede Muskelzelle besitzt nur einen Zellkern und deren Zytoplasma besteht zum größten Teil aus Myofibrillen, die in der Längsrichtung der Zelle verlaufen und die Muskelkontraktion (beispielsweise Peristaltik) ermöglichen. Glatte Muskeln arbeiten langsam und können die Kontraktion ohne großen Energieverbrauch längere Zeit aufrechterhalten. Für die Reizauslösung (Innervation) ist das vegetative Nervensystem verantwortlich. Glatte Muskeln unterliegen damit der unbewussten Steuerung (Eckert *et al.*, 2000; Schmidt & Thews, 1997).

Der quergestreifte Muskel kann in den Skelett- und den Herzmuskel unterteilt werden und kennzeichnet sich durch eine regelmäßige Bänderung der Myofibrillen aus. Unter dem Lichtmikroskop zeigen diese eine Querstreifung auf. Zellen der Herzmuskulatur besitzen meist einen zentralen Kern und sind netzartig untereinander zu einem Fasersystem verbunden. Die Innervation übernimmt das herzeigene Reizleitungssystem. Damit unterliegt das Herz, wie die glatten Muskeln, einer unbewussten Steuerung und eine Ermüdung des Herzmuskels ist nahezu unmöglich (Eckert *et al.*, 2000).

Die Skelettmuskulatur von Wirbeltieren setzt sich aus zahlreichen gebündelten Muskelfasern zusammen (Abbildung 1 A). Die Länge der zylindrisch geformten Muskelfasern variiert zwischen wenigen Millimetern und mehreren Zentimetern. Jede Faser enthält zahlreiche randständige Zellkerne, die direkt unter der Zellmembran (Sarkolemma) liegen. Die vielkernigen Muskelfasern sind durch Verschmelzen von vielen einzelnen Muskelzellen entstanden und werden auch als Synzytium bezeichnet. Das Zellplasma (Sarkoplasma) einer Muskelfaser enthält zahlreiche Myofibrillen, die als Struktureinheit so geordnet sind, dass eine Querstreifung erscheint. Die Myofibrillen Muskelfasern ermöglichen die Muskelkontraktion. Mehrere sind einer von

Bindegewebsmembran umgeben und bilden ein sogenanntes Faserbündel oder Primärbündel. Mehrere dieser Primärbündel bilden zusammen die Sekundärbündel, welche ebenfalls von einer Bindegewebsmembran umgeben sind. Mehrere Sekundärbündel sind wiederum von einer elastischen Muskelhülle (*Muskelfaszie*) umschlossen und bilden den Muskel. Skelettmuskeln sind an den Knochen durch sehr feste Bindegewebsbänder, den Sehnen, befestigt.



#### Abbildung 1: Aufbau der Skelettmuskulatur.

(A) Schematische Darstellung der Skelettmuskulatur (Tajbakhsh, 2009). Muskeln sind über Sehnen an den Knochen verankert. Der Skelettmuskel besteht aus einer Ansammlung mehrerer Muskelfaserbündel (*Faszikel*), die von einer Bindegewebshülle (*Perimysium*) umgeben sind. Zwischen den Muskelfaserbündeln befinden sich das *Epimysium* sowie Gefäße und Nerven. In einem Bündel wird der Raum zwischen benachbarten Muskelfasern vom *Endomysium* aufgefüllt. Über Motoneuronen sind Muskelfasern mit dem Zentralnervensystem verbunden. Eine einzelne Muskelfaser setzt sich aus mehreren fadenförmigen Myofibrillen zusammen. Diese sind durch eine Plasmamembran (*Sarkolemma*) und eine Basalmembran umgeben. Unterhalb der Plasmamembran befinden sich peripher angeordnete Muskelfaserkerne. (**B**) Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Muskelstammzelle (*Satellitenzelle*) zwischen der Plasma- und Basalmembran einer Muskelfaser (Hawke & Garry, 2001). Für die Reizauslösung ist das zentrale und periphere Nervensystem verantwortlich. Die Skelettmuskulatur unterliegt damit dem Konzept der bewussten Steuerung. Im Allgemeinen versorgen Motoneuronen über motorische Endplatten mehrere Muskelfasern. Damit wird gewährleistet, dass mehrere Muskelfasern gleichzeitig innerviert und stimuliert werden. Aufgrund des hohen Energieverbrauchs bei den Prozessen der Kontraktion und Erschlaffung des Muskels, kommt es bei starker Beanspruchung jedoch zur schnellen Ermüdung der Muskelfasern (Bayrhuber *et al.*, 1989; Eckert *et al.*, 2000; Schmidt & Thews, 1997).

Die Skelettmuskulatur von Säugern lässt sich in drei Hauptgruppen entsprechend der Muskelfasertypen unterscheiden (Tabelle 1). **Typ I** Fasern (langsam, oxidativ) weisen eine langsame Kontraktionsgeschwindigkeit und eine geringe Ermüdbarkeit auf. Diese Eigenschaft der Fasern wird durch einen hohen Gehalt an Mitochondrien und einer guten Durchblutung gewährleistet. Muskeln mit einem hohen Anteil an Typ I-Fasern werden auch als Rote Muskulatur bezeichnet. Sie sind durch eine rötliche Färbung charakterisiert, da sie hohe Konzentrationen des Sauerstoff-speichernden Proteins Myoglobin enthalten. Typ I-Fasern befinden sich in den Stellmuskeln und dienen zur Einhaltung der Körperstellung und für langsame, sich wiederholende Bewegungen. Typ lla Fasern (schnell, oxidativ. glykolytisch) sind durch eine hohe Kontraktionsund Erschlaffungsgeschwindigkeit auf schnelle sich wiederholende Bewegungen spezialisiert. Durch eine hohe Anzahl an Mitochondrien kann schnell Energie zur Kontraktion bereitgestellt werden und die Fasern ermüden nur langsam. Typ IIb Fasern (schnell, glykolytisch) stellen den am schnellsten reagierenden Muskelfasertyp dar. Diese Fasern ermüden von allen Fasertypen am schnellsten, können aber im Gegenzug die meiste Kraft und Leistung erzeugen. Typ IIb Fasern kommen bei Aktivitäten zum Einsatz, bei denen man alle Kraft auf einmal und in sehr kurzer Zeit benötigt. Aufgrund der geringen Anzahl an Mitochondrien und Myoglobin führen diese Fasern häufig eine anaerobe Glykolyse, infolge der Sauerstoffschuld, zur Energiegewinnung durch (Eckert et al., 2000).

Die Mehrheit der Menschen besitzt eine annähernd gleiche Anzahl von Typ I und Typ II Fasern. Es ist bekannt, dass körperliches Training Einfluss auf die Umbauprozesse der Skelettmuskulatur hat. Die Gesamteigenschaften der Fasern können sich in Abhängigkeit von mehr aerobem oder anaerobem Training ändern. Spitzensportler können somit extrem unterschiedliche Faseranteile aufweisen. Ein Marathonläufer besitzt vermehrt Ausdauerfasern vom Typ I, da diese für langandauernde Aktivitäten von Vorteil sind. Diese Fasern besitzen außerdem die geringste Fähigkeit zu wachsen. Dagegen fördert das

4

Gewichtstraining die glykolytische (anaerobe) Fähigkeit der Typ IIb Muskelfasern. Diese erzeugen mehr Kraft und haben die größte Fähigkeit zu wachsen (Eckert *et al.*, 2000).

#### Tabelle 1: Eigenschaften der Muskelfasertypen

Modifiziert nach Eckert et al., 2000.

|                                     | langsam<br>oxodativ<br><i>Typ I</i> | schnell<br>oxidativ glykolytisch<br><i>Typ Ila</i> | schnell<br>glykolytisch<br><i>Typ lla</i> |
|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Kontraktionsgeschwindigkeit         | langsam                             | schnell                                            | schnell                                   |
| Ermüdung                            | gering                              | mittel                                             | hoch                                      |
| Mitochondriendichte                 | hoch                                | mittel                                             | gering                                    |
| Myoglobin                           | viel                                | wenig                                              | wenig                                     |
| anaerobe glykolytische<br>Fähigkeit | niedrig                             | hoch                                               | am höchsten                               |
| Kapillardichte                      | hoch                                | mittel                                             | niedrig                                   |
| Faserdurchmesser                    | gering                              | mittel                                             | groß                                      |
| Fähigkeit Kraft zu entwickeln       | gering                              | mittel                                             | groß                                      |

#### 1.2 Muskelentwicklung

Unabhängig von der aufgeführten Beschaffenheit, haben alle Skelettmuskelfasertypen ihren Ursprung im paraxialen und im prechordalen Mesoderm. Die Entwicklung der Skelettmuskelzellen wird als Myogenese bezeichnet (Abbildung 2). Mesenchymale Zellen des paraxialen Mesoderms formen im Verlauf der Entwicklung in kranialer nach kaudaler Richtung lateral neben dem Neuralrohr epitheliale Strukturen, die *Somiten* (Christ & Ordahl, 1995). Neugebildete Somiten (Abbildung 2 (a)) bestehen zunächst aus einem Epithel mit einem mesenchymalen Hohlraum, dem Somitozöl. Ein epithelialisierter Somit lässt sich in eine dorso-laterale und eine ventro-mediale Hälfte unterteilen. Während der Reifung der Somiten erfolgt eine epithelial-mesenchymale Transformation der ventro-medialen Zellen. Diese wandern aus dem Zellverband der Somiten heraus und bilden das *Sklerotom* (Abbildung 2 (b), *Sc*). Dies stellt das Anlagenmaterial für Rippen und Wirbelsäule dar. Der dorso-laterale Teil der Somiten bildet das Dermamyotom (Abbildung

2 (b) - (c)) aus und beinhaltet Zellen, die durch einen undifferenzierten, proliferativen Zustand gekennzeichnet sind. Aus diesen Zellen entwickelt sich die spätere Skelettmuskulatur, Dermis sowie subkutanes Gewebe (Christ & Ordahl, 1995).



#### Abbildung 2: Entwicklung der Skelettmuskulatur aus den Somiten.

Schematische Darstellung (Tajbakhsh, 2003) von transversalen Schnitten eines Mausembryos 9,75 Tage nach der Empfängnis (E9.75). (a) In neugebildeten Somiten aktivieren Sonic Hedgehog (Shh) und Wnt (wingless-type mouse mammary tumor virus (MMTV) integration site (Int-1) family members) Signale, ausgehend vom Neuralrohr (NT) und Notochord (Nc), die Determinierung von Muskelvorläuferzellen. Sezernierte knochenmorphogenetische Proteine (BMPs. Bone Morphogenetic Proteins) aus dem Seitenplattenmesoderm (LPM, lateral plate mesoderm) inhibieren die Entstehung von Muskelzellen in der ventro-lateralen Hälfte der Somiten. Diese Zellen durchlaufen eine epithelial-mesenchymale Transformation und bilden das Sklerotom (Sc) aus, während dorso-laterale Zellen das Dermamyotom ausbilden (b). Das epaxiale und hypaxiale Myotom ((b)-(c)) besteht aus myogenen Zellen, die aus der dorso-medialen Lippe (DML) bzw. der ventro-lateralen Lippe (VLL) des Dermamyotoms wandern. Auf Höhe der Extremitäten wandern myogene Vorläuferzellen (MPCs, myogenic precursor cells) von der VLL des Dermamyotoms in die Nach Erreichen der Zielregionen erfolgt die Expression der Extremität. myogenen Regulationsfaktoren (Myf5, MyoD, Mrf4) und ab E11.5 (d) die anschließende Differenzierung zu Muskelfasern.

Der dorsale Teil des Dermamyotoms (nahe dem Neuralrohr) wird als epaxiales Dermamyotom und der ventrale Bereich als hypaxiales Dermamyotom bezeichnet. Vom epaxialen Dermamyotom wandern die dorso-medial liegenden Zellen (Abbildung 2 (b), DML, dorso-mediale Lippe), nach einer epithelial-mesenchymalen Transformation, zwischen Dermamyotom und Sklerotom und formen das epaxiale Myotom (Denetclaw et al., 1997; Denetclaw & Ordahl, 2000). Die Zellen des epaxialen Myotoms starten als erste die myogene Differenzierung und bilden die spätere interkostale sowie die tiefe Rückenmuskulatur aus. Aus dem hypaxialen Dermamyotom entwickelt sich die Muskulatur der Extremitäten, der Zunge und des Rumpfes. Zellen der ventro-lateralen Dermamyotomlippe (Abbildung 2 (b) und (c), VLL, ventro-laterale Lippe) durchlaufen eine epithelial-mesenchymale Transformation, wandern in das hypaxiale Myotom und differenzieren zur Rumpfmuskulatur (Abbildung 2 (c)) (Cinnamon et al., 1999). Auf Höhe der Extremitäten wandern diese Zellen von der VLL in die Extremitäten hinein (Abbildung 2 (b)). Erst nach Erreichen ihrer Zielregion proliferieren die Zellen, exprimieren myogene Regulationsfaktoren und differenzieren zu Muskeln (Birchmeier & Brohmann, 2000). Die zur Differenzierung determinierten Myoblasten fusionieren miteinander zu langestreckten mehrkernigen Zellen, den Synzytien (Abbildung 2 (d)). In dieser ersten Phase des Fusionierungsprozesses entstehen die primären Muskelfasern, die als Grundgerüst für die spätere Muskulatur dienen. Im Anschluss bilden sich die sekundären Fasern durch Fusionierung weiterer Myoblasten mit den primären Fasern aus. Dies führt zum Anstieg der Zellkernzahl und der Fasergröße (Harris et al., 1989; Jansen & Pavlath, 2008).

Die Spezifizierung der multipotenten Zellen in den Somiten erfolgt durch die Expression von skelettmuskelspezifischen Transkriptionsfaktoren. Die embryonalen Vorläuferzellen der Muskeln gehen aus dem zentralen Bereich des Dermamyotoms hervor und sind durch die Expression der *Paired-Box* Transkriptionsfaktoren Pax3 und Pax7 gekennzeichnet (Goulding *et al.*, 1991; Kassar-Duchossoy *et al.*, 2005; Relaix *et al.*, 2005). Die Skelettmuskelentwicklung wird durch die vier myogenen Regulationsfaktoren (*myogenic regulatory factors, MRFs*) Myf5, MyoD, Myogenin und Mrf4/Myf6 reguliert. In Mausembryonen ist Myf5 der erste MRF, der beginnend ab Tag 8 der Embryogenese (E8.0) in der dorso-medialen Lippe des Dermamyotoms (DML) exprimiert wird (Ott *et al.*, 1991; Summerbell *et al.*, 2000) und bis E13.5 in den Somiten nachweisbar ist. Myogenin wird direkt nach Myf5 ab E8.5 exprimiert und kann bis zur Geburt in differenzierten Myoblasten nachgewiesen werden. Die Expression von Mrf4 zeigt hingegen einen

7

biphasischen Verlauf. Zwischen E9.0 und E11.5 erfolgt eine transiente Transkription von Mrf4 im epaxialen Myotom und ab E16.5 bis zur Geburt kann Mrf4 in Myoblasten detektiert werden (Bober *et al.*, 1991; Sassoon *et al.*, 1989). MyoD ist der letzte MRF, der in den Somiten ab E10.5 anfänglich von Zellen des ventro-lateralen Dermamyotoms exprimiert wird und bis zum Ende der Embryonalentwicklung in Muskelzellen nachzuweisen ist (Smith *et al.*, 1994).

In Zellen, welche in die Extremitäten wandern, ist die Expression der myogenen Regulationsfaktoren verzögert. Die Spezifität dieser wandernden Zellen ist durch die Expression von Pax3, c-Met und Lbx1 gekennzeichnet (Tajbakhsh & Buckingham, 1994). Die Zellen beginnen mit der Expression der MRFs erst nach Erreichen der späteren Muskelareale (Abbildung 2 (d)). Die Bestimmung der myogenen Identität der Vorläuferzellen erfolgt in den Extremitäten ab E10.5 mit der Expression von Myf5, bevor ab E11.5 MyoD und Myogenin exprimiert werden (Braun *et al.*, 1992; Rudnicki *et al.*, 1993). Mrf4 wird als letzter MRF ab E13.5 exprimiert. MyoD, Myogenin und Mrf4 können in den Extremitäten bis zur Geburt nachgewiesen werden (Abbildung 3).



# Abbildung 3: Zusammenfassung der Expression myogener Regulationsfaktoren im Verlauf der Embryogenese in Muskelvorläuferzellen in den Somiten und den Extremitäten.

Dargestellt sind Ergebnisse von *in situ* Hybridisierungen von Mausembryonen unterschiedlichen Alters. Modifiziert nach Sassoon, 1993.

Im Verlauf der Muskelentwicklung gehen myogene Zellen in mehreren Schüben aus den Somiten hervor. Es werden daher embryonale von fetalen Myoblasten unterschieden. Durch Erzeugung von Mäusen, in denen einzelne myogene Regulationsfaktoren deletiert (*Knockout*) wurden, konnte die funktionelle Bedeutung der einzelnen MRFs dargestellt werden.

Inaktivierung von MyoD (MyoD<sup>-/-</sup>) führt zu kaum ersichtlichen Veränderungen der Muskulatur im Vergleich zu Wildtypembryonen. In MyoD<sup>-/-</sup> Embryonen konnte ein bis zu vierfacher Anstieg der Myf5 mRNA Expression nachgewiesen werden (Rudnicki *et al.*, 1992). Mit Hilfe von MyoD<sup>LacZ</sup> Reportermäusen wurde in MyoD<sup>-/-</sup> Embryonen eine um 2,5 Tage verzögerte Entwicklung der hypaxialen Muskeln nachgewiesen (Kablar *et al.*, 1997).

Die Nullmutation für Myf5 (Myf5<sup>m1</sup>) weist ebenso eine normal entwickelte Skelettmuskulatur auf. Aufgrund fehlender myotomaler Zellen zeigen Myf5-defiziente Embryonen eine verzögerte Ausbildung epaxialer Muskeln (Braun *et al.*, 1992; Kablar *et al.*, 1997). Die Myogenese beginnt in diesen Tieren mit einer Verzögerung von etwa zwei Tagen, nach Einsetzen der MyoD Expression (Braun *et al.*, 1992). Myf5-defiziente Mäuse sterben aufgrund schwerwiegender Rippendefekte unmittelbar nach der Geburt. Dabei konnte die gestörte Ausbildung des Brustkorbs in Myf5<sup>m1</sup>-defizienten Mäusen auf die Dysregulation eines noch unbekannten Gens zurückgeführt werden (Kaul *et al.*, 2000).

Die kombinierte Ausschaltung von Myf5 und MyoD führt zum kompletten Verlust der Skelettmuskulatur und muskelspezifischer mRNAs. Aufgrund des Fehlens beider myogener Faktoren werden keine myotomalen Zellen determiniert, was zum Verlust von Muskelzellen führt (Rudnicki *et al.*, 1993). Neueste Studien konnten zudem zeigen, dass dieser Phänotyp durch den zusätzlichen Verlust der Mrf4 Expression hervorgerufen wird (Kassar-Duchossoy *et al.*, 2004). Dies veranschaulicht, dass die Determinierung von Muskelzellen durch mehrere MRFs vollzogen werden kann.

Obwohl Myogenin Knockout Mäuse eine normale Anzahl an Myoblasten aufweisen, sterben die Embryonen aufgrund des Fehlens von differenzierten Muskelfasern (Hasty *et al.*, 1993; Nabeshima *et al.*, 1993; Venuti *et al.*, 1995). Myogenin ist ein essentieller MRF, der für die terminale Differenzierung von myogenen Zellen in der sekundären Myogenese erforderlich ist.

Die Inaktivierung von Mrf4 allein führt zu einer unveränderten Expression der primären MRFs, Myf5 und MyoD. Aufgrund der erhöhten Expression von Myogenin, weisen die Embryonen eine normal entwickelte Muskulatur auf (Braun & Arnold, 1995; Olson *et al.*,

1996; Zhang *et al.*, 1995). Demgegenüber zeigen Mrf4:MyoD Doppelmutanten schwerwiegende Muskeldefekte, welche mit Myogenin-defizienten Mäusen vergleichbar sind (Rawls *et al.*, 1998). Es wird angenommen, dass Mrf4 für die Herunterregulierung von Myogenin verantwortlich ist (Zhang *et al.*, 1995). Mrf4 gilt somit als Differenzierungsfaktor, der jedoch auch Determinierungsfunktionen übernehmen kann (Braun & Arnold, 1995; Kassar-Duchossoy *et al.*, 2004).

Mittels der einzelnen Knockout Studien konnte eine hierarchische Beziehung zwischen den einzelnen MRFs gezeigt werden. Myf5 und MyoD sind für die myogene Determination der multipotenten Somitenzellen verantwortlich und werden als primäre Muskeltranskriptionsfaktoren bezeichnet. Myogenin und Mrf4 sind hingegen für die Differenzierung und den Erhalt des terminal differenzierten Zustandes der Zellen erforderlich (Braun & Arnold, 1996; Megeney & Rudnicki, 1995; Rudnicki *et al.*, 1992; Rudnicki *et al.*, 1993).

#### **1.3 Regeneration des Skelettmuskels**

Es ist bekannt, dass körperliche Betätigung Einfluss auf Umbau- und Regenerationsprozesse der Skelettmuskulatur hat. Während durch Reize ein Muskelwachstum beobachtet werden kann, führt eine fehlende Beanspruchung zur Verringerung der Muskelmasse.

Ständige intensive Beanspruchung des Muskels kann zur Schädigung von Muskelfasern führen. Die Muskulatur besitzt die Fähigkeit Rupturen von Fasern zu regenerieren. Der zeitliche Ablauf einer Muskelregeneration kann pathophysiologisch in drei Phasen eingeteilt werden (Jarvinen *et al.*, 2005).

I. Destruktionsphase: Die erste Phase des Regenerationsprozesses ist durch ein Muskeltrauma gekennzeichnet. Dies kann von Rissen einzelner Fasern bis hin zur Ruptur des gesamten Muskels reichen. Neben der Schädigung des Muskels erfolgt ebenso eine Zerstörung von Gefäßen, Nerven und Bindegewebsstrukturen. Die geschädigten Fasern und Zellen werden nekrotisch abgebaut, was zu einer verstärkten lokalen Entzündungsreaktion führt. Nekrotische Muskelfasern sezernieren zahlreiche Wundhormone, welche die Einwanderung von Entzündungszellen in den Bereich der Ruptur steigern (Jarvinen *et al.*, 2005).

- П. Reparaturphase: In dieser Phase wird zerstörtes Muskelgewebe durch einwandernde Makrophagen phagozytotisch abgebaut. Die eingewanderten Makrophagen sezernieren weitere chemotaktische Signale, wie Wachstumshormone Zytokine/Chemokine, die und zirkulierende Entzündungszellen leiten (Bischoff, 1997). Es erfolgen ein Ersatz von Muskelfasern sowie die Erneuerung von Gefäßen. Das extrazelluläre Material wird durch einsetzende Kollagensynthese erhöht.
- III. Remodulationsphase: Kennzeichen dieser Phase ist der Umbau des Gewebes mit Reorganisation des Narbengewebes. Die funktionelle Kapazität des Muskelgewebes wird wiederhergestellt.

Im adulten Muskel sind die Muskelfaserkerne nicht in der Lage wieder in den Zellzyklus einzutreten (postmitotisch). Um eine Regeneration geschädigter Skelettmuskulatur zu gewährleisten befinden sich im Muskel myogene Zellen, welche die Fähigkeit besitzen zu proliferieren und zu neuen Muskelfasern zu differenzieren. Diese, als Satellitenzellen bezeichnete Zellpopulation (Abbildung 1 B, Abbildung 4), wird durch den Anstieg an Entzündungsfaktoren infolae eines Muskeltraumas. wie beispielsweise einen Muskelfaserriss, aktiviert. Satellitenzellen wandern an den Ort der Verletzung und proliferieren. Die dabei entstehenden von Satellitenzellen abstammenden Tochterzellen (Myoblasten) verschmelzen wieder zu funktionellen Muskelfasern (Abbildung 4). Die zur Differenzierung bestimmten Myoblasten fusionieren entweder mit noch bestehenden Muskelfaserbündeln oder bilden durch Fusion untereinander neue Muskelfasern aus. Im Verlauf des Regenerations- bzw. Fusionsprozesses lagern sich die Zellkerne, der miteinander verschmolzenen Myoblasten, zentral in den neugebildeten Muskelfasern an (Hawke & Garry, 2001). Nach Beendigung der Myoblastenfusion erfolgt ein Größenwachstum der Fasern durch Zunahme zytoplasmatischer Strukturen und eine Neupositionierung der Muskelfaserkerne in eine periphere Region. Der Abschluss der Muskelregeneration geht mit einem Abbruch der Myoblastenproliferation und der Expression kontraktiler Proteine einher (Andres & Walsh, 1996).



#### Abbildung 4: Muskelregeneration durch Satellitenzellen.

Infolge eines Muskeltraumas (Muskelfaserriss) werden Satellitenzellen aktiviert und proliferieren. Die von Satellitenzellen abstammenden Myoblasten wandern zu geschädigten Muskelfasern. In Abhängigkeit der Schwere der Verletzung fusionieren die Myoblasten mit noch bestehenden Muskelfasern oder fusionieren untereinander und bilden neue Muskelfasern aus. Neugebildete, regenerierte Muskelfasern sind durch zentral liegende Muskelfaserkerne gekennzeichnet (Hawke & Garry, 2001).

#### 1.3.1 Satellitenzellen

Satellitenzellen wurden erstmals 1961 von Alexander Mauro entdeckt und aufgrund ihrer peripheren Lokalisation an der Muskelfasermembran benannt (Mauro, 1961). Hierbei handelt es sich um ruhende Einzelzellen, die charakteristisch zwischen dem Sarkolemma und der Basallamina von adulten Muskelfasern zu finden sind (Muir *et al.*, 1965). Satellitenzellen besitzen im Vergleich zu Muskelfaserkernen einen viel kleineren Zellkern mit einem erhöhten Anteil an Heterochromatin (Abbildung 1 B) sowie nur wenige Zellorganellen (Schultz & McCormick, 1994).

Es wird vermutet, dass Satellitenzellen eine spezielle Klasse von myogenen Zellen sind. Jedoch ist es noch unklar, ob Satellitenzellen direkte Nachkommen von embryonalen Myoblasten sind oder als eigenständiger Zelltyp durch Migration aus den Somiten entstehen (Schultz & McCormick, 1994). Erste Satellitenzellen wurden in den Gliedmaßen von E17.5 Mausembryonen nachgewiesen. Diese ersten juvenilen Satellitenzellen sind in Mäusen bis 14 Tage nach der Geburt (pränatales Stadium P14) noch proliferativ aktiv und am Muskelwachstum beteiligt. Nach Abschluss des Muskelwachstums (ca. drei bis vier Wochen nach der Geburt) gehen die Zellen in einen Ruhezustand über. Dieser Zustand ist durch die Beendigung der Mitose und dem Verlust von Zellorganellen gekennzeichnet (Seale & Rudnicki, 2000; Tajbakhsh, 2009).

Satellitenzellen sind die adulten Stammzellen der Muskulatur und genauso wie alle Stammzellen weisen sie zwei wichtige Charakteristika auf. Zum einen sind diese Zellen in der Lage, über einen langen Zeitraum hinweg, sich selbst zu erneuern, das heißt den Stammzellcharakter zu erhalten, und zum anderen können sie proliferativ aktive Myoblasten generieren, die zu Muskelfasern ausdifferenzieren (Bischoff & Heintz, 1994). Satellitenzellen stellen im unverletzten adulten Muskel nur einen kleinen Anteil dar. Durchschnittlich 2 % entsprechen diese Zellen weniger als von allen Muskelfaserzellkernen. Analysen der Satellitenzellzahl von Mäusen und Ratten ergaben, dass die Anzahl dieser Zellen in den ersten Wochen nach der Geburt am höchsten ist (~15%), danach schnell abnimmt und sich kontinuierlich mit zunehmendem Alter verringert (Allbrook et al., 1971; Schultz, 1974; White et al., 2010). Variationen in der Satellitenzellzahl wurden in verschiedenen Muskeltypen beobachtet. In oxidativ arbeitenden guergestreiften Muskeln wurden deutlich höhere Satellitenzellzahlen, als bei glykolytisch arbeitender oder gemischter quergestreifter Muskulatur nachgewiesen (Gibson & Schultz, 1982).

#### 1.3.2 Faktoren zur Identifikation von Satellitenzellen

Lange Zeit wurden Satellitenzellen nur elektronenmikroskopisch von Muskelfaserkernen unterschieden (Abbildung 1 B). Das Genexpressionsprofil von ruhenden, aktivierten und proliferierenden Satellitenzellen bzw. Myoblasten ist im Fokus des aktuellen Forschungsbestrebens. Ruhende Satellitenzellen exprimieren eine Vielzahl von Proteinen, die für deren Identifizierung genutzt werden können. Am häufigsten verwendet werden: *M*-*Cadherin, c-Met, Syndecan-3, Syndecan-4, CD34, Caveolin-1* und *Pax7*.

*M-Cadherin* ist ein Ca<sup>2+</sup>-abhängiges Zelladhäsionsprotein, dass in ruhenden Satellitenzellen auf Mausmuskelfasern sowie im Verlauf der frühen Regeneration in aktivierten Satellitenzellen detektiert werden kann. M-Cadherin befindet sich in der

Plasmamembran von Satellitenzellen direkt an der Kontaktfläche zur Muskelfaser (Bornemann & Schmalbruch, 1994; Cornelison & Wold, 1997; Irintchev *et al.*, 1994). Es wird vermutet, dass M-Cadherin eine stabilisierende Rolle im Kontakt zwischen Satellitenzelle und Muskelfaser besitzt (Irintchev *et al.*, 1994).

Die Rezeptor-Tyrosinkinase *c-Met* kennzeichnet im nichtgeschädigten Muskel ruhende und auf kultivierten Muskelfasern aktivierte Satellitenzellen (Cornelison & Wold, 1997). c-Met-positive Satellitenzellen sind durch eine Oberflächenfärbung unterhalb der Basallamina charakterisiert. Eine c-Met<sup>-/-</sup> Mutation weist einen embryonal letalen Phänotyp um E16.5 auf (Bladt *et al.*, 1995). Aufgrund des Verlustes von migrationsfähigen myogenen Vorläuferzellen besitzen c-Met<sup>-/-</sup> Embryonen keine Muskulatur in den Extremitäten und im Diaphragma. Das multifunktionale Zytokin *HGF* (<u>hepatocyte g</u>rowth <u>factor</u>) ist ein physiologischer Ligand des c-Met Rezeptors. Durch ansteigende Expression von HGF bei einem Muskeltrauma fungiert es als Aktivator von Satellitenzellen und fördert zudem deren Proliferation (Allen *et al.*, 1995; Hawke & Garry, 2001).

Die Proteoglykane *Syndecan-3* und *Syndecan-4* wurden in ruhenden und aktivierten c-Met-positiven Satellitenzellen nachgewiesen (Cornelison *et al.*, 2001). Syndecan-3<sup>-/-</sup> Mäuse besitzen eine hypertrophe Muskulatur mit einer reduzierten Anzahl an Satellitenzellen im Vergleich zu Kontrolltieren. Satellitenzellen dieser Tiere weisen eine verringerte Proliferation und eine verspätete Differenzierung infolge von erhöhtem Zelltod auf (Cornelison *et al.*, 2004; Pisconti *et al.*, 2010). Während Syndecan-3<sup>-/-</sup> Mäuse eine normale Muskelregeneration aufweisen, sind Syndecan-4<sup>-/-</sup> Mäuse nicht in der Lage geschädigte Muskelfasern zu regenerieren (Cornelison *et al.*, 2004).

Das Transmembranglykoprotein *CD34* ist ein etablierter Marker für hämatopoetische Stammzellen und ruhende Satellitenzellen (Beauchamp *et al.*, 2000; Krause *et al.*, 1996). Jonathan R. Beauchamp und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass CD34 mit M-Cadherin in ruhenden und proliferierenden Satellitenzellen exprimiert wird. Dabei existieren zwei Isoformen von CD34, die vermutlich auf unterschiedliche Weise den Erhalt des Stammzellcharakters und die Aktivierung von Satellitenzellen regulieren. Während die kürzere CD34<sup>trunc</sup> Isoform in ruhenden Satellitenzellen exprimiert wird, führt die Aktivierung der Zellen zur Expression der längsten CD34<sup>full</sup> Isoform (Beauchamp *et al.*, 2000).

Der Paired-Box Transkriptionsfaktor Pax7 wurde sowohl in ruhenden, als auch proliferierenden Satellitenzellen identifiziert (Seale et al., 2000). Seale und Mitarbeiter zeigten, dass die Deletion von Pax7 zu einer reduzierten Muskelmasse, sowie einen kompletten Verlust von Satellitenzellen in Pax7<sup>-/-</sup> Mäuse führt. Isolierte Skelettmuskelzellen aus diesen Tieren sind nicht in der Lage c-Met-positive Myoblasten auszubilden (Seale et al., 2000). Der letale Phänotyp von Pax7<sup>-/-</sup> Mäuse innerhalb der ersten drei Lebenswochen wird vermutlich auf die embryonale Pax7 Expression in Teilen des Zentralnervensystems zurückgeführt (Mansouri et al., 1996). Mittels einer transgenen Pax7 Mauslinie, welche das β-Galaktosidase Gen anstelle des *Paired-Box* Transkriptionsfaktors exprimiert (Pax7<sup>LacZ/LacZ</sup>), konnten Satellitenzellen in juvenilen Pax7-defiziente Mäuse nachgewiesen werden (Oustanina et al., 2004). Diese Beobachtung sowie die normal entwickelte Muskulatur in Pax7<sup>LacZ/LacZ</sup> Mäusen lassen vermuten, dass Pax7 für die Spezifizierung von Satellitenzellen und Skelettmuskelbildung nicht erforderlich ist. Im Verlauf der postnatalen Muskelentwicklung reduziert sich die Anzahl an Satellitenzellen vermutlich durch unzureichende mitotische Aktivität und erhöhte Apoptose der Zellen (Kuang et al., 2006; Relaix et al., 2006). Pax7 scheint somit für den Erhalt des Stammzellcharakters der Satellitenzellen von entscheidender Bedeutung zu sein. Die absolute Notwendigkeit von Pax7-positiven Satellitenzellen für die Muskelregeneration wurde in neuesten Studien dargestellt. Lepper und Mitarbeiter konnten durch induzierte Ablation von Pax7-positiven Zellen in adulten Pax7<sup>+/CE</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Mäusen zeigen, dass die Muskeln dieser Tiere nicht zur Regeneration befähigt sind (Lepper et al., 2011).

Funktionelle Analysen von Pax7 bei der Muskelregeneration und der Aufrechterhaltung des Satellitenzellpools werden auch in unserer Arbeitsgruppe (AG Braun) durchgeführt. Inaktivierung der Pax7 Expression mittels Gendeletion in frühen mesodermalen Zellpopulationen ab E7.0 führt zu einer massiven Reduktion von Satellitenzellen in adulten Tieren. Eine Schädigung des Muskels dieser Mäuse resultiert hingegen in einem Anstieg der Satellitenzellzahl, was möglicherweise auf eine erhöhte Proliferation restlicher Pax7positiver Satellitenzellen zurückzuführen ist (S. Günther, unveröffentlicht). Diese Beobachtungen lassen ebenso vermuten, dass eine weitere myogene Satellitenzellpopulation existiert, die einen alternativen embryonalen Ursprung aufweist. Mäusen, in denen die Expression von Pax7 in Myf5-exprimierenden Zellen ausgeschaltet wurde (Myf5<sup>Cre</sup> Pax7<sup> $\Delta/\Delta$ </sup>), entwickeln eine normale Muskulatur. Im Vergleich zu Kontrolltieren zeigen Myf5<sup>Cre</sup> Pax7<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> Mäuse jedoch ein Wachstumsdefizit und mit zunehmenden Alter eine verstärkte Reduktion der Satellitenzellzahl. Dies resultiert in

EINLEITUNG

einem Verlust der Regenerationsfähigkeit nach Schädigung in adulten Tieren (S. Günther, unveröffentlicht). Kuang und Mitarbeiter beschreiben mit Hilfe der Myf5<sup>Cre</sup> Rosa26<sup>YFP</sup> Reportermaus, dass etwa 10 % aller adulten Pax7-positiven Satellitenzellen niemals Myf5 exprimiert haben (Kuang *et al.*, 2007). Es wurde zudem gezeigt, dass aus Pax7-positiven/Myf5-negativen Satellitenzellen Myf5-positive Zellen hervorgehen können. Diese Studien sind jedoch nicht unumstritten, da bei Verwendung anderer Reportermauslinien divergierende Resultate erzielt wurden. Die Markierung und Verfolgung von MyoD-exprimierenden Zellen mittels einer MyoD<sup>Cre</sup> Rosa26<sup>YFP</sup> Reportermaus zeigten, dass fast alle Satellitenzellen während der Entwicklung einmal MyoD exprimiert haben (Kanisicak *et al.*, 2009).

Es lässt sich feststellen, dass keiner der oben aufgeführten Faktoren ausschließlich ruhende Satellitenzellen markiert. Dagegen ist bekannt, dass ruhende Satellitenzellen keine oder nur unerhebliche Mengen der myogenen Regulationsfaktoren exprimieren. Oftmals dient somit eine Kombination von Stammzell- und Abstammungsmarkern zur eindeutigen Identifizierung der Muskelstammzellpopulation.

#### 1.3.3 Bedeutung myogener Regulationsfaktoren in Satellitenzellen

Auf der Grundlage von Expressionsstudien werden MRFs in zwei funktionelle Gruppen eingeteilt. Während Myf5 und MyoD von proliferierenden Satellitenzellen exprimiert werden, sind erst mit Differenzierung der Zellen Myogenin und Mrf4 nachweisbar. Mit Hilfe verschiedener transgener Mausmodelle wurde die Wichtigkeit der einzelnen MRFs in Satellitenzellen untersucht.

Mit Mäusen, in denen  $\beta$ -Galaktosidase ausgehend vom Myf5 Promoter exprimiert wird (Myf5<sup>nLacZ/+</sup>), konnte nachgewiesen werden, dass etwa 90 % aller Satellitenzellen Myf5 positiv sind. Myf5<sup>nLacZ/+</sup> Satellitenzellen sind ebenso positiv für CD34 und M-Cadherin (Beauchamp *et al.*, 2000). Obwohl in wenigen ruhenden Satellitenzellen Myf5 mRNA nachgewiesen wurde (Cornelison & Wold, 1997), wird Myf5 als Marker für aktvierte Satellitenzellen eingeordnet. Myf5 fungiert als Determinante des myogenen Zellschicksals und kann vermehrt in proliferierenden Satellitenzellen nachgewiesen werden (Zammit *et al.*, 2002). Adulte Myf5-defiziente (Myf5<sup>Δ/Δ</sup>) Mäuse besitzen im Vergleich zu Kontrolltieren eine leicht reduzierte Satellitenzellzahl (Ustanina *et al.*, 2007). Aufgrund verminderter

Proliferationsaktivität der Satellitenzellen weisen Myf5<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> Knockout Mutanten eine verzögerte Regeneration nach Muskelschädigung auf (Ustanina *et al.*, 2007).

Wie für Myf5 gezeigt wurde, konnten ebenso nur unerhebliche MyoD mRNA Mengen in einzelnen Satellitenzellen direkt nach der Isolation detektiert werden (Cornelison & Wold, 1997). Der Verlust von MyoD führt zur erhöhten Anzahl an Satellitenzellen auf Muskelfasern von MyoD<sup>null</sup> Knockout Mäusen (Cornelison *et al.*, 2000). Obwohl MyoD<sup>null</sup> Satellitenzellkulturen erhöhte Mengen von Myf5 mRNA und eine vermehrte Proliferation aufweisen, ist die terminale Differenzierung der Zellen inhibiert (Cornelison *et al.*, 2000; Sabourin *et al.*, 1999; Yablonka-Reuveni *et al.*, 1999). Es wird daher vermutet, dass der Verlust von MyoD zu einem intermediären Zellstatus zwischen ruhenden Satellitenzellen und determinierten Myoblasten führt (Sabourin *et al.*, 1999; Sabourin & Rudnicki, 2000). Mrf4 wird nicht von Satellitenzellen exprimiert und ist erst mit Beginn der Fusionierung in MyoD- und Myogenin-positiven Myoblasten nachzuweisen (Zhou & Bornemann, 2001).

Satellitenzellen besitzen die Fähigkeit das Gleichgewicht zwischen dem Erhalt des Stammzellcharakters und der Differenzierung zu Muskelfasern zu bewahren (Abbildung 5). Der molekulare Mechanismus, wie Satellitenzellen ihren Stammzellcharakter nach Aktivierung erhalten können wird von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Studien mit Muskelfaser-assoziierten Satellitenzellen beschreiben, dass eine Teilpopulation von aktivierten Satellitenzellen die Pax7 Expression beibehält und die Expression der MRFs MyoD/Myf5 reduziert (Abbildung 5). Diese Zellen bewahren dadurch ihren Stammzellcharakter und bleiben als Satellitenzelle erhalten, während die anderen durch Myogenin Expression zur Differenzierung bestimmt sind (Olguin et al., 2007; Zammit et al., 2004). Weiterhin wird vermutet, dass sich Satellitenzellen asymmetrisch teilen können und zwei ungleiche Tochterzellen entstehen. Während eine Tochterzelle, die für den Erhalt des Stammzellcharakters bestimmt ist in einen Ruhezustand übergeht, proliferiert und differenziert die andere (Kuang et al., 2008). Alternativ wird spekuliert, dass die symmetrische Zellteilung von Satellitenzellen zwei Tochterzellen mit identischem Schicksal generiert. Dabei entstehen entweder zwei Stammzellen oder zwei proliferierende Myoblasten. Eine weitere Theorie basiert auf der zufälligen Bestimmung des Zellschicksals der Tochterzellen nach symmetrischer Zellteilung (Kuang et al., 2008).



## Abbildung 5: Schematische Darstellung der Expression myogener Regulationsfaktoren und deren Einfluss auf das Schicksal von Satellitenzellen.

Aktivierte Pax7-positive Satellitenzellen beginnen mit der Expression von Myf5 und/oder MyoD. Während der Differenzierung wird Pax7 durch Myogenin als Differenzierungsmarker abgelöst. Eine Teilpopulation an Zellen behält durch kontinuierliche Pax7 Expression ihren Stammzellcharakter.

Der genaue molekulare Mechanismus der Aktivierung und Erhaltung des Stammzellcharakters sowie Differenzierung von Satellitenzellen, ist jedoch noch nicht entschlüsselt. Unabhängig von den MRFs können beispielsweise auch intrinsische zytoplasmatische Faktoren das Zellschicksal von Satellitenzellen beeinflussen.

#### 1.4 Die Zellschicksalsdeterminanten Numb und Numblike

Numb ist ein evolutionär hoch konserviertes Adapterprotein, das bei der Bestimmung des Zellschicksals sowohl in neuronalen als auch nicht-neuronalen Geweben eine Rolle spielt. Ursprünglich wurde die Funktion von Numb in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* bei der asymmetrischen Zellteilung von Vorläuferzellen im peripheren und zentralen Nervensystem identifiziert (Rhyu *et al.*, 1994; Spana *et al.*, 1995; Uemura *et al.*, 1989). So verteilt sich Numb im Verlauf der Zellteilung von *Drosophila* Neuroblasten vorherrschend nur in die basal liegende Zelle. Diese asymmetrische Verteilung gewährleistet, dass die Numb-positive Zelle als Ganglion Mutterzelle bestimmt wird. Während die Ganglion Mutterzelle zum postmitotischen Neuron differenziert, behält die apikal liegende Zelle ihren Stammzellcharakter als Neuroblast (Jan & Jan, 2001).

Eine asymmetrische Verteilung des Numb Homologs in Säugern wurde in mitotischen neuronalen Vorläuferzellen von E12.5 Mausembryonen beschrieben (Zhong et al., 1996). Dabei ist Numb mit Abschluss der Zellteilung in der apikalen Zelle lokalisiert. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass die Numb-positive Zelle ihren Stammzellcharakter als neuronale Vorläuferzelle bewahrt und in der ventrikulären Zone des Neocortex verbleibt (Zhong et al., 1996; Zhong et al., 1997). Mit fortscheitender neuronaler Entwicklung konnte Numb jedoch auch in postmitotischen Zellen detektiert werden. So wird vermutet, dass Numb in Säugern, wie auch in Invertebraten, das Gleichgewicht zwischen Erhalt des Stammzellcharakters und Differenzierung reguliert (Zhong et al., 1997; Zhou et al., 2007). In Säugern werden die zwei homologen Gene, Numb und Numblike, in einer Vielzahl von Geweben exprimiert. Numb und Numblike weisen teilweise überlappende Expressionsmuster im Verlauf der embryonalen Mausentwicklung auf. Ab E8.5 werden beide Gene in den meisten embryonalen Strukturen, wie den Somiten und dem gesamten Neuralrohr exprimiert (Petersen et al., 2002; Zhong et al., 1996; Zhong et al., 1997). Erste Unterschiede im Expressionsmuster von Numb und Numblike wurden ab E12.5 bei der neuronalen Entwicklung nachgewiesen. Während Numb sowohl in mitotisch aktiven neuronalen Vorläuferzellen sowie in differenzierten Neuronen exprimiert ist, wurde Numblike nur in differenzierten Neuronen außerhalb der ventrikulären Zone nachgewiesen (Petersen et al., 2004; Zhong et al., 1996; Zhong et al., 1997). In adulten Mäusen wird Numblike vermehrt im Gehirn und in geringerem Maße in Lunge und Skelettmuskel exprimiert (Zhong et al., 1997). Numb zeigt hingegen ein ubiquitär verteiltes Expressionsmuster in nahezu allen Geweben bzw. Organen, wie beispielsweise Herz, Gehirn, Lunge etc. (Zhong et al., 1996).

Bisherige Arbeiten in Säugern weisen auf eine Funktion von Numb beim Erhalt des Stammzellcharakters sowie bei der Regulierung der Differenzierung hin. So resultiert der Funktionsverlust von Numb in einem embryonal letalen Phänotyp zwischen E10.5 und E11.5. Verantwortlich hierfür ist die unvollendete Schließung des kranialen Neuralrohrs aufgrund frühzeitiger Differenzierung mitotisch aktiver Epithelzellen (Zhong *et al.*, 2000; Zilian *et al.*, 2001). Für das Numb Homolog Numblike kann keine eindeutige Funktion beschrieben werden. Außer einer verringerten Fertilität weiblicher Tiere, weisen Numblike Nullmutationen keinen offensichtlichen Phänotyp auf (Petersen *et al.*, 2002). Die gleichzeitige Abwesenheit beider Gene führt zu einer früheren Letalität ab E9.5 (Petersen *et al.*, 2002; Petersen *et al.*, 2004). Dies spricht für eine funktionelle Überlappung von Numblike innerhalb der Numb Familie.

Numblike ist ein zytoplasmatisches Protein, während Numb zytoplasmatisch, wie auch membranständig detektiert werden kann (Zhong et al., 1997). Während für Numblike keine ausführlichen Studien über Spleißformen existieren, sind für Numb vier Protein-Isoformen in Säugern bekannt (Abbildung 6). Infolge alternativen mRNA Spleißen unterscheiden sich die Numb Isoformen in der Proteingröße: Numb1 (72 kDa), Numb2 (66 kDa), Numb3 (71 kDa) und Numb4 (65 kDa). Die kürzeste Isoform, Numb4, zeigt dabei eine hohe Homologie zum Drosophila Numb (Verdi et al., 1999). Eine N-terminale Phosphotyrosin-Bindedomäne (PTB) reguliert die Lokalisation von Numb in der Zelle und dient zur Interaktion mit Ubiquitinligasen (Dho et al., 1999; Dho et al., 1998; Knoblich et al., 1997; McGill & McGlade, 2003; Verdi et al., 1999; Yaich et al., 1998). Durch eine um elf Aminosäuren längere PTB Domäne (Numb-PTBL) unterscheiden sich die Isoformen Numb1 und Numb2 von Numb3 und Numb4 (Numb-PTB<sub>5</sub>, Abbildung 6). So konnte gezeigt werden, dass nur die Numb-PTB<sub>L</sub> Isoformen durch Interaktion mit der E3-Ubiquitinligase LNX ubiquitinyliert werden und damit deren proteasomaler Abbau vermittelt wird (Nie *et al.*, 2004). Während die Numb-PTB<sub>1</sub> Isoformen membranständig vorzufinden sind, konnte gezeigt werden, dass die Isoformen mit verkürzter PTB<sub>S</sub> Domäne zytoplasmatisch lokalisiert sind (Dho et al., 1999; Knoblich et al., 1997). Im Verlauf der neuronalen Differenzierung wurde beschrieben, dass die Numb-PTB<sub>S</sub> Isoformen sowohl in neuronalen Vorläuferzellen als auch in differenzierten Neuronen nachzuweisen sind. Die Expression der Numb-PTB<sub>L</sub> Isoformen reduziert sich hingegen mit zunehmender Differenzierung und ist im adulten Gehirn nicht nachweisbar (Bani-Yaghoub et al., 2007). Am C-terminalen Ende von Numb befinden sich konservierte Bindemotive für endozytotische Prozesse. So ermöglicht das DPF (Asparaginsäure-Prolin-Phenylalanin) Bindemotiv die Bindung von  $\alpha$ -Adaptin. Über das NPF (Asparagin-Prolin-Phenylalanin) Motiv erfolgt die Interaktion mit Proteinen der Esp15-Familie, die bei Clathrin-abhängigen und -unabhängigen Endozytoseprozessen beteiligt sind (Smith et al., 2004; Zhou et al., 2007).



## Abbildung 6: Vergleich der Proteinstruktur von *Drosophila* Numb mit den Maus Homologen Numb und Numblike.

Vier verschiedene Numb Isoformen existieren durch alternatives mRNA Spleißen in Säugern. Numb1 (p72) und Numb2 (p66) enthalten die längste Phosphotyrosin Bindedomäne (PTB), während Numb3 (p71) und Numb4 (p65) eine verkürzte PTB Domäne aufweisen. Numb1 und Numb3 besitzen eine um 48 Aminosäuren längere Prolinreiche Region (PRR) als Numb2 und Numb4. AS = Aminosäuren, DPF = <u>Asparaginsäure-Prolin-Phe</u>nylalanin Bindemotiv, NPF = <u>Asparagin-Prolin-Phe</u>nylalanin Bindemotiv. Angaben in Klammern entsprechen der Proteingröße in kDa. Abbildung verändert aus Gulino *et al.*, 2010.

Ein weiterer Unterschied in den Numb Isoformen ist durch eine Prolinreiche Region (PRR) am C-Terminus des Proteins gekennzeichnet. Entsprechend der Länge der PRR Domäne, werden Numb1 und Numb3 mit einer um 48 Aminosäuren längeren PRR Domäne (PRR<sub>L</sub>) von Numb2 und Numb4 (PRR<sub>s</sub>) unterschieden. Während die Numb-PRR<sub>s</sub> Isoformen ubiquitär im Verlauf der gesamten embryonalen Entwicklung und in adulten Geweben exprimiert werden, weisen Numb-PRR<sub>L</sub> Isoformen ein reguliertes Expressionsmuster auf (Verdi *et al.*, 1999). Dabei sind Numb-PRR<sub>L</sub> Isoformen nur in proliferierenden neuronalen Vorläuferzellen und nicht in differenzierten Neuronen im adulten Gehirn nachzuweisen (Bani-Yaghoub *et al.*, 2007; Verdi *et al.*, 1999). Die bisherigen neuronalen Studien weisen darauf hin, dass die Numb-PRR<sub>L</sub> Isoformen für den Erhalt des Stammzellcharakters bzw. für die Proliferation der Vorläuferzellen verantwortlich sind (Tabelle 2). Demgegenüber konnte gezeigt werden, dass die Numb-PRR<sub>s</sub> Isoformen die neuronale Differenzierung fördern (Bani-Yaghoub *et al.*, 2007; Verdi *et al.*, 1999).

|                                                          | embryonale<br>Expression     | adulte<br>Expression | Gewebe                          | Zellstatus/Funktion                                 |
|----------------------------------------------------------|------------------------------|----------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Numblike                                                 | E8.5 bis E18.5<br>(neuronal) | ja                   | Gehirn, Lunge,<br>Skelettmuskel | differenzierte Neuronen                             |
| Numb1<br>(PTB <sub>L</sub> -PRR <sub>L</sub> )<br>72 kDa | E8.5 bis E14.5<br>(neuronal) | gering               | Testis,<br>Prostata,<br>Darm    | Erhalt des<br>Stammzellcharakters,<br>Proliferation |
| Numb2<br>(PTB <sub>L</sub> -PRR <sub>s</sub> )<br>66 kDa | E8.5 bis E18.5<br>(neuronal) | ja                   | ubiquitär                       | fördert neuronale<br>Differenzierung                |
| Numb3<br>(PTB <sub>s</sub> -PRR <sub>L</sub> )<br>71 kDa | E8.5 bis E14.5<br>(neuronal) | gering               | Testis,<br>Prostata,<br>Darm    | Erhalt des<br>Stammzellcharakters,<br>Proliferation |
| Numb4<br>(PTB <sub>s</sub> -PRR <sub>s</sub> )<br>65 kDa | E8.5 bis E18.5<br>(neuronal) | ja                   | ubiquitär                       | fördert neuronale<br>Differenzierung                |

Tabelle 2: Zusammenfassung der Expression und Zellfunktion von Numblike und Numb imMausgewebe.

Neben der asymmetrischen Verteilung in neuronalen Vorläuferzellen wurde ebenso eine Ungleichverteilung des Proteins in mitotischen Retinazellen (Cayouette et al., 2001; Dooley et al., 2003) und Skelettmuskelvorläuferzellen (Conboy & Rando, 2002; Jory et al., 2009) beschrieben, was auf eine weitere Funktion von Numb außerhalb des Zentralnervensystems hinweist. Aus Studien in Drosophila ist bekannt, dass die Abwesenheit von Numb in Muskelvorläuferzellen zum Verlust der Expression von Muskelgenen und damit einer Muskelzellpopulation führt (Ruiz Gomez & Bate, 1997). Eine asymmetrische Verteilung von Numb in mitotischen Zellen des Dermamyotoms wurde ebenso in Hühnchen- sowie in Mausembryonen gezeigt (Holowacz et al., 2006; Jory et al., 2009). In Hühnchenembryonen wurde beschrieben, dass Numb sich an die basale Membran von Pax3/Pax7-positiven Muskelvorläuferzellen der dorso-medialen Lippe des Dermanyotoms konzentriert, während in postmitotischen Zellen des Myotoms eine gleichförmige Verteilung von Numb vorzufinden ist (Holowacz et al., 2006; Venters & Ordahl, 2005). Es wird vermutet, dass die dorso-mediale Lippe des Dermamyotoms eine Stammzellnische darstellt, wo das Schicksal der Zellen durch die asymmetrische Verteilung von Numb bestimmt wird. Die Numb-negative Tochterzelle verbleibt proliferationsaktiv in der DML, während die Numb-positive Zelle in das Myotom wandert und zur Zelldifferenzierung bestimmt ist (Holowacz *et al.*, 2006; Venters & Ordahl, 2005). Überexpression von Numb::GFP in Pax3/Pax7-positiven myogenen Vorläuferzellen des epaxialen Dermamyotoms in Mausembryonen führt zur vermehrten symmetrischen Verteilung von Numb. Dies resultiert in einer Vermehrung der myogenen sowie dermalen Stammzellpopulation (Jory *et al.*, 2009). Obwohl eine asymmetrische Verteilung von Numb auch in adulten mitotisch aktiven Satellitenzellen (Conboy & Rando, 2002; Shinin *et al.*, 2006) gezeigt werden konnte, ist dessen funktionelle Wichtigkeit in diesen Zellen noch nicht aufgeklärt.

#### **1.5 Zielsetzung der Arbeit**

Bisherige Arbeiten über die embryonale Muskelentwicklung wiesen darauf hin, dass die myogenen Regulationsfaktoren Myf5 und MyoD sich gegenseitig kompensieren können. Untersuchungen in unserem Labor haben gezeigt, dass die Anwesenheit von einem dieser Regulationsfaktoren für eine normale Muskelentwicklung erforderlich ist. Für die Fragestellung, ob verschiedene embryonale Muskelvorläuferzellpopulationen existieren, wurden Myf5-exprimierende Zellen mittels eines *in vivo* Zellablationsmodells aus dem Zellverband im Verlauf der embryonalen Entwicklung entfernt. Die stetige Ablation der Myf5-exprimierender Zellen sollte darüber Aufschluss geben, ob MyoD aus derselben oder von einer Myf5-negativen Zellpopulation hervorgeht.

Weitere Faktoren, denen eine Beteiligung bei der Bestimmung des Zellschicksals von Vorläuferzellen zugesprochen wird, sind die Proteine Numb und Numblike. So wurde bereits eine Expression von Numb in Satellitenzellen nachgewiesen. Um die Rolle beider Faktoren für die Differenzierung bzw. der Erhaltung des Zellstatus in Muskelzellen detaillierter zu analysieren, wurden Untersuchungen in Zellkultur und *in vivo* vorgenommen. Zunächst wurde die Auswirkung der Herunterregulierung der Expression von Numb und/oder Numblike auf das Differenzierungspotential von  $C_2C_{12}$  Mausmyoblasten untersucht. Um aufzuklären, welche Rolle Numb und Numblike in Satellitenzellen besitzen, erfolgte die einzelne sowie kombinierte genetische Inaktivierung beider Gene in der Maus und deren funktionelle Untersuchung.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim), Carl Roth GmbH (Karlsruhe) und Invitrogen GmbH (Karlsruhe) bezogen.

| Reagenz                                            | Hersteller                                           |
|----------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| BM purple AP Substrat                              | Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim |
| Collagen Typ 1 (#354236)                           | BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA            |
| Collagenase P (#11 213 857 001)                    | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim                     |
| Collagenase Typ 2 (#4176)                          | Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA   |
| Diaminobenzidin (DAB) Substrat Tabletten           | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim                 |
| Digoxigenin-11-UTP                                 | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim                     |
| Dispase (#354235)                                  | BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA            |
| DMSO                                               | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim                 |
| DNase I (#11 284 932 001)                          | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim                     |
| Dithiothreitol (DTT)                               | AppliChem GmbH, Darmstadt                            |
| Entelan®                                           | Merck, Darmstadt                                     |
| Eosin 2C 140                                       | Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH & CO., Münster       |
| Ethidiumbromid                                     | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim                 |
| Hämatoxylin Gill Nr.3                              | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim                 |
| Ionenaustauscher (AG501-X8)                        | BioRad Laboratories GmbH, München                    |
| Isotonische NaCI-Lösung 0,9 %                      | B. Braun Melsungen AG, Melsungen                     |
| Kardiotoxin ( <i>Naja mossambica</i> , #C-9759)    | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim                 |
| Ketamin 10 %                                       | CEVA Sante Animale, Düsseldorf                       |
| Magermilchpulver                                   | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                            |
| Mowiol 4-88                                        | Fluka Chemie GmbH, Buchs                             |
| Paraformaldehyd (PFA)                              | Fluka Chemie GmbH, Buchs                             |
| Percoll (#P4937)                                   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim                 |
| Ponceau S                                          | Fluka Chemie GmbH, Buchs                             |
| Proteinstandard<br>(Novex® Sharp Protein Standard) | Invitrogen GmbH, Karlsruhe                           |

#### Tabelle 3: Spezifische Reagenzien

| Puromycin                                                    | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim          |
|--------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Rimadyl® (Carprofen)                                         | Pfizer Inc. (geliefert aus der Apotheke)      |
| Tissue-Tek® O.C.T. Polyfreeze <sup>™</sup><br>Einfriermedium | Miles Inc., Diagnostic Division, Elkhart, USA |
| TRIZOL Reagenz®                                              | Invitrogen GmbH, Karlsruhe                    |
| X-Gal                                                        | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim          |
| Xylazin 2 %                                                  | CEVA Sante Animale, Düsseldorf                |

### 2.2 Geräte

Im Folgenden sind nur solche Geräte aufgeführt, deren Erwähnung im Rahmen dieser Arbeit als wichtig erschien.

| Gerät                         | Тур                                             | Hersteller                                                     |
|-------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Gewebezerkleinerer            | Mcllwain™ <i>Tissue Chopper</i>                 | The Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd., Guildford, England |
| Kryostat                      | Leica CM3050                                    | Leica Microsysteme Vertrieb GmbH,<br>Bensheim                  |
| Mikroplatten-Reader           | FLUOstar®                                       | BMG Labtech GmbH, Ortenberg                                    |
| Mikroskope                    | Axiophot 2                                      | Carl Zeiss Jena GmbH, Jena                                     |
|                               | Konfokales Mikroskop<br>(TCS SP2)               | Leica Microsysteme Vertrieb GmbH,<br>Bensheim                  |
|                               | Z1 Fluoreszenzmikroskop                         | Carl Zeiss Jena GmbH, Jena                                     |
| PCR Maschinen                 | Thermocycler                                    | SensoQuest Biomedizinische<br>Elektronik GmbH, Göttingen       |
|                               | iCycler iQ Multicolor Real Time PCR<br>Maschine | Bio-Rad Laboratories GmbH,<br>München                          |
| Spektralphotometer            | Nanodrop 2000/2000c                             | Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA                        |
| Ultraschall-Homogenisator     | SONOPULS HD 2070/2200                           | Bandelin electronic GmbH & Co.<br>KG, Berlin                   |
| VersaDoc™ <i>Image System</i> | VersaDoc™ 3000                                  | BioRad Laboratories GmbH,<br>München                           |
| Vibratom                      | Leica VT 1000S                                  | Leica Microsysteme Vertrieb GmbH,<br>Bensheim                  |

#### Tabelle 4: Geräte

## 2.3 Spezielle Verbrauchsmaterialien

| Material                                                 | Hersteller                                    |
|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Insulinspritze mit Kanüle                                | Mercateo AG, München                          |
| Kammer-Objektträger (Lab Tek™ Chamber Slide™)            | Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA       |
| Proteinmembran<br>(Protran Nitrozellulose Membran, BA85) | Whatman Inc., New Jersey, USA                 |
| SDS Gele (NuPAGE® Novex®)                                | Invitrogen GmbH, Karlsruhe                    |
| Super Frost Ultra Plus                                   | Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA       |
| Super Signal West™ Femto                                 | Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA       |
| Tissue-Tek® Einfrierförmchen                             | Miles Inc., Diagnostic Division, Elkhart, USA |
| XCell II™ Western Blot Module                            | Invitrogen GmbH, Karlsruhe                    |
| Zellsiebe (40 μm und 100 μm)                             | BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA     |

#### Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien

## 2.4 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

#### **Tabelle 6: Verwendete Kits**

| Kit                                                                 | Hersteller                              |
|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Click-iT EdU                                                        | Invitrogen GmbH, Karlsruhe              |
| <i>DC</i> ™ Protein Kit                                             | BioRad Laboratories GmbH, München       |
| illustra ProbeQuant™ G-50 Micro Columns                             | GE Healthcare Europe GmbH, München      |
| Masson-Trichrom                                                     | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim    |
| TUNEL Apoptose Assay<br>(In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red) | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim        |
| Absolut™ SYBR® Green Fluorescein Mix                                | Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA |
| VECTASTAIN Elite ABC Standard Kit - Peroxidase                      | Vector Laboratories, Wiesbaden          |
| Vector Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I                     | Vector Laboratories, Wiesbaden          |
# 2.5 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit Wasser angesetzt, welches zuvor über eine Aufbereitungsanlage (MilliQ Plus Water System, Millipore GmbH, Schwalbach/Ts) bis zum Qualitätsgrad *"aqua bidest"* gereinigt wurde.

| Allgemeine Lösungen                          |                                                                                                                                    |  |  |  |
|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--|--|
| 2x HBS                                       | 50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O, pH 7,05                                      |  |  |  |
| 1x PBS                                       | 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄•2H₂O,<br>1,4 mM KH₂PO₄                                                                     |  |  |  |
| 4 % PFA/PBS                                  | 40 mg/ml Paraformaldehyd (PFA) in PBS, pH 7,4                                                                                      |  |  |  |
| Mowiol                                       | 2,4 g Mowiol 4-88, 6,0 g Glyzerin, 6,0 ml MilliQ-H₂O,<br>12,0 ml Tris-HCl (pH 8,5)                                                 |  |  |  |
| RBC Puffer                                   | 150 mM NH <sub>4</sub> Cl, 10 mM KHCO <sub>3</sub> , 0,1 mM EDTA, pH 7,35, in MilliQ-H <sub>2</sub> O                              |  |  |  |
| 1x TE                                        | 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0                                                                                                  |  |  |  |
| TENS Lysis Puffer                            | 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 % SDS, 200 μg/ml Proteinase K (frisch zugeben)                                |  |  |  |
| Lösungen für β-Galaktosidase Färbung (X-Gal) |                                                                                                                                    |  |  |  |
| Fixierlösung                                 | 0,2 % Glutaraldehyd, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 5 mM EGTA (pH 7,5) in SPP Puffer                                                     |  |  |  |
| SPP Puffer                                   | 77,4 ml 1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 22,6 ml 1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 1 l MilliQ-H <sub>2</sub> O, pH 7,4 |  |  |  |
| Waschlösung                                  | 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,01 % Na-Desoxycholat, 0,02 % NP-40 in SPP Puffer                                                        |  |  |  |
| 2 % X-Gal                                    | 20 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid                                                                                                 |  |  |  |
| X-Gal Färbelösung                            | 5 mM $K_3$ FeCN <sub>6</sub> , 5 mM $K_4$ FeCN <sub>6</sub> , 0,1 % X-Gal in Waschlösung                                           |  |  |  |
| Lösungen für histologische Färbung           |                                                                                                                                    |  |  |  |
| Alcianblau Lösung                            | 0,03 % Alcianblau 8GS, 80 % Ethanol, 20 % Essigsäure                                                                               |  |  |  |
| Alizarin Rot S Lösung                        | 1 % Alizarin Red S, 1 % KOH                                                                                                        |  |  |  |
| Lösungen für SDS-PAGE und Western Blot       |                                                                                                                                    |  |  |  |
| MES SDS Laufpuffer                           | 50 mM MES, 50 mM Tris-HCl, 0,1 % SDS, 1 mM EDTA, pH 7,3                                                                            |  |  |  |
| Protein Extraktionspuffer                    | 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0), 10 % SDS, 1 M EDTA                                                                                        |  |  |  |
| Proteinase/Phosphatase-<br>Inhibitoren Mix   | 4 $\mu g/ml$ Aprotinin, 500 $\mu g/ml$ Benzamidin, 4 $\mu g/ml$ Leupeptin, 1 mM Na_3VO_4, 20 mM NaF, 2 mM PMSF                     |  |  |  |
| 5x SDS Probenpuffer                          | 66 mM Tris-HCI (pH 6,8), 2 % SDS                                                                                                   |  |  |  |

#### Tabelle 7: Puffer und Lösungen

| 5x SDS Probenpuffer mit<br>Glyzerin    | 66 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2 % SDS, 27 % (v/v) Glyzerin                                                                        |
|----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TBST                                   | 20 mM Tris, 140 mM NaCl, 0,1 % Tween-20                                                                                      |
| Tris-Acetat Puffer                     | 50 mM Tricine, 50 mM Tris-Base, 0,1 % SDS, pH 8,24                                                                           |
| Western Blot Transferpuffer            | 12,5 mM Bicine, 12,5 mM Bis-Tris, 0,8 mM EDTA, 20 % Methanol                                                                 |
| Lösungen für <i>in situ</i> Hybridisie | erung                                                                                                                        |
| Alkalischer Phosphatase (AP)<br>Puffer | 100 mM NaCl, 50 mM MgCl_2, 100 mM Tris-HCl (pH 9,5), 2 mM Levamisol, 0,1 % Tween20 in DEPC-H_2O                              |
| Block Lösung                           | 10 % (w/v) Block-Reagenz in Maleinsäure Puffer (MAP) autoklavieren, 0,1 % Tween20 zugeben, aliquotieren und bei -20°C lagern |
| DEPC-H <sub>2</sub> O                  | 0,01 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) über Nacht in MilliQ-H <sub>2</sub> O rühren und anschließend autoklavieren          |
| Färbelösung                            | 10 ml BM purple AP Substrat, 2 mM Levamisol, 0,1 % Tween20                                                                   |
| Formamid (deionisiert)                 | 10 % (w/v) Ionenaustauscher in Formamid mindestens eine Stunde rühren, filtern und bei -80°C lagern                          |
| Hybridisierungspuffer                  | 50 % Formamid (deionisiert), 0,1 % Tween20 in 1x SSC, pH 6,0 mit Zitronensäure einstellen                                    |
| Maleinsäure Puffer (MAB)               | 0,1 M Maleinsäure, 1,5 M NaCl, pH 7,5 mit NaOH einstellen                                                                    |
| MABT                                   | 0,1 % Tween20 in MAB                                                                                                         |
| РВТ                                    | 0,1 % Tween20 in PBS                                                                                                         |
| PBT/Glyzin                             | 2 mg/ml Glyzin in PBT                                                                                                        |
| PFA/Glutaraldehyd                      | 4,0 % PFA, 0,2 % Glutaraldehyd in 1x PBS                                                                                     |
| Proteinase K Puffer                    | 20 mM Tris-HCI (pH 7,0), 1 mM EDTA                                                                                           |
| RIPA                                   | 0,05 % SDS, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0,5 % Na-Desoxycholat, 1 mM EDTA, 5 mM Tris-HCl (pH 8,0) in DEPC-H <sub>2</sub> O        |
| RNase Lösung                           | 500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, in DEPC-H <sub>2</sub> O, 0,1 % Tween20 frisch dazu geben                               |
| 20x SSC (Saline-Sodium-<br>Citrate)    | 3 M NaCl, 0,3 M Na <sub>3</sub> -Citrat-Dihydrat in DEPC-H <sub>2</sub> O, pH 7,0                                            |
| SSC/FA/Tween20                         | 50 % Formamid (FA, deionisiert), 0,1 % Tween20 in 2x SSC                                                                     |
| 10x TBS                                | 1,5 M NaCl, 30 mM KCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7,5                                                                                |
| 1x TBST                                | 0,1 % Tween20 in TBS                                                                                                         |

## 2.6 Nährmedien

Medien und Reagenzien zur Kultivierung tierischer Zellen wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen), PAA Laboratories GmbH (Cölbe) und Invitrogen GmbH (Karlsruhe) bezogen.

| Nährmedien für Zelllinien   |                                                                                                                                                                                        |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Einfriermedium              | 10 % DMSO, 90 % fötales Kälberserum                                                                                                                                                    |
| Proliferationsmedium        | DMEM ( <u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium) mit 4,5 g/l Glukose,<br>10 % fötales Kälberserum, 100 <i>U</i> /ml Penicillin/Streptomyzin,<br>20 mM Glutamin |
| Differenzierungsmedium      | DMEM mit 4,5 g/l Glukose,<br>2 % Pferdeserum, 100 <i>U</i> /ml Penicillin/Streptomyzin, 20 mM Glutamin                                                                                 |
| Nährmedien für primäre Zell | ən                                                                                                                                                                                     |
| Proliferationsmedium        | DMEM GlutaMAX™ mit 4,5 g/l Glukose<br>30 % fötales Kälberserum, 100 <i>U</i> /ml Penicillin/Streptomyzin                                                                               |
| Differenzierungsmedium      | DMEM GlutaMAX™ mit 4,5 g/l Glukose<br>2 % Pferdeserum, 100 <i>U</i> /ml Penicillin/Streptomyzin                                                                                        |

#### Tabelle 8: Nährmedien

## 2.7 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von Invitrogen GmbH (Karlsruhe) bezogen.

| rabelle 5. Oligonakieotiae iai Genotypisieraligen |
|---------------------------------------------------|
|---------------------------------------------------|

| Gen                     |                                                  | Oligonukleotid-Sequenzen von 5' $\rightarrow$ 3'            | Annealing<br>Temp. |
|-------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------|
| Cre                     | 5' Cre<br>3' Cre                                 | GAG CAC TAC AGT GGC GAC TC<br>GCG GTG TCG TAG CCA TTC TG    | 55°C               |
| Myf5 <sup>Cre</sup>     | 5' Myf5 <sup>Cre</sup><br>3' Myf5 <sup>Cre</sup> | TAA AGA GCC CCA ACC TCA G<br>CCT CAT CAC TCG TTG CAT C      | 53°C               |
| Myogenin <sup>Cre</sup> | 5' Myo <sup>Cre</sup><br>3' Myo <sup>Cre</sup>   | TGT GCA GCA ACA GCT TAG AG<br>AGG CTA AGT GCC TTC TCT ACA G | 55°C               |

| Numb                                                 | 5' Numb<br>3' Numb                               | GAA GGA GCC TTC CAA AAT CGT ATT C<br>TAA GGG CTA CAG AGT AAG TTC AAG GAC AG                             | 53°C |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Numb                                                 | 5' Numb <sup>Del</sup><br>3' Numb <sup>Del</sup> | AGC TTA CAG GGT GCC CCA GTT ACT A<br>AGG CTT CTG GGA AAC CTC ACT TAC TC                                 | 63°C |
| Numblike                                             | 5' Numblike<br>5' Numblike<br>3' Numblike        | CTG TTT CCT GCC TTC CTT CCT AGT C<br>GCA GGC AGT GAA AAA CCA TCT CTC<br>CAC TCT GCC ACC TAG CTT CAT GTC | 62°C |
| Rosa26 <sup>LacZ</sup><br>und<br>Rosa <sup>DTA</sup> | R26-FA<br>R26-RF<br>R26-SA                       | AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT<br>GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG<br>CAT CAA GGA AAC CCT GGA CTA CAT G         | 57°C |

#### Tabelle 10: Oligonukleotide für quantitative Real-Time PCR

| Gen       |                            | Oligonukleotid-Sequenzen von 5' → 3'                                                     | Annealing<br>Temp. |
|-----------|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| ARP       | 5' ARP<br>3' ARP           | CGA CCT GGA AGT CCA ACT AC<br>ATC TGC TGC ATC TGC TTG                                    | 60°C               |
| GAPDH     | 5' GAPDH<br>3' GAPDH       | GTG GCA AAG TGG AGA TTG TTG CC<br>GAT GAT GAC CCT TTT GGC TCC                            | 59°C               |
| Hes1      | 5' Hes1<br>3' Hes1         | GTG GGT CCT AAC GCA GTG TC<br>ACA AAG GCG CAA TCC AAT ATG                                | 57°C               |
| Hey1      | 5' Hey1<br>3' Hey1         | TGA ATC CAG ATG ACC AGC TAC TGT<br>TAC TTT CAG ACT CCG ATC GCT TAC                       | 57°C               |
| Mrf4/Myf6 | 5' Mrf4<br>3' Mrf4         | ATG GAA GAA AGG CGC TGA AGA CTG<br>CTG CGC GAA AGG AGG AGA CTA AAG                       | 67°C               |
| Myf5      | 5' Myf5<br>3' Myf5         | CGC TGG TCG CTG GAG AG<br>GAG GGA ACA GGT GGA GAA CTA TTA                                | 58°C               |
| МуоD      | 5' MyoD<br>3' MyoD         | GGT CTG GGT TCC CTG TTC TGT GT<br>CGG CGG CAG AAT GGC TAC G                              | 60°C               |
| Myogenin  | 5' Myogenin<br>3' Myogenin | AGG AGG CGC TGT GGG AGT T<br>GGG CCC CTG GAA GAA AAG                                     | 58°C               |
| Numb      | Exon 1<br>Exon 2           | GAC GTT TAT GTC CCA GAG GCC<br>TCT CTT TAC GGC ATC TTC ACA G                             | 60°C               |
| Numb      | Exon 1<br>Exon 3<br>Exon 5 | AAC TAC GGC AAA GCT TCA GG<br>GTT CTT CAA AGG CTT CTT TGG<br>ACA GCC ATG AAA CAA TGA CAG | 60°C               |
| Numb      | Exon 8<br>Exon 10          | CTT GTG TTC CCA GAT CAC CAG<br>CCG CAC ACT CTT TGA CAC TTC                               | 60°C               |
| Numblike  | Exon 2<br>Exon 5           | CTG AAA CCT TCA GGA CGG AG<br>CAC AGG ACA GAC TTC ACG GA                                 | 55°C               |
| Numblike  | Exon 8<br>Exon 9           | CTC CTT TCG TGG GTT CCC TG<br>CAC AGA GCA TTG ATG CCA TCG                                | 60°C               |

| Pax3 | 5' Pax3<br>3' Pax3 | GAT CCG CCT CCT CCT CTC CTT<br>GCC AGG GCC GAG TCA ACC AG | 60°C |
|------|--------------------|-----------------------------------------------------------|------|
| Pax7 | 5' Pax7<br>3' Pax7 | CCA GCC CCT TCC GCC ATC AAC<br>GTA GCC AGCCACAGGGTCCACACT | 63°C |

#### Tabelle 11: Oligonukleotide für Sequenzierung

| Gen       | Oligonukleotid-Sequenzen von 5' $\rightarrow$ 3' |
|-----------|--------------------------------------------------|
| pLKO.1Seq | CAA GGC TGT TAG AGA GAT AAT TGG A                |

# 2.8 Plasmide

|  | Tabelle | 12: | Verwendete | Plasmide |
|--|---------|-----|------------|----------|
|--|---------|-----|------------|----------|

| Name                                   | Beschreibung                                                                                                                                                                    | Bezugsquelle                            |
|----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| pLKO.1-puro<br>(SHC001)                | MISSION® TRC lentiviraler Kontrollvektor mit Puromycin-Resistenzgen.                                                                                                            | Sigma-Aldrich Chemie<br>GmbH, Steinheim |
| pLKO.1-GFP                             | MISSION® TRC lentiviraler Kontrollvektor zur<br>Expression eines grün fluoreszierenden Proteins (GFP).<br>Dieser Vektor enthält kein Puromycin-Resistenzgen.                    | Sigma-Aldrich Chemie<br>GmbH, Steinheim |
| pLKO.1-puro- <i>scrambled</i><br>shRNA | MISSION® TRC lentiviraler Kontrollvektor mit<br>Puromycin-Resistenzgen zur Expression einer shRNA,<br>die mit keinem bekannten Gen der Maus oder des<br>Menschen übereinstimmt. | Sigma-Aldrich Chemie<br>GmbH, Steinheim |
| pLKO.1-puro-Numb<br>(NM_010949)        | Set aus fünf verschiedenen MISSION® TRC lentiviralen Vektoren mit Puromycin-Resistenzgen zur Expression von shRNA gegen murines Numb.                                           | Sigma-Aldrich Chemie<br>GmbH, Steinheim |
| pLKO.1-puro-Numblike<br>(NM_010950)    | Set aus fünf verschiedenen MISSION® TRC lentivirale<br>Vektoren mit Puromycin-Resistenzgen zur Expression<br>von shRNA gegen murines Numblike.                                  | Sigma-Aldrich Chemie<br>GmbH, Steinheim |
| psPAX2                                 | Plasmid zur Expression der Verpackungsgene <i>gag, pol</i> und <i>rev</i> zur Herstellung von Lentiviren.                                                                       | Sigma-Aldrich Chemie<br>GmbH, Steinheim |
| pMD2.G                                 | Plasmid zur Expression der viralen Hüllproteine VSV-G zur Herstellung von Lentiviren.                                                                                           | Sigma-Aldrich Chemie<br>GmbH, Steinheim |

| Probe    | Vektor           | Antisense<br>Transkription | Bezugsquelle/Referenz     |
|----------|------------------|----------------------------|---------------------------|
| Myf5     | pBluesript KS II | Nco I, T3                  | Thomas Böttger (AG Braun) |
| MyoD     | pBluesript KS II | Hind III, T7               | Thomas Böttger (AG Braun) |
| Myogenin | pBluesript KS II | Xho I, T3                  | Thomas Böttger (AG Braun) |

#### Tabelle 13: RNA Proben für in situ Hybridisierung

## 2.9 Antikörper

| Antigen                         | Spezies   | Verdünnung                | Bezugsquelle                                    |
|---------------------------------|-----------|---------------------------|-------------------------------------------------|
| CD34                            | Ratte     | 1:200 (IF)                | eBioscience, Frankfurt                          |
| MyoD                            | Kaninchen | 1:200 (IF)                | Santa Cruz Biotechnology Inc.,<br>Heidelberg    |
| МуоD                            | Maus      | 1:500 (IF)                | Dako GmbH, Hamburg                              |
| Myf5                            | Kaninchen | 1:250 (IF)                | Santa Cruz Biotechnology Inc.,<br>Heidelberg    |
| MF20 (MyHC, myosin heavy chain) | Maus      | 1:10 (IF)                 | DSHB, Iowa, USA                                 |
| Notch2 ICD                      | Kaninchen | 1:1000 (WB)               | Cell Signaling Technology Inc.,<br>Danvers, USA |
| Notch3                          | Kaninchen | 1:1000 (WB)               | Sigma-Aldrich Chemie GmbH,<br>Steinheim         |
| Numb                            | Kaninchen | 1:200 (IF)<br>1:1000 (WB) | Cell Signaling Technology Inc.,<br>Danvers, USA |
| Numblike                        | Kaninchen | 1:200 (IF)<br>1:1000 (WB) | ProteinTech Group Inc., Chicago, USA            |
| Pax7                            | Maus      | 1:10 (IF)                 | DSHB, Iowa, USA                                 |
| Phalloidin-Alexa Fluor® 633     | -         | 1:50 (IF)                 | Invitrogen GmbH, Karlsruhe                      |

#### Tabelle 14: Auflistung der verwendeten Erstantikörper

IF: Immunfluoreszenz; WB: Western Blot

| Name             | Spezies | Konjugation                    | Verdünnung | Bezugsquelle                                         |
|------------------|---------|--------------------------------|------------|------------------------------------------------------|
| Alexa Fluor® 594 | Ziege   | Alexa Fluor 594                | 1:1000     | Invitrogen GmbH, Karlsruhe                           |
| Alexa Fluor® 488 | Ziege   | Alexa Fluor 488                | 1:1000     | Invitrogen GmbH, Karlsruhe                           |
| Cy2™             | Esel    | Cy2                            | 1:100      | Dianova GmbH, Hamburg                                |
| Су3™             | Esel    | СуЗ                            | 1:300      | Dianova GmbH, Hamburg                                |
| Biotin           | Ziege   | Biotin                         | 1:300      | Vector Laboratories, Wiesbaden                       |
| HRP              | Ziege   | Meerrettichperoxidase<br>(HRP) | 1:1000     | Thermo Fisher Scientific,<br>Rockford, USA           |
| Streptavidin-Cy3 | -       | СуЗ                            | 1:1000     | Rockland Immunochemicals Inc.,<br>Gilbertsville, USA |

Tabelle 15: Auflistung der verwendeten Zweitantikörper

#### 2.10 Zelllinien

| <b>C₂C₁₂</b><br>ATCC CRL-1772™    | Murine Myoblasten-Zelllinie, die charakteristische Muskelproteine exprimiert<br>und befähigt ist bei niedriger Serumkonzentration mehrkernige Muskelzellen<br>( <i>Synzytien</i> ) auszubilden (Yaffe & Saxel, 1977).                                                                               |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>HEK293T</b><br>ATCC CRL-11268™ | Humane, embryonale Nierenepithelzelllinie (engl. <u>h</u> uman <u>e</u> mbryonic <u>k</u> idney),<br>die das temperatursensitive <i>Semian-Virus 40 (SV40) large T-</i> Antigen<br>exprimiert. 293T Zellen eignen sich damit zur Produktion von Virus-Partikeln<br>(DuBridge <i>et al.</i> , 1987). |

### 2.11 Mauslinien

- **Myf5**<sup>Cre</sup> Diese Mauslinie exprimiert das *Cre*-Rekombinase Gen unter der Kontrolle des endogenen *Myf5* Promoters. Die *Cre* cDNA wurde in den 5'UTR Bereich des ersten Introns des *Myf5* Gens eingefügt, wodurch eine Nullmutation erreicht wird. Homozygote Mäuse besitzen daher einen perinatal, letalen Phänotyp und sterben unmittelbar nach der Geburt. Mit Hilfe dieser Linie (heterozygote Tiere) ist es möglich Gene bzw. Sequenzen von Genen, welche durch *loxP*-Seiten flankiert sind spezifisch in der Skelettmuskulatur auszuschalten (Tallquist *et al.*, 2000).
- Myogenin<sup>Cre</sup>Die Myogenin<sup>Cre</sup> Mauslinie exprimiert die Cre-Rekombinase ausgehend vom<br/>Myogenin Promoter und dem Skelettmuskelspezifischen Enhancer des<br/>MEF2C (Myocyte-specific enhancer factor 2C) Gens (Li et al., 2005).

- NumbBei den Numbflox/floxMäusen ist im NumbGen Lokus das erste kodierende<br/>Exon von zwei loxP-Sequenzen flankiert. Durch Cre-vermittelte<br/>Rekombination kann Numb<br/>gewebespezifisch ausgeschaltet werden (Zilian<br/>et al., 2001).
- Numblike<sup>-/-</sup>Die Numblike<sup>-/-</sup> Knockout Mauslinie wurde durch homologe Rekombination in<br/>ES Zellen generiert. In dieser konstitutiven Knockout Maus wurden Exon 3<br/>bis Exon 5 von Numblike deletiert (Wilson *et al.*, 2007).
- **Rosa26**<sup>LacZ</sup> LacZ-Reportermauslinie zum Nachweis *Cre*-vermittelter Rekombination. Das *LacZ* Reportergen ist unter der Kontrolle eines ubiquitär aktiven Rosa26 Promoters und liegt stromabwärts einer Stoppsequenz, die mit *loxP*-Stellen flankiert ist. Diese Stoppsequenz wird durch *Cre*-Rekombination entfernt und das *LacZ*-Gen wird abgelesen (Soriano, 1999).
- **Rosa<sup>DTA</sup>** (Rosa26<sup>LacZ/DTA</sup>) Dieser Mausstamm enthält eine LacZ<sup>flox/flox</sup>/DTA Kassette im ubiquitären Rosa26 Lokus. Das *Diphtheria Toxin A* (DTA) Gen wird durch das mit *loxP* Sequenzen flankierte *LacZ* Gen von seinem ATG Startcodon getrennt. Durch *Cre*-vermittelte Rekombination erfolgt eine Exzision des *LacZ* Gens und damit eine zeit- und gewebespezifische DTA Expression (Brockschnieder *et al.*, 2006).
- Z/AP In dieser transgenen Doppelreporter Mauslinie erfolgt eine ubiquitäre und konstitutive *LacZ* Expression. Das *LacZ* Gen ist von loxP Sequenzen flankiert und fungiert als Stopp-Kassette für die humane plazentale alkalische Phosphatase (hPAP). Infolge *Cre*-vermittelter Rekombination wird die *LacZ*-Kassette entfernt und es erfolgt eine zeit- und gewebespezifische Expression der alkalischen Phosphatase (Lobe *et al.*, 1999).

#### 2.12 Software

| Software           | Hersteller                              |
|--------------------|-----------------------------------------|
| AxioVision® 4.8    | Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, Jena |
| DNASTAR Lasergene® | DNASTAR Inc. (USA)                      |
| GraphPad Prism®    | GraphPad Software Inc. (USA)            |
| ImageJ             | National Institutes of Health (USA)     |
| Office 2007        | Microsoft Corporation (USA)             |
| Photoshop 8.0      | Adobe Systems Incorporated (USA)        |
| Quantity One       | BioRad Laboratories GmbH, München       |

#### **Tabelle 16: Verwendete Programme**

# **3 METHODEN**

#### 3.1 Tierexperimentelle Arbeiten

#### 3.1.1 Haltung von Versuchsmäusen

Mäuse wurden in Plastikkäfigen auf Streu gehalten und erhielten Trockenfutter und Wasser nach Belieben. Der Tag- und Nachtzyklus betrug jeweils zwölf Stunden. Zur Identifikation wurden die Tiere im Alter von zwei bis drei Wochen mit einer Ohrmarkierung durch Kerben versehen und eine Schwanzbiopsie zur DNA-Gewinnung durchgeführt. Alle Arbeiten mit den Versuchstieren wurden entsprechend den geltenden Richtlinien der Tierschutzkommission durchgeführt.

#### 3.1.2 Tötung von Versuchsmäusen

Entsprechend dem Versuchsaufbau wurden die Mäuse jeweils des angegebenen Alters durch zervikale Dislokation getötet.

#### 3.1.3 Isolierung von Mausembryonen aus dem Uterus des Muttertieres

Für die Präparation von Mausembryonen spezifischer Entwicklungsstadien wurden entsprechende Elterntiere verpaart und die Trächtigkeitsperiode durch die Vaginal-Plug Methode bestimmt. Der Tag, an dem nach Verpaarung ein Vaginalpfropf festgestellt werden konnte, wurde als Tag 0,5 nach Empfängnis angenommen. Ausgehend von diesem Datum wurde der Termin für die Entnahme der Embryonen berechnet. Die einzelnen Embryonalstadien werden wie folgt beschrieben: E0.5.

Trächtige Weibchen wurden durch zervikale Dislokation getötet. Durch einen Bauchdeckenschnitt wurden die Embryonen aus dem Muttertier entfernt und in kaltem PBS aus den zwei Uteri herauspräpariert. Zur Fixierung wurden die Embryonen in 4 % PFA/1x PBS überführt.

#### 3.1.4 Untersuchung der Regeneration der Skelettmuskulatur adulter Mäuse

Die Regeneration der Skelettmuskulatur kann durch eine gezielte Verletzung des Muskels induziert werden. Für diesen Versuch wurden die zu untersuchenden Tiere entsprechend ihrem Körpergewicht mit 0,1 ml Ketamin/Xylazin-Lösung pro 10 g Gewicht intraperitoneal narkotisiert. Die chirurgische Toleranz dieser Applikation lag bei 30 min mit einer gesamten Schlafdauer von 120 bis 240 min.

| Gemisch für 1-4 Tiere |         |  |
|-----------------------|---------|--|
| 2 % Xylazin           | 62,5 µl |  |
| 10 % Ketamin          | 125 µl  |  |
| 0,9 % NaCl 1 ml       |         |  |

Narkotisierten Mäusen wurde der *Musculus tibialis anterior* (*TA*) durch einen lateralen Hautschnitt freigelegt. Mittels einer Einmal-Insulinspritze erfolgte die Kardiotoxin-Applikation in den Muskel. Hierzu wurden den Mäusen 50 µl einer 0,06 mg/ml Kardiotoxin-Lösung in 0,9 % Kochsalzlösung (NaCl) injiziert. Eine gleichmäßige Verteilung der Kardiotoxin-Lösung wurde erreicht, in dem die Kanüle in einem sehr flachen Winkel eingestochen und die Einspritzmenge im gesamten Muskel verabreicht wurde. Damit etwaige Infektionen nicht das Versuchsergebnis verfälschen, wurde ein Wundverschluss im Anschluss des Eingriffes vorgenommen. Die postoperative Schmerztherapie erfolgte täglich über die nächsten drei Tage durch subkutane Gabe von 5 mg/kg Rimadyl®, welches eine schmerzlindernde und entzündungshemmende Wirkung besitzt. Am Versuchsende, zehn Tagen nach der Kardiotoxin-Applikation, wurden die Versuchstiere durch zervikale Dislokation getötet und der *TA* Muskel für histologische Untersuchungen entnommen. Für die Untersuchung der Regenerationsfähigkeit wurden Geschwistertiere mit entsprechendem Genotyp verwendet.

#### <u>Auswertung</u>

Von jedem Versuchstier wurden Transversale Gefrierschnitte des obersten Drittels des *TA* Muskels angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Lichtmikroskopische Aufnahmen wurden mit 200-facher Vergrößerung angefertigt und die Durchmesser von Muskelfasern mit zentral liegendem Zellkern mit Hilfe der AxioVision Software ermittelt.

#### 3.2 Molekularbiologische Methoden

# 3.2.1 Isolierung genomischer DNA aus murinen Schwanzbiopsien und murinem embryonalem Gewebe

Zur Gewinnung von genomischer DNA wurden etwa 0,5 cm lange Schwanzbiopsien oder das Nabelbläschen (*Vesicula omphaloenterica s. umbilicalis;* engl. *yolk sac*) von noch ungeborenen Mäusen verwendet. Das biologische Material wurde über Nacht in 500 µl TENS Lysis-Puffer bei 55°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Die Fällung der genomischen DNA erfolgte durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und kräftigem Schütteln. Die DNA wurde durch Zentrifugation pelletiert und mit 70 % Ethanol gewaschen. Die im Anschluss getrocknete DNA wurde in 100 µl MilliQ-H<sub>2</sub>O oder 1x TE bei 55°C unter Schütteln gelöst.

#### 3.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des TRIZOL-Reagenz unter Verwendung des Protokolls von Invitrogen durchgeführt.

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen wurden diese mit 1x PBS gewaschen, um Reste des Mediums zu entfernen. Anschließend wurde 1 ml TRIZOL-Reagenz pro 100-mm Zellkulturschale zugegeben, die Zellen mittels Zellschaber von der Platte gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die so lysierten Zellen konnten bis zur RNA Isolierung bei -80°C gelagert werden oder direkt aufgearbeitet werden. Die Konzentration der RNA wurde mittels NanoDrop 2000/2000c Spektralphotometer gemessen. Der Absorptionsquotient 260/280 nm diente zur Qualitätskontrolle der RNA Präparation und lag zwischen 1,8 und 2,0.

#### 3.2.3 Polymerase Ketten Reaktion

Die Methode der Polymerase-Ketten Reaktion (engl. <u>polymerase chain reaction</u>, PCR) dient als Verfahren zur exponentiellen Amplifikation von DNA Fragmenten. Die PCR erfolgte unter Verwendung einer hitzestabilen Taq DNA-Polymerase (Saiki *et al.*, 1988) zur Genotypisierung von Jungtieren bzw. von Mausembryonen.

Der 25 µl Standard PCR-Reaktionsansatz bestand aus einer *Unit* Taq DNA Polymerase, 2,5 µl 10x Taq-Puffer, 5 µl 5x *Enhancer* (optional), 0,5 µl 10 mM dNTP Mix (10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP), und je 0,5 µl des sequenzspezifischen Vorwärts- und Rückwärts-Oligonukleotids (100 pmol/µl). Für die Genotypisierung wurde 1 µl der isolierten genomischen DNA eingesetzt. Das PCR Programm zum Amplifizieren eines entsprechenden DNA-Fragmentes umfasste folgende Schritte:

| Vorgang                                                                      | Temperatur          | Zeit                                   | Anzahl der Zyklen |
|------------------------------------------------------------------------------|---------------------|----------------------------------------|-------------------|
| Initialisierung                                                              | 95°C                | 4 min                                  | 1 Zyklus          |
| Denaturierung<br>Oligonukleotid-Anlagerung ( <i>Annealing</i> )<br>Extension | 95°C<br>x°C<br>72°C | 0,5 - 1 min<br>0,5 - 1 min<br>1 min/kb | 25 - 35 Zyklen    |
| Finale Extension                                                             | 72°C                | 5 min                                  | 1 Zyklus          |

Die Oligonukleotid-Hybridisierungstemperatur (engl. *Annealing*) variiert je nach Länge und Sequenz der eingesetzten Oligonukleotide und wurde annähernd nach folgender Formel berechnet:

 $Temperatur = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T) - 5^{\circ}C$ 

Dabei bezeichnen G, C, A und T die Basen der DNA. Eine Auflistung der Oligonukleotid-Sequenzen und verwendeten *Annealing* Temperaturen ist in Tabelle 9 dargestellt.

#### 3.2.3.1 Reverse Transkription zur Herstellung komplementärer DNA (cDNA)

Vor der Herstellung von cDNA wurden 1 µg Gesamt-RNA für 30 min bei 37°C mit einer *Unit* RQ1 RNase-freier DNase inkubiert, um Reste von DNA zu entfernen. Durch Zugabe von 1 µl RQ1 DNase Stopp-Puffer und Inkubation bei 65°C für 10 min wurde der DNA-Verdau beendet. Die anschließende cDNA Synthese erfolgte entsprechend des SuperScript<sup>™</sup> II Reverse Transkriptase Protokolls von Invitrogen. Die so erhaltene cDNA wurde als Vorlage (engl. *Template*) für semi-quantitative sowie quantitative Echtzeit-PCR (engl. *real-time PCR, RT-PCR*) verwendet.

#### 3.2.3.2 Quantitative Real-Time PCR

Die RT-PCR diente zum Nachweis spezifischer mRNA-Moleküle nach vorheriger reverser Transkription. Quantitative real-time PCRs (qRT-PCR) ermöglichen es mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen quantitative Unterschiede in der mRNA Expression verschiedener Gene zu bestimmen. In dieser Arbeit wurde der Absolut™ SYBR® Green Fluoreszein Mix von Thermo Scientific verwendet. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I lagert sich während eines PCR-Zyklus in doppelsträngiger DNA ein. Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional mit der Menge an PCR Produkt zu. Die Messung der qRT-PCR erfolgte mit Hilfe der iCvcler iQ Multicolor Real Time PCR Maschine. Mittels einer Schmelzkurvenanalyse wurde die Reinheit des PCR Produktes am Ende der PCR überprüft. Bei der Schmelzkurvenanalyse wird von 50°C Ausgangstemperatur pro Zyklus die Temperatur um 0,5°C bis auf 100°C erhöht. Durch das Aufschmelzen der Doppelstrang-DNA zu zwei Einzelsträngen wird der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I wieder freigesetzt, was in einer Fluoreszenzabnahme resultiert. Damit war es möglich spezifische PCR Produkte, welche eine höhere Schmelztemperatur haben, von unspezifischen Oligonukleotid-Dimeren zu unterscheiden.

Um Ungenauigkeiten zu minimieren wurde die synthetisierte cDNA 1:100 in MilliQ-H<sub>2</sub>O verdünnt und 10  $\mu$ l dieser Verdünnung eingesetzt. Der 25  $\mu$ l qRT-PCR Reaktionsansatz bestand aus 12,5  $\mu$ l 2x SYBR® Green I Fluoreszein Mix, je 2,5 pmol Oligonukleotid und 10  $\mu$ l cDNA. Das durchgeführte *PCR*-Programm sah wie folgt aus:

| Vorgang                                                 | Temperatur          | Zeit                       | Anzahl der Zyklen                                         |
|---------------------------------------------------------|---------------------|----------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Initialisierung                                         | 95°C                | 15 min                     | 1 Zyklus                                                  |
| Denaturierung<br>Oligonukleotid-Anlagerung<br>Extension | 95°C<br>x°C<br>72°C | 30 sec<br>30 sec<br>30 sec | 50 Zyklen<br>(Fluoreszenzmessung )                        |
| Schmelzkurvenanalyse                                    | 50°C                | 10 sec                     | 100 Zyklen<br>(Erhöhung 0,5°C/Zyklus, Fluoreszenzmessung) |

#### 3.2.4 In situ Hybridisierung

#### 3.2.4.1 *In vitro* Transkription und DIG-Markierung von RNA Sonden

Zur Herstellung einer RNA Sonde für die *in situ* Hybridisierung wurde das entsprechende Plasmid mit enthaltener Riboprobe für die *in vitro* Transkription und Digoxiginin(DIG)-Markierung linearisiert. Die Linearisierung erfolgte mit 5 µg Plasmid-DNA (Tabelle 13) in einem 50 µl Reaktionsansatz und 5 *Units* des entsprechenden Enzymes für zwei Stunden bei 37°C. Danach wurde die linearisierte DNA mittels Isopropanol/Ammoniumacetat-Fällung präzipitiert und mit 70 % Ethanol gewaschen. Die getrocknete DNA wurde anschließend in 12 µl MilliQH<sub>2</sub>O gelöst und bei -20°C gelagert. Der Transkriptionsansatz für die *in vitro* Transkription und DIG-Markierung sah wie folgt aus:

| Linearisierte Plasmid-DNA         | 12,0 µl |
|-----------------------------------|---------|
| 5x Transkriptionspuffer           | 4,0 µl  |
| 10x DIG-Labeling-Mix              | 2,0 µl  |
| RNasin (RNase Inhibitor, 40 U/μl) | 0,5 µl  |
| RNA-Polymerase (Τ3, Τ7; 17 U/μl)  | 1,5 µl  |
| DEPC-H <sub>2</sub> O             | 12,0 µl |

Die Synthese der DIG-markierten RNA Sonden erfolgte für zwei Stunden bei 37°C und wurde auf Eis gestoppt. Anschließend erfolgte der Abbau einzelsträngiger DNA durch Zugabe von 2  $\mu$ I RQ1 DNase und Inkubation bei 37°C für 10 min. Eine Säulenaufreinigung der DIG-markierten RNA Sonden wurde mit Hilfe der *illustra ProbeQuant*<sup>TM</sup> *G-50 Micro Columns* gemäß den Herstellerangaben durchgeführt und die Sonden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### 3.2.4.2 Whole mount in situ Hybridisierung von Embryonen

Präparierte Mausembryonen wurden in 4 % PFA/1x PBS über Nacht bei 4°C fixiert, anschließend in 1x PBT gewaschen und in einer aufsteigenden Methanolreihe (je 10 min in 25 %, 50 %, 75 % Methanol/1x PBT und zweimal 100 % Methanol) bei 4°C dehydriert. Die Embryonen konnten so bis zum Zeitpunkt der Analyse in 100 % Methanol bei -20°C gelagert werden.

Vor der Hybridisierung wurden die Embryonen schrittweise in einer Methanol/1x PBT-Reihe (je 10 min in 75%, 50%, 25%) bei 4°C rehydriert und zweimal 15 min mit 1x PBT bei 4°C gewaschen. Um den Hintergrund bei der späteren Färbung zu reduzieren wurden endogene Phosphatasen durch die Behandlung mit Wasserstoffperoxid inaktiviert. Die Embryonen wurden in 6 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/1x PBT für ein Stunde bei 4°C inkubiert und anschließend dreimal 10 min mit PBT gewaschen. Danach wurden die Embryonen für 3-5 min in 20 µg/ml Proteinase K in Proteinase K Puffer bei RT verdaut und zum Abstoppen der Reaktion zweimal 5 min mit 1x PBT/Glyzin, zweimal 5 min mit 1x PBT, dreimal 5 min mit RIPA Puffer und dreimal 5 min mit 1x PBT gewaschen. Nach der Proteinase K Behandlung ist eine Nachfixierung der Embryonen erforderlich. Dafür wurden die Embryonen für 20 min in 4 %PFA/0,2 % Glutaraldehyd/1x PBT bei RT inkubiert und dreimal 5 min mit 1x PBT gewaschen. Dann erfolgte Umpuffern in ein Hybridisierungslösung durch 10 min waschen in 1:1 Hybridisierungspuffer:PBT bei RT und 10 min in Hybridisierungspuffer bei 65°C. Die Prähybridisierung der Embryonen fand für ein bis drei Stunden bei 65°C statt. Vor der Hybridisierung wurden 4 µl DIG-markierte RNA Sonde pro 700 µl Hybridisierungspuffer/100 µg/ml tRNA Lösung für 3 min bei 80°C denaturiert. Die Embryonen wurden mit den DIG-markierten RNA Sonden über Nacht bei 65°C hybridisiert.

Am nächsten Tag wurden die Embryonen zweimal 30 min mit Hybridisierungspuffer bei 65°C und nach anschließendem Abkühlen für 5 min in 1:1 Hybridisierungspuffer:RNase Lösung bei RT gewaschen. Um eine unspezifische Bindung der Sonde zu reduzieren erfolgte ein Verdau in 100 µg/ml RNaseA in RNase Lösung für zweimal 30 min bei 37°C. Danach wurden die Embryonen mit hoher Stringenz gewaschen. Beginnend mit 5 min in 1:1 RNase Lösung:SSC/FA/Tween20 mit anschließendem Erhitzen in SSC/FA/Tween20 von RT auf 65°C. Darauf folgten:

- zweimal 5 min mit SSC/FA/Tween20 bei 65°C waschen
- dreimal 10 min mit SSC/FA/Tween20 bei 65°C waschen
- einmal 30 min mit SSC/FA/Tween20 bei 65°C waschen
- fünfmal 1 h mit SSC/FA/Tween20 bei 65°C waschen

Im Anschluss wurden die Embryonen auf RT abgekühlt, 5 min in 1:1 SSC/FA/Tween20:1x TBST, zweimal 10 min in 1x TBST und zweimal 10 min in MABT bei RT gewaschen. Vor der Inkubation der Embryonen mit dem alkalische Phosphatasekonjugierten anti-DIG (anti-DIG-AP) Antikörper wurden diese für eine Stunde in 5 % Blocklösung/MABT bei RT inkubiert. Während des Blockens erfolgte die Präadsorption

METHODEN

des anti-DIG-AP Antikörpers in einer 1:5000 Verdünnung in 1 % Blocklösung/MABT bei 4°C. Die Embryonen wurden mit der Antikörperlösung unter ständigem Schütteln bei 4°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde ungebundener Antiköper durch mehrmaliges Waschen in 1x TBST entfernt. Die Embryonen wurden für die Färbung dreimal 20 min in AP Puffer und anschließend in der Färbelösung mehrere Stunden bis zu drei Tagen bei RT oder 4°C im Dunkeln gefärbt. Die Färbereaktion wurde dabei in bestimmten Zeitintervallen unter dem Mikroskop beobachtet und durch Waschen (zweibis dreimal 10 min) mit AP Puffer beendet. Die Embryonen wurden über Nacht mit 4 %PFA/1x PBS nachfixiert, mit 1x PBS gewaschen und zur weiteren Verwendung bei 4°C in 1x PBS gelagert.

#### 3.3 Biochemische Methoden

#### 3.3.1 Proteinisolation aus kultivierten Zellen

Die Proteinisolation aus kultivierten Zellen erfolgte nach angegeben Zeitpunkten. Dazu wurde zunächst das Zellkulturmedium vollständig abgesaugt und die Zellen anschließend zweimal mit 1x PBS gewaschen. Nach Zugabe von 300  $\mu$ l 5x SDS Probenpuffer mit Zusatz von Proteinase/Phosphatase-Inhibitoren wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von der Oberfläche abgelöst und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zum Aufschluss der Zellen wurden diese mit Hilfe eines Ultraschall-Homogenisators (Amplitude von 15 % bis 20 % für 10 sec) homogenisiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation des Lysates für 5 min bei 14000 *g* und der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Proteinextrakte bei -80°C gelagert.

#### 3.3.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung diente der quantitativen Analyse der aus den Zellen gewonnenen Proteine und wurde mit Hilfe des DC<sup>™</sup> Protein Kit vorgenommen. Bei dieser Methode handelt es sich um ein kolorimetrisches Verfahren, entsprechend der *Lowry* Methode (Lowry *et al.*, 1951). Das in der Lösung enthaltene Kupfer bildet bei einem alkalischen pH-Wert Komplexe mit den Proteinen und führt in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration zu einem charakteristischen blauen Farbumschlag. Die Messung der Absorption bei

750 nm erfolgte in einem Dreifachansatz in einer Mikrotiterplatte unter Verwendung eines Proteinstandards mit definierter Konzentration an Rinderserumalbumin (engl. *bovin serum albumin, BSA*)

#### 3.3.3 SDS Polyacrylamid Gel Elektrophorese

Mit Hilfe der *SDS-PAGE* lassen sich Proteine spezifisch der Größe nach fraktionieren. Zur Vorbereitung wurde durch Zugabe von 5x SDS Probenpuffer mit Glyzerin eine einheitliche Proteinkonzentration von 1 µg/µl eingestellt. Des Weiteren wurden 4 µl 1 M DTT und 2 µl Bromphenolblau pro 100 µl Proteinprobe zugesetzt und nachfolgend für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels kontinuierlicher SDS-PAGE mit gradiellen Acrylamidanteil von 4-12% bzw. 3-8%. Bis zur Auftrennung der Proben aus dem Sammelgel wurde die SDS-PAGE bei 70 V durchgeführt und anschließend auf 150 V erhöht. Für die Bestimmung des Molekulargewichtes wurde ein Proteinstandard mitgeführt.

#### 3.3.4 Western Blot Analyse

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch Elektroblotting mit Hilfe der XCell II<sup>™</sup> Blot Module auf eine Nitrozellulose-Trägermembran für zwei Stunden bei 30 V übertragen. Dabei binden die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen an die Membran. Zur Kontrolle des Proteintransfers erfolgte eine durch Wasser reversible Ponceau S Rotfärbung der Membran.

#### Antikörperbindung

Zum Nachweis der immobilisierten Proteine auf der Nitrozellulose Membran wurden verschiedene Erstantikörper (Tabelle 14) eingesetzt, die mit enzymgekoppelten Zweitantikörpern (Tabelle 15) nachgewiesen wurden.

Zuerst erfolgte eine einstündige Inkubation der Membran in 5 % Milchpulver in 1x TBST zum Blocken von unspezifischen Bindungsstellen. Das Milchpulver wurde durch sechsmaliges Waschen für je 5 min mit 1x TBST entfernt und die Membran mit dem Erstantikörper in 3 % BSA/1x TBST über Nacht bei 4°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde ungebundener Erstantikörper durch sechsmaliges Wachen für 5 min mit 1x TBST entfernt. Die Inkubation mit dem Meerrettichperoxidase-(engl. <u>Horseradish Peroxidase, HRP</u>) konjugierten Zweitantikörper erfolgte in 3 % Milchpulver/1x TBST für eine Stunde bei RT auf dem Schüttler. Danach wurde die Membran erneut mehrmals mit 1x TBST gewaschen. Nach zusätzlichem einstündigem Waschen mit 1x TBST erfolgte die Entwicklung der Membran durch Messung der Chemilumineszenz.

#### **Detektion**

Zur Chemilumineszenz-Detektion wurde die Membran mit dem SuperSignal West<sup>™</sup> Femto-Gemisch nach Angaben des Herstellers dünn beschichtet und mittels des VersaDoc<sup>™</sup>3000 Image Systems exponiert. Die an den Zweitantikörper gekoppelte Peroxidase katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, bei der eine Chemilumineszenz detektiert werden kann. Die Auswertung der Proteinbanden erfolgte mit der Software *Quantity One*.

#### 3.4 Histologische Methoden

#### 3.4.1 Färbung von Knochen- und Knorpelsubstanzen

Zur differentiellen Färbung der Knochen und des Knorpels von E18.5 Mausembryonen wurden diese nach der Isolation aus dem Muttertier für mindestens 24 Stunden in 90 % Ethanol bei RT fixiert. Nach dem Entfernen von inneren Organen sowie der Haut erfolgte eine dreitägige Alcianblau Färbung einzelner Embryonen unter ständigem leichtem Schütteln. Die so gefärbten Embryonen wurden in einer abfallenden Ethanol-Reihe von 70 % (zweimal), 40 % und 15 % für je zwei bis drei Stunden bei RT, mit anschließender Wässerung in MilliQ-H<sub>2</sub>O für 24 Stunden, rehydriert. Hieran schloss sich eine zweittägige Inkubation in 1 % KOH an. Die Färbung der Knochen wurde mittels Alizarin Rot S Lösung für zwei bis drei Tage bei RT und leichtem Schütteln vorgenommen. Durch mehrmaliges Waschen mit 1 % KOH wurde die Färbelösung entfernt und die Embryonen durch eine aufsteigende Glyzerin-Reihe (20 %, 50 %, 80 %, und zweimal 100 % für je 24 Stunden) geführt, was die anschließende Lagerung in 100 % Glyzerin ermöglicht.

#### 3.4.2 Herstellung von Gefrierschnitten

Mausembryonen wurden in kaltem 1x PBS präpariert, gewaschen und anschließend über Nacht in 4 % PFA/1x PBS bei 4°C fixiert. Am nächsten Tag erfolgte ein dreimaliges Waschen für 10 min der Embryonen in kaltem 1x PBS, bevor diese zur Kryoprotektion in 30 % Saccharose/1x PBS unter ständigem Schwenken über Nacht bei 4°C inkubiert wurden. Nach Absenken der Embryonen in der Saccharose/PBS Lösung wurden diese kurz in 1x PBS geschwenkt, in eine Einbettform mit Tissue-Tek® O.C.T. Polyfreeze™ überführt, positioniert, auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert.

Isoliertes Muskelgewebe wurde ohne Fixierung in Tissue-Tek® O.C.T. Polyfreeze<sup>™</sup> eingebettet. Dazu wurde das frisch präparierte Gewebe direkt in eine Metalleinbettform mit Tissue-Tek® O.C.T. Polyfreeze<sup>™</sup> überführt und in Stickstoffgekühltem Isopentan eingefroren. Die Lagerung der Präparate erfolgte bei -80°C.

Die Herstellung von Gefrierschnitten von Embryonen sowie Muskelgewebe erfolgte mit Hilfe eines Kryostaten. Bei einer Blocktemperatur von -18 bis -25°C wurden Gefrierschnitte mit einer Schnittdicke zwischen 8 und 12 µm angefertigt. Die Schnitte wurden auf SuperFrost Plus Adhäsions-Objektträger aufgenommen, über Nacht bei RT getrocknet und anschließend bei -20°C feuchtigkeitsgeschützt gelagert.

#### 3.4.3 Hämatoxylin und Eosin Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung ist die Standardfärbung in der Histologie, um eine gute Darstellung des Gewebes zu erhalten. Dabei wird eine Hämatoxylin-Lösung für die Kernfärbung und eine Eosin-Lösung für die Zytoplasmafärbung verwendet. Alle Schritte des nachstehenden Färbeprotokolls erfolgten, wenn nicht anders beschrieben, bei RT.

Muskelschnitte wurden für die Hämatoxylin-Eosin Färbung bei RT aufgetaut, mit eiskalten 100 % Aceton für 5 min bei -20°C nachfixiert und für 30 min getrocknet. Im ersten Schritt wurden die Kerne mit einer Hämalaun-Lösung für 10 min gefärbt. Das so genannte Bläuen der Schnitte erfolgte anschließend unter fließendem Leitungswasser für 2 min bis sich die Objekte blau verfärbt hatten. Nach einem kurzen Spülen in MilliQ-H<sub>2</sub>O wurden die Gewebeschnitte für 6 min in Eosin gefärbt. Zum Fixieren der Eosinfärbung und Entwässern der Schnitte erfolgte ein zweimaliges schnelles Eintauchen der Objekte in 95 % Ethanol sowie 100 % Ethanol mit anschließendem Waschen in 100 % Ethanol und Klären in 100 % Xylol. Die so gefärbten Präparate wurden im Anschluss für mikroskopische Untersuchungen mit dem Kunstharz Entelan® eingedeckelt.

#### 3.4.4 Masson-Trichrom-Färbung

Mit Hilfe der Trichrom-Färbung können kollagene Strukturen vom Muskelgewebe unterschieden werden. Die Färbung von Muskelgefrierschnitten erfolgte, nach zehnminütiger Fixierung mit 100 % eiskaltem (-20°C) Aceton, nach dem Protokoll des Herstellers.

Die Masson-Trichrom-Färbung ist dreifarbig. Kollagene Fasern werden mit Aniline Blue tiefblau gefärbt, die Kerne werden durch Hämatoxylin dunkelrot bis blau und das Zytoplasma bzw. die Muskelfasern weisen durch die Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin Lösung eine rosa bis rote Färbung auf.

#### 3.4.5 β-Galaktosidase Färbung

Der β-Galaktosidase (*X-Gal*) Nachweis wurde auf Gefrierschnitten sowie als *Whole-Mount*-Färbung von Embryonen angewendet. Für eine Färbung auf Gefrierschnitten wurden die entsprechenden Embryonen unfixiert eingebettet. Die angefertigten Gefrierschnitte wurden für 10 min in der X-Gal Fixierlösung fixiert und anschließend dreimal mit Waschpuffer gespült. Danach erfolgte die Färbung in der X-Gal Färbelösung für zwei bis drei Stunden bzw. je nach Färbeintensität über Nacht bei 37°C. Abschließend wurden die Schnitte mehrmals in 1x PBS gewaschen und mit Mowiol eingedeckelt.

Für die *Whole-Mount*-Färbung von Embryonen wurden diese entsprechend dem Alter (E9.5 bis E12.5) für 5 bis 15 min in der X-Gal Fixierlösung inkubiert. Darauf folgte ein dreimaliges Waschen mit anschließender Färbung in der X-Gal Färbelösung über Nacht bei 37°C. Die Färbung wurde durch Waschen mit 1x PBS beendet und die Embryonen mit 4 % PFA/1x PBS nachfixiert. Die Embryonen wurden in PBS schwimmend fotografiert und gegebenenfalls für Vibratomschnitte eingebettet.

#### 3.4.6 Alkalische Phosphatase Färbung auf Gewebeschnitten

Der Nachweis der alkalischen Phosphatase (AP) erfolgte auf Gefrierschnitten von Embryonen unter Verwendung des *Vector Red Alkaline Phosphatase Substrate Kits* nach Angaben des Herstellers. AP-positive Zellen zeigten dabei ein rotes Färbeergebnis.

#### 3.4.7 Herstellung von Vibratomschnitten

Für eine detaillierte Analyse des Expressionsmusters von *Whole-Mount X-Gal* gefärbten Embryonen wurden Vibratomschnitte angefertigt. Hierzu wurden die Embryonen in Gelatine/Albumin eingebettet, mit Hilfe eines Gewebeklebers auf einen Halteblock fixiert und 70-100 µm dicke Querschnitte angefertigt. Die einzelnen Schnitte wurden auf unbeschichteten Objektträgern aufgenommen und mit Mowiol für mikroskopische Analysen eingedeckelt.

#### 3.4.8 Immunologische Färbungen

Für immunologische Färbungen wurden Gefrierschnitte von Embryonen, kultivierte Zellen bzw. Muskelfasern mit 1x PBS gewaschen und mit 4 % PFA/1x PBS für 10 min bei RT fixiert. Eine Permeabilisierung der Zellmembranen erfolgte für 5 min mit 0,5 % TritonX-100/1x PBS, anschließend wurden die Präparate zweimal mit 1x PBS gewaschen. Um unspezifische Antikörperreaktionen zu reduzieren, wurden die Objekte in Tag 1 Lösung (0,5 % BSA/0,1 % TritonX-100/5 % Ziegenserum/1x PBS) für eine Stunde bei RT blockiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper (Tabelle 14) in Tag 1 Lösung über Nacht bei 4°C. Daraufhin wurden die Präparate mehrmals mit 1x PBS gewaschen und für zwei Stunden mit einem Fluorophor-konjugierten Zweitantikörper (Tabelle 15) in 1x PBS inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen, um ungebundenen Zweitantikörper zu entfernen, erfolgte eine Kernfärbung mit DAPI (4`,6`-<u>Dia</u>midino-2-<u>p</u>henyl<u>i</u>ndol) für 10 min. Die gefärbten Objekte wurden mit Hilfe von Mowiol eingedeckelt.

#### Diaminobenzidin Färbung

Eine indirekte Antikörperfärbung mit Hilfe von Diaminobenzidin (DAB) wurde zur Signalverstärkung auf Muskelfasern angewendet. Dazu wurden die Muskelfasern wie oben beschrieben mit dem Erstantikörper über Nacht inkubiert. Hierauf folgte nach mehrmaligem Waschen die Inkubation mit einem Biotin-gekoppelten Zweitantikörper (Tabelle 15). Nach dreimaligen Wachen wurden die Proben für eine Stunde mit dem ABC-Kit laut Hersteller behandelt. Die ABC-Lösung enthält eine Avidin-gekoppelte Peroxidase, welche mit dem Biotin ein Komplex bildet. Der Nachweis des gebildeten Komplexes erfolgte durch Zugabe des Substrates Diaminobenzidin. Für die Substratlösung wurden eine DAB-Tablette (10 mg) in 17 ml 0,1 M TrisHCl (pH 7,2) gelöst und durch einen Spritzenfilter filtriert, 1 ml 0,1 M TrisHCl (pH 7,2) + 5  $\mu$ l 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugegeben und anschließend im Dunkeln für 5 min auf den Muskelfasern inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch zweimaliges Waschen mit 1x PBS beendet. Abschließend erfolgten die Färbung der Kerne mit DAPI und das Eindeckeln mit Mowiol. Das entstandene braune Präzipitat kann mit Hilfe eines Lichtmikroskopes nachgewiesen werden.

#### TUNEL Apoptose Assay

Ein wesentliches Kennzeichen der Apoptose ist die Fragmentierung der DNA durch die Aktivität von Endonukleasen. Die an den DNA-Strangbrüchen freiwerdenden 3'OH-Enden können *in situ* mit Hilfe der TUNEL Methode (*<u>Terminal deoxynucleotidyl Transferase</u> (TdT)-mediated d<u>UTP-biotin nick end labeling</u>) mit markierten Nukleotiden (zum Beispiel Fluoreszenz) versehen und sichtbar gemacht werden (Gavrieli <i>et al.*, 1992).

Für die Untersuchung von apoptotischen Zellen in Mausembryonen wurde in dieser Arbeit der *In Situ Cell Death Detection Kit* nach Herstellerangaben auf Gefrierschnitten angewendet.

#### 3.5 Zellbiologische Methoden

#### 3.5.1 Kultivierung von Zellen

Die Routine-Kultivierung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellen erfolgte in 60mm und 100-mm Zellkulturschalen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. Die Zellen wurden, in den in Tabelle 8 aufgeführten Medien kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen mit sterilem 1x PBS gewaschen und durch eine 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA-Lösung vom Kulturgefäß gelöst. Die Enzymwirkung der Trypsin/EDTA Lösung wurde durch Zugabe des doppelten Volumens an serumhaltigem Kultivierungsmedium gestoppt. Die gewünschte Menge an Zellen wurde anschließend in frischem Medium verdünnt und auf neue Kulturgefäße verteilt.

#### 3.5.2 Gefrierkonservierung und Auftauen von Zellen

Zur Gefrierkonservierung wurden die Zellen wie in 3.5.1 beschrieben trypsinisiert und für 5 min bei 500 *g* zentrifugiert. Eine Zellmenge von  $2 \times 10^6$  Zellen wurde in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Einfrierröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde in dafür vorgesehenen Einfrierbehältern für mindestens 24 Stunden bei -80°C belassen bevor die Zellen anschließend in flüssigem Stickstoff eingelagert wurden. Ein schnelles Auftauen der Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37°C. Die aufgetaute Zellsuspension wurde in serumhaltiges Medium überführt und für 5 min bei 500 *g* zentrifugiert. Das DMSO-haltige Einfriermedium wurde so aus der Zellsuspension herausgewaschen. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in frischem Medium wieder in Kultur gebracht.

#### 3.5.3 Lentiviraler Gentransfer von shRNA-kodierenden Vektoren

Für die stabile Repression (*Knockdown*) der Genexpression bzw. Translation von Numb und/oder Numblike in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Zellen wurde das lentivirale shRNA-Vektorsystem, MISSION® TRC, von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH verwendet. Der pLKO Vektor wurde aus dem HIV abgeleiteten Vektor pRRL-cppt-hPGKsin entwickelt. Diesem, ursprünglich als *lentihair* bezeichneten Vektor wurde im Vergleich zu einem von *Moloney Murine Leucaemia Virus*-Vektor abstammenden Virus eine effektivere Infizierung von Zelllinien und primären Zellen nachgewiesen (Stewart *et al.*, 2003).

In dieser Arbeit wurden je fünf verschiedene shRNA-kodierende Vektoren (Tabelle 12) zur genspezifischen Hemmung von *Numb* bzw. *Numblike* getestet und die am effektivsten wirkende shRNA Sequenz zur Herstellung von stabilen shRNA-exprimierenden C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myoblasten verwendet. Als Kontrolle diente eine *scrambled* shRNA, die mit keinem bekannten Gen der Maus oder des Menschen übereinstimmt (www.sigmaaldrich.com). Diese shRNA ist in der Lage den RNAi Signalweg (RNA-Interferenz vermittelte Stilllegung von Genen) zu aktivieren, wodurch es möglich war unspezifische Effekte in den shRNA behandelten Zellen zu berücksichtigen.

#### 3.5.3.1 Kalziumphosphat-Transfektion

Die Herstellung von den sich selbst inaktivierenden lentiviralen Partikeln erfolgte in HEK293T Zellen durch Kotransfektion eines shRNA-kodierenden Vektors (Tabelle 12) mit dem psPAX2 Plasmid, welches für die Verpackungsgene (*gag*, *pol* und *rev*) kodiert und dem pMD2.G Plasmid, welcher die viralen Hüllproteine (*VSV-G*) enthält.

Am Vortag der Transfektion wurden  $7 \times 10^5$  HEK293T Zellen pro Well einer 6-Well-Platte ausplattiert. Für die Transfektion wurden 1 µg des shRNA-kondierenden lentiviralen Vektors (pLKO.1) sowie 0,9 µg und 0,1 µg der Verpackungsplasmide pPAX2 bzw. pMD2.G mit MilliQ-H<sub>2</sub>O in einem Gesamtvolumen von 68 µl gemischt. Nach Zugabe von 22 µl 2 M CaCl<sub>2</sub> und 90 µl 2x HBS Puffer wurde das Gemisch tropfenweise zum Medium der Zellen gegeben. Die Kulturplatten wurden zur gleichmäßigen Verteilung des Transfektionsgemisches vorsichtig geschwenkt und bei 37°C inkubiert.

Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden entsprechend dem Gentechnik Gesetz (GenTG) unter den Sicherheitsmaßnahmen der Sicherheitsstufe S2 vorgenommen.

#### 3.5.3.2 Lentivirale Transduktion

Transfizierte HEK293T Zellen wurden für 24 Stunden im Brutschrank kultiviert. Für eine effektive Virusproduktion erfolgte ein Wechsel des Kultivierungsmediums durch Medium mit 30 % FCS. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die erste Abnahme des Mediums mit den enthaltenen lentiviralen Partikeln. Die virusproduzierenden Zellen wurden für weitere 24 Stunden mit neuem Medium versorgt, so dass eine zweite Abnahme des Virusüberstandes erfolgen konnte. Im Anschluss wurden die Zellen entsprechend dem Gentechnik Gesetz der Sicherheitsstufe S2 entsorgt. Der virale Überstand wurde durch Zentrifugieren bei 2000 *g* von restlichen Zellbestandteilen getrennt und bei 4°C gelagert. Für die virale Transduktion von  $C_2C_{12}$  Myoblasten wurden  $2\times10^4$  Zellen/Well am Tag vor der Infektion in 24-Well Zellkulturplatten ausplattiert. Am folgenden Tag wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 2 ml der viralen Suspension versetzt. Um eine effiziente Virusinfektion zu erhalten, wurde dem Virusmedium 8 µg/ml Polybrene

zugesetzt. Ein Mediumwechsel mit frischem Wachstumsmedium erfolgte 24 Stunden nach der Infektion. Zur weiteren Kultivierung wurden die Myoblasten in 6-Well Zellkulturplatten überführt und mit der Selektion begonnen. Als Kontrolle zur Bestimmung der Transfektions- bzw. Transduktionseffizienz wurde ein pLKO.1-GFP kodierender Vektor verwendet. Abbildung 7 zeigt exemplarisch transfizierte HEK293T Zellen 48 Stunden nach Kotransfektion des lentiviralen Vektors und der Verpackungsplasmide. Mittels Kalziumphosphat-Transfektion konnten effektiv 80 % der HEK293T Zellen mit dem pLKO.1-GFP Vektor transfiziert werden. Die in den Zellkulturüberstand abgegebenen Viruspartikel wurden anschließend für die Infektion von  $C_2C_{12}$  Myoblasten verwendet. In den  $C_2C_{12}$  Myoblasten konnte eine Transduktionseffizienz von etwa 60 % erzielt werden (Abbildung 7 C-D).



# Abbildung 7: Herstellung von lentiviralen Viruspartikeln in HEK293T und Transduktion von $C_2C_{12}$ Myoblasten.

(**A-B**) HEK293T Zellen 48 Stunden nach Co-Transfektion des pLKO.1-GFP Kontrollvektors mit den Verpackungsplasmiden (psPAX2 und pMD2.G) zur Herstellung von Viruspartikeln. (**B**) Mittels Kalziumphosphatmethode wurde eine Transfektionseffizienz von 80 % erzielt. (**C-D**) Transduzierte  $C_2C_{12}$  Myoblasten 48 Stunden nach Infektion mit dem virushaltigen Überstand der HEK293T Zellen. Etwa 60 % der Myoblasten zeigten ein positives GFP Signal (**D**). A und C: Phasenkontrast; B und D: fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (Emission: 520 nm) dargestellt in Grau. Größenmaßstab beträgt 50 µm in allen Bildern.

#### 3.5.3.3 Selektionieren

Die shRNA-kodierenden pLKO.1 Vektoren enthalten ein Puromycin-Resistenzgen zur Selektion der transduzierten Zellen. Dies ermöglicht die kontinuierliche Expression der shRNA und damit die fortdauernde Repression der Zielgene.

Die Selektion der  $C_2C_{12}$  Myoblasten erfolgte zwei Tage nach Infektion der Zellen mit 2 µg/ml Puromycin. Das Sterben von nicht-infizierten Zellen erreichte seinen Höhepunkt zwei bis drei Tage nach Beginn der Selektion. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 50 bis 60 % passagiert und gut vereinzelt wieder ausplattiert. Die weitere Kultivierung dieser Zellen erfolgte routinemäßig in Puromycin-haltigem Medium.

#### 3.5.4 Isolierung und Kultivierung von murinen Skelettmuskelzellen

Die Isolierung von primären Muskelzellen, den so genannten Satellitenzellen, basiert auf dem Protokoll von Yablonka-Reuveni und Mitarbeitern (Yablonka-Reuveni et al., 1987). Mäuse verschiedenen Genotyps wurden durch zervikale Dislokation getötet und die gesamte Muskulatur der Vorder-, Hintergliedmaßen, Brust (M. pectoralis major, minor) und Rücken (M. erector spinae) entnommen. Fettgewebe, sowie größere Sehnen wurden entfernt und das gesäuberte Muskelgewebe mit Hilfe eines Gewebezerkleinerers zu einer homogenen Masse von ca. 1 mm<sup>2</sup> großen Stücken zerhackt. Diese Muskelmasse wurde in 50 ml GlutaMAX/1 % Penicillin/Streptomycin (PS) überführt, kurz gemixt und für 2 min bei 1000 g zentrifugiert um restliche Fettgewebsstückchen und Lipidtröpfchen abzutrennen. Alle weiteren Isolierungsschritte wurden an der Sterilbank unter Bedingungen der Sicherheitsstufe S1 durchgeführt. Zuerst erfolgte ein Verdau der pelletierte Muskelmasse in 10 % Dispase in GlutaMAX/1 % PS für 30 min bei 37°C. Durch Zugabe von Collagenase Typ 2 (Endkonzentration: 0,05 %) und weiteren 30 min Inkubation bei 37°C wurde ein besserer enzymatischer Verdau erreicht. Mehrmaliges mixen während der Inkubationszeiten sorgte für eine homogene Verteilung der Enzyme und einen gleichmäßigen Verdau des Muskelgewebes. Um Satellitenzellen von den Muskelfasern abzulösen, wurde die Muskelsuspension zweimal mittels einer 30 ml Spritze durch eine 20G Kanüle gedrückt. Da der gesamte Vorgang der Muskelzellisolation mit der Zerstörung und Lyse von einigen Zellen einhergeht, wird DNA in das Dissoziationsmedium freigesetzt. Ein DNA-Gehalt im Medium ist oftmals die Ursache für das ungewollte Verklumpen von Zellen. Die Zugabe von 10 µg/ml DNase I (5 min bei RT) zum Dissoziationsmedium

verminderte diesen Effekt. Die verdaute Muskelzellsuspension wurde auf ein Volumen von 50 ml mit GlutaMAX/1 % PS aufgefüllt, für eine Minute bei 500 *g* zentrifugiert und dann durch ein 100  $\mu$ m und ein 40  $\mu$ m Zellsieb filtriert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1000 *g* für 5 min pelletiert, der Überstand wurde nochmals bei 3000 *g* für 5 min zentrifugiert. Die beiden Zellpellets wurden anschließend in 10 ml GlutaMAX/1 % PS wieder suspendiert und erneut über ein 100  $\mu$ m und ein 40  $\mu$ m Zellsieb gegeben, um mögliche größere Muskelzellfragmente zu beseitigen.

Während der Zellisolation war eine Kontamination mit roten Blutzellen unvermeidbar. Eine Lyse dieser Zellen erfolgte durch einen hypertonischen Schock. Dafür wurden die Zellen nach Zentrifugation (5 min für 1000 g) für 3 min in 3 ml RBC Puffer auf Eis inkubiert. Die Lyse der Blutzellen wurde durch Zugabe von GlutaMAX/1 % PS beendet, die Zellen erneut für 5 min bei 1000 g zentrifugiert und das Pellet nach Absaugen des Überstandes in 3 ml frischen GlutaMAX/1 % PS aufgenommen. Eine sich anschließende Dichtegradienten-Zentrifugation ermöglichte die Abtrennung der lebenden Muskelzellen von toten Zellen und Muskelfragmenten. Dazu wurde ein diskontinuierlicher Percoll-Gradient hergestellt. In einem 15-ml Falkon wurden 7 ml einer 30% igen Percoll-Lösung mit 3 ml einer 70% igen Percoll-Lösung unterschichtet, so das eine Phasentrennung erkennbar war. Die Zellsuspension (3 ml) wurde anschließend vorsichtig auf den Gradienten pipettiert und bei 1500 g für 15 min bei geringer Beschleunigung und ohne Bremsen zentrifugiert. Nach der Zentrifugation lagen die Muskelzellen in der Interphase und Zellfragmente auf der Oberfläche des Gradienten vor. Die Zellen aus der Interphase wurden vorsichtig heraus pipettiert, in GlutaMAX/1 % PS zur Abtrennung von Percoll-Resten gewaschen und bei 1000 g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Proliferationsmedium aufgenommen und auf Collagen-beschichtete 35-mm Zellkulturschalen pipettiert und bei 37°C kultiviert. Einen Tag nach der Präparation haben sich die schnelladhärierenden Fibroblasten an den Zellkulturschalenboden angeheftet. Muskelzellen hingegen befinden sich als nichtadhärente Zellen im Medium. Das Kulturmedium wurde zum Pelletieren der Zellen abgenommen und diese in Collagen-beschichtete Objektträger mit abnehmbarer Kammer (Chamber Slide™) für Proliferations- und Differenzierungsversuche kultiviert.

#### 3.5.5 Isolierung von murinen Muskelfasern

Für die Isolierung einzelner Muskelfasern wurden zwei verschiedene Muskeln ausgewählt. Der *Musculus extensor digitorum longus (EDL)* oder "langer Zehenstrecker" befindet sich lateral zum *Musculus tibialis anterior (TA)* direkt auf der Fibula. Der *EDL* Muskel ist ein sehr schmaler Muskel mit langen Muskelfasern. Der *Musculus flexor digitorum brevis* (*FDB*) oder "kurzer Zehenbeuger" ist ein langgestreckter flächiger Muskel im Bereich der Unterseite des Fußskelettes. Dieser Muskel ist ebenfalls leicht heraus zu präparieren, und besitzt im Gegensatz zum *EDL* Muskel kürzere und zahlenmäßig mehr Muskelfasern. Bei der Präparation der einzelnen Muskeln wurde darauf geachtet, dass keine starken Zugkräfte bzw. andere Beschädigungen durch das Präparationsbesteck auf den Muskel einwirkten.

*EDL* oder *FDB* Muskeln wurden in 0,2 % Collagenase P/DMEM für eine Stunde bei 37°C verdaut. Die Enzym-Aktivität der Collagenase diente zu Dissoziation der einzelnen Muskelfasern aus dem gesamten Muskelverband. Um die Enzymreaktion beenden wurden die verdauten Muskelstücke in 10 % FCS/DMEM überführt. Mit Hilfe einer Pasteur-Pipette erfolgte durch mehrmaliges hoch und runter Pipettieren die Trennung der Muskelfasern. Die einzelnen Fasern wurden in Polystyrol Rundboden-Röhrchen überführt und mit 1x PBS oder Proliferationsmedium gewaschen, um die dissoziierten Einzelzellen zu entfernen. Die Muskelfasern wurden sofort mit 4 % PFA/1x PBS für 10 min bei RT fixiert oder bei 37°C in Suspension kultiviert.

#### 3.5.6 Bestimmung der Zellproliferation

Zur Visualisierung aktiver DNA-Synthese wurde das Thymidinanalogon 5-ethynyl-2'deoxyuridine (EdU) verwendet. EdU ist eine neue Alternative zum BrdU (5-Bromo-2'deoxyuridin) und wird ebenso während der S-Phase des Zellzyklus in die neusynthetisierte DNA eingebaut. Für die EdU-Markierungen wurden primäre Myoblasten oder FDB Muskelfasern im Verlauf der Kultivierung mit 20 µM EdU für drei Stunden inkubiert. Nach dieser Pulse-Phase wurden die Zellen entweder direkt mit 4 % PFA/1x PBS für 10 min bei RT fixiert, oder es erfolgte ein Wechsel des Mediums mit anschließender weiterer Kultivierung. Im Verlauf dieser so genannten Chase-Phase, die zwischen drei und sechs Tage bei primären Myoblasten und 24 bis 48 Stunden bei kultivierten FDB Muskelfasern (Abbildung 8) andauerte. erfolgte ie nach Proliferationsgeschwindigkeit eine Verteilung des eingebauten EdU auf die Tochterzellen. Der immunologische Nachweis des eingebautem EdU erfolgte mit Hilfe des Click-iT® EdU Imaging Kits. Für die Analyse der Proliferation von Satellitenzellen auf FDB Muskelfasern wurden diese in zwei Gruppen eingeteilt: Einzelzellen und Zellcluster (Abbildung 8).



#### Abbildung 8: Schematische Darstellung der Kultivierung von FDB Muskelfasern.

Nach der Isolierung von intakten einzelnen *FDB* Muskelfasern wurden diese unter normalen Wachstumsbedingungen für 24 Stunden kultiviert. Danach erfolgte eine dreistündige Inkubation mit *EdU*. Der Einbau von *EdU* in neu synthetisierte DNA dient zum Nachweis von aktivierten und proliferierenden Satellitenzellen. Muskelfasern wurden direkt nach *EdU* Markierung, sowie nach 24 bis 48 Stunden weiterer Kultivierung fixiert. Immunfluoreszenzfärbungen (IF) der kultivierten *FDB* Fasern erfolgten mit Hilfe des Click-iT<sup>™</sup> *EdU* Kits und mit dem monoklonalen Pax7 Antikörper. Auf den Muskelfasern können Einzelzellen sowie Zellcluster von Pax7-positiven Satellitenzellen beobachtet werden.

#### 3.5.7 Messung der Differenzierungsfähigkeit

Die von Satellitenzellen abstammenden Myoblasten sowie die  $C_2C_{12}$ Muskelvorläuferzelllinie besitzen die Fähigkeit bei einer Kultivierung unter geringen Serumkonzentrationen zu Synzytien zu differenzieren. In dieser Arbeit wurde die Differenzierung der Zellen durch DMEM mit einem Zusatz von 2 % Pferdeserum (Differenzierungsmedium) induziert.

Für die Untersuchung der Differenzierungseigenschaften von  $C_2C_{12}$  Myoblasten wurden diese in 12-Well Zellkulturplatten in Proliferationsmedium bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert und die Differenzierung der Myoblasten durch einen Wechsel zu Differenzierungsmedium induziert. Nach drei und sechs Tagen erfolgte die Analyse des Fusionsverhaltens der Myoblasten.

Für die Untersuchung der Differenzierungseigenschaften von Satellitenzellen wurden diese mit einer Zelldichte von 6×10<sup>3</sup> Zellen in 20 µl Medium in speziellen Kammer-Objektträgern (*Lab Tek™ Chamber Slide*™) ausplattiert. Nach dreitägiger Kultivierung in Proliferationsmedium erfolgte der Wechsel zu Differenzierungsmedium mit anschließender sechstägiger Inkubation.

#### <u>Auswertung</u>

Der Nachweis von differenzierten C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> und primären Myoblasten erfolgte über eine MF20-Antikörperfärbung. Der skelettmuskelspezifische Antikörper MF20 detektiert alle sarkomeren Myosine (genauer: die schweren Ketten des Myosins), die von differenzierten Synzytien exprimiert werden. Drei bzw. sechs Tage nach der Induktion der Differenzierung wurden die Kulturen mit 1x PBS gewaschen und für 10 min mit 4 % PFA/1x PBS fixiert. Der Nachweis von MF20 erfolgte über eine Immunfluoreszenzfärbung der fixierten Kulturen. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden fünf bis zehn unabhängige Bildaufnahmen angefertigt. Die Bestimmung des Fusionsindexes der Myoblasten erfolgte nach folgender Formel, wobei die Ermittlung der Anzahl an Kernen mit Hilfe der ImageJ Software durchgeführt wurde:

 $My oblast enfusion [\%] = \frac{Anzahl der Kerne in Synzytien}{gesamte Anzahl an Kernen in Myoblasten und Synzytien} \times 100$ 

## **4 ERGEBNISSE**

# 4.1 Untersuchung der Myf5-abhängigen embryonalen Skelettmuskelentwicklung

Die Determinierung myogener Zellen während der Embryogenese wird durch die Expression der myogenen Regulationsfaktoren Myf5 und MyoD reguliert. Vorangegangene Studien der gezielten Inaktivierung der einzelnen Gene Myf5 und/oder MyoD in der Maus sowie in embryonalen Stammzellen zeigten, dass nur eine teilweise funktionelle Überlappung dieser Faktoren besteht und möglicherweise sich die Skelettmuskulatur aus zwei unabhängigen Zellpopulationen entwickeln kann (Braun & Arnold, 1994, 1996; Rudnicki et al., 1993). Obwohl in vitro Analysen mit embryonalen Stammzellen einige experimentelle Vorteile bieten, fehlt diesen jedoch die in vivo Komplexität der embryonalen Entwicklung. Für weitere Einblicke in die embryonale Muskelentwicklung in Abhängigkeit von Myf5-exprimierenden Zellen wurde daher eine konditionale Zellablationsmethode, basierend auf der Cre-Rekombinase-vermittelten Aktivierung des Diphterie-Toxin A (DTA), in der Maus verwendet. Die Nutzung der Myf5<sup>Cre</sup> Mauslinie (Tallquist et al., 2000) ermöglichte es gezielt Myf5-exprimierende Zellen der frühen Muskelzellpopulation während der embryonalen Entwicklung durch induzierten Zelltod aus dem Zellverband zu entfernen.

#### 4.1.1 Das Expressionsmuster der Myf5<sup>Cre</sup> Mauslinie

Für die Visualisierung der Myf5-Promoter vermittelten *Cre*-Rekombinase Aktivität wurden Myf5<sup>Cre</sup> Mäuse mit der Reportermauslinie Rosa26<sup>LacZ</sup> (Soriano, 1999) verkreuzt. Der Nachweis der *Cre*-Aktivität durch die LacZ Färbung ermöglichte zum einen die Markierung Myf5-positiver Zellen und diente zu dem, das weitere Schicksal der Zellen im Verlauf der Myogenese auch nach Abschalten des Myf5-Promoters zu verfolgen. Vergleichend zu den LacZ Färbungen wurden *in situ* Hybridisierungen vom embryonalen Stadium E10.5 und E15.5 angefertigt, um die Myf5 mRNA Expression darzustellen. Erste LacZ-positive Zellen zeigten sich bereits in den Somiten am Tag E9.0 (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 9 (B-C) sind die Unterschiede zwischen LacZ-gefärbten Myf5-abstämmigen Zellen und *in situ* markierten Myf5-exprimierenden Zellen gegenübergestellt. Während Myf5-exprimierende

Zellen am Tag E10.5 nur im Myotom (Abbildung 9 C) nachzuweisen sind, werden Myf5abstammende Zellen (LacZ-positiv) neben dem Myotom auch im Sklerotom (Abbildung 9 B) und verteilt in den vorderen Extremitäten detektiert. Am Tag E15.5 formen Myf5abstammende Zellen die Muskelfasern der Skelettmuskulatur, wie beispielsweise in den vorderen Extremitäten zu erkennen ist (Abbildung 9 D-E). Zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung wurden keine Myf5-exprimierenden Zellen mittels *in situ* Hybridisierung in den Extremitäten nachgewiesen (Abbildung 9 F).



Abbildung 9: Verteilung Myf5-abstämmiger Zellen während der embryonalen Entwicklung.

Myf5<sup>Cre</sup> Mäuse wurden mit Rosa26<sup>LacZ</sup> Reportermäusen verkreuzt. (**A-B**) *Whole mount* LacZ Färbung eines E10.5 Myf5<sup>Cre</sup> Rosa26<sup>LacZ</sup> Embryos zeigt Myf5-abstämmige Zellen in den vorderen Extremitäten, dem Myotom (m) und in Bereichen des Sklerotoms (sk). (**C**) *In situ* Hybridisierung unter Verwendung einer DIG-markierten Myf5 mRNA-Sonde zeigt Myf5-exprimierende Zellen spezifisch im Myotom (m) eines E10.5 Wildtypembryos. (**D-E**) Transversaler Schnitt und LacZ Färbung eines E15.5 Myf5<sup>Cre</sup> Rosa26<sup>LacZ</sup> Embryos. Myf5-abstämmige Zellen sind in Muskelfasern der Skelettmuskulatur der Extremität (**E**) sowie der Körperwand zu erkennen. (**F**) Bei E15.5 wurden keine Myf5 mRNA-positive Zellen mittels *in situ* Hybridisierung in den Muskelfasern der vorderen Extremität nachgewiesen.

Zusätzlich zu der muskelspezifischen Lokalisation Myf5-abstammender Zellen wurden in E15.5 Myf5<sup>Cre</sup> Rosa26<sup>LacZ</sup> Embryonen, LacZ-positive Knorpelzellen der Rippen und Wirbel, sowie der dorsalen Wurzelganglien nachgewiesen (Abbildung 10). Vermutlich handelt es

sich hierbei um Myf5-abstammende Zellen, welche aus dem paraxialen Mesoderm bzw. aus dem Sklerotom stammen.



#### Abbildung 10: Verbreitung Myf5-abstämmiger Zellen in verschiedenen Geweben.

LacZ-positive Zellen wurden bei E15.5 Myf5<sup>Cre</sup> Rosa26<sup>LacZ</sup> Embryonen im Knorpelgewebe der Wirbel (**A**) und Rippen (**B**, Pfeil) nachgewiesen. (**C**) Vereinzelte Myf5-abstammende Zellen sind im Neuralrohr und in den dorsalen Wurzelganglien zu finden (Pfeile). Pfeilspitzen in (C) verweisen auf LacZ-positive Chondrozyten in einem Wirbel. Größenmaßstab entspricht 100  $\mu$ m.

# 4.1.2 Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Mäuse sterben perinatal aufgrund massiver Fehlentwicklung des axialen Skelettes

Für die Ablation Myf5-exprimierender Zellen wurden Myf5<sup>Cre</sup> Mäuse mit Rosa<sup>DTA</sup> Tieren (Brockschnieder *et al.*, 2006) verkreuzt. Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Mäuse (Gensch *et al.*, 2008) wurden entsprechend der Mendel'schen Verteilung geboren, starben jedoch kurz nach der Geburt.

Aufgrund der nachgewiesenen Myf5-abstämmigen Zellen im Knorpelgewebe des axialen Skelettes von E15.5 Embryonen (Abbildung 10), erfolgte die Untersuchung der Skelettstruktur von E18.5 Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen (Abbildung 11 B). Der perinatal letale Phänotyp in Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen (Abbildung 11 A) ist auf eine massive Verformung der Wirbelsäule (Abbildung 11 E), Verschmelzungen von Rippenbögen (Abbildung 11 F), sowie dem Fehlen distaler Rippen und gesamter Rippenbögen (Abbildung 11 B und G) zurückzuführen. Dadurch unterscheiden sich Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Tiere von Myf5<sup>m1</sup> Mutanten, welchen nur die distalen Bereiche der Rippen fehlten (Braun *et al.*, 1992; Kaul *et al.*, 2000).



Abbildung 11: Rippenphänotyp von E18.5 Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen.

Erscheinungsbild von E18.5 Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> (**A**) und Wildtypembryonen (**C**). (**B** und **D**) Skelettfärbung der in A und C gezeigten Embryonen mit Alcianblau/Alizarin Rot verdeutlichen die Abwesenheit des Brustkorbes in Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Mäusen. Vergrößerte Darstellung der fehlentwickelten Wirbelsäule (**E-F**) sowie die verkürzten und verformten Rippenbögen (**G**).

#### 4.1.3 Die Ablation Myf5-exprimierender Zellen führt zur verminderten Expression der myogenen Marker MyoD und Myogenin in Somiten von E10.5 Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen

Die Myf5<sup>Cre</sup>-vermittelte Aktivierung von DTA in Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen führt zum induzierten Zelltod. Apoptotische Zellen wurden vermehrt in den Somiten von E9.5 und E10.5 Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen mit Hilfe des TUNEL Apoptose Assay nachgewiesen (Abbildung 12 A-B und E-F). Dies weist auf den Verlust myogener Vorläuferzellen hin. In E9.5 Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen wurden im epaxialen Dermamyotom (Abbildung 12 A-B) und ab E10.5 zusätzlich im hypaxialen Dermamyotom (Abbildung 12 E-F) apoptotische Zellen nachgewiesen. In Wildtypembryonen wurden hingegen keine TUNEL-positiven Zellen detektiert (Abbildung 12 C-D und G-H).



# Abbildung 12: Myf5<sup>Cre</sup>-vermittelte DTA Expression führt zum Zelltod in den Somiten von Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen.

Transversale Schnitte durch die Somiten von E9.5 (**A-D**) und E10.5 (**E-H**) Embryonen mit durchgeführter TUNEL Färbung zum Nachweis apoptotischer Zellen. Im Vergleich zu den Wildtypembryonen (**C-D** und **G-H**) wurden vermehrt TUNEL-positive Zellen im Dermamyotom von Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen (**A-B** und **E-F**) nachgewiesen. Umrandungen kennzeichnen die Embryonen sowie das Neuralrohr (NR). Der Größenmaßstab beträgt 200 µm.

Der Verlust von Myf5-exprimierenden Zellen geht mit einer reduzierten Anzahl an MyoDund Myogenin-exprimierenden Zellen in E10.5 Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen einher (Abbildung 13 C und E). Aufgrund des gestreuten Musters der verbliebenen MyoD- bzw. Myogenin-positiven Zellen im Bereich des Dermamyotoms ist anzunehmen, dass die Ablation Myf5-exprimierender Zellen zum Verlust der geordneten Struktur der Somiten führt (Abbildung 13 C und E). Die Analyse von Pax7-exprimierenden Zellen, einem weiteren myogenen Marker, ergab ein Verlust dieser Zellen im epaxialen Dermamyotom (Abbildung 13 A). Die Expression von Pax7 in neuronalen Gewebe sowie dem hypaxialen Dermamyotom wurde durch die Ablation Myf5-exprimierender Zellen nicht beeinflusst (Abbildung 13 A).



# Abbildung 13: Reduzierte Expression myogener Regulationsfaktoren in E10.5 Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen.

Immunfluoreszenzfärbung kranial liegender Somiten von Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> (**A**, **C**, **E**) und Wildtypembryonen (**B**, **D**, **F**) mit Myf5/Pax7, Myf5/MyoD und Myf5/Myogenin. Eine massive Reduktion von MyoD und Myogenin-exprimierenden Zellen konnte in Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen beobachtet werden. Die äußere Linie kennzeichnet den Außenrand der Embryonen, Umrandung verweist auf das Dermamyotom, NR = Neuralrohr. Größenmaßstab entspricht 100 μm.

Mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung konnte der Verlust von Myf5- und MyoD-exprimierenden Zellen in kranial liegenden Somiten von E10.5 Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen nachgewiesen werden (Abbildung 14 A-H). Aufgrund des Entstehungsmusters der Somiten wird eine kranio-kaudale Orientierung unterschieden. Dabei geben die neuentstehenden Somiten die kaudale Richtung vor. Diese schnüren sich vom nichtsegmentierten paraxialen Mesoderm ab und reifen zu den kranial liegenden Somiten. Während in kranial liegenden Somiten von E10.5 Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen die Deletion Myf5-positiver Zellen abgeschlossen ist (Abbildung 14 A), konnten in den unreifen kaudal liegenden Somiten vereinzelt Myf5- und MyoD-positive Zellen detektiert werden (Abbildung 14 B und F).
Diese Zellen beschreiben den kurzzeitigen Zustand vor der DTA-induzierten Deletion. Im Gegensatz zum Verlust aller kranial liegenden MyoD-positiven Zellen konnten vereinzelte Myogenin-exprimierende Zellen in reifen Somiten detektiert werden (Abbildung 14 I-J). Hierbei handelt es sich um ein ektopisches Expressionsmuster.



### Abbildung 14: Verlust von Myf5, MyoD und Myogenin mRNA Expression in den kranial liegenden Somiten von E10.5 Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen.

*In situ* Hybridisierung von E10.5 Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> und Wildtypembryonen mit RNA Sonden gegen Myf5 (**A-D**), MyoD (**E-H**) und Myogenin (**I-L**). Gezeigt sind transversale Schnitte durch kranial und kaudal liegende Somiten. Myf5 und MyoD mRNA exprimierende Zellen wurden in kranial liegenden Somiten ablatiert, während restliche positive Zellen noch in kaudal liegenden Somiten von Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen nachweisbar sind. Größenmaßstab entspricht 100 µm. (**M**) Semi-quantitative RT-PCR Analyse zum Nachweis der mRNA Expressionsmengen von Myf5, MyoD, Myogenin, Myf6 (Mrf4), Pax3 und Pax7 in E10.5 und E14.5 Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> (Cre/DT-A) und Wildtypembryonen (Control). Als Referenzgen diente das *acidic ribosomal protein P0* (*ARP*).

Die Analyse des Expressionslevels myogener Faktoren mittels RT-PCR (Abbildung 14 M) ergab einen Verlust von Myf5, MyoD und Myogenin auf mRNA Ebene in E10.5 Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen. Für die Transkriptionsfaktoren Pax3 und Pax7 wurden keine veränderten Expressionslevel in Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen im Vergleich zu Wildtypembryonen beobachtet. Diese von den Immunfluoreszenzfärbungen abweichenden Ergebnisse für die Pax7 Expression (Abbildung 13 A) finden die Ursache in der Aufarbeitung der Embryonen für die RNA Isolierung. Durch den Einsatz gesamter Embryonen wurde auch neuronales Gewebe für die RT-PCR Analyse genutzt. Bei E14.5 Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen zeigten sich keine Veränderungen der mRNA Expressionslevel von MyoD, Myogenin und Mrf4/Myf6 im Vergleich zu Wildtypembryonen. Dies weist auf eine verspätete Anschaltung dieser Gene hin.

Der vollständige Verlust Myf5-abstämmiger Zellen konnte in E15.5 Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen nachgewiesen werden (Abbildung 15). Der Nachweis des gezielten Zelltodes von Myf5-abstammenden Zellen erfolgte durch Einkreuzen der Z/AP Reportermaus (Lobe *et al.*, 1999). Die Z/AP Reportermaus exprimiert nach *Cre*-vermittelter Rekombination die humane plazentale alkalische Phosphatase (hPLAP). Myf5-abstammende Zellen sind beispielsweise in der Zunge (Abbildung 15 A) sowie in der vorderen Extremität (Abbildung 15 C) von E15.5 Myf5<sup>Cre</sup> Z/AP Embryonen als Rotfärbung zuerkennen. In E15.5 Myf5<sup>Cre</sup> Z/AP Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen sind alle hPLAP basierenden Signale nicht mehr nachzuweisen (Abbildung 15 B und D).



### Abbildung 15: Effiziente DTA-vermittelte Ablation von Myf5-abstammenden Zellen in E15.5 Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen.

Alkalische Phosphatase (AP) Färbungen von E15.5 Myf5<sup>Cre</sup> Z/AP Embryonen zeigen Myf5abstammende Zellen im Muskel der Zunge (A) und vorderen Extremität (C). Die Abwesenheit der humanen plazentalen alkalischen Phosphatase-Aktivität in Myf5<sup>Cre</sup> Z/AP Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen verweist auf den Verlust von Myf5-abstämmigen Zellen im Muskelgewebe Zunae (**B**) und Extremität der (**D**). Größenmaßstab entspricht 200 µm.

### 4.1.4 Unveränderte fetale Muskelbildung in Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Mäusen

Die entwickelte Skelettmuskelstruktur von E18.5 Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen (Abbildung 16 A, C und E) wies keine Unterschiede im Vergleich zu Wildtypembryonen (Abbildung 16 B, D und F) auf. Der immunologische Nachweis von differenzierten Muskelfasern erfolgte mittels MF20 Antikörperfärbung. Die Ausbildung von Skelettmuskeln in den Extremitäten (Abbildung 16 A-B), der Rückenmuskulatur (Abbildung 16 C-D) sowie der interkostalen Muskulatur (Abbildung 16 E-F) von Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen zeigten keine Auffälligkeiten gegenüber Wildtypembryonen.



### Abbildung 16: Unveränderte Ausformung der Skelettmuskulatur von Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen.

Immunologischer Nachweis ausdifferenzierter Muskelfasern mittels MF20 Antikörperfärbung von E18.5 Embryonen. Gezeigt sind transversale Schnitte von den vorderen Extremitäten (**A-B**), dem Rücken (**C-D**) und dem interkostalen Bereich (**E-F**). Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen (**A, C** und **E**) weisen eine vergleichbare Muskelentwicklung wie Wildtypembryonen (**B, D** und **F**) auf. Größenmaßstab entspricht 200 µm.

### 4.1.5 Verspätete Myf5-unabhängige Expression von MyoD

*In vitro* Studien haben bereits gezeigt, dass die selektive Ablation Myf5-exprimierender Zellen aus differenzierenden Kulturen von embryonalen Stammzellen zu keiner Inhibierung der MyoD-abhängigen Differenzierung der Zellen führt (Braun & Arnold, 1996). Es war somit anzunehmen, dass *in vivo* ebenfalls Myf5-negative MyoD-exprimierende Zellen existieren.

Während in E10.5 Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen keine MyoD mRNA nachzuweisen war, wurden vermehrt MyoD-exprimierende Zellen in den Somiten von E11.5 und E12.5 Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen detektiert (Abbildung 17 B-C). Dabei wurde eine erste MyoD Expression im hypaxialen Teil des Dermamyotoms von E11.5 Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen nachgewiesen (Abbildung 17 B). Bei E12.5 konnte kein wesentlicher Unterschied im MyoD mRNA Expressionsmuster in Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen im Vergleich zu Wildtypembryonen beobachtet werden (Abbildung 17 C und F). Der Grund für die unveränderte Muskelentwicklung von Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Mäusen liegt mit großer Wahrscheinlichkeit in der Vermehrung einer Myf5-negativen MyoD-exprimierenden Zellpopulation.



### Abbildung 17: Anstieg MyoDexprimierender Zellen in Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen.

In situ Hybridisierung gegen MyoD von Mvf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> (**A-C**) und Wildtypembryonen (D-F) In E10.5 Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen (**A**) konnte keine MyoD Expression nachgewiesen werden. Bei E11.5 wurden erste MyoDexprimierende Zellen im hypaxialen Dermamyotom von Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen (B) nachgewiesen. Das MyoD Expressionsmuster von E12.5  $Myf5^{Cre} Rosa^{DTA} Embryonen (C) war$ vergleichbar mit Wildtypembryonen (F). Größenmaßstab entspricht 150 µm.

### 4.1.6 Die Myogenin-exprimierende Zellpopulation ist während der Myogenese unverzichtbar

Myogenin ist ein weiterer myogener Regulationsfaktor, der im Gegensatz zu Myf5 bei der terminalen Differenzierung von Myoblasten eine Rolle spielt. In Myogenin<sup>Null</sup> Mutationen wurde bereits beschrieben, dass der Verlust des Transkriptionsfaktors durch keinen anderen myogenen Faktor kompensiert werden kann, was zu einem kompletten Verlust der Muskulatur führt (Hasty *et al.*, 1993; Venuti *et al.*, 1995).

In den Somiten kann Myogenin nach der Myf5 Expression im Myotom ab E8.5 detektiert werden (Sassoon *et al.*, 1989). Um Myogenin-abgeleitete Zellen während der embryonalen Entwicklung darzustellen, wurden E9.5 Myogenin<sup>Cre</sup> Rosa26<sup>LacZ</sup> Embryonen (Gensch *et al.*, 2008) untersucht, wobei LacZ-positive Zellen nur im Myotom von reifen kranial liegenden Somiten (Abbildung 18 A-B) nachgewiesen wurden. Am Tag E15.5 (Abbildung 18 C-D) sind alle Muskelzellen und Muskelfasern LacZ-positiv.



#### Abbildung 18: Verteilung Myogenin-abstammender Zellen während der Myogenese.

(**A-B**) *Whole mount* LacZ Färbung eines E9.5 Myogenin<sup>Cre</sup> Rosa26<sup>LacZ</sup> Embryos zeigt Myogeninabstammende Zellen im Myotom in den reiferen kranial liegenden Somiten. (**C-D**) In transversalen Schnitten eines E15.5 Myogenin<sup>Cre</sup> Rosa26<sup>LacZ</sup> Embryos sind Myogenin-abstammende Zellen in allen Muskelfasern der Skelettmuskulatur wie Extremität (**C**) sowie der interkostalen Muskulatur (**D**) zu erkennen. Myogenin-exprimierende Zellen wurden im Verlauf der embryonalen Entwicklung durch Kreuzung von Myogenin<sup>Cre</sup> (Li *et al.*, 2005) mit Rosa<sup>DTA</sup> Mäusen aus dem myogenen Zellverband entfernt. Myogenin<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Mäuse (Gensch *et al.*, 2008) wurden entsprechend der Mendel'schen Verteilung geboren, starben jedoch kurz nach der Geburt. Die Embryonen wiesen eine gekrümmte Haltung (Abbildung 19 A) und keine motorischen Reaktion auf. Untersuchungen des axialen Skelettes von E18.5 Myogenin<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen ergaben keine Veränderungen der Knochen- bzw. Knorpelstruktur im Vergleich zu Wildtypembryonen (Abbildung 19 B und D).



### Abbildung 19: Phänotyp von E18.5 Myogenin<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen.

Die Ablation von Myogenin-abstammenden Zellen resultiert bei E18.5 Myogenin<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen zu einer gekrümmten Haltung (**A**) und fehlender motorischer Reaktionen. Es wurden keine Veränderungen des axialen Skelettes von Myogenin<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen (**B**) im Vergleich zu Wildtypembryonen (**D**) beobachtet.

Der Myogenin-Promoter ist erst in differenzierenden Myoblasten aktiv. Es wurden daher in E10.5 Myogenin<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen keine Veränderungen des Expressionsmusters der myogenen Regulationsfaktoren Myf5, MyoD und des Transkriptionsfaktors Pax7 in noch nicht differenzierenden Myoblasten beobachtet (Abbildung 20 A-B). Die Ausbildung der Dermamyotomstruktur in diesen Embryonen war vergleichbar mit Wildtypembryonen (Abbildung 20). Die nachgewiesenen Myogenin-positiven Zellen in den Somiten von E10.5 Myogenin<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen lassen eine verspätete Myogenin<sup>Cre</sup>-vermittelte Aktivierung der DTA Expression vermuten (Abbildung 20 E-F).



### Abbildung 20: Unveränderte Expression der Transkriptionsfaktoren Myf5, MyoD und Pax7 in E10.5 Myogenin<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen.

Immunfluoreszenzfärbung kranial liegender Somiten von Myogenin<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> (**A**, **C**, **E**) und Wildtypembryonen (**B**, **D**, **F**) mit Myf5/Pax7, Myf5/MyoD und Myf5/Myogenin. Unveränderte Expression von Myf5, MyoD und Pax7 im Dermamyotom von Myogenin<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen im Vergleich zum Wildtyp. Die äußere Linie kennzeichnet den Außenrand der Embryonen, Umrandung verweist auf das Dermamyotom, NR = Neuralrohr. Größenmaßstab entspricht 100 μm.

Bei E14.5 und E18.5 Myogenin<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen wurden keine differenzierten Muskelfasern mittels MF20 Antiköperfärbung nachgewiesen (Abbildung 21). Der Verlust differenzierter Muskulatur, speziell der Rücken- und der interkostalen Muskulatur, resultiert bei E18.5 Embryonen in einer gekrümmten Haltung (Abbildung 19 A), sowie fehlender motorischer Reaktionen. Die komplette Abwesenheit der Muskulatur in Myogenin<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen (Abbildung 21 A, C, E und G) bestätigt die effiziente Ablation von Myogenin-exprimierenden Zellen und zeigt die funktionelle Relevanz von Myogenin bei der Differenzierung von Myoblasten.



### Abbildung 21: Verlust von terminal differenzierten Muskelfasern in Myogenin<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen.

Immunologischer Nachweis ausdifferenzierter Muskelfasern mittels MF20 Antikörperfärbung von E14.5 (A-B) und E18.5 (C-H) Embryonen. Gezeigt sind transversale Schnitte vom Rücken (A-D), den vorderen Extremitäten (E-F) und dem interkostalen Bereich (G-H). E14.5 Myogenin<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen (A) wiesen einen Verlust erster differenzierter Muskelfasern auf. Im Vergleich zu Wildtypembryonen (D, F und H) fehlen bei E18.5 Myogenin<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Embryonen (C, E und G) terminal differenzierte Skelettmuskelfasern. Größenmaßstab entspricht 200 µm.

Mit Hilfe der DTA-Zellablationsmethode konnte gezeigt werden, dass eine Myf5unabhängige Zellpopulation existiert, welche MyoD exprimiert und für die vollständige Entwicklung der Skelettmuskulatur in Abwesenheit von Myf5-exprimierenden Zellen verantwortlich ist. Der Verlust von Myogenin-exprimierenden Zellen kann dagegen durch keine unabhängige Zellpopulation bzw. anderen myogenen Faktor ersetzt werden, was zu einem vollständigen Verlust der Skelettmuskulatur führt.

### 4.2 Untersuchung der Funktion von Numb und Numblike in $C_2C_{12}$ Myoblasten

#### 4.2.1 Die Zellschicksalsdeterminante Numb

Die Existenz einer zweiten myogenen Zellpopulation, die unabhängig von Myf5 die Skelettmuskelentwicklung regulieren kann, spiegelt die Komplexität der Myogenese wider. Für die Regulation des Wachstums und der Regeneration von Skelettmuskeln ist neben der Bereitstellung von myogenen Vorläuferzellen, die durch Myf5 und MyoD determiniert werden, die Kontrolle der Selbsterneuerung myogener Vorläuferzellen von besonderer Bedeutung. Ein möglicher Kandidat für die Regulation dieses Prozesses ist die Zellschicksalsdeterminante Numb.

Das evolutionär hochkonservierte Adapterprotein Numb wirkt antagonistisch zu dem Transmembranrezeptor Notch und besitzt in Säugern komplexe Funktionen bei der Proliferation und Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen (Verdi *et al.*, 1999). Durch dessen asymmetrische Verteilung in mitotischen neuronalen Vorläuferzellen (Shen *et al.*, 2002), aber auch in embryonalen Muskelvorläuferzellen (Carmena *et al.*, 1998; Jory *et al.*, 2009), wird eine Beteiligung von Numb für den weiteren Schicksalsverlauf der Zellen in ihrer Entwicklung vermutet. Für weitere Einblicke in die molekularen Mechanismen der Zellerneuerung von Muskelsatellitenzellen wurde die Funktion von Numb in Muskelzellen näher untersucht. Ein geeignetes Modelsystem für die Untersuchung der Rolle von Numb bei der Differenzierung bietet die  $C_2C_{12}$  Mausmyoblastenzelllinie.

# 4.2.1.1 Unveränderte mRNA Expression von *Numb* während der Proliferation und Differenzierung von C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myoblasten

Zur Überprüfung der endogenen Expression von *Numb* in  $C_2C_{12}$  Myoblasten wurden quantitative Real-Time PCR Analysen von proliferierenden und differenzierenden Zellen durchgeführt. Zwischen proliferierenden und differenzierten  $C_2C_{12}$  Myoblasten konnten keine Veränderungen der mRNA Expression von *Numb* beobachtet werden (Abbildung 22).



### Abbildung 22: Quantitative RT-PCR Analyse zeigt keine Veränderungen der Expression von *Numb* im Verlauf der Differenzierung von $C_2C_{12}$ Myoblasten.

Dargestellt ist die relative *Numb* mRNA Expression normalisiert auf das Referenzgen *ARP* (engl. *acidic ribosomal protein P0*). Die angegebenen Daten sind relative Werte zum Tag 1 nach Aussaat in Proliferationsmedium. Es wurde kein signifikanter Anstieg der endogenen *Numb* mRNA Expression im Verlauf der Differenzierung von  $C_2C_{12}$  Myoblasten nachgewiesen.

### 4.2.1.2 Die Isoformen Numb2 und Numb4 werden von C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myoblasten exprimiert

Anders als in *Drosophila* findet man in Säugetierorganismen vier verschiedene Isoformen von Numb, welche durch alternatives Spleißen von Exon 3 und Exon 9 (Abbildung 23 A) entstehen (Dho *et al.*, 1999; Gulino *et al.*, 2010). Für den Nachweis der unterschiedlichen mRNA Spleißvarianten wurden, die von Corallini und Mitarbeitern (Corallini *et al.*, 2006) beschriebenen Exon-spezifischen Oligonukleotide (Abbildung 23 B) verwendet. Die RT-PCR Analysen ergaben, dass die Numb Isoformen *Numb2* und *Numb4* in proliferierenden sowie in differenzierten  $C_2C_{12}$  Myoblasten exprimiert werden (Abbildung 23 B). Die aus diesen Transkripten entstehenden Protein-Isoformen besitzen durch das Fehlen von Exon 9 eine verkürzte Prolinreiche Region (PRR<sub>s</sub>, Abbildung 23 C). Numb2 unterscheidet sich von Numb4 durch ein Insert in der Phosphotyrosin Bindungsdomäne (PTB), welches durch Exon 3 kodiert wird (Abbildung 23 C).



#### Abbildung 23: Nachweis der Isoformen Numb2 und Numb4 in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myoblasten mittels semiquantitativer RT-PCR.

(A) Schematische Darstellung der längsten Protein-Isoform und des kodierenden Genabschnittes für Numb. (B) Illustration der Bindestellen der verwendeten Oligonukleotide zum Nachweis des alternativ gespleißten Exon 3 sowie Exon 9 (Pfeile). In proliferierenden und differenzierenden  $C_2C_{12}$  Myoblasten konnten mRNA Transkripte mit und ohne Exon 3 nachgewiesen werden. Es wurden keine mRNA Transkripte mit Exon 9 in den Myoblasten detektiert. (C) Veranschaulichung der nachgewiesenen Numb Transkripte, *Numb2* und *Numb4*, mit den entsprechenden Protein Isoformen. Abkürzungen: PTB = Phosphotyrosin Bindungsdomäne, NumbF = NUMB Domäne, PRR = C-teriminale Prolinreiche Region, AS = Aminosäuren, Prolif. = Proliferation, DM = Differenzierungsmedium. Modifiziert nach Corallini *et al.*, 2006 und Gulino *et al.*, 2010.

### 4.2.2 Keine Veränderung der *Numblike* mRNA Expression in differenzierenden $C_2C_{12}$ Myoblasten

Zusätzlich zu den verschiedenen Numb Isoformen wird in Säugern das funktionelle Homolog, *Numblike*, exprimiert. Die Proteine Numb und Numblike besitzen eine hohe Sequenz-Analogie, weisen aber Unterschiede im Expressionsmuster sowie in der subzellulären Lokalisation auf (Zhong *et al.*, 1997). Verschiedene Studien im Zentralnervensystem deuten darauf hin, dass in Abwesenheit von Numb, Numblike partiell dessen Funktionsverlust kompensieren kann (Petersen *et al.*, 2002; Petersen *et al.*, 2004). Vergleichbare Studien über Numb und Numblike sind in Muskelzellen noch nicht beschrieben.

Eine *Numblike* Expression konnte in  $C_2C_{12}$  Myoblasten nachgewiesen werden, wobei in beiden Zuständen, der Proliferation und der Differenzierung, keine signifikanten Veränderungen der mRNA Expressionslevel beobachtet werden konnten (Abbildung 24).





Dargestellt ist die relative *Numblike* mRNA Expression normalisiert auf das Referenzgen *ARP* (engl. *acidic ribosomal protein P0*). Die angegebenen Daten sind relative Werte zum Tag 1 nach Aussaat in Proliferationsmedium. Es wurden keine signifikanten Veränderungen des endogenen *Numblike* Expressionslevels detektiert.

### 4.2.3 Repression von Numb und Numblike in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myoblasten mittels RNAi

Für die *in vitro* Untersuchung der Funktion von Numb und Numblike in Muskelzellen wurde die Translation der endogenen Proteine mit Hilfe der RNA Interferenz (RNAi) Methode

inhibiert. Da bekannt ist, dass verschiedene, zu einem bestimmten Genabschnitt komplementäre RNA Sequenzen (siRNA, *short interfering* RNA) mit unterschiedlicher Effizienz die Funktion des Zielgens herunterregulieren (*Knockdown*), wurden je fünf *small hairpin RNA* (shRNA)-kodierende Plasmide gegen *Numb* bzw. *Numblike* in  $C_2C_{12}$  Myoblasten eingebracht und deren Effizienz getestet.

Die genspezifischen Zielsequenzen, sowie die Position der siRNA Sequenzen (Abbildung 25), wurden mittels *BLAST* Sequenzvergleich überprüft. Aufgrund der nachgewiesenen Numb Isoformen (Abbildung 23) war es wichtig, dass keine der siRNA in Exon 3 oder Exon 9 bindet.



Abbildung 25: Schematische Darstellung der siRNA Bindestellen für Numb und Numblike. Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Numb (A) und Numblike (B) mit den entsprechenden mRNA Transkripten. Die Bindungsstellen der einzelnen shRNA sind unterhalb der Genabschnitte dargestellt und mit #1 bis #5 nummeriert. Abkürzungen: PTB = Phosphotyrosin Bindungsdomäne, NumbF = NUMB Domäne, PRR = C-terminale Prolinreiche Region, AS = Aminosäuren.

Mit Hilfe des lentiviral-gestützten shRNA-Systems (Sigma-Aldrich) wurden die einzelnen shRNA-kodierenden Vektoren in  $C_2C_{12}$  Myoblasten transduziert. Die Effektivität der jeweiligen siRNA-vermittelten Reduktion der endogenen Numb bzw. Numblike Proteinexpression in den Myoblasten wird im folgenden Abschnitt (4.2.3.1) genauer beschrieben.

### 4.2.3.1 Unterschiedlich effiziente shRNA-vermittelte Reduktion der endogenen Numb und Numblike Proteinexpression

Als Kontrolle für die Etablierung einzelner shRNA gegen *Numb* bzw. *Numblike* wurde eine *scrambled* Kontroll-shRNA verwendet. Dabei handelt es sich um eine kurze siRNA Sequenz, welche durch einen Austausch von vier Basen zu einer nichtfunktionellen siRNA gegen humane und murine Gene umgewandelt wurde (Sigma-Aldrich). Durch das in den shRNA-kodierenden Plasmiden enthaltene Puromycin-Resistenzgen konnten transduzierte  $C_2C_{12}$  Myoblasten selektioniert werden. Western Blot Analysen von  $C_2C_{12}$  Myoblasten, die mit den einzelnen shRNA-exprimierenden Virionen transduziert wurden, zeigten eine spezifische siRNA-vermittelte Reduktion der endogenen Numb bzw. Numblike Proteinexpression auf (Abbildung 26). Keine Veränderungen der Proteinmengen für Numb und Numblike wurden in pLKO.1 bzw. *scrambled* shRNA-exprimierenden  $C_2C_{12}$  Kontrollmyoblasten detektiert.



#### Abbildung 26: Etablierung von C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myoblasten mit stabiler shRNA Expression.

Verschiedene (#1 bis #5) Numb-spezifische (**A-B**) und Numblike-spezifische (**C-D**) shRNAexprimierende Vektoren wurden mit Hilfe lentiviraler Partikel in  $C_2C_{12}$  Myoblasten transduziert. Als Kontrolle wurden die Plasmide pLKO.1 und *scrambled* shRNA verwendet. Nach siebentägiger Puromycin Selektion erfolgte die Analyse der endogenen Numb (**A**) bzw. Numblike (**C**) Proteinexpression. Es wurden je 20 µg Gesamtproteinextrakt mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteingehalte im Western Blot untersucht. Die Bandenintensitäten für Numb (**B**) bzw. Numblike (**D**) wurden zum GAPDH Signal normalisiert und als relative Werte zur *scrambled* shRNA dargestellt. Die Auswertung der Bandenintensitäten, nach Normalisierung zu GAPDH, ergab eine Reduktion der Numb Proteinmenge um 70 % für shNumb #5 im Vergleich zur *scrambled* shRNA (Abbildung 26 A-B). Der Proteinlevel für Numblike wurde zu 80 % (shNumblike #4) bzw. zu 90 % (shNumblike #3) in den transduzierten  $C_2C_{12}$  Myoblasten verringert (Abbildung 26 C-D). Für die weitergehenden Analysen wurden stabile shNumb #5 bzw. shNumblike #3 exprimierende  $C_2C_{12}$  Myoblasten durch Puromycin Selektion generiert.

### 4.2.3.2 Effiziente simultane Unterdrückung von Numb und Numblike

Um die beschriebene mögliche kompensatorische Wirkung von Numblike auf den Funktionsverlust von Numb für die weiteren Untersuchungen zu berücksichtigen wurde im Folgenden eine stabile Zelllinie mit kombinierter Unterdrückung von Numb und Numblike (shNumb/shNumblike) mit den shRNA-kodierenden Vektoren shNumb #5 und shNumblike #3 (Abbildung 27) etabliert.



### Abbildung 27: Spezifische Repression der Proteinexpression von Numb und Numblike in $C_2C_{12}$ Myoblasten.

Gezeigt sind Western Blot Analysen zum Nachweis der Numb und Numblike Proteinexpression in shRNA-exprimierenden (shNumb #5 und/oder shNumblike #3) C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myoblasten. (**B**) Für die Quantifizierung wurden die Bandenintensitäten für Numb bzw. Numblike zum GAPDH Signal normalisiert und relativ zur *scrambled* shRNA-Kontrolle dargestellt. Im Vergleich zur *scrambled* shRNA Kontrolle wurde in den stabilen shNumb/shNumblike exprimierenden Myoblasten eine Reduktion der Proteinmengen um 60 % für Numb und 70 % für Numblike nachgewiesen.

In shNumb/shNumblike Myoblasten wurden signifikant reduzierte Proteinmengen für Numb und Numblike nachgewiesen, wobei die Auswertung der Bandenintensitäten eine Minderung des Numb Proteinlevels um 60 % und für Numblike um 70 %, relativ zur *scrambled* Kontrolle, ergaben (Abbildung 27). In den Einzelzelllinien (shNumb bzw. shNumblike) wurden keine erhöhten Proteinmengen des jeweiligen homologen Proteins detektiert. Die niedrigere Knockdown Effizienz in der shNumb/shNumblike Zelllinie kann auf die erhöhte Konzentration der verwendeten kombinierten viralen Überstände zurückgeführt werden.

### 4.2.3.3 Verminderte Differenzierung der Myoblastenkulturen nach Repression von Numblike, Numb und Numb/Numblike

Die C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myoblastenzelllinie eignet sich besonders für die Untersuchung der myogenen Differenzierung *in vitro*. Unter Mangel von Wachstumsfaktoren und Zell-Zell-Kontakten stellen Myoblasten ihre Teilungsfähigkeit ein und fusionieren zu langgestreckten vielkernigen Zellschläuchen, den sogenannten *Synzytien*, die muskelspezifische Gene und Proteine exprimieren.

Für die Untersuchung der Differenzierungseigenschaften der in Abschnitt 4.2.3.2 dargestellten Zelllinien wurden diese während der Proliferation (Abbildung 28 A-D), zum Zeitpunkt der beginnenden Differenzierung, durch Zugabe von Differenzierungsmedium (Abbildung 28 E-H), sowie am Tag drei (Abbildung 28 I-L) und sechs (Abbildung 28 M-P) der Differenzierung dokumentiert.

Erste Unterschiede im Fusionsverhalten der shNumb, shNumblike und shNumb/shNumblike Myoblasten konnten, im Vergleich zu den scrambled Zellen, am dritten Tag der Differenzierung beobachtet werden (Abbildung 28 I-L). Während in Kontrollkulturen vermehrt Synzytien zu erkennen waren, wiesen shNumblike Kulturen weniger Synzytien als scrambled shRNA Myoblasten auf. Demgegenüber wurden nur vereinzelt fusionierte Zellen in den shNumb und shNumb/shNumblike Myoblastenkulturen beobachtet (Abbildung 28 K-L). Die sechstägige Kultivierung dieser Zellen in Differenzierungsmedium ergab keine Annäherung an das Fusionsverhalten von scrambled (Abbildung 28 M-P) bzw. wildtypischen  $C_2C_{12}$  Myoblasten (nicht gezeigt). Dies lässt vermuten, dass die abschließende Differenzierung durch die Repression von Numb und/oder Numblike gestört ist.



### Abbildung 28: Reduziertes Differenzierungsverhalten von shNumb und shNumb/shNumblike exprimierenden $C_2C_{12}$ Myoblasten.

(A-D) Unter Proliferationsbedingungen wurden keine Unterschiede zwischen den einzelnen shRNAexprimierenden C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Zellen beobachtet. (E-H) Der Wechsel zu Differenzierungsmedium erfolgte bei 100 % Konfluenz der Myoblasten. (I-L) Nach dreitägiger Kultivierung der Myoblasten in Differenzierungsmedium sind Synzytien in *scrambled* shRNA (I), shNumblike (J) und zu geringerem Maß in shNumb (K) Kulturen zu erkennen. (M-P) Die sechstägige Kultivierung in Differenzierungsmedium ergab keine Angleichung im Fusionsverhalten von shNumblike, shNumb und shNumb/shNumblike Myoblasten zur *scrambled* shRNA Kontrolle. Abkürzungen: DM = Differenzierungsmedium. Größenmaßstab: 500 µm.

Bestätigt wurden diese Beobachtungen durch die Verwendung eines Differenzierungsmarkers. MF20 (Abbildung 29) wird nur von differenzierten Myoblasten exprimiert und detektiert skelettmuskelspezifisch die schweren Ketten von Myosin II. Der immunologische Nachweis ergab eine signifikante Reduktion MF20-markierter Zellen in shNumblike, shNumb und shNumb/shNumblike Kulturen im Vergleich zur *scrambled* Kontrolle (Abbildung 29 B-B', C-D und C'-D'). Die Berechnung des Fusionsindex ergab eine signifikant verminderte Anzahl an Zellkernen in MF20-positiven Zellen, was auf ein

gestörtes Differenzierungs- und damit Fusionsverhalten dieser Myoblasten hinweist (Abbildung 29 E). Da bereits die Einzelknockdown Zelllinien, shNumblike und shNumb, eine starke Reduktion des Fusionsverhaltens aufweisen, war die Untersuchung einer möglichen Verstärkung des Phänotyps durch Doppelsuppression von Numblike und Numb nicht möglich (Abbildung 29 E). Der Funktionsverlust jedes einzelnen Proteins besitzt bereits einen negativen Einfluss auf die Differenzierung von Myoblasten. Numb scheint dabei das Fusionsverhalten stärker zu beeinflussen als Numblike.



### Abbildung 29: Signifikante Reduktion der terminalen Differenzierung von shNumblike, shNumb und shNumb/shNumblike Myoblasten.

Immunologischer Nachweis von differenzierten Myoblasten mit Hilfe des MF20 Antikörpers erfolgte nach dreitägiger (**A-D**) und sechstägiger (**A'-D'**) Kultivierung in Differenzierungsmedium. Stabile shNumblike (**B-B'**), shNumb (**C-C'**) und shNumb/shNumblike (**D-D**') exprimierende Myoblasten bildeten, im Vergleich zur *scrambled* shRNA Kontrolle (**A-A'**), nur wenige MF20-positive differenzierte Zellen aus. (**E**) Für die Quantifizierung der terminalen Differenzierung erfolgte die Bestimmung des Fusionsindex durch Auszählung der Zellkerne in MF20-positiven Zellen im Verhältnis zu allen Kernen. Dargestellt ist der Mittelwert ± Standardfehler, statistische Signifikanz (Student's t-Test): \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,005, n = 3 Experimente. DM = Differenzierungsmedium.

### 4.2.3.4 Der Notch Signalweg ist durch den Verlust von Numb und/oder Numblike nicht signifikant hochreguliert

Wie bereits angesprochen, wird eine antagonistische Funktion von Numb auf den Notch Signalweg postuliert. Durch die Bindung von Numb an die intrazelluläre Domäne des Notch Rezeptors und die Rekrutierung einer Ubiquitinligase wird der proteolytische Abbau des Rezeptors vermittelt (Beres *et al.*, 2011; McGill & McGlade, 2003).

In Säugern werden den drei Notch Rezeptoren Notch1, Notch2 und Notch3 inhibitorische Funktionen bei der Skelettmuskelentwicklung zugeschrieben. Im Folgenden Teil der Arbeit wurde untersucht, ob die Unterdrückung von Numb und/oder Numblike Auswirkungen auf die Konzentration bzw. Aktivierung der Notch Rezeptoren Notch2 und Notch3 (Abbildung 30) haben. Western Blot Analysen zum Nachweis von Notch1 hatten keinen Erfolg, da diese keine Signale in der Positivkontrolle zeigten, und werden hier nicht aufgeführt.

Zum Nachweis des aktivierten Notch2 Rezeptor wurde ein spezifischer an die intrazelluläre Domäne bindender Antikörper verwendet (Notch2 ICD). Es fand sich eine Abnahme der Konzentration von Notch2 ICD im Verlauf der Differenzierung der  $C_2C_{12}$ Myoblastenkulturen (Abbildung 30), was darauf hindeutet, dass Notch2 die Proliferation fördert und die Differenzierung hemmt und somit bei der Initiation der Differenzierung herunterreguliert werden muss. Die einzelnen Knockdown Zelllinien zeigten keine Beeinflussung der Notch2 ICD Proteinmenge im Vergleich zur *scrambled* Kontrolle. Aufgrund der gleichbleibenden Proteinmengen des Notch3 Rezeptor in proliferierenden und differenzierenden Kontrollmyoblastenkulturen (Abbildung 30) kann angenommen werden, dass Notch3 keine Funktion bei der Proliferation und der Differenzierung von  $C_2C_{12}$  Myoblasten besitzt. In shNumblike, shNumb und shNumb/shNumblike Kulturen wurde keine veränderten Konzentrationen des Notch3 Rezeptor im Vergleich zur *scrambled* Kontrolle beobachtet.



#### Abbildung 30: Western Blot Analyse der Notch2 und Notch3 Rezeptoren.

Spezifische Antikörperfärbung gegen die intrazelluläre Domäne des Notch2 Rezeptors (Notch2 ICD) zeigte eine Abnahme in der Proteinmenge im Verlauf der Differenzierung von Myoblastenkulturen. Im Vergleich zu den *scrambled* Kontrollzellen konnten keine Änderungen in der Proteinmenge festgestellt werden. Die shRNA-exprimierenden Myoblastenzelllinien wiesen ebenso keine Veränderungen in den Notch3 Rezeptor Proteinmengen im Vergleich zu den *scrambled* Kontrollzellen auf. Abkürzungen: DM = Differenzierungsmedium, ICD = intrazelluläre Domäne.

In der Wildtypsituation dient die intrazelluläre Domäne des Notch Rezeptors zur Signalweiterleitung. In Verbindung mit Kofaktoren erfolgt die Aktivierung der Transkription von verschiedenen Notch Zielgenen. Um zu überprüfen, ob der Verlust von Numb und/oder Numblike zur vermehrten Notch Aktivität führt, wurde die Expression einiger Gene der hairy enhancer of split (Hes) Familie untersucht. Es wurden keine signifikanten Veränderungen im Expressionslevel der Notch Zielgene Hes1 und Hey1 im Verlauf der Differenzierung von scrambled Myoblasten beobachtet (Abbildung 31). Zudem konnten in einzelnen shRNA Myoblastenzelllinien, vergleichend mit den der scrambled Kontrollzelllinie, keine Beeinflussung der Hes1 und Hey1 Expressionslevel nachgewiesen werden.

MyoD, als Determinierungsfaktor für die Differenzierung von Myoblasten, zeigte in *scrambled* shRNA sowie in den shNumb und/oder shNumb/shNumblike Kulturen eine Hochregulation mit Beginn der Differenzierung am Tag 3 und bleibt konstant in differenzierten Kulturen erhalten (Abbildung 31). Obwohl die Knockdown Zelllinien verminderte Fusionierungseigenschaften aufweisen, kann dies nicht auf eine ausbleibende Determinierung zur Differenzierung zurückgeführt werden.



Abbildung 31: Der Verlust von Numb und/oder Numblike führt nicht zu einer erhöhten Notch Aktivität.

Semi-quantitative RT-PCR Analysen von proliferierenden und differenzierenden Myoblastenzelllinien zum Nachweis der Expression von MyoD, Hes1, Hey1, Numblike und Numb. Als Kontrolle diente das Referenzgen *ARP* (engl. *acidic ribosomal protein P0*).

# 4.3 *In vivo* Charakterisierung der Funktion von Numb/Numblike in Muskelgewebe und Satellitenzellen

*In vitro* Analysen der Muskelzelldifferenzierung bieten in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myoblasten experimentelle Vorteile, jedoch fehlt diesen Zellen die *in vivo* Komplexität von Muskelvorläuferzellen und adulten Stammzellen.

Aufgrund des pränatal letalen Phänotyps Numb defizienter Embryonen erfolgte für die *in vivo* Untersuchung der skelettmuskelspezifischen Funktion von Numb, dessen konditionale Ausschaltung unter Verwendung der Myf5<sup>Cre</sup> Mauslinie (Tallquist *et al.*, 2000). Dies ermöglichte die selektive Deletion von Numb in Muskelvorläuferzellen sowie adulten Satellitenzellen.

### 4.3.1 Etablierung von Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Mäusen

Für die Etablierung der Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Mauslinie wurden zu Beginn konditionale Numb Mäuse (Numb<sup>fl/fl</sup>), welche *loxP* Sequenzen um das erste kodierende Exon besitzen (Zilian *et al.*, 2001), mit konstitutiven Numblike Knockout Mäusen (Numblike<sup>-/-</sup>) verkreuzt. Die so erhaltenen Numb<sup>fl/fl</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Tiere waren wie erwartet lebensfähig, wobei weibliche homozygote Numblike<sup>-/-</sup> Mäuse eine bereits beschriebene verminderte Fertilität aufwiesen (Petersen *et al.*, 2002). Nach Einkreuzung der Myf5<sup>Cre</sup> Tiere, erwies sich die Verpaarung von weiblichen Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>+/-</sup> Mäusen mit Numb<sup>fl/fl</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Männchen am effektivsten (Abbildung 32 A). Zu Übersichtszwecken werden die erhaltenen Genotypen wie folgt abgekürzt:

| Verwendete Abkürzung der Genotypen                              |                     | Genotyp           |          |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------|-------------------|----------|
|                                                                 | Myf5 <sup>Cre</sup> | Numb              | Numblike |
| Kontrolle                                                       | negativ             | flox/flox         | +/-      |
| Numblike <sup>-/-</sup>                                         | negativ             | flox/flox         | -/-      |
| Myf5 <sup>Cre</sup> Numb <sup>∆/∆</sup>                         | positiv             | $\Delta / \Delta$ | +/-      |
| Myf5 <sup>Cre</sup> Numb <sup>∆/∆</sup> Numblike⁻ <sup>/-</sup> | positiv             | $\Delta / \Delta$ | -/-      |

#### Tabelle 17: Übersicht über die erhaltenen Genotypen und den verwendeten Abkürzungen.

Die Auswertung der Nachkommen bezüglich der Genotypen ergab eine leicht reduzierte Anzahl an Tieren mit dem Genotyp Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> Numblike<sup>-/-</sup> (~ 17 % von zu erwarteten 25 %, Abbildung 32 C). Für die anderen möglichen Genotypen wurden keine Abweichungen vom erwarteten Mendel'schen Verteilungsmuster beobachtet (Abbildung 32 C), wobei zahlenmäßig mehr Kontrolltiere geboren wurden (~ 34 % von zu erwarteten 25 %).

Neben der verminderten Fertilität von weiblichen Numblike<sup>-/-</sup> Tieren wurden keine offensichtlichen phänotypischen Veränderungen beobachtet, was detailliert in Abschnitt 4.3.2 beschrieben wird. Für die Analyse der Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Doppelmutanten wurden immer die entsprechenden Geschwistertiere zu Kontrollzwecken verwendet.



#### Abbildung 32: Statistische Verteilung der erhaltenen Genotypen.

(A) Verkreuzt wurden weibliche Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> Numblike<sup>+/-</sup> Mäuse mit Numb<sup>fl/fl</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Männchen. (B) Die prozentuale Verteilung der erhaltenen Genotypen aus der in (A) gezeigten Verpaarung wurde bezüglich dem Geschlecht dargestellt. (C) Entsprechend den Mendel'schen Regeln lag die statistische Wahrscheinlichkeit der einzelnen Genotypen bei jeweils 25 %. Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> Numblike<sup>-/-</sup> Mäuse wurden mit leicht reduzierter Anzahl erhalten (~ 17 % von allen erhaltenen Genotypen). n = 28 Würfe.

# 4.3.1.1 Myf5<sup>Cre</sup> Rekombinase vermittelte Deletion *in vivo* führt zu einem kompletten Verlust von Numb in primären Myoblasten

Zur Überprüfung der korrekten Exzision, des mit *loxP* Sequenzen flankierten Exons von *Numb*, wurden PCR Analysen mit genomischer DNA durchgeführt, die aus *EDL* Muskeln bzw. isolierten proliferierenden Satellitenzellen (primären Myoblasten) gewonnen wurde. Mit Hilfe des DNA-Oligonukleotidpaares Numb<sup>Del</sup>, welche außerhalb des gefloxten DNA

Abschnittes binden, konnte sowohl das *loxP* flankierte Exon (Numb<sup>fl/fl</sup>) mit einer Größe von 2,0 Kilobasen (kb), als auch das mutante Numb<sup>Del</sup> Allel (0,7 kb) detektiert werden. In Abbildung 33 B ist eine exemplarische PCR Analyse von wildtypischen und Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> *EDL* Muskel bzw. Myoblasten dargestellt. Das spezifische Numb<sup>Del</sup> Amplifikat, für die *Cre*-vermittelte Exzision, wurde nur detektiert, wenn Myf5<sup>Cre</sup> nachgewiesen werden konnte (Abbildung 33 B).



### Abbildung 33: Myf5<sup>cre</sup> Rekombinase vermittelte Deletion von Numb in primären Myoblasten von Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Tieren.

(**A**) Dargestellt sind *TA* Muskeln (*Musculus tibialis anterior*) und primäre Myoblasten einer Kontrolle und einer Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> Numblike<sup>-/-</sup> Maus. (**B**) PCR Analyse von genomischer DNA aus *EDL* Muskel und Myoblasten zum Nachweis der Myf5<sup>Cre</sup> Rekombinase vermittelten Exzision des mit *loxP* Sequenzen flankierten Numb DNA Abschnittes.

### 4.3.1.2 Immunologischer Nachweis von Numb und Numblike in Satellitenzellen

Eine membranständige, sowie eine asymmetrische Lokalisation von Numb in mitotischen Zellen wurde in embryonalen Muskelvorläuferzellen von *Drosophila* (Carmena *et al.*, 1998; Ruiz Gomez & Bate, 1997), Maus- (Jory *et al.*, 2009) und Hühnchenembryonen (Holowacz *et al.*, 2006) beschrieben, wohingegen Numblike in neuronalen Vorläuferzellen eine symmetrische Verteilung und zytoplasmatische Lokalisation aufweist (Zhong *et al.*, 1997). Für den Nachweis des Satellitenzellstatus wurden der Transkriptionsfaktor Pax7 (Seale *et al.*, 2000) sowie der Oberflächenmarker CD34 (Beauchamp *et al.*, 2000) verwendet.



### Abbildung 34: Immunologischer Nachweis von Numb und Numblike in Muskelfaserassoziierten Satellitenzellen.

Immunfluoreszenzfärbung von Kontroll *FDB* Muskelfasern ergaben eine spezifische membranständige Kolokalisation von Numb (**A**) und Numblike (**C**) mit dem Oberflächenmarker CD34. Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> Numblike<sup>-/-</sup> Muskelfasern weisen keine Numb (**B**) bzw. Numblike (**D**) Färbung in CD34- bzw. Pax7-positiven Satellitenzellen auf. Zur Darstellung der Muskelfasern wurden diese mit Phalloidin-AlexaFluor®633 und die Muskelfaserkerne mit DAPI gefärbt.

Bei Immunfluoreszenz Analysen von Muskelfaser-assoziierten Satellitenzellen konnte eine Kolokalisation von Numb und Numblike mit CD34 nachgewiesen werden (Abbildung 34 A, C). Der immunhistologische Nachweis von Numb und Numblike in Doppelmutanten ergab keine positiven Signale innerhalb der CD34- bzw. Pax7-positiven Satellitenzellen (Abbildung 34 B, D). Die mit filamentären Aktin angereicherten Regionen der Fasern (sichtbar durch Phalloidin-Färbung) zeigten eine Hintergrundfärbung des Zweitantikörpers (Abbildung 34 B).

### 4.3.2 Homozygote Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Tiere sind phänotypisch unauffällig

Die generierten Doppelmutanten zeigten keine Verstärkung der bis hierhin aufgeführten Phänotypen der Einzelmutanten. In Abbildung 35 (A) sind beispielhaft sechs Wochen alte Mäuse mit den entsprechend erhaltenen Genotypen gegenübergestellt. Phänotypische Analysen von juvenilen Mäusen sowie von sieben Monate alten Tieren ergaben keine Veränderungen des Körpergewichts bzw. der Gesamtmuskelmasse (Abbildung 35 B-C). Das durchschnittliche Gewicht (Abbildung 35 B) von sechs Wochen alten Doppelmutanten betrug 17,9 ± 0,3 g (Kontrolle 20,9 ± 2,3 g) und etwa 33,9 ± 3,7 g von adulten Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Mäusen (Kontrolle 33,0 ± 4,0 g).

Detaillierte Analysen der Muskelmasse (Abbildung 35 C), durch Isolation der Skelettmuskulatur von Gliedmaßen und Rücken, ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen sechs Wochen alten Doppelmutanten (~ $2,5 \pm 0,09$  g), Numb Einzelmutanten  $(\sim 3,0 \pm 0,04 \text{ g})$  und den Kontrolltieren  $(\sim 3,2 \pm 0,53 \text{ g})$  bzw. Numblike<sup>-/-</sup>  $(\sim 3,6 \pm 0,41 \text{ g})$ . Für adulte, sieben Monate alte Mäuse wurden ebenso keine signifikanten Abweichungen der Muskelmasse festgestellt (Abbildung 35 C). Die Ermittlung der Muskelmasse bzw. des Körpergewichtes allein ermöglicht keine quantitative Bewertung des Muskelphänotyps. Die Berechnung des Verhältnisses aus Muskelmasse und Körpergewicht (Abbildung 35 D) veranschaulicht hingegen den prozentualen Anteil der Muskelmasse am Gesamtkörpergewicht. Die vergleichende Analyse ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Mausmutanten im Vergleich zu den Kontrolltieren, was auf eine normale postnatale Entwicklung der Skelettmuskulatur hinweist.



### Abbildung 35: Phänotypische Analyse von Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Mäusen.

(A) Aufnahmen von sechs Wochen alten Geschwistertieren ergaben eine weitgehend unauffällige postnatale Skelettmuskelentwicklung. Durchschnittliches Körpergewicht (B) und Gesamtmuskelmasse aus Gliedmaßen und Rücken (C). Das Verhältnis Gesamtmuskelmasse zu Körpergewicht (D) ergab im Vergleich zu den Kontrolltieren keine signifikanten Unterschiede. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, n = 3 Tiere pro Genotyp.

### 4.3.3 Reduzierte Satellitenzellzahl in juvenilen Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Mäusen

Wie einleitend beschrieben, wird vermutet, dass Numb bei der asymmetrischen Zellteilung von Satellitenzellen und damit beim Erhalt des Muskelstammzellpools beteiligt ist. Somit kann vermutet werden, dass die Ausschaltung von Numb in eine veränderte Anzahl an Satellitenzellen resultiert.

Als erste grundlegende Untersuchung erfolgte die Analyse der Satellitenzellpopulation von Tieren unterschiedlichen Alters. Die Tiere wurden dafür in drei Altersgruppen, von sechs Wochen, sieben bis acht Monaten und elf bis zwölf Monaten, eingeteilt und die Anzahl an Satellitenzellen pro *FDB* Muskelfaser ermittelt (Abbildung 36 A). Auszählungen (Abbildung 36 B) ergaben eine signifikant verringerte Anzahl an Pax7-positiven Satellitenzellen in sechs Wochen alten Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Tieren (0,7 ± 0,03 Zellen pro *FDB* Faser) im Vergleich zu Kontrolltieren (1,3 ± 0,2 Zellen). Die Numblike<sup>-/-</sup> Mutanten wiesen eine leicht erhöhte Anzahl von 1,5 ± 0,2 Satellitenzellen pro *FDB* Muskelfaser auf. Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Einzelmutanten zeigten deutlich weniger Satellitenzellen (0,9 ± 0,1 Pax7-positive Zellen pro *FDB* Faser) als die Kontrolltiere und Numblike<sup>-/-</sup> Mutanten auf. Es kann vermutet werden, dass die Verminderung der Stammzellpopulation auf das Fehlen von Numb zurückzuführen ist (Abbildung 36 B).

Bei der Betrachtung der Verteilung der Satellitenzellen pro *FDB* Muskelfaser konnten rund 20 % mehr Fasern ohne Pax7-positive Zellen in sechs Wochen alten Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> Numblike<sup>-/-</sup> und Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> Tieren als in Kontrolltieren und Numblike<sup>-/-</sup> Mutanten nachgewiesen werden (Abbildung 36 C). Bei den sieben bis acht Monate alten Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> Mäusen sowie Doppelmutanten wurde eine Tendenz zur vermehrten Anzahl an *FDB* Muskelfaser ohne Satellitenzellen beobachtet (Abbildung 36 C). Es konnte aber kein signifikanter Unterschied ermittelt werden.

Während die Anzahl der *FDB* Muskelfaserkerne von juvenilen sowie adulten Numblike<sup>-/-</sup> Mutanten mit den Kontrolltieren vergleichbar waren, zeigten sechs Wochen und sieben Monate alte Doppelmutanten eine signifikant verringerte Muskelfaserkernzahl im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 36 D, Tabelle 18). Eine reduziertere Anzahl an Kernen wurde zudem in adulten sieben Monate alten Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Tieren nachgewiesen. Es ist möglich, dass Numb bei der Myoblastenfusion im Verlauf der Skelettmuskelentwicklung eine Rolle spielt und der Verlust von Numb zu einer verminderten Fusion der Myoblasten führt.



#### Abbildung 36: Analyse der Satellitenzellzahl und FDB Muskelfaserkerne.

(A) Nachweis von Muskelfaser-assoziierten Satellitenzellen (Pfeile) mittels Pax7-Antikörperfärbung, erkennbar als ovale braune Zellen (DAB Färbung). (B) Auszählung von Pax7-positiven Zellen pro *FDB* Muskelfaser von verschiedenen Altersgruppen zeigt signifikant weniger Satellitenzellen in sechs Wochen alten Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zur Kontrolle. (C) Die verringerte durchschnittliche Anzahl an Satellitenzellen auf Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> *FDB* Muskelfasern resultiert aus der vermehrten Anzahl an Fasern, welche keine Pax7-positiven Zellen enthalten. (D) Verteilung der Zellkerne pro *FDB* Muskelfaser deutet auf eine verminderte Fusion von Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Myoblasten bei der Skelettmuskelentwicklung hin. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler, statistische Signifikanz (Student's t-Test): \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, n = 4-6 Tiere pro Genotyp.

| Genotyp                                                         | Durchschnittliche Anzahl an<br>Muskelfaserkerne |            | Signifikanz zur Kontrolle |             |
|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------|---------------------------|-------------|
|                                                                 | 6 Wochen                                        | 7-8 Monate | 6 Wochen                  | 7-8 Monate  |
| Kontrolle                                                       | 53,2 ± 4,2                                      | 60,5 ± 1,8 | -                         | -           |
| Numblike <sup>-/-</sup>                                         | 54,2 ± 2,6                                      | 59,4 ± 1,2 | n.s.                      | n.s.        |
| Myf5 <sup>Cre</sup> Numb <sup>∆/∆</sup>                         | 49,2 ± 2,0                                      | 52,8 ± 2,3 | n.s.                      | ** p < 0,01 |
| Mvf5 <sup>Cre</sup> Numb <sup>Δ/Δ</sup> Numblike <sup>-/-</sup> | 42.9 ± 1.4                                      | 54.2 ± 1.6 | * p < 0.05                | ** p < 0.01 |

#### Tabelle 18: Durchschnittliche Anzahl an Zellkernen pro FDB Muskelfaser.

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, statistische Signifikanz (Student's t-Test): n.s. = nicht signifikant, n = 4-6 Tiere pro Genotyp.

### 4.3.4 Erhöhte Proliferationsrate isolierter Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Satellitenzellen im Vergleich zu Kontrollzellen

Aufgrund der reduzierten Satellitenzellzahl, sowie der verringerten Anzahl an Muskelfaserzellkernen von Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> Numblike<sup>-/-</sup> Tieren, wurde die Proliferationsaktivität der Satellitenzellen untersucht. Dabei diente das Thymidin-Analogon *EdU (5-<u>e</u>thynyl-2'-<u>d</u>eoxy<u>u</u>ridine), was während der S-Phase des Zellzyklus in neu synthetisierte DNA anstelle von Thymidin eingebaut wird, als Marker für die Proliferationsaktivität der Satellitenzellen (Abbildung 37 A).* 

In einem Pulse-Chase-Experiment wurden die isolierten Satellitenzellen für drei Stunden mit EdU inkubiert (Pulse) und fixiert. Dabei inkorporierten prozentual mehr Pax7-positive  $Mvf5^{Cre}$  Numb<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> Numblike<sup>-/-</sup> Satellitenzellen *EdU* als Kontrollzellen (Abbildung 37 B, 0 h). Nach dreitägiger Kultivierung (Chase) unter normalen Wachstumsbedingungen erfolgte eine schnellere Ausdünnung des inkorporierten EdU in Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Satellitenzellkulturen im Vergleich zur Kontrolle, was auf eine erhöhte Proliferationsrate der Satellitenzellen von Doppelmutanten hinweist. In diesen Kulturen wurden 10 % weniger *EdU*/Pax7-doppelpositive Satellitenzellen nachgewiesen als in den Kontrollkulturen (Abbildung 37 B). Weiterhin konnten in den Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Kulturen aufgrund der erhöhten Proliferationsrate 10 % mehr EdU-negative/MyoD-positive (Abbildung 37 C) und EdU-negative/Myogenin-positive (Abbildung 37 D) Myoblasten beobachtet werden. Aufgrund der Expression der Proliferationsbzw. Differenzierungsmarker MyoD und Myogenin kann angenommen werden, dass die

schneller proliferierenden Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Satellitenzellen vorzeitig den Differenzierungsmarker Myogenin anschalten.



### Abbildung 37: Erhöhte Proliferationsrate von primären Myf5<sup>Cre</sup> Numb $^{\Delta/\Delta}$ Numblike<sup>-/-</sup> Myoblasten.

(A) Immunologischer Nachweis proliferierender primärer Myoblasten nach dreistündiger Inkubation mit *EdU*, erkennbar durch Pax7- und *EdU*-doppelpositive Zellen (Pfeile). Quantitative Auswertung *EdU*-markierter Pax7- (B), MyoD- (C) oder Myogenin-positiver (D) primärer Myoblasten direkt (0 h) oder nach drei- und sechstägiger Kultivierung nach *EdU* Inkubation. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, statistische Signifikanz (Student's t-Test): \* p < 0,05. n = 3 Tiere je Genotyp, n.b. = nicht bestimmt.

### 4.3.5 Vermindertes Differenzierungsvermögen von Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>∆/∆</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Myoblasten

Obwohl Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> Numblike<sup>-/-</sup> Satellitenzellen höhere Proliferationsraten als Kontrollzellen aufwiesen (4.3.4), ließen die geringere Anzahl an *FDB* Muskelfaserkernen (4.3.3), sowie die *in vitro* Studien der Repression von Numb und Numblike in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Myoblasten (4.2.3.3) vermuten, dass Numb und Numblike bei der Muskelzelldifferenzierung eine Rolle spielen. Um einen möglichen Differenzierungsdefekt näher zu analysieren, wurde die terminale Differenzierung der Satellitenzellen mittels immunologischer MF20-Färbung untersucht (Abbildung 38).

Fünf Tage nach Induktion der Differenzierung konnten signifikante Unterschiede im Differenzierungsverhalten von Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> und Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Myoblasten, im Vergleich zu Kontrollzellen und Numblike<sup>-/-</sup> Zellen beobachtet werden (Abbildung 38). Kontroll- und Numblike<sup>-/-</sup> Myoblasten fusionierten zu einem Netzwerk von funktionellen Synzytien (Abbildung 38 A-B), wobei Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> und Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Myoblasten deutlich weniger mehrkernige MF20-positive Zellen ausbildeten (Abbildung 38 C-D). Die Berechnung des Fusionsindex ergab eine signifikant verminderte Anzahl an Zellkernen in Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> und Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Mumblike<sup>-/-</sup> MF20-positiven Zellen, was auf ein gestörtes Fusionsverhalten der Myoblasten hinweist (Abbildung 38 E). Keine Einschränkungen des Fusionsverhaltens wurden in den Numblike<sup>-/-</sup> Kulturen beobachten (Abbildung 38 B-B'' und E).



### Abbildung 38: Verminderte Differenzierung primärer Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> und Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> Numblike<sup>-/-</sup> Myoblasten.</sup>

Kontrolle (**A-A**<sup>••</sup>) und Numblike<sup>-/-</sup> (**B-B**<sup>••</sup>) Myoblasten bilden nach fünftägiger Kultivierung in Differenzierungsmedium ein Netzwerk aus funktionellen Synzytien aus. Im Vergleich dazu weisen Kulturen von Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> (**C-C**<sup>••</sup>) und Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> (**D-D**<sup>••</sup>) Myoblasten eine geringe Anzahl an mehrkernigen MF20-positiven Zellen auf. #1 – #3 = individuelle Differenzierungskulturen aus drei verschiedenen Tieren je Genotyp. Größenmaßstab entspricht 200 µm. (**E**) Quantitative Auswertung der Differenzierung. Nach fünftägiger Kultivierung in Differenzierungsmedium zeigen Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> und Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Kulturen eine signifikant verminderte Anzahl an Kernen in MF20-positiven Zellen. Darstellung der Mittelwerte ± Standardfehler, statistische Signifikanz (Student's t-Test): \* p < 0,05, n = 4-6 Tiere pro Genotyp.

## 4.3.6 Verzögerte Aktivierung von Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>∆/∆</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Satellitenzellen auf isolierten Muskelfasern

Die Kultivierung von Myoblasten in Zellkulturschalen stellt eine artifizielle Umgebung für die Zellen dar. Die Kultivierung von isolierten Muskelfasern bietet hingegen die Möglichkeit die Aktivierung und Proliferation von Satellitenzellen in ihrer natürlichen Umgebung der Stammzellnische unterhalb der Basallamina der Muskelfaser zu untersuchen. Diese Kultivierungsmethode bewahrt die potentiell wichtigen Wechselwirkungen zwischen Satellitenzelle und Muskelfaser.

Nach 24-stündiger Kultivierung in Wachstumsmedium sind Pax7-positive Satellitenzellen als Einzelzellen sowie vereinzelt in kleinen Gruppen von zwei Zellen (Zellcluster) auf Muskelfasern von Kontrolltieren, Einzel- und Doppelmutanten zu beobachten (Abbildung 39 A). Nach 48 Stunden befanden sich etwa die Hälfte aller Pax7-positiven Zellen (47 ± 10 % Kontrolle und Numblike<sup>-/-</sup>, 53 ± 5 % Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> und 44 ± 10 % Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> und 44 ± 10 % Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> und 44 ± 10 % Myf5<sup>Cre</sup> Aktivierung der Satellitenzellen hinweist.



Abbildung 39: Prozentuale Verteilung Pax7-positiver Zellen in Einzelzellen und Zellclustern.

Die Kultivierung von einzelnen *FDB* Muskelfasern erfolgte für 24 (**A**), 48 (**B**) und 72 Stunden (**C**) in Suspension unter normalen Wachstumsbedingungen. Die Auszählung Pax7-positiver Zellen in Zellclustern oder als Einzelzellen auf den Muskelfasern ergab keine signifikanten Unterschiede (Student's t-Test) zwischen den einzelnen Genotypen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$ Standardfehler, n = 3-5 Tiere pro Genotyp. Nach insgesamt 72-stündiger Kultivierung wurden Pax7-positive Zellen mehrheitlich in Gruppen von zwei bis sechs Zellen auf den in Suspension kultivierten *FDB* Muskelfasern nachgewiesen (Abbildung 39 C). Dabei konnten keine signifikanten Abweichungen in der Anzahl Pax7-positiver Zellen in Zellclustern auf den Muskelfasern von Kontrollkulturen  $(2,6 \pm 0,2 \text{ Zellen})$  sowie Einzel-  $(2,7 \pm 0,1 \text{ Numblike}^{-/-}, 2,7 \pm 0,2 \text{ Myf5}^{Cre} \text{ Numb}^{\Delta/\Delta})$  und Doppelmutanten  $(2,7 \pm 0,2)$  ermittelt werden.

Mittels des *EdU-Pulse-Chase*-Experimentes konnten aktivierte Muskelfaser-assoziierte Satellitenzellen in einzelnen Suspensionskulturen nachgewiesen werden (Abbildung 40). Während prozentual weniger Numblike<sup>-/-</sup> (4,6 %) und Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> (3,2 %) Satellitenzellen *EdU* inkorporierten, war die *EdU*-Inkorporationsrate von Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> Numblike<sup>-/-</sup> Satellitenzellen (13,3 %) vergleichbar mit den Kontrollzellen (11 %, Abbildung 40 F). Für die weiterführende Analyse erfolgte eine Einteilung der Muskelfaser-assoziierten Satellitenzellen in Einzelzellen und Zellcluster (Abbildung 40).

Nach 24-stündiger Kultivierung nach *EdU* Inkorporation wurde eine signifikant höhere Anzahl an Pax7-positiven/*EdU*-negativen Einzelzellen (Abbildung 40 G) auf Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> (38 %) und Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> (34 %) Muskelfasern im Vergleich zur Kontrolle (16,6 %) detektiert, was auf eine verzögerte Aktivierung der Satellitenzellen weist. Da diese Zellen während der *Pulse*-Phase kein *EdU* inkorporierten und ebenso keine Teilungsaktivität zeigten, kann vermutet werden, dass diese ruhende Satellitenzellen darstellen. Auch nach 48-stündiger *Chase* Phase (Abbildung 40 H) wurden tendenziell mehr *EdU*-negative Satellitenzellen auf Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> (22,3 %) und Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> (14,5 %) Muskelfasern beobachtet als auf Kontrollfasern (10 %). Nur ca. 4 % aller Pax7-positiven Numblike<sup>-/-</sup> Satellitenzellen, verteilt als Einzelzellen, zeigten zu diesem Zeitpunkt keine *EdU* Markierung (Abbildung 40 H). Nach 24- sowie 48-stündiger *Chase* Phase konnte zudem eine erhöhte Anzahl Pax7-positiver/*EdU*-negativer Satellitenzellen in Zellclustern auf Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> und Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Muskelfasern detektiert werden (Abbildung 40 I-J).

In den einzelnen Muskelfaserkulturen konnten aktivierte, sich teilende Satellitenzellen in verschiedener Orientierung sowohl planar entlang der Muskelfaser (Abbildung 40 D) als auch in einer apikal-basalen Ausrichtung zur Muskelfaser beobachtet werden. Es wird postuliert, dass entsprechend der Orientierung der Zellteilungsachse die Tochterzellen der Satellitenzelle ein unterschiedliches Zellschicksal annehmen (Kuang *et al.*, 2008; Kuang *et al.*, 2007). Die Zelle mit Kontakt zur Stammzellnische behält den Stammzellcharakter, während die andere zur Proliferation und späteren Differenzierung bestimmt ist. Da nur ein



geringer Anteil sich "aktiv" teilender Zellen in Kulturen von Mutanten sowie den Kontrollen beobachtet werden konnte, erfolgte keine Auswertung der Orientierung der Zellteilung.

### Abbildung 40: Nachweis von aktivierten Satellitenzellen auf kultivierten *FDB* Muskelfasern mittels *EdU*.

(**A-E**) Immunologischer Nachweis aktivierter Satellitenzellen auf kultivierten *FDB* Muskelfasern nach 24-stündiger Kultivierung und einer dreistündigen Inkubation mit *EdU*. Muskelfasern wurden direkt nach der *EdU*-Markierung fixiert (0 h *Chase*) oder für weitere 24 bzw. 48 Stunden (*Chase*) kultiviert. Pax7-positive Satellitenzellen wurden verteilt auf den Muskelfasern als Einzelzellen oder in Gruppen von zwei bis sechs Zellen (Zellcluster) beobachtet. *EdU*-negative/Pax7-positive Zellen konnten vermehrt auf Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> und Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Muskelfasern als Einzelzellen (**G**) sowie in Zellclustern (**D** und **I**) nach 24-stündiger *Chase* Phase nachgewiesen werden. Während auf Muskelfasern von Kontroll- und Numblike<sup>-/-</sup> Mäusen keine *EdU*-negativen Zellen in Zellclustern auf Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> und Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Mumblike<sup>-/-</sup> Muskelfasern *EdU*-negativen Zellen in den Clustern auf Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> und Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Muskelfasern *EdU*-negativen Zellen in den Clustern auf Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> und Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Muskelfasern *EdU*-negativen Zellen in den Clustern auf Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> und Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Muskelfasern *EdU*-negative (**J**). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler, statistische Signifikanz (Student's t-Test): \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, n = 3-5 Tiere pro Genotyp.
#### 4.3.7 Keine Beeinträchtigung des Regenerationsverhaltens nach Schädigung

Morphologische Untersuchungen der Muskulatur von Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup>, Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> sowie Numblike<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten peripher liegende Muskelfaserkerne, was auf eine normal entwickelte Skelettmuskulatur der Einzel- und Doppelmutanten hinweist (Abbildung 41 B-E).

Um zu überprüfen, welche Effekte die Deletion von Numb und Numblike auf die Regenerationsfähigkeit hat, wurden die *M. tibialis anterior* (*TA*) Muskeln von Numblike<sup>-/-</sup>, Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> und Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> Numblike<sup>-/-</sup> Mäusen, sowie von Kontrolltieren durch intramuskuläre Injektion von Kardiotoxin (*CTX*, engl. *cardiotoxin*) geschädigt (Abbildung 41 A). Es ist bekannt, dass eine komplette Erneuerung eines Wildtypmuskels innerhalb von drei bis vier Wochen nach Schädigung erfolgt. Dabei werden Satellitenzellen aktiviert, proliferieren und differenzieren zu funktionellen Muskelfasern (Couteaux *et al.*, 1988; Hawke & Garry, 2001). In transversalen Muskelschnitten sind neu-regenerierte Muskelfasern durch zentral liegende Zellkerne gekennzeichnet. Diese entstehen im Fusionierungsprozess der Myoblasten, welche sich hintereinander anordnen und miteinander verschmelzen.

Zehn Tage nach Kardiotoxin Schädigung erfolgten histologische Hämatoxylin und Eosin Färbungen der regenerierten *TA* Muskeln. Muskeln von Numblike<sup>-/-</sup>, Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> und Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Mäuse waren, wie die Kontrollmuskeln, durch zahlreiche neugebildete Muskelfasern gekennzeichnet (Abbildung 41 F-I). Es wurde kein vermindertes Differenzierungsverhalten der Muskeln von Einzel- und Doppelmutanten beobachtet. Die Ermittlung der Muskelfaserdurchmesser ergab eine Normalverteilung der neugebildeten Fasern mit zentral liegendem Kern von Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> und Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren (Abbildung 41 J-K). Der durchschnittliche Faserdurchmesser von Doppelmutanten (23,3 ± 0,6 µm) und Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Mäusen (22,0 ± 1,2 µm) war vergleichbar mit Kontrolltieren (23,9 ± 1,1 µm). Vermehrt kleinere Muskelfasern (15,1 ± 0,9 µm) wurden hingegen im regenerierten *TA* Muskel von Numblike<sup>-/-</sup>



# Abbildung 41: Normale Skelettmuskelregeneration von Myf5<sup>Cre</sup> Numb $^{\Delta/\Delta}$ Numblike<sup>-/-</sup> nach einmaliger Schädigung.

(A) Für die Untersuchung des Regenerationsvermögens adulter, drei Monate alter Tiere erfolgte eine intramuskuläre Kardiotoxin (CTX) Applikation in den M. tibialis anterior (TA) und die Analyse des geschädigten Muskels nach zehn Tagen. (B-E) Hämatoxylin und Eosin Färbungen von transversalen Muskelschnitten des nicht geschädigten Muskels zeigen eine normale Muskelstruktur mit peripheren Muskelfaserkernen. (F-I) Im geschädigten TA Muskel sind regenerierte Muskelfasern durch zentral liegende Faserkerne gekennzeichnet. (**J-K**) Quantifizierung der Muskelfaserdurchmesser mit zentral liegendem Kern deutet auf ein leicht verzögertes Regenerationsvermögen von Numblike<sup>-/-</sup> Mäusen hin. Darstellung der Mittelwerte ± Standardfehler, statistische Signifikanz (Student's t-Test): \* p < 0,05, n = 2-3 Tiere pro Genotyp.

Während der Regeneration des Skelettmuskels ist es nicht nur erforderlich, dass neue Muskelfasern gebildet werden, sondern auch, dass der Stammzellpool an Satellitenzellen wieder hergestellt wird. Verschiedene Arbeiten postulieren, dass der Erhalt des Satellitenzellpools in der Muskulatur durch asymmetrische Zellteilung gewährleistet wird (Kuang *et al.*, 2008; Shinin *et al.*, 2006). Anhand wiederholter Schädigungen des *TA* Muskels (Abbildung 42 A) wurde im Folgenden untersucht, ob die Deletion der Zellschicksalsdeterminanten Numb und Numblike Auswirkungen auf den Erhalt des Satellitenzellpools haben.

Durch wiederholte Schädigungen erfolgte eine komplette Neustrukturierung des TA Muskels, wodurch vermehrt Muskelfasern mit zentral liegendem Kern beobachtet werden konnten (Abbildung 42 B-E). Große klar abgegrenzte Fasern mit zentral liegendem Kern weisen auf eine beendende Regeneration hin (Abbildung 42 B-E), wobei Entzündungsreaktionen, im direkt betroffenen Umfeld der Kardiotoxin-Injektionsstelle, durch eine vermehrte Anzahl an Hämatoxylin-positiven Kerne gekennzeichnet sind (Abbildung 42 B'-E'). Diese sind auf die massive Einwanderung von Makrophagen und Leukozyten zurückzuführen (Hawke & Garry, 2001). Die Hämatoxylin und Eosin Färbungen nach vierfacher Schädigung zeigten keine offensichtlichen Unterschiede im Regenerationsverhalten von Einzel- und Doppelmutanten im Vergleich zu Kontrolltieren (Abbildung 42 B-E und B'-E'), was auf eine normale Rekonstruktion der Stammzellnische in Einzel- und Doppelmutanten hinweist. Die Quantifizierung der Faserdurchmesser ergab, einfacher Schädigung des Muskels. eine Normalverteilung wie bei der Muskelfaserdurchmesser, was im Gegensatz zu den Differenzierungsversuchen primärer Myoblasten (siehe 4.3.5, Abbildung 38) auf ein normales Fusionsverhalten der Zellen schließen lässt.



#### Abbildung 42: Normale Regeneration nach mehrfacher Muskelschädigung.

(A) Eine viermalige intramuskuläre Applikation von Kardiotoxin (*CTX*) erfolgte in einem Abstand von drei Wochen. Zehn Tage nach der vierten Injektion wurden die *TA* (*M. tibialis anterior*) Muskeln isoliert und histologisch untersucht. (**B-E**) Zentral liegende Faserkerne deuten auf neu gebildete Muskelfasern hin, wobei in stark entzündeten Bereichen eine vermehrte Anzahl von Kernen (blaulia Färbung) beobachtet wurde, welche auf eingewanderte Makrophagen und Leukozyten hinweisen (**B'-E'**). Die Auszählung der Muskelfaserdurchmesser (**F-G**) weist nahezu vergleichbare Regenerationsfähigkeiten zwischen den einzelnen Genotypen auf. Darstellung der Mittelwerte ± Standardfehler, statistische Signifikanz (Student's t-Test): \* p < 0,05, n = 3 Tiere pro Genotyp.

Um mögliche Veränderungen in den regenerierten Muskeln zu erkennen wurde zusätzlich eine Bindegewebsfärbung durchgeführt. Bei einer mangelhaften Regeneration der Muskulatur, aber auch bei unterschiedlichen Erkrankungen (beispielsweise bei Sklerose), kann es zur gesteigerten Synthese und Einbau von Kollagen kommen, was zu Funktionseinschränkungen des Muskels führen kann. Trichrom Färbungen von *TA* Muskeln nach vierfacher Schädigung zeigten vergleichbare regenerationsbedingte Einlagerungen von Kollagen in Muskeln von Mutanten und Kontrolltieren (Abbildung 43).



#### Abbildung 43: Masson-Trichrom Färbung von Kardiotoxin geschädigten Muskeln.

Kollagene Fasern sind tiefblau, die Kerne leuchtend rot und das Zytoplasma rosa gefärbt. Nach vierfacher Schädigung des *TA* (*M. tibialis anterior*) Muskels mit Kardiotoxin (*CTX*) sind keine signifikanten Veränderungen in der Menge des eingelagerten Kollagens zu erkennen.

Um zu überprüfen, ob Numb und Numblike bei der Erneuerung bzw. dem Erhalt des Satellitenzellpools beteiligt sind, wurde die Satellitenzellzahl nach vierfacher Schädigung ermittelt.

Die Kardiotoxin-induzierte Schädigung führt zur Aktivierung und Proliferation der Satellitenzellen im *TA* Muskel sowie im benachbarten *M. extensor digitorum longus (EDL)* Muskel, der im Folgenden für die Bestimmung der Satellitenzellzahl verwendet wurde. Die Auszählung Pax7-positiver Zellen pro *EDL* Muskelfaser ergab vergleichbare Anstiege der Satellitenzellzahl nach Regeneration zwischen Mutanten und Kontrolltieren (Abbildung 43). Dies deutet darauf hin, dass die Abschaltung von Numb/Numblike in Satellitenzellen keinen Einfluss auf deren Erhalt des Stammzellcharakters hat.



# Abbildung 44: Vergleichbare Satellitenzellzahl pro *EDL* Muskelfaser nach vierfacher Schädigung des *TA* Muskels von Numb-defizienten Mäusen.

Intramuskuläre Applikation von Kardiotoxin (*CTX*) in den *M. tibialis anterior* (*TA*) führt zur Aktivierung von Satellitenzellen im *M. extensor digitorum longus* (*EDL*). Für die Untersuchung der Satellitenzellzahl nach Muskelschädigung wurden einzelne *EDL* Muskelfasern isoliert und Satellitenzellen mittels Pax7 Antikörperfärbung nachgewiesen. Eine Schädigung des Muskels führt zu einem Anstieg der Anzahl an Satellitenzellen pro *EDL* Muskelfaser. Es wurden keine signifikanten Unterschiede (Student's t-Test: p > 0,05) in der Satellitenzellzahl nach vierfacher Muskelschädigung zwischen Kontrolle, Einzel- und Doppelmutanten detektiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler, n = 3 Tiere pro Genotyp.

## **5** DISKUSSION

Die gesamte Skelettmuskulatur von Wirbeltieren geht aus den Somiten hervor. Somiten segmentieren sich aus dem paraxialen Mesoderm in das Dermamyotom und das Sklerotom. Die Zellen des Sklerotoms bilden dabei das Anlagenmaterial für Rippen und Wirbelsäule. Das Dermamyotom unterteilt sich in Myotom und das Dermatom aus dem die Skelettmuskulatur bzw. die Haut hervorgeht. Im Verlauf der embryonalen Muskelentwicklung sind die myogenen Regulationsfaktoren (MRF) Myf5, MyoD, Myogenin und Mrf4 für die Determinierung des myogenen Zellschicksals, sowie für die Differenzierung der Zellen verantwortlich. Myf5 ist der erste MRF, der beginnend mit E8.5 in neugebildeten Somiten im dorsalen Dermamyotom und Myotom exprimiert wird.

## 5.1 Myf5-abstammende Zellen sind uneingeschränkt für die Bildung der Rippen verantwortlich

Obwohl die MRFs Myf5 Mrf4 weder Knorpelgeweben und in noch in Knorpelvorläuferzellen exprimiert werden, zeigen Knockout Mäuse für diese Faktoren Fehlbildungen des Brustkorbs. So resultiert der Funktionsverlust von Myf5 in Myf5<sup>m1</sup> Knockout (Braun et al., 1992) und Myf5<sup>nLacZ</sup> Knockin (Tajbakhsh et al., 1996) Mäusen in einem Fehlen distaler Rippen und einem perinatal letalen Phänotyp. Weitere Rippenphänotypen im variablen Umfang sind aus verschiedenen Mrf4 Mutanten bekannt. Eine Nullmutation weist nur geringe Verformungen der Rippen auf (Zhang et al., 1995) und ist homozygot lebensfähig, während die anderen Mutationen eine perinatale Letalität aufweisen. Diese zeigen unterschiedlich verkürzte distale Rippen und sind vergleichbar mit dem Myf5 Phänotyp (Braun & Arnold, 1995) oder besitzen stärkere Verschmelzungen der Rippen mit fehlerhafter Anbindung dieser an das Sternum (Patapoutian et al., 1995). Myf5 und Mrf4 liegen direkt benachbart auf demselben Chromosom und weisen Elemente für die Regulation des jeweils anderen Gens auf. So wurde vermutet, dass cis-Interaktionen der beiden Gene Ursache für die Rippenphänotypen sind. Kaul und Mitarbeiter konnten durch die Generierung von verschiedenen Knockout Mäusen zeigen, dass der beobachtete Rippenphänotyp von Myf5<sup>m1</sup> Knockout Mäusen auf die Dysregulation eines unbekannten Gens zurückzuführen ist (Kaul et al., 2000). Die in diesem Zusammenhang durch Einkreuzen eines Cre-Deleters generierten Myf5<sup> $\Delta$ loxP/ $\Delta$ loxP</sub></sup>

Knockout Mutanten weisen keine Veränderung in der Rippenbildung auf. Die Expression des *Myf5*-Gens ist somit vermutlich nicht für die Ausbildung der Rippen verantwortlich.

Wir konnten zeigen, dass der Verlust von Myf5-abstammenden Zellen im Sklerotom zu einem stärkeren Rippenphänotyp führt, als die bis dato beschriebenen Rippendeformationen der Myf5 Mutanten. Ursache für diesen ausgeprägten Phänotyp ist die frühe Aktivität des Myf5-Promoters im nichtsegmentierten paraxialen Mesoderm. So zeigen Zebrafisch- und Hühnchenembryonen eine signifikante Myf5 Expression im paraxialen Mesoderm (Chen et al., 2001; Kiefer & Hauschka, 2001). Myf5-abstammenden Zellen im Sklerotom sprechen für eine frühe Aktivität der Myf5<sup>Cre</sup> Mauslinie, da es im Allgemeinen ein bis zwei Tage benötigt, bis die Cre-vermittelte Rekombination abgeschlossen und eine Zellmarkierung nachzuweisen ist. Eine unspezifische Aktivität der Mvf5<sup>Cre</sup> Mauslinie kann hinsichtlich der spezifischen Verteilung Myf5-abstammender Zellen in Geweben die aus dem paraxialen Mesoderm stammen ausgeschlossen werden. Der Nachweis von Myf5-abstammenden Zellen in Knorpelgewebe deckt sich mit beobachteten Myf5-Vorläuferzellen in den Rippen von Myf5<sup>2a-/-</sup> Knockout Mäusen, die ein *nLacZ* Reportergen tragen (Tajbakhsh et al., 1996). Bei der Entwicklung der Embryonen kommt es zu einer unorganisierten Verteilung der Vorläuferzellen im Sklerotom. Diese Zellen stellen vermutlich in Abwesenheit von Myf5 ihr genetisches Programm um und nehmen das Schicksal von Mesenchymzellen im Sklerotom an. Mesenchymzellen differenzieren zu Chondrozyten oder Osteoblasten und liefern das Anlagenmaterial der Wirbelsäule und dass die Ablation Myf5-abstammenden Rippen. Wir konnten zeigen, von Mesenchymzellen im Sklerotom zu einer erheblichen Fehlbildung von Wirbeln und Rippen führt. Es kann angenommen werden, dass der Verlust einer solchen Zellpopulation nicht ersetzt werden kann. Die Präsenz von Myf5-abstammenden Zellen in dieser Zellpopulation wurde in einer vergleichbaren Zellablationsstudie bestätigt (Haldar et al., 2008). Dabei wurden, unter Verwendung von unterschiedlichen Myf5<sup>Cre</sup> Mauslinien, weniger schwerwiegende Rippenphänotypen beschrieben. Die Myf5<sup>ICN</sup> Rosa26<sup>DTA</sup> Embryonen weisen einen annähernd normalen Brustkorb auf, während Myf5<sup>NN</sup> Rosa26<sup>DTA</sup> Embryonen Fusionierung der Rippen zeigen (Haldar et al., 2008). Diese weniger ausgeprägten Phänotypen sind vermutlich auf eine eingeschränkte Aktivität der für die betreffende Studie verwandten Myf5<sup>Cre</sup> Mauslinie zurückzuführen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass die Ablation von Myf5abstammenden Zellen für die fehlerhafte Ausbildung der Rippen verantwortlich ist. Dabei wurde gezeigt, dass Myf5- aber nicht Myogenin-abstämmige Zellen an der Bildung von Rippen beteiligt sind.

# 5.2 Eine Myf5-unabhängige Zellpopulation sorgt für eine normale Entwicklung der Skelettmuskulatur nach Ablation von Myf5exprimierenden Zellen

Die Skelettmuskulatur entwickelt sich aus Pax3/Pax7-positiven embryonalen multipotenten Vorläuferzellen des Dermamyotoms. Die Spezifizierung und Differenzierung dieser Vorläuferzellen wird durch die Expression der MRFs gesteuert. Im Verlauf der Myogenese zeigen die MRFs überlappende, aber zeitlich streng regulierte Expressionsmuster. Myf5 und MyoD determinieren multipopente Vorläuferzellen zu Myoblasten, während die terminale Differenzierung der Myoblasten durch die Expression von Myogenin und Mrf4 gesteuert wird. Trotz der einzigartigen Funktion der MRFs zeigen Knockout Studien, dass einzelne Faktoren ersetzbar sind. Die genetische Redundanz zwischen Myf5 und MyoD wurde in Nullmutationen dieser MRFs beschrieben. Während Doppelknockout Embryonen keine Muskulatur besitzen. weisen Einzelmutanten vollständig ausgebildete Skelettmuskeln auf (Braun et al., 1992; Rudnicki et al., 1992; Rudnicki et al., 1993). Die Anwesenheit eines dieser Faktoren, Myf5 oder MyoD, ist somit für die Entwicklung von Skelettmuskeln essentiell.

Wir konnten zeigen, dass eine Myf5-unabhängige Myoblastenpopulation existiert, welche MyoD exprimiert und für eine normale Bildung der Skelettmuskulatur sorgt.

Die Ablation von Myf5-exprimierenden Zellen führt zu einer verspäteten Ausbildung des Myotoms, vermutlich aufgrund des Fehlens erster Myf5-determinierter Myoblasten. Dies deckt sich mit Beobachtungen aus Myf5 Knockout Embryonen, in denen der Funktionsverlust von Myf5 durch eine verspätete MyoD-Expression beantwortet wird und eine verzögerte Determinierung der Myoblasten hervorruft (Braun *et al.*, 1992). Das Wildtyp-Expressionsmuster von Myf5 und MyoD weist jedoch zeitliche Unterschiede auf. Myf5 wird ab E8.5 ausgehend vom epaxialen Dermamyotom exprimiert und ist ab E14.5 nicht mehr nachweisbar (Ott *et al.*, 1991; Summerbell *et al.*, 2000). Mit beginnender Myf5 Expression werden Myoblasten determiniert, verlassen den Zellverband des Dermamyotoms und bilden das Myotom aus. MyoD determiniert hingegen beginnend ab

E10.5 die hypaxialen Myoblasten und kann bis zum Ende der Muskelentwicklung in Myoblasten nachgewiesen werden (Sassoon, 1993). Überraschenderweise zeigte die Ablation von Myf5-exprimierenden Zellen einen erhöhten Zelltod von MyoD-positiven Zellen in den Somiten. Die reduzierte Anzahl MyoD- und Myogenin-exprimierender Zellen kann damit begründet werden, dass in den Somiten MyoD und Myogenin direkt nach Myf5 exprimiert werden. Die Ablation von Myf5-exprimierenden Zellen geht folglich mit dem Verlust von Myogenin- und MyoD-positiven Zellen einher.

Die Kapazität der Skelettmuskulatur den Verlust einer Zellpopulation bzw. der Expression eines MRFs zu kompensieren, zeichnet diese als eine heterogene Population aus. So führt der Verlust von Myf5 Transkript zu einer normal entwickelten Muskulatur in adulten Myf5 Knockout Mäusen (Gayraud-Morel et al., 2007; Ustanina et al., 2007). Aus der hier gezeigten Ablationsstudie ist ersichtlich, dass eine Myf5-unabhängige Zellpopulation existiert, die MyoD exprimiert, den Verlust der Myf5-positiven Zellpopulation ersetzt und für eine normale Muskelentwicklung sorgt. Es stellt sich damit die Frage nach der Notwendigkeit der Myf5-exprimierenden Zellpopulation bei der Muskelentwicklung. Myf5 ist der erste MRF, der mit Beginn der Myogenese exprimiert wird. In dessen Anwesenheit verläuft die Entwicklung der Muskulatur primär ausgehend von der Myf5-positiven Zellpopulation. Dies konnte durch die vollständige Markierung der Skelettmuskeln mit Myf5-abstammenden Zellen aufgezeigt werden (Abbildung 45, Myf5<sup>Cre</sup> Rosa26<sup>LacZ</sup>). Fehlt jedoch die Myf5-abhängige Population wird diese durch eine Myf5-unabhängige MyoDexprimierende Myoblastenpopulation ersetzt. Diese Myf5-unabhängige Zellpopulation ist in der Wildtypsituation nicht für die Muskelentwicklung verantwortlich. Erst durch den Verlust Myf5-exprimierender Zellen expandiert diese Myoblastenpopulation und ermöglicht eine vollständige Entwicklung der Skelettmuskeln (Abbildung 45, Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup>). Im Fall der Generierung späterer Satellitenzellen könnte diese Myf5-negative Zellpopulation jedoch einen natürlichen Beitrag leisten. Dies würde eine Erklärung für das Vorhandensein Myf5negativer Satellitenzellen (Kuang et al., 2007) in Wildtypmäusen liefern. Fehlen Myf5 und MyoD-exprimierende Zellen können keine Vorläuferzellen zu Myoblasten determiniert werden, was zum Verlust der Muskelentwicklung in Myf5:MyoD Doppelknockout Embryonen führt (Abbildung 45, Myf5:MyoD KO). Beide MRFs, Myf5 und MyoD, sind grundlegende Faktoren für die Myogenese, werden jedoch partiell von autonomen Zellpopulationen exprimiert.



# Abbildung 45: Eine Myf5-abhängige und eine Myf5-unabhänge Zellpopulation ist bei der embryonalen Skelettmuskelentwicklung der Maus beteiligt.

In der Wildtypsituation entwickelt sich die Gesamtheit der Muskulatur aus Myf5-abstämmigen myogenen Zellen (Myf5<sup>Cre</sup> Rosa26<sup>LacZ</sup>). Die Ablation Myf5-exprimierender Zellen (Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup>) führt zur verzögerten Vermehrung einer myogenen Myf5-unabhängen Zellpopulation. Diese ist in der Lage über die MyoD Expression autonom eine normal entwickelte Skelettmuskulatur zu bilden. Der Funktionsverlust beider Zellpopulation (Myf5:MyoD KO = Doppelknockout) kann nicht ersetzt werden und führt zum Verlust aller Skelettmuskeln. Abkürzungen: NR = Neuralrohr, NC = Notochord, DM = Dermamyotom, DML = dorso-mediale Lippe, VLL = ventro-laterale Lippe.

## 5.3 Numb, eine Determinante der myogenen Differenzierung?

Weitere Faktoren, die mögliche Funktionen bei der Muskelentwicklung haben und bereits im Dermamyotom exprimiert werden, sind die homologen Proteine Numb und Numblike. Neben der Expression im Dermamyotom weisen Numb und Numblike starke mRNA Expressionslevel im Zentralnervensystem ab E9.5 auf. Der Verlust von Numb resultiert in einem letalen Phänotyp zwischen E10.5 und E11.5, wobei eine frühzeitige Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen in den Embryonen nachgewiesen wurde (Zhong *et al.*, 2000; Zilian *et al.*, 2001). Die zusätzliche Deletion von Numblike verstärkt diese neuronalen Defekte (Petersen *et al.*, 2002). In Abhängigkeit verwendeter *Cre*-Mauslinien wurden unterschiedliche Phänotypen beobachtet. Daher ist es noch unklar, ob Numb für die Proliferation oder die Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen verantwortlich ist. Während der frühen Neurogenese wird Numb eine Funktion beim Erhalt des Stammzellcharakters von neuronalen Vorläuferzellen zugesprochen (Zilian *et al.*, 2001).

Unsere Arbeitsgruppe interessiert die Funktion von Numb während der embryonalen Muskelentwicklung und dem Erhalt von adulten Muskelstammzellen. Durch Überexpressionen von Numb im epaxialen Dermamyotom unter der Kontrolle des epaxialen Enhancer Elements des Myf5-Promoters konnten Jory und Mitarbeiter eine vermehrte symmetrische Verteilung von Numb zeigen. Dies führt zur erhöhten Anzahl an dermalen und myogenen Vorläuferzellen (Jory et al., 2009). Es wird daher vermutet, dass Numb in Prozessen der Entstehung dieser Vorläuferzellen involviert ist und deren Proliferation fördert. Dafür spricht auch die vermutete Funktion von Numb. Als Antagonist der Notch Aktivität sollte über die Unterdrückung der Hes1 Expression die MyoD Aktivität und damit die Differenzierung von Myoblasten gefördert werden. Der gleichzeitige Verlust von Numb und Numblike sollte somit über den aktivierten Notch Signalweg die MyoD Aktivität und damit verbundene Differenzierung von Myoblasten hemmen. Überraschenderweise führt der selektive Verlust von Numb und Numblike in Myf5exprimierenden Zellen zu einer Reduktion von Satellitenzellen im juvenilen Stadium. Dagegen führt der Verlust von MyoD zur erhöhten Anzahl von Satellitenzellen sowie durch verminderte Differenzierung von Satellitenzellen zur Anhäufung von Zellen mit Stammzellcharakter (Cornelison et al., 2000). Dies lässt vermuten, dass die Deletion von Numb und Numblike nicht zwangsläufig den Notch Signalweg beeinflusst. Dafür spricht, dass in den durchgeführten Experimenten keine Veränderungen in den Proteinmengen

der aktvierten Form der Notch Rezeptoren, sowie der Notch Zielgene Hes1 und Hey1 beobachtet werden konnten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass trotz der gestörten Differenzierung, der MyoD Expressionslevel nicht verändert ist. Dies deckt sich mit den Untersuchungen von Buas und Mitarbeitern. Die Inhibierung der myogenen Differenzierung, infolge der Überexpression von Hey1, geht mit einer unveränderten MyoD Expression einher (Buas *et al.*, 2010). Wesentlich dramatischere Phänotypen als durch die Deletion von Numb und Numblike in Muskelzellen beobachtet werden konnten, zeigen konstitutive Aktivierungen des Notch Signalwegs. Ektopische Expression von aktvierten Notch Rezeptor (Notch ICD) in *Xenopus* Embryonen (Kopan *et al.*, 1994) oder Überexpression des Notch Liganden Delta in Hühnchenembryonen (Delfini *et al.*, 2000) inhibieren die terminale Differenzierung von Muskelzellen, was zu einer unorganisierten Muskelstruktur führt. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass Numb/Numblike im Muskel den Notch Signalweg nur marginal beeinflussen.

Andererseits zeigen die Zellkulturexperimente, dass der Verlust von Numb und Numblike zu einer verminderten Differenzierung bzw. Fusionierung von Myoblasten führt. Hierbei ist anzumerken, dass nur die Herunterregulierung der Numb Isoformen Numb2 und Numb4 diese verringerte Differenzierung zeigen. Dies deckt sich mit der beobachteten Funktion im Gehirn, wo Numb2 und Numb4 ausschließlich in differenzierenden und ausdifferenzierten adulten neuronalen Zellen exprimiert werden (Bani-Yaghoub et al., 2007; Verdi et al., 1999). Diese beiden Isoformen sind wahrscheinlich, wie für neuronale Zellen (Pedersen et al., 2002), auch für die Differenzierungsprozesse von myogenen Zellen verantwortlich. Die Zellkulturergebnisse lassen die Annahmen zu, dass Numb sowie Numblike in die Gruppe von differenzierungsfördernden Faktoren eingeordnet werden können. Juvenile Numbund Numblike-defiziente Mäuse weisen eine reduzierte Anzahl an Satellitenzellen auf. Obwohl dies auf eine direkte oder indirekte Beteiligung von Numb und Numblike auf die Entstehung und den Erhalt des Stammzellcharakters hinweist, zeigen sich Unterschiede Vergleich Differenzierungsfaktoren. Obwohl MyoD-defiziente im mit anderen Satellitenzellen nicht zur Differenzierung befähigt sind, weisen MyoD<sup>-/-</sup> Mäuse eine erhöhte Anzahl an Satellitenzellen pro Muskelfaser auf (Cornelison et al., 2000). Aufgrund des gesteigerten Proliferationsverhaltens von MyoD-defizienten Satellitenzellen unter Differenzierungsbedingungen wird vermutet, dass diese Zellen den Erhalt des Stammzellcharakters anstelle der Differenzierung bzw. Fusionierung bevorzugen (Sabourin et al., 1999). Beide Faktoren, Numb und Numblike, zeigen neben einer Expression während der Myogenese eine dauerhafte Aktivität in adulten Satellitenzellen

auf. Die erhöhte Proliferation isolierter Satellitenzellen von Doppelmutanten weisen auf verwandte Funktionen während adulter Stadien hin (Abbildung 46). Hierbei bleibt jedoch noch zu klären, welchen myogenen Charakter die Differenzierungs-defizienten Zellen besitzen.



#### Abbildung 46: Modell der Funktion von Numb in ex vivo Satellitenzellkulturen.

In der Wildtypsituation ermöglicht die Numb Expression die Fusionierung von Myoblasten zu Synzytien. Das verminderte Fusionierungsverhalten infolge des Verlustes von Numb (Numb<sup> $\Delta/\Delta$ </sup>) kann vermutlich auf eine erhöhte Notch oder Shh/Gli Aktivität in den Myoblasten zurückgeführt werden. Daher weisen Numb-negative Myoblasten im Gegensatz zu Wildtypmyoblasten vermutlich eine erhöhte Proliferationsaktivität auf.

Wenn der Verlust von Numb nicht zwangsläufig Einfluss auf den Notch Signalweg nimmt, stellt sich weiterhin die Frage, welche Signalwege in Verbindung mit Numb die myogene

Differenzierung regulieren. Im Verlauf der neuronalen Entwicklung wurde Numb als ein Inhibitor des Sonic Hedgehog (Shh/Gli) Signalweges nachgewiesen (Di Marcotullio et al., 2006). So fördert die Aktivität des Shh Signalweges den Erhalt des Stammzellcharakters von neuronalen Vorläuferzellen und unterbindet deren Differenzierung. Das Adapterprotein Numb vermittelt dabei in Verbindung mit der E3 Ubiquitinligase Itch den proteasomalen Abbau des Hedghog Trankriptionsfaktors Gli1, was zur Inhibierung des Shh Signalweges führt und die Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen ermöglicht (Di Marcotullio et al., 2006; Di Marcotullio et al., 2011). In erwachsenen Organismen reguliert der Shh/Gli Signalweg die Zellteilung adulter Stammzellen. Es ist daher möglich, dass die gesteigerte Proliferationsrate und das verminderte Differenzierungsverhalten Numb-defizienter Myoblasten für eine erhöhte Aktivität des Shh/Gli Signalweges sprechen. Dies würde sich mit Zellkulturstudien von Koleva und Mitarbeitern decken. Die verstärkte Aktivierung des Signalweges führt zur Inhibierung der Differenzierung von  $C_2C_{12}$  Myoblasten sowie adulten Satellitenzellen (Koleva et al., 2005). Weiterführende Untersuchungen sollten daher zeigen, dass durch den Verlust von Numb der Shh/Gli Signalweg nicht gehemmt werden kann und dies zu einer verminderten Myoblastendifferenzierung führt (Abbildung 46).

Jedoch kann anhand der gewonnen Daten keine konkrete Aussage über die genaue Funktion der beiden Faktoren, Numb und Numblike, getroffen werden. Die ausbleibende Differenzierung isolierter Satellitenzellen von Numb/Numblike-defizienten Mäuse spricht zwar für den Charakter eines Differenzierungsfaktors (Abbildung 46). Dennoch sollte Vorsicht bei der Übertragung auf das *in vivo* Modell geboten sein. So ist es nicht möglich, aufgrund des Fehlens wichtiger Signalfaktoren aus der Muskelfaser (beispielsweise Wachstumsfaktoren und Entzündungsfaktoren), Satellitenzellen über einen längeren Zeitraum proliferativ-aktiv zu halten. Im Verlauf der Kultivierung verlieren diese Zellen ihren Stammzellcharakter, wodurch sich eine abschließende Differenzierung zu Synzytien anschließt. Des Weiteren lassen experimentell limitierende Faktoren, wie die vermehrte Anhäufung von Fibroblasten, keine längere Kultivierung zu. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass Numb-defiziente Satellitenzellen durch die erhöhte Proliferationsaktivität ihr Differenzierungsprogramm zu einem späteren Zeitpunkt, außerhalb des kultivierungsfähigen Zeitraums, anschalten. Dafür spräche der unauffällige Phänotyp geschädigter Doppelmutanten. Frühere Isolation und anschließende morphologische Untersuchungen geschädigter Muskeln könnten darüber Aufschluss geben. Ebenso könnten Numb/Numblike-unabhängige Mechanismen ein mögliches Regenerationsdefizit aufheben, welches durch die homogene Kultivierung von Satellitenzellen nicht zum Tragen

kommt. Ein möglicher Numb-unabhängiger Prozess soll hier im Folgenden vorgestellt werden.

### 5.4 Modell der binären Funktion von Numb in Muskelzellen

Während der Entwicklung der Muskulatur und Satellitenzellen erfolgt eine dynamische Verteilung von Numb in proliferierenden und differenzierenden Myoblasten. In sich teilenden embryonalen dermamyotomalen Muskelvorläuferzellen erfolgt vermutlich eine asymmetrische Verteilung von Numb auf die Tochterzellen. Die Zelle, welche Numb behält bewahrt ihren Stammzellcharakter und verbleibt im Dermamyotom. Diese können ebenso einen embryonalen Ursprung von adulten Satellitenzellen darstellen. Demgegenüber nimmt die Numb-negative Tochterzelle einen intermediären Zellstatus an und wird durch Expression der myogenen Regulationsfaktoren zum Myoblasten determiniert (Abbildung 47, WT). So kann vermutet werden, dass determinierte Myoblasten aufgrund erhöhter Notch Aktivität proliferativ-aktiv sind und die myogene Zellpopulation erweitern. Die terminale Differenzierung der Myoblasten wird jedoch durch eine erhöhte Notch Aktivität inhibiert. Aus diesem Grund erfolgt eine erneute Expression von Numb in zur Differenzierung determinierten Myoblasten. Die Anhäufung von Numb wirkt antagonistisch auf die Notch Aktivität, was die Fusionierung der Myoblasten zu Synzytien bzw. Muskelfasern ermöglicht (Abbildung 47, WT).

Anhand der gewonnen Daten der embryonalen Muskelentwicklung kann vermutet werden, dass in Numb-defizienten Mäusen eine Teilpopulation an Vorläuferzellen existiert, welche Myf5-negativ sind, Numb exprimieren und den Verlust der Satellitenzellen umgeht (Abbildung 47, Numb<sup>Δ/Δ</sup>). Mit Hilfe der Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Mäuse konnte gezeigt werden, dass eine Myf5-negative MyoD-exprimierende Zellpopulation für die Muskelentwicklung und möglicherweise ebenso für die Generierung von Satellitenzellen verantwortlich ist. Es ist jedoch nicht bekannt, ob durch den Verlust Myf5-exprimierender Zellen die Satellitenzellzahl beeinflusst wird. Somit könnte eine reduzierte Anzahl an Satellitenzellen in Myf5<sup>Cre</sup> Rosa<sup>DTA</sup> Tieren eine mögliche Erklärung für die verringerte Satellitenzellzahl in Numb-defizienten Mäusen sein. Es wäre zudem interessant zu untersuchen, ob die erhöhte Anzahl an myogenen Stammzellen durch Überexpression von Numb in Vorläuferzellen des epxialen Dermamyotoms (Jory *et al.*, 2009) ebenso zu einer vermehrten Satellitenzellzahl führt. In dem hier aufgezeigten Modell (Abbildung 47) wird

vermutet, dass Numb-negative Vorläuferzellen zu Muskelzellen determiniert werden, jedoch aufgrund der verminderten Fusionseigenschaft durch Apoptose oder andere Prozesse aus dem Zellverband entfernt werden. Der hier beobachtete Phänotyp Numbdefizienter Tiere lässt die Annahme zu, dass Numb in unterschiedlichen Zellphasen, sowohl beim Erhalt des Stammzellcharakters, als auch bei der myogenen Differenzierung eine Rolle spielt. Es kann somit gesagt werden, dass Numb binär das Schicksal von Myoblasten beeinflusst.



#### Abbildung 47: Modell der binären Funktion von Numb im Verlauf der Muskelentwicklung.

In myogenen Vorläuferzellen aus den Somiten ist Numb für den Erhalt des Stammzellcharakters erforderlich. Die Zellen, welche Numb exprimieren können der Ursprung von adulten Satellitenzellen sein. Erhöhte Notch Aktivität in Numb-negativen Myoblasten ermöglicht deren Proliferation und Erweiterung der Muskelzellpopulation. Myoblasten, die zur Differenzierung bestimmt sind exprimieren erneut Numb, was antagonistisch zur Notch Aktivität fungiert und die Fusionierung von Myoblasten ermöglicht. In Numb-defizienten Mäusen (Numb<sup>Δ/Δ</sup>) wird die normale Muskelentwicklung möglicherweise durch die autonome Myf5-unabhängige Zellpopulation gewährleistet. Da nur diese Zellen in der Lage sind Numb zu exprimieren, aus denen sowohl Satellitenzellen als auch Muskelfasern generiert werden, weisen Numb-defiziente Mäuse eine verringerte Anzahl an Satellitenzellen auf.

### 5.5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass durch Expression von Myf5 und MyoD zwei Subpopulationen von embryonalen Muskelvorläuferzellen existieren. Die Zusammensetzung der Skelettmuskulatur aus einer heterogenen Zellpopulation verweist auf dessen Anpassungsfähigkeit infolge des Verlusts einzelner Faktoren. Es ist jedoch noch unklar, welche Signale notwendig sind, um das Gleichgewicht zwischen den beiden myogenen Zellpopulationen aufrechtzuerhalten und welche nach Ablation Myf5-exprimierender Zellen zum Anstieg der MyoD Population führen. Diesbezüglich wird postuliert, dass auch Mrf4, neben Myf5 und Pax3, MyoD aktivieren kann und damit zur embryonalen Muskelentwicklung beiträgt (Kassar-Duchossoy *et al.*, 2004). Die Beobachtung, dass Myf5 eine Subpopulation an myogenen Vorläuferzellen darstellt, spricht ebenso für die beschriebene heterogene Population adulter Satellitenzellen (Zammit, 2008). Diesbezüglich sollten weitere Analysen Aufschluss darüber geben, ob mögliche Myf5-negative Satellitenzellen (Kuang *et al.*, 2008) aus MyoD- oder Mrf4-exprimierenden myogenen Vorläuferzellen stammen.

Die in dieser Arbeit etablierte Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Mauslinie bietet eine Grundlage zur Untersuchung der *in vivo* Funktion des Adapterproteins Numb in Muskelzellen. Die hier gezeigten Ergebnisse weisen darauf hin, dass Numb funktionell an der Differenzierung von Myoblasten beteiligt ist. Die detaillierten molekularen Wirkungsmechanismen von Numb konnten in dieser Arbeit jedoch nicht aufgeklärt werden. Aus den präsentierten Daten ergaben sich verschiedene weiterführende Fragen. Wie beeinflusst Numb (bisher nicht als myogener Faktor bekannt) das Differenzierungsverhalten von Myoblasten? Wie wirkt sich das Fehlen von Numb auf den Erhalt des Satellitenstammzellpools aus? Beeinflusst Numb die asymmetrische Zellteilung von Satellitenzellen?

Im Hinblick der erhaltenen Ergebnisse des verminderten Fusionierungsverhaltens von Numb-defizienten Myoblasten wäre es interessant das Regenerationsverhalten Numbmutanter Tiere infolge einer Muskelschwächung zu untersuchen. Ein etabliertes Tiermodell der Muskeldystrophie Duchenne stellt die *mdx*-Maus dar. Eine Punktmutation im Dystrophin-Gen führt zur Defizienz von Dystrophin in der Muskulatur der Tiere. Ein charakteristisches Merkmal der Tiere ist die fortlaufende Aktivierung von Satellitenzellen und Regeneration des Muskels. Demnach könnte durch Verkreuzung der *mdx*-Maus mit Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Tieren die Frage geklärt werden, ob Numb ein essentieller Faktor für die Differenzierung von Satellitenzellen ist. So konnte bereits mittels der mdx:MyoD Doppelknockout Maus, MyoD als ein wichtiger Faktor der Satellitenzelldifferenzierung nachgewiesen werden (Megeney et al., 1996). Des Weiteren könnten mdx:Numb Mäuse genutzt werden, um zu analysieren, ob Numb für den Erhalt des Stammzellcharakters notwendig ist. Eine Hypothese über den Erhalt des Satellitenzellpools beruht auf der asymmetrischen Verteilung von Numb in mitotischaktiven Satellitenzellen (Shinin et al., 2006). Nach dieser Annahme sollte durch Ausschaltung von Numb und stätiger Aktivierung der Satellitenzellen in mdx-mutanten Mäusen eine kontinuierliche Abnahme der Satellitenzellpopulation zu beobachten sein.

Im Zusammenhang mit der Aktivierung und asymmetrischen Zellteilung von Satellitenzellen ist ebenso eine Beteiligung des Notch Signalwegs beschrieben worden (Conboy & Rando, 2002; Kuang et al., 2008). So ist bekannt, dass eine hohe Notch Aktivität zu einer verminderten Differenzierung von Myoblasten und damit zu einer reduzierten Muskelregeneration führt (Conboy et al., 2003). Im Vordergrund der weiteren Arbeit sollte daher detailliert die endogene Notch Aktivität in Numb-defizienten Myoblasten analysiert werden. Neueste Arbeiten zeigen, dass die einzelnen Numb Isoformen unterschiedliche inhibitorische Funktionen auf die Notch Rezeptoren aufweisen. So wirken alle Numb Isoformen antagonistisch auf den Rezeptor Notch1, während die Notch3 Aktivität durch Numb nicht inhibiert wird (Beres et al., 2011). Aufgrund dieser differentiellen Funktion von Numb auf Notch kann vermutet werden, dass andere Signalwege als Notch, wie zum Beispiel der Sonic Hedgehog (Shh/Gli) Signalweg, durch Numb beeinflusst werden, die zur Inhibierung der Differenzierung führen. C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> Knockdown Myoblasten stellen ein effizientes in vitro Modell zur Analyse der Notch Aktivität dar. Die Aktivierung des Notch Signalwegs, infolge der Bindung eines Liganden, führt zur proteolytischen Abspaltung der intrazellulären Domäne (NotchICD) des Notch Rezeptors. NotchICD wandert in den Zellkern und bindet an Transkriptionsfaktoren der CSL-Familie (CBF1/RBP-JK, Su(h), LAG-1). Dies führt zur Aktivierung der Transkription verschiedener Zielgene, wie der E(sp)/Hes Familie (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Um untersuchen zu können, ob die Abschaltung von Numb/Numblike zur erhöhten Notch Aktivität führt, soll ein DsRed-Reporterkonstrukt mit CSL-Bindungsstellen (10xCSL-DsRed) verwendet werden. Damit ist es möglich die Notch Signalaktivierung über den transkriptionellen Aktivator NotchICD/CSL in vitro zu visualisieren und zu guantifizieren. Weitere Versuche sollten die Analyse des Shh Signalwegs zum Gegenstand haben, von dem bekannt ist, dass er die Differenzierung von Myoblasten beeinflusst (Gerber et al., 2007; Koleva et al., 2005). Mit

Hilfe eines Shh/Gli-Reporterkonstruktes mit Bindungsstellen für den Hedgehog Transkriptionsfaktor Gli (6xGli-Luciferase) ist es möglich die Shh Signalaktivierung über eine Luciferase-Reporter Aktivität (Liu *et al.*, 2011) in Numb-defizienten Myoblasten zu untersuchen.

Darüber hinaus bleibt auch zu klären, ob die bislang gewonnen Erkenntnisse über Numb innerhalb Myf5-exprimierender Zellen spezifisch auch auf ruhende Satellitenzellen übertragbar sind. So könnte zum Beispiel die Verwendung einer Pax7<sup>Cre</sup> Mauslinie weitere Hinweise über die Funktion von Numb liefern. Aufgrund der neuronalen Expression von Pax7 im Verlauf der embryonalen Entwicklung ist es jedoch notwendig, dass eine induzierbare Cre-Linie verwendet wird. In diesem Hintergrund wurde damit begonnen Numb<sup>fl/fl</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Tiere mit Pax7<sup>CreERT2</sup> Mäusen (Lepper *et al.*, 2009) zu verkreuzen. Dieses Mausmodell ermöglicht durch temporale Applikation von Tamoxifen, Numb spezifisch in adulten Satellitenzellen zu inaktivieren. Nach der Hypothese von Shinin und Mitarbeitern dürfte die genetische Ablation von Numb in Pax7-positiven Satellitenzellen zu einer kontinuierlichen Abnahme der Population an Satellitenzellen führen. Mit Hilfe von Muskelfaser-assoziierten Satellitenzellkulturen könnten detaillierte Untersuchungen bezüglich der Aktivierung und asymmetrischen Zellteilung durchgeführt werden. Damit wäre es zudem auch möglich die Orientierung der Zellteilungsachse zu untersuchen. Diesbezüglich postulieren Kuang und Mitarbeiter, dass eine asymmetrische Zellteilung vorherrschend in einer apikal-basalen Orientierung zur Muskelfaser zu beobachten ist. Die Zelle, welche Kontakt zur Muskelfaser besitzt, behält ihren Stammzellcharakter, während die apikale Tochterzelle zur Proliferation und anschließender Differenzierung bestimmt ist (Kuang et al., 2008). Bereits erste durchgeführte Analysen von Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup>Δ/Δ</sup> Numblike<sup>-/-</sup> Satellitenzellen ergaben keine Hinweise auf eine bevorzugte planare Zellteilungsachse infolge der Ausschaltung von Numb. In diesem Zusammenhang sollten weitere Untersuchungen mit Hilfe von Zeitraffervideomikroskopie Aufschluss darüber geben, wie sich das Fehlen von Numb auf die Orientierung der Zellteilungsachse und den Erhalt des Stammzellcharakters von Satellitenzellen auswirkt. Kulturen von Muskelfaser mit assoziierten Satellitenzellen ergaben eine verzögerte Aktivierung von Myf5<sup>Cre</sup> Numb<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> und  $Myf5^{Cre}$  Numb<sup> $\Delta/\Delta$ </sup> Numblike<sup>-/-</sup> Satellitenzellen. Die erhöhte Anzahl an nicht mitotisch aktiven Satellitenzellen in Numb-defizienten Zellclustern kann auf eine weitere Funktion von Numb bei der Migration von Satellitenzellen hinweisen. Es ist bekannt, dass Satellitenzellen im Muskel infolge einer Schädigung aktiviert werden und zur geschädigten Muskelfaser migrieren können. So zeigen neueste Studien, dass verschiedene exogene Faktoren, wie

HGF (<u>hepatocyte growth factor</u>) oder FGF (<u>fibroblast growth factor</u>) sowie Migrationssignalwege, wie der *Ephrin/Eph* Signalweg das Bewegungsvermögen von Satellitenzellen regulieren (Siegel *et al.*, 2009; Stark *et al.*, 2011). Weiterführende Untersuchungen mit Hilfe der Zeitraffermikroskopie sollten daher zeigen, ob die mögliche verzögerte initiale Aktivierung zur erhöhten migratorischen Aktivität Numb-defizienter Satellitenzellen führt, um den Funktionsverlust von Numb zu kompensieren.

## **6** LITERATURVERZEICHNIS

- Allbrook, D. B., Han, M. F., & Hellmuth, A. E. 1971. Population of muscle satellite cells in relation to age and mitotic activity. *Pathology*, 3(3): 223-243.
- Allen, R. E., Sheehan, S. M., Taylor, R. G., Kendall, T. L., & Rice, G. M. 1995. Hepatocyte growth factor activates quiescent skeletal muscle satellite cells in vitro. *J Cell Physiol*, 165(2): 307-312.

Andres, V., & Walsh, K. 1996. Myogenin expression, cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis. *J Cell Biol*, 132(4): 657-666.

- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D., & Lake, R. J. 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*, 284(5415): 770-776.
- Bani-Yaghoub, M., Kubu, C. J., Cowling, R., Rochira, J., Nikopoulos, G. N., Bellum, S., & Verdi, J. M. 2007. A switch in numb isoforms is a critical step in cortical development. *Dev Dyn*, 236(3): 696-705.
- Bayrhuber, H., Kull, U., Bäßler, U., & Danzer, A. 1989. Linder Biologie, 20. neubearbeitete Auflage ed.: Schroedel Schulbuchverlag GmbH, Hannover.
- Beauchamp, J. R., Heslop, L., Yu, D. S., Tajbakhsh, S., Kelly, R. G., Wernig, A., Buckingham, M. E., Partridge, T. A., & Zammit, P. S. 2000. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol*, 151(6): 1221-1234.
- Beres, B. J., George, R., Lougher, E. J., Barton, M., Verrelli, B. C., McGlade, C. J., Rawls, J. A., & Wilson-Rawls, J. 2011. Numb regulates Notch1, but not Notch3, during myogenesis. *Mech Dev*.
- Birchmeier, C., & Brohmann, H. 2000. Genes that control the development of migrating muscle precursor cells. *Curr Opin Cell Biol*, 12(6): 725-730.
- Bischoff, R. 1997. Chemotaxis of skeletal muscle satellite cells. *Dev Dyn*, 208(4): 505-515.
- Bischoff, R., & Heintz, C. 1994. Enhancement of skeletal muscle regeneration. Dev Dyn, 201(1): 41-54.
- Bladt, F., Riethmacher, D., Isenmann, S., Aguzzi, A., & Birchmeier, C. 1995. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature*, 376(6543): 768-771.
- Bober, E., Lyons, G. E., Braun, T., Cossu, G., Buckingham, M., & Arnold, H. H. 1991. The muscle regulatory gene, Myf-6, has a biphasic pattern of expression during early mouse development. *J Cell Biol*, 113(6): 1255-1265.
- Bornemann, A., & Schmalbruch, H. 1994. Immunocytochemistry of M-cadherin in mature and regenerating rat muscle. *Anat Rec*, 239(2): 119-125.
- Braun, T., & Arnold, H. H. 1994. ES-cells carrying two inactivated myf-5 alleles form skeletal muscle cells: activation of an alternative myf-5-independent differentiation pathway. *Dev Biol*, 164(1): 24-36.
- Braun, T., & Arnold, H. H. 1995. Inactivation of Myf-6 and Myf-5 genes in mice leads to alterations in skeletal muscle development. *EMBO J*, 14(6): 1176-1186.
- Braun, T., & Arnold, H. H. 1996. Myf-5 and myoD genes are activated in distinct mesenchymal stem cells and determine different skeletal muscle cell lineages. *EMBO J*, 15(2): 310-318.
- Braun, T., Rudnicki, M. A., Arnold, H. H., & Jaenisch, R. 1992. Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell*, 71(3): 369-382.
- Brockschnieder, D., Pechmann, Y., Sonnenberg-Riethmacher, E., & Riethmacher, D. 2006. An improved mouse line for Cre-induced cell ablation due to diphtheria toxin A, expressed from the Rosa26 locus. *Genesis*, 44(7): 322-327.
- Buas, M. F., Kabak, S., & Kadesch, T. 2010. The Notch effector Hey1 associates with myogenic target genes to repress myogenesis. *J Biol Chem*, 285(2): 1249-1258.
- Carmena, A., Murugasu-Oei, B., Menon, D., Jimenez, F., & Chia, W. 1998. Inscuteable and numb mediate asymmetric muscle progenitor cell divisions during Drosophila myogenesis. *Genes Dev*, 12(3): 304-315.
- Cayouette, M., Whitmore, A. V., Jeffery, G., & Raff, M. 2001. Asymmetric segregation of Numb in retinal development and the influence of the pigmented epithelium. *J Neurosci*, 21(15): 5643-5651.
- Chen, Y. H., Lee, W. C., Liu, C. F., & Tsai, H. J. 2001. Molecular structure, dynamic expression, and promoter analysis of zebrafish (Danio rerio) myf-5 gene. *Genesis*, 29(1): 22-35.
- Christ, B., & Ordahl, C. P. 1995. Early stages of chick somite development. *Anat Embryol (Berl)*, 191(5): 381-396.
- Cinnamon, Y., Kahane, N., & Kalcheim, C. 1999. Characterization of the early development of specific hypaxial muscles from the ventrolateral myotome. *Development*, 126(19): 4305-4315.
- Conboy, I. M., Conboy, M. J., Smythe, G. M., & Rando, T. A. 2003. Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science*, 302(5650): 1575-1577.
- Conboy, I. M., & Rando, T. A. 2002. The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev Cell*, 3(3): 397-409.
- Corallini, S., Fera, S., Grisanti, L., Falciatori, I., Muciaccia, B., Stefanini, M., & Vicini, E. 2006. Expression of the adaptor protein m-Numb in mouse male germ cells. *Reproduction*, 132(6): 887-897.

- Cornelison, D. D., Filla, M. S., Stanley, H. M., Rapraeger, A. C., & Olwin, B. B. 2001. Syndecan-3 and syndecan-4 specifically mark skeletal muscle satellite cells and are implicated in satellite cell maintenance and muscle regeneration. *Dev Biol*, 239(1): 79-94.
- Cornelison, D. D., Olwin, B. B., Rudnicki, M. A., & Wold, B. J. 2000. MyoD(-/-) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. *Dev Biol*, 224(2): 122-137.
- Cornelison, D. D., Wilcox-Adelman, S. A., Goetinck, P. F., Rauvala, H., Rapraeger, A. C., & Olwin, B. B. 2004. Essential and separable roles for Syndecan-3 and Syndecan-4 in skeletal muscle development and regeneration. *Genes Dev*, 18(18): 2231-2236.
- Cornelison, D. D., & Wold, B. J. 1997. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol*, 191(2): 270-283.
- Couteaux, R., Mira, J. C., & d'Albis, A. 1988. Regeneration of muscles after cardiotoxin injury. I. Cytological aspects. *Biol Cell*, 62(2): 171-182.
- Delfini, M. C., Hirsinger, E., Pourquie, O., & Duprez, D. 2000. Delta 1-activated notch inhibits muscle differentiation without affecting Myf5 and Pax3 expression in chick limb myogenesis. *Development*, 127(23): 5213-5224.
- Denetclaw, W. F., Jr., Christ, B., & Ordahl, C. P. 1997. Location and growth of epaxial myotome precursor cells. *Development*, 124(8): 1601-1610.
- Denetclaw, W. F., & Ordahl, C. P. 2000. The growth of the dermomyotome and formation of early myotome lineages in thoracolumbar somites of chicken embryos. *Development*, 127(4): 893-905.
- Dho, S. E., French, M. B., Woods, S. A., & McGlade, C. J. 1999. Characterization of four mammalian numb protein isoforms. Identification of cytoplasmic and membrane-associated variants of the phosphotyrosine binding domain. *J Biol Chem*, 274(46): 33097-33104.
- Dho, S. E., Jacob, S., Wolting, C. D., French, M. B., Rohrschneider, L. R., & McGlade, C. J. 1998. The mammalian numb phosphotyrosine-binding domain. Characterization of binding specificity and identification of a novel PDZ domain-containing numb binding protein, LNX. *J Biol Chem*, 273(15): 9179-9187.
- Di Marcotullio, L., Ferretti, E., Greco, A., De Smaele, E., Po, A., Sico, M. A., Alimandi, M., Giannini, G., Maroder, M., Screpanti, I., & Gulino, A. 2006. Numb is a suppressor of Hedgehog signalling and targets Gli1 for Itch-dependent ubiquitination. *Nat Cell Biol*, 8(12): 1415-1423.
- Di Marcotullio, L., Greco, A., Mazza, D., Canettieri, G., Pietrosanti, L., Infante, P., Coni, S., Moretti, M., De Smaele, E., Ferretti, E., Screpanti, I., & Gulino, A. 2011. Numb activates the E3 ligase Itch to control Gli1 function through a novel degradation signal. *Oncogene*, 30(1): 65-76.
- Dooley, C. M., James, J., Jane McGlade, C., & Ahmad, I. 2003. Involvement of numb in vertebrate retinal development: evidence for multiple roles of numb in neural differentiation and maturation. J Neurobiol, 54(2): 313-325.
- DuBridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M., Miller, J. H., & Calos, M. P. 1987. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol*, 7(1): 379-387.
- Eckert, R., Randall, D., Burggren, W., & French, K. 2000. Tierphysiologie, 3. völlig neubearbeitete und erweiterte Auflage ed.: Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., & Ben-Sasson, S. A. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 119(3): 493-501.
- Gayraud-Morel, B., Chretien, F., Flamant, P., Gomes, D., Zammit, P. S., & Tajbakhsh, S. 2007. A role for the myogenic determination gene Myf5 in adult regenerative myogenesis. *Dev Biol*, 312(1): 13-28.
- Gensch, N., Borchardt, T., Schneider, A., Riethmacher, D., & Braun, T. 2008. Different autonomous myogenic cell populations revealed by ablation of Myf5-expressing cells during mouse embryogenesis. *Development*, 135(9): 1597-1604.
- Gerber, A. N., Wilson, C. W., Li, Y. J., & Chuang, P. T. 2007. The hedgehog regulated oncogenes Gli1 and Gli2 block myoblast differentiation by inhibiting MyoD-mediated transcriptional activation. *Oncogene*, 26(8): 1122-1136.
- Gibson, M. C., & Schultz, E. 1982. The distribution of satellite cells and their relationship to specific fiber types in soleus and extensor digitorum longus muscles. *Anat Rec*, 202(3): 329-337.
- Goulding, M. D., Chalepakis, G., Deutsch, U., Erselius, J. R., & Gruss, P. 1991. Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO J*, 10(5): 1135-1147.
- Gulino, A., Di Marcotullio, L., & Screpanti, I. 2010. The multiple functions of Numb. *Exp Cell Res*, 316(6): 900-906.
- Haldar, M., Karan, G., Tvrdik, P., & Capecchi, M. R. 2008. Two cell lineages, myf5 and myf5-independent, participate in mouse skeletal myogenesis. *Dev Cell*, 14(3): 437-445.
- Harris, A. J., Duxson, M. J., Fitzsimons, R. B., & Rieger, F. 1989. Myonuclear birthdates distinguish the origins of primary and secondary myotubes in embryonic mammalian skeletal muscles. *Development*, 107(4): 771-784.

- Hasty, P., Bradley, A., Morris, J. H., Edmondson, D. G., Venuti, J. M., Olson, E. N., & Klein, W. H. 1993. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature*, 364(6437): 501-506.
- Hawke, T. J., & Garry, D. J. 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol*, 91(2): 534-551.
- Holowacz, T., Zeng, L., & Lassar, A. B. 2006. Asymmetric localization of numb in the chick somite and the influence of myogenic signals. *Dev Dyn*, 235(3): 633-645.
- Irintchev, A., Zeschnigk, M., Starzinski-Powitz, A., & Wernig, A. 1994. Expression pattern of M-cadherin in normal, denervated, and regenerating mouse muscles. *Dev Dyn*, 199(4): 326-337.
- Jan, Y. N., & Jan, L. Y. 2001. Asymmetric cell division in the Drosophila nervous system. *Nat Rev Neurosci*, 2(11): 772-779.
- Jansen, K. M., & Pavlath, G. K. 2008. Molecular control of mammalian myoblast fusion. *Methods Mol Biol*, 475: 115-133.
- Jarvinen, T. A., Jarvinen, T. L., Kaariainen, M., Kalimo, H., & Jarvinen, M. 2005. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med*, 33(5): 745-764.
- Jory, A., Le Roux, I., Gayraud-Morel, B., Rocheteau, P., Cohen-Tannoudji, M., Cumano, A., & Tajbakhsh, S. 2009. Numb promotes an increase in skeletal muscle progenitor cells in the embryonic somite. *Stem Cells*, 27(11): 2769-2780.
- Kablar, B., Krastel, K., Ying, C., Asakura, A., Tapscott, S. J., & Rudnicki, M. A. 1997. MyoD and Myf-5 differentially regulate the development of limb versus trunk skeletal muscle. *Development*, 124(23): 4729-4738.
- Kanisicak, O., Mendez, J. J., Yamamoto, S., Yamamoto, M., & Goldhamer, D. J. 2009. Progenitors of skeletal muscle satellite cells express the muscle determination gene, MyoD. *Dev Biol*, 332(1): 131-141.
- Kassar-Duchossoy, L., Gayraud-Morel, B., Gomes, D., Rocancourt, D., Buckingham, M., Shinin, V., & Tajbakhsh, S. 2004. Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. *Nature*, 431(7007): 466-471.
- Kassar-Duchossoy, L., Giacone, E., Gayraud-Morel, B., Jory, A., Gomes, D., & Tajbakhsh, S. 2005. Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes Dev*, 19(12): 1426-1431.
- Kaul, A., Koster, M., Neuhaus, H., & Braun, T. 2000. Myf-5 revisited: loss of early myotome formation does not lead to a rib phenotype in homozygous Myf-5 mutant mice. *Cell*, 102(1): 17-19.
- Kiefer, J. C., & Hauschka, S. D. 2001. Myf-5 is transiently expressed in nonmuscle mesoderm and exhibits dynamic regional changes within the presegmented mesoderm and somites I-IV. *Dev Biol*, 232(1): 77-90.
- Knoblich, J. A., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. 1997. The N terminus of the Drosophila Numb protein directs membrane association and actin-dependent asymmetric localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(24): 13005-13010.
- Koleva, M., Kappler, R., Vogler, M., Herwig, A., Fulda, S., & Hahn, H. 2005. Pleiotropic effects of sonic hedgehog on muscle satellite cells. *Cell Mol Life Sci*, 62(16): 1863-1870.
- Kopan, R., Nye, J. S., & Weintraub, H. 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(9): 2385-2396.
- Krause, D. S., Fackler, M. J., Civin, C. I., & May, W. S. 1996. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*, 87(1): 1-13.
- Kuang, S., Charge, S. B., Seale, P., Huh, M., & Rudnicki, M. A. 2006. Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. *J Cell Biol*, 172(1): 103-113.
- Kuang, S., Gillespie, M. A., & Rudnicki, M. A. 2008. Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell*, 2(1): 22-31.
- Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F., & Rudnicki, M. A. 2007. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell*, 129(5): 999-1010.
- Lepper, C., Conway, S. J., & Fan, C. M. 2009. Adult satellite cells and embryonic muscle progenitors have distinct genetic requirements. *Nature*, 460(7255): 627-631.
- Lepper, C., Partridge, T. A., & Fan, C. M. 2011. An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. *Development*, 138(17): 3639-3646.
- Li, S., Czubryt, M. P., McAnally, J., Bassel-Duby, R., Richardson, J. A., Wiebel, F. F., Nordheim, A., & Olson, E. N. 2005. Requirement for serum response factor for skeletal muscle growth and maturation revealed by tissue-specific gene deletion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(4): 1082-1087.
- Liebisch, F. 2000. Schüler Duden Biologie, 4. neubearbeitete Auflage ed.: Bibliographisches Institut & F.A. Brockhaus AG, Mannheim.
- Liu, L., Lanner, F., Lendahl, U., & Das, D. 2011. Numblike and Numb differentially affect p53 and Sonic Hedgehog signaling. *Biochem Biophys Res Commun*.

- Lobe, C. G., Koop, K. E., Kreppner, W., Lomeli, H., Gertsenstein, M., & Nagy, A. 1999. Z/AP, a double reporter for cre-mediated recombination. *Dev Biol*, 208(2): 281-292.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1): 265-275.
- Mansouri, A., Stoykova, A., Torres, M., & Gruss, P. 1996. Dysgenesis of cephalic neural crest derivatives in Pax7-/- mutant mice. *Development*, 122(3): 831-838.
- Mauro, A. 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. J Biophys Biochem Cytol, 9: 493-495.
- McGill, M. A., & McGlade, C. J. 2003. Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *J Biol Chem*, 278(25): 23196-23203.
- Megeney, L. A., Kablar, B., Garrett, K., Anderson, J. E., & Rudnicki, M. A. 1996. MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes Dev*, 10(10): 1173-1183.
- Megeney, L. A., & Rudnicki, M. A. 1995. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem Cell Biol*, 73(9-10): 723-732.
- Muir, A. R., Kanji, A. H., & Allbrook, D. 1965. The structure of the satellite cells in skeletal muscle. *J Anat*, 99(Pt 3): 435-444.
- Nabeshima, Y., Hanaoka, K., Hayasaka, M., Esumi, E., Li, S., & Nonaka, I. 1993. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature*, 364(6437): 532-535.
- Nie, J., Li, S. S., & McGlade, C. J. 2004. A novel PTB-PDZ domain interaction mediates isoform-specific ubiquitylation of mammalian Numb. *J Biol Chem*, 279(20): 20807-20815.
- Olguin, H. C., Yang, Z., Tapscott, S. J., & Olwin, B. B. 2007. Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination. *J Cell Biol*, 177(5): 769-779.
- Olson, E. N., Arnold, H. H., Rigby, P. W., & Wold, B. J. 1996. Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4. *Cell*, 85(1): 1-4.
- Ott, M. O., Bober, E., Lyons, G., Arnold, H., & Buckingham, M. 1991. Early expression of the myogenic regulatory gene, myf-5, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. *Development*, 111(4): 1097-1107.
- Oustanina, S., Hause, G., & Braun, T. 2004. Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. *EMBO J*, 23(16): 3430-3439.
- Patapoutian, A., Yoon, J. K., Miner, J. H., Wang, S., Stark, K., & Wold, B. 1995. Disruption of the mouse MRF4 gene identifies multiple waves of myogenesis in the myotome. *Development*, 121(10): 3347-3358.
- Pedersen, W. A., Chan, S. L., Zhu, H., Abdur-Rahman, L. A., Verdi, J. M., & Mattson, M. P. 2002. Numb isoforms containing a short PTB domain promote neurotrophic factor-induced differentiation and neurotrophic factor withdrawal-induced death of PC12 Cells. *J Neurochem*, 82(4): 976-986.
- Petersen, P. H., Zou, K., Hwang, J. K., Jan, Y. N., & Zhong, W. 2002. Progenitor cell maintenance requires numb and numblike during mouse neurogenesis. *Nature*, 419(6910): 929-934.
- Petersen, P. H., Zou, K., Krauss, S., & Zhong, W. 2004. Continuing role for mouse Numb and Numbl in maintaining progenitor cells during cortical neurogenesis. *Nat Neurosci*, 7(8): 803-811.
- Pisconti, A., Cornelison, D. D., Olguin, H. C., Antwine, T. L., & Olwin, B. B. 2010. Syndecan-3 and Notch cooperate in regulating adult myogenesis. *J Cell Biol*, 190(3): 427-441.
- Rawls, A., Valdez, M. R., Zhang, W., Richardson, J., Klein, W. H., & Olson, E. N. 1998. Overlapping functions of the myogenic bHLH genes MRF4 and MyoD revealed in double mutant mice. *Development*, 125(13): 2349-2358.
- Relaix, F., Montarras, D., Zaffran, S., Gayraud-Morel, B., Rocancourt, D., Tajbakhsh, S., Mansouri, A., Cumano, A., & Buckingham, M. 2006. Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J Cell Biol*, 172(1): 91-102.
- Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A., & Buckingham, M. 2005. A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature*, 435(7044): 948-953.
- Rhyu, M. S., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. 1994. Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell*, 76(3): 477-491.
- Rudnicki, M. A., Braun, T., Hinuma, S., & Jaenisch, R. 1992. Inactivation of MyoD in mice leads to upregulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell*, 71(3): 383-390.
- Rudnicki, M. A., Schnegelsberg, P. N., Stead, R. H., Braun, T., Arnold, H. H., & Jaenisch, R. 1993. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell*, 75(7): 1351-1359.
- Ruiz Gomez, M., & Bate, M. 1997. Segregation of myogenic lineages in Drosophila requires numb. *Development*, 124(23): 4857-4866.
- Sabourin, L. A., Girgis-Gabardo, A., Seale, P., Asakura, A., & Rudnicki, M. A. 1999. Reduced differentiation potential of primary MyoD-/- myogenic cells derived from adult skeletal muscle. *J Cell Biol*, 144(4): 631-643.
- Sabourin, L. A., & Rudnicki, M. A. 2000. The molecular regulation of myogenesis. Clin Genet, 57(1): 16-25.

- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839): 487-491.
- Sassoon, D., Lyons, G., Wright, W. E., Lin, V., Lassar, A., Weintraub, H., & Buckingham, M. 1989. Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis. *Nature*, 341(6240): 303-307.
- Sassoon, D. A. 1993. Myogenic regulatory factors: dissecting their role and regulation during vertebrate embryogenesis. *Dev Biol*, 156(1): 11-23.
- Schmidt, R. F., & Thews, G. 1997. Physiologie des Menschen, 27. Auflage ed.: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Schultz, E. 1974. A quantitative study of the satellite cell population in postnatal mouse lumbrical muscle. *Anat Rec*, 180(4): 589-595.
- Schultz, E., & McCormick, K. M. 1994. Skeletal muscle satellite cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 123: 213-257.
- Seale, P., & Rudnicki, M. A. 2000. A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev Biol*, 218(2): 115-124.
- Seale, P., Sabourin, L. A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., & Rudnicki, M. A. 2000. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*, 102(6): 777-786.
- Shen, Q., Zhong, W., Jan, Y. N., & Temple, S. 2002. Asymmetric Numb distribution is critical for asymmetric cell division of mouse cerebral cortical stem cells and neuroblasts. *Development*, 129(20): 4843-4853.
- Shinin, V., Gayraud-Morel, B., Gomes, D., & Tajbakhsh, S. 2006. Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells. *Nat Cell Biol*, 8(7): 677-687.
- Siegel, A. L., Atchison, K., Fisher, K. E., Davis, G. E., & Cornelison, D. D. 2009. 3D timelapse analysis of muscle satellite cell motility. *Stem Cells*, 27(10): 2527-2538.
- Smith, C. A., Dho, S. E., Donaldson, J., Tepass, U., & McGlade, C. J. 2004. The cell fate determinant numb interacts with EHD/Rme-1 family proteins and has a role in endocytic recycling. *Mol Biol Cell*, 15(8): 3698-3708.
- Smith, T. H., Kachinsky, A. M., & Miller, J. B. 1994. Somite subdomains, muscle cell origins, and the four muscle regulatory factor proteins. *J Cell Biol*, 127(1): 95-105.
- Soriano, P. 1999. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. Nat Genet, 21(1): 70-71.
- Spana, E. P., Kopczynski, C., Goodman, C. S., & Doe, C. Q. 1995. Asymmetric localization of numb autonomously determines sibling neuron identity in the Drosophila CNS. *Development*, 121(11): 3489-3494.
- Stark, D. A., Karvas, R. M., Siegel, A. L., & Cornelison, D. D. 2011. Eph/ephrin interactions modulate muscle satellite cell motility and patterning. *Development*, 138(24): 5279-5289.
- Stewart, S. A., Dykxhoorn, D. M., Palliser, D., Mizuno, H., Yu, E. Y., An, D. S., Sabatini, D. M., Chen, I. S., Hahn, W. C., Sharp, P. A., Weinberg, R. A., & Novina, C. D. 2003. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA*, 9(4): 493-501.
- Summerbell, D., Ashby, P. R., Coutelle, O., Cox, D., Yee, S., & Rigby, P. W. 2000. The expression of Myf5 in the developing mouse embryo is controlled by discrete and dispersed enhancers specific for particular populations of skeletal muscle precursors. *Development*, 127(17): 3745-3757.
- Tajbakhsh, S. 2003. Stem cells to tissue: molecular, cellular and anatomical heterogeneity in skeletal muscle. *Curr Opin Genet Dev*, 13(4): 413-422.
- Tajbakhsh, S. 2009. Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis. *J Intern Med*, 266(4): 372-389.
- Tajbakhsh, S., & Buckingham, M. E. 1994. Mouse limb muscle is determined in the absence of the earliest myogenic factor myf-5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(2): 747-751.
- Tajbakhsh, S., Rocancourt, D., & Buckingham, M. 1996. Muscle progenitor cells failing to respond to positional cues adopt non-myogenic fates in myf-5 null mice. *Nature*, 384(6606): 266-270.
- Tallquist, M. D., Weismann, K. E., Hellstrom, M., & Soriano, P. 2000. Early myotome specification regulates PDGFA expression and axial skeleton development. *Development*, 127(23): 5059-5070.
- Uemura, T., Shepherd, S., Ackerman, L., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. 1989. numb, a gene required in determination of cell fate during sensory organ formation in Drosophila embryos. *Cell*, 58(2): 349-360.
- Ustanina, S., Carvajal, J., Rigby, P., & Braun, T. 2007. The myogenic factor Myf5 supports efficient skeletal muscle regeneration by enabling transient myoblast amplification. *Stem Cells*, 25(8): 2006-2016.
- Venters, S. J., & Ordahl, C. P. 2005. Asymmetric cell divisions are concentrated in the dermomyotome dorsomedial lip during epaxial primary myotome morphogenesis. *Anat Embryol (Berl)*, 209(6): 449-460.
- Venuti, J. M., Morris, J. H., Vivian, J. L., Olson, E. N., & Klein, W. H. 1995. Myogenin is required for late but not early aspects of myogenesis during mouse development. *J Cell Biol*, 128(4): 563-576.

- Verdi, J. M., Bashirullah, A., Goldhawk, D. E., Kubu, C. J., Jamali, M., Meakin, S. O., & Lipshitz, H. D. 1999. Distinct human NUMB isoforms regulate differentiation vs. proliferation in the neuronal lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(18): 10472-10476.
- White, R. B., Bierinx, A. S., Gnocchi, V. F., & Zammit, P. S. 2010. Dynamics of muscle fibre growth during postnatal mouse development. *BMC Dev Biol*, 10: 21.
- Wilson, A., Ardiet, D. L., Saner, C., Vilain, N., Beermann, F., Aguet, M., Macdonald, H. R., & Zilian, O. 2007. Normal hemopoiesis and lymphopoiesis in the combined absence of numb and numblike. *J Immunol*, 178(11): 6746-6751.
- Yablonka-Reuveni, Z., Quinn, L. S., & Nameroff, M. 1987. Isolation and clonal analysis of satellite cells from chicken pectoralis muscle. *Dev Biol*, 119(1): 252-259.
- Yablonka-Reuveni, Z., Rudnicki, M. A., Rivera, A. J., Primig, M., Anderson, J. E., & Natanson, P. 1999. The transition from proliferation to differentiation is delayed in satellite cells from mice lacking MyoD. *Dev Biol*, 210(2): 440-455.
- Yaffe, D., & Saxel, O. 1977. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*, 270(5639): 725-727.
- Yaich, L., Ooi, J., Park, M., Borg, J. P., Landry, C., Bodmer, R., & Margolis, B. 1998. Functional analysis of the Numb phosphotyrosine-binding domain using site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, 273(17): 10381-10388.
- Zammit, P. S. 2008. All muscle satellite cells are equal, but are some more equal than others? *J Cell Sci*, 121(Pt 18): 2975-2982.
- Zammit, P. S., Golding, J. P., Nagata, Y., Hudon, V., Partridge, T. A., & Beauchamp, J. R. 2004. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J Cell Biol*, 166(3): 347-357.
- Zammit, P. S., Heslop, L., Hudon, V., Rosenblatt, J. D., Tajbakhsh, S., Buckingham, M. E., Beauchamp, J. R., & Partridge, T. A. 2002. Kinetics of myoblast proliferation show that resident satellite cells are competent to fully regenerate skeletal muscle fibers. *Exp Cell Res*, 281(1): 39-49.
- Zhang, W., Behringer, R. R., & Olson, E. N. 1995. Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in upregulation of myogenin and rib anomalies. *Genes Dev*, 9(11): 1388-1399.
- Zhong, W., Feder, J. N., Jiang, M. M., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. 1996. Asymmetric localization of a mammalian numb homolog during mouse cortical neurogenesis. *Neuron*, 17(1): 43-53.
- Zhong, W., Jiang, M. M., Schonemann, M. D., Meneses, J. J., Pedersen, R. A., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. 2000. Mouse numb is an essential gene involved in cortical neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(12): 6844-6849.
- Zhong, W., Jiang, M. M., Weinmaster, G., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. 1997. Differential expression of mammalian Numb, Numblike and Notch1 suggests distinct roles during mouse cortical neurogenesis. *Development*, 124(10): 1887-1897.
- Zhou, Y., Atkins, J. B., Rompani, S. B., Bancescu, D. L., Petersen, P. H., Tang, H., Zou, K., Stewart, S. B., & Zhong, W. 2007. The mammalian Golgi regulates numb signaling in asymmetric cell division by releasing ACBD3 during mitosis. *Cell*, 129(1): 163-178.
- Zhou, Z., & Bornemann, A. 2001. MRF4 protein expression in regenerating rat muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, 22(4): 311-316.
- Zilian, O., Saner, C., Hagedorn, L., Lee, H. Y., Sauberli, E., Suter, U., Sommer, L., & Aguet, M. 2001. Multiple roles of mouse Numb in tuning developmental cell fates. *Curr Biol*, 11(7): 494-501.

# 7 ANHANG

# 7.1 Abkürzungsverzeichnis

| %               | Prozent                                                                                                |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| °C              | Grad Celsius                                                                                           |
| μl              | Mikroliter                                                                                             |
| Α               |                                                                                                        |
| ATCC            | <u>A</u> merican <u>t</u> ype <u>c</u> ulture <u>c</u> ollection                                       |
| В               |                                                                                                        |
| BLAST           | <u>B</u> asic <u>L</u> ocal <u>A</u> lignment <u>S</u> earch <u>T</u> ool                              |
| BSA             | Rinderserumalbumin (engl. <u>b</u> ovin <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin)                                 |
| bzw.            | beziehungsweise                                                                                        |
| С               |                                                                                                        |
| CO <sub>2</sub> | Kohlendioxid                                                                                           |
| Cre             | engl. <u>c</u> auses <u>re</u> combination                                                             |
| Cy2             | Carbocyanin                                                                                            |
| СуЗ             | Indocarbocyanin                                                                                        |
| Cy5             | Indodicarbocyanin                                                                                      |
| D               |                                                                                                        |
| DAPI            | 4',6'- <u>Dia</u> midino-2- <u>p</u> henyl <u>i</u> ndol                                               |
| d.h.            | das heißt                                                                                              |
| DMEM            | <u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium                                       |
| DMF             | <u>Dim</u> ethyl <u>f</u> ormamid                                                                      |
| DNA             | Desoxyribonukleinsäure (engl. <u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)                          |
| DSHB            | <u>D</u> evelopmental <u>S</u> tudies <u>H</u> ybridoma <u>B</u> ank                                   |
| E               |                                                                                                        |
| EDTA            | Ethylendiamintetraessigsäure (engl. <u>e</u> thylene <u>d</u> iamine <u>t</u> etraacetic <u>a</u> cid) |
| EdU             | 5- <u>e</u> thynyl-2'- <u>d</u> eoxy <u>u</u> ridine                                                   |
| ex vivo         | Lateinisch für "außerhalb des Lebendigen"                                                              |
| F               |                                                                                                        |
| FGF             | <u>F</u> ibroblast <u>g</u> rowth <u>f</u> actor                                                       |
| G               |                                                                                                        |
| g               | Erdbeschleunigung (engl. gravitational acceleration)                                                   |
| GAPDH           | Gen für die <u>G</u> lyzerin <u>a</u> ldehyd-3- <u>P</u> hosphat- <u>D</u> ehydrogenase                |
| GFP             | Grün-fluoreszierendes Protein (Green Fluorescent Protein)                                              |

| Н        |                                                                                                                                                                                |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| h        | Stunde(n)                                                                                                                                                                      |
| HEK      | Humane, embryonale Nierenepithelzelllinie (engl. <u>H</u> uman <u>e</u> mbryonic <u>k</u> idney)                                                                               |
| HGF      | <u>H</u> epatocyte <u>g</u> rowth <u>f</u> actor                                                                                                                               |
| I        |                                                                                                                                                                                |
| in situ  | Lateinisch für "am Ort"                                                                                                                                                        |
| in vitro | Lateinisch für "im Glas, außerhalb des lebenden Organismus"                                                                                                                    |
| in vivo  | Lateinisch für "im Lebendigen"                                                                                                                                                 |
| ltch     | E3 Ubiquitin Ligase Itchy Homolog<br>(alternativer Name: <i>Atrophin-1-interacting protein 4</i> )                                                                             |
| К        |                                                                                                                                                                                |
| kb       | Größenangabe: <u>K</u> ilo <u>b</u> asen                                                                                                                                       |
| kDa      | Größenangabe: <u>K</u> ilo <u>da</u> lton                                                                                                                                      |
| L        |                                                                                                                                                                                |
| LNX      | E3 Ubiquitin Ligase LNX<br>(alternativer Name: <i>Ligand of Numb-protein X 1</i> )                                                                                             |
| loxP     | <u>l</u> ocus <u>o</u> f cross-over ( <u>x</u> ) des Bakteriophagen <u>P</u> 1                                                                                                 |
| М        |                                                                                                                                                                                |
| MES      | 2-(N- <u>M</u> orpholino)- <u>E</u> thansulfon <u>s</u> äure                                                                                                                   |
| MEF2C    | <u>M</u> yocyte <u>e</u> nhancer <u>f</u> actor 2C                                                                                                                             |
| min      | Minute(n)                                                                                                                                                                      |
| Myf5     | <u>M</u> yogenic <u>f</u> actor <u>5</u>                                                                                                                                       |
| MyoD     | <u>My</u> ogenic <u>d</u> etermination factor                                                                                                                                  |
| Р        |                                                                                                                                                                                |
| PBS      | Phosphat-gepufferte physiologische Salzlösung (engl. <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline)                                                                        |
| PCR      | Polymerase Kettenreaktion (engl. <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)                                                                                            |
| PFA      | <u>P</u> ara <u>f</u> orm <u>a</u> ldehyd                                                                                                                                      |
| PMSF     | Phenyl <u>m</u> ethyl <u>s</u> ulfonyl <u>f</u> luorid                                                                                                                         |
| R        |                                                                                                                                                                                |
| RNA      | Ribonukleinsäure (engl. <u>r</u> ibo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)                                                                                                             |
| ROSA     | engl. <u>r</u> everse <u>o</u> rientation <u>s</u> plice <u>a</u> cceptor β-gal                                                                                                |
| RT       | <u>R</u> aum <u>t</u> emperatur                                                                                                                                                |
| S        |                                                                                                                                                                                |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. <u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate <u>P</u> oly <u>a</u> crylamide <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis) |
| sec      | Sekunde(n)                                                                                                                                                                     |
| shRNA    | <u>s</u> hort- <u>h</u> airpin RNA                                                                                                                                             |

| SPP         | Natrium Phosphat Puffer (engl. <u>S</u> odium <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffer)     |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| т           |                                                                                     |
| TE          | <u>T</u> ris- <u>E</u> DTA Puffer                                                   |
| TENS        | <u>T</u> risHCI- <u>E</u> DTA- <u>N</u> aCI- <u>S</u> DS Puffer                     |
| Tris        | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan                                                    |
| TritonX-100 | Octylphenolpolyethylenglycolether                                                   |
| U           |                                                                                     |
| U, Unit     | Maß für biologische Aktivität                                                       |
| W           |                                                                                     |
| WT          | <u>W</u> ild <u>t</u> yp(en)                                                        |
| Х           |                                                                                     |
| X-Gal       | Bromo-Chloro-Indolyl-Galactopyranoside (BCIG = IUPAC Name)                          |
| Y           |                                                                                     |
| YFP         | Gelb-fluoreszierendes Protein ( <u>Y</u> ellow <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein) |

# 7.2 Abbildungsverzeichnis

| ABBILDUNG 1: AUFBAU DER SKELETTMUSKULATUR.                              | 3    |
|-------------------------------------------------------------------------|------|
| ABBILDUNG 2: ENTWICKLUNG DER SKELETTMUSKULATUR AUS DEN SOMITEN          | 6    |
| ABBILDUNG 3: ZUSAMMENFASSUNG DER EXPRESSION MYOGENER                    |      |
| REGULATIONSFAKTOREN IM VERLAUF DER EMBRYOGENESE IN                      |      |
| MUSKELVORLÄUFERZELLEN IN DEN SOMITEN UND DEN EXTREMITÄTEN               | 8    |
| ABBILDUNG 4: MUSKELREGENERATION DURCH SATELLITENZELLEN.                 | . 12 |
| ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER EXPRESSION MYOGENER           |      |
| REGULATIONSFAKTOREN UND DEREN EINFLUSS AUF DAS SCHICKSAL VON            |      |
| SATELLITENZELLEN                                                        | . 18 |
| ABBILDUNG 6: VERGLEICH DER PROTEINSTRUKTUR VON DROSOPHILA NUMB MIT      |      |
| DEN MAUS HOMOLOGEN NUMB UND NUMBLIKE                                    | . 21 |
| ABBILDUNG 7: HERSTELLUNG VON LENTIVIRALEN VIRUSPARTIKELN IN HEK293T UND |      |
| TRANSDUKTION VON C2C12 MYOBLASTEN.                                      | . 52 |
| ABBILDUNG 8: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER KULTIVIERUNG VON FDB          |      |
| MUSKELFASERN                                                            | . 56 |
| ABBILDUNG 9: VERTEILUNG MYF5-ABSTÄMMIGER ZELLEN WÄHREND DER             |      |
| EMBRYONALEN ENTWICKLUNG.                                                | . 59 |

| ABBILDUNG 10: VERBREITUNG MYF5-ABSTÄMMIGER ZELLEN IN VERSCHIEDENEN                          |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| GEWEBEN.                                                                                    | . 60 |
| ABBILDUNG 11: RIPPENPHÄNOTYP VON E18.5 MYF5 <sup>CRE</sup> ROSA <sup>DTA</sup> EMBRYONEN    | . 61 |
| ABBILDUNG 12: MYF5 <sup>CRE</sup> -VERMITTELTE DTA EXPRESSION FÜHRT ZUM ZELLTOD IN          |      |
| DEN SOMITEN VON MYF5 <sup>CRE</sup> ROSA <sup>DTA</sup> EMBRYONEN                           | . 62 |
| ABBILDUNG 13: REDUZIERTE EXPRESSION MYOGENER REGULATIONSFAKTOREN IN                         |      |
| E10.5 MYF5 <sup>CRE</sup> ROSA <sup>DTA</sup> EMBRYONEN                                     | . 63 |
| ABBILDUNG 14: VERLUST VON MYF5, MYOD UND MYOGENIN MRNA EXPRESSION IN                        |      |
| DEN KRANIAL LIEGENDEN SOMITEN VON E10.5 MYF5 <sup>CRE</sup> ROSA <sup>DTA</sup> EMBRYONEN   | . 64 |
| ABBILDUNG 15: EFFIZIENTE DTA-VERMITTELTE ABLATION VON MYF5-ABSTAMMENDEN                     |      |
| ZELLEN IN E15.5 MYF5 <sup>CRE</sup> ROSA <sup>DTA</sup> EMBRYONEN                           | . 65 |
| ABBILDUNG 16: UNVERÄNDERTE AUSFORMUNG DER SKELETTMUSKULATUR VON                             |      |
| MYF5 <sup>CRE</sup> ROSA <sup>DTA</sup> EMBRYONEN                                           | . 66 |
| ABBILDUNG 17: ANSTIEG MYOD-EXPRIMIERENDER ZELLEN IN MYF5 <sup>CRE</sup> ROSA <sup>DTA</sup> |      |
| EMBRYONEN.                                                                                  | . 67 |
| ABBILDUNG 18: VERTEILUNG MYOGENIN-ABSTAMMENDER ZELLEN WÄHREND DER                           |      |
| MYOGENESE.                                                                                  | . 68 |
| ABBILDUNG 19: PHÄNOTYP VON E18.5 MYOGENIN <sup>CRE</sup> ROSA <sup>DTA</sup> EMBRYONEN.     | . 69 |
| ABBILDUNG 20: UNVERÄNDERTE EXPRESSION DER TRANSKRIPTIONSFAKTOREN                            |      |
| MYF5, MYOD UND PAX7 IN E10.5 MYOGENIN <sup>CRE</sup> ROSA <sup>DTA</sup> EMBRYONEN          | . 70 |
| ABBILDUNG 21: VERLUST VON TERMINAL DIFFERENZIERTEN MUSKELFASERN IN                          |      |
| MYOGENIN <sup>CRE</sup> ROSA <sup>DTA</sup> EMBRYONEN                                       | . 71 |
| ABBILDUNG 22: QUANTITATIVE RT-PCR ANALYSE ZEIGT KEINE VERÄNDERUNGEN                         |      |
| DER EXPRESSION VON NUMB IM VERLAUF DER DIFFERENZIERUNG VON $C_2C_{12}$                      |      |
| MYOBLASTEN                                                                                  | . 73 |
| ABBILDUNG 23: NACHWEIS DER ISOFORMEN NUMB2 UND NUMB4 IN C2C12                               |      |
| MYOBLASTEN MITTELS SEMI-QUANTITATIVER RT-PCR                                                | . 74 |
| ABBILDUNG 24: QUANTITATIVE RT-PCR ANALYSE ZEIGT KEINE VERÄNDERUNGEN DER                     |      |
| EXPRESSION VON NUMBLIKE IM VERLAUF DER DIFFERENZIERUNG VON $C_2C_{12}$                      |      |
| MYOBLASTEN                                                                                  | . 75 |
| ABBILDUNG 25: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER SIRNA BINDESTELLEN FÜR NUMB                      |      |
| UND NUMBLIKE.                                                                               | . 76 |
| ABBILDUNG 26: ETABLIERUNG VON C2C12 MYOBLASTEN MIT STABILER SHRNA                           |      |
| EXPRESSION.                                                                                 | . 77 |
| ABBILDUNG 27: SPEZIFISCHE REPRESSION DER PROTEINEXPRESSION VON NUMB                         |      |
| UND NUMBLIKE IN C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> MYOBLASTEN                                   | . 78 |

| ABBILDUNG 28: REDUZIERTES DIFFERENZIERUNGSVERHALTEN VON SHNUMB UND                                                                               |       |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| SHNUMB/SHNUMBLIKE EXPRIMIERENDEN C2C12 MYOBLASTEN.                                                                                               | 80    |
| ABBILDUNG 29: SIGNIFIKANTE REDUKTION DER TERMINALEN DIFFERENZIERUNG VON                                                                          |       |
| SHNUMBLIKE, SHNUMB UND SHNUMB/SHNUMBLIKE MYOBLASTEN                                                                                              | 81    |
| ABBILDUNG 30: WESTERN BLOT ANALYSE DER NOTCH2 UND NOTCH3 REZEPTOREN                                                                              | 83    |
| ABBILDUNG 31: DER VERLUST VON NUMB UND/ODER NUMBLIKE FÜHRT NICHT ZU                                                                              |       |
| EINER ERHÖHTEN NOTCH AKTIVITÄT.                                                                                                                  | 84    |
| ABBILDUNG 32: STATISTISCHE VERTEILUNG DER ERHALTENEN GENOTYPEN                                                                                   | 86    |
| ABBILDUNG 33: MYF5 <sup>CRE</sup> REKOMBINASE VERMITTELTE DELETION VON NUMB IN                                                                   |       |
| PRIMÄREN MYOBLASTEN VON MYF5 <sup>CRE</sup> NUMB <sup>Δ/Δ</sup> NUMBLIKE⁻/- TIEREN                                                               | 87    |
| ABBILDUNG 34: IMMUNOLOGISCHER NACHWEIS VON NUMB UND NUMBLIKE IN                                                                                  |       |
| MUSKELFASER-ASSOZIIERTEN SATELLITENZELLEN.                                                                                                       | 88    |
| ABBILDUNG 35: PHÄNOTYPISCHE ANALYSE VON MYF5 <sup>CRE</sup> NUMB <sup>Δ/Δ</sup> NUMBLIKE <sup>-/-</sup>                                          |       |
| MÄUSEN                                                                                                                                           | 90    |
| ABBILDUNG 36: ANALYSE DER SATELLITENZELLZAHL UND FDB MUSKELFASERKERNE.                                                                           | 92    |
| ABBILDUNG 37: ERHÖHTE PROLIFERATIONSRATE VON PRIMÄREN MYF5 <sup>CRE</sup> NUMB $^{\Delta/\Delta}$                                                |       |
| NUMBLIKE <sup>-/-</sup> MYOBLASTEN                                                                                                               | 94    |
| ABBILDUNG 38: VERMINDERTE DIFFERENZIERUNG PRIMÄRER MYF5 <sup>CRE</sup> NUMB <sup>Δ/Δ</sup> UND                                                   |       |
| MYF5 <sup>CRE</sup> NUMB <sup>Δ/Δ</sup> NUMBLIKE <sup>-/-</sup> MYOBLASTEN                                                                       | 96    |
| ABBILDUNG 39: PROZENTUALE VERTEILUNG PAX7-POSITIVER ZELLEN IN                                                                                    |       |
| EINZELZELLEN UND ZELLCLUSTERN.                                                                                                                   | 97    |
| ABBILDUNG 40: NACHWEIS VON AKTIVIERTEN SATELLITENZELLEN AUF KULTIVIERTEN                                                                         |       |
| FDB MUSKELFASERN MITTELS EDU.                                                                                                                    | 99    |
| ABBILDUNG 41: NORMALE SKELETTMUSKELREGENERATION VON MYF5 <sup>CRE</sup> NUMB $^{\Delta \! \! \! \! \! \! \! \! \! \! \! \! \! \! \! \! \! \! \!$ |       |
| NUMBLIKE <sup>-/-</sup> NACH EINMALIGER SCHÄDIGUNG                                                                                               | . 101 |
| ABBILDUNG 42: NORMALE REGENERATION NACH MEHRFACHER                                                                                               |       |
| MUSKELSCHÄDIGUNG.                                                                                                                                | . 103 |
| ABBILDUNG 43: MASSON-TRICHROM FÄRBUNG VON KARDIOTOXIN GESCHÄDIGTEN                                                                               |       |
| MUSKELN.                                                                                                                                         | . 104 |
| ABBILDUNG 44: VERGLEICHBARE SATELLITENZELLZAHL PRO EDL MUSKELFASER                                                                               |       |
| NACH VIERFACHER SCHÄDIGUNG DES TA MUSKELS VON NUMB-DEFIZIENTEN                                                                                   |       |
| MÄUSEN                                                                                                                                           | . 105 |
| ABBILDUNG 45: EINE MYF5-ABHÄNGIGE UND EINE MYF5-UNABHÄNGE                                                                                        |       |
| ZELLPOPULATION IST BEI DER EMBRYONALEN SKELETTMUSKELENTWICKLUNG                                                                                  |       |
| DER MAUS BETEILIGT.                                                                                                                              | . 110 |
| ABBILDUNG 46: MODELL DER FUNKTION VON NUMB IN EX VIVO                                                                                            |       |
| SATELLITENZELLKULTUREN                                                                                                                           | . 113 |

| ABBILDUNG 47: MODELL DER BINÄREN FUNKTION VON NUMB IM VERLAUF DER |       |
|-------------------------------------------------------------------|-------|
| MUSKELENTWICKLUNG                                                 | . 116 |

## 7.3 Tabellenverzeichnis

| TABELLE 1: EIGENSCHAFTEN DER MUSKELFASERTYPEN                     | 5  |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| TABELLE 2: ZUSAMMENFASSUNG DER EXPRESSION UND ZELLFUNKTION VON    |    |
| NUMBLIKE UND NUMB IM MAUSGEWEBE                                   | 22 |
| TABELLE 3: SPEZIFISCHE REAGENZIEN                                 | 24 |
| TABELLE 4: GERÄTE                                                 | 25 |
| TABELLE 5: VERBRAUCHSMATERIALIEN                                  | 26 |
| TABELLE 6: VERWENDETE KITS                                        | 26 |
| TABELLE 7: PUFFER UND LÖSUNGEN                                    | 27 |
| TABELLE 8: NÄHRMEDIEN                                             | 29 |
| TABELLE 9: OLIGONUKLEOTIDE FÜR GENOTYPISIERUNGEN                  | 29 |
| TABELLE 10: OLIGONUKLEOTIDE FÜR QUANTITATIVE <i>REAL-TIME</i> PCR | 30 |
| TABELLE 11: OLIGONUKLEOTIDE FÜR SEQUENZIERUNG                     | 31 |
| TABELLE 12: VERWENDETE PLASMIDE                                   | 31 |
| TABELLE 13: RNA PROBEN FÜR IN SITU HYBRIDISIERUNG                 | 32 |
| TABELLE 14: AUFLISTUNG DER VERWENDETEN ERSTANTIKÖRPER             | 32 |
| TABELLE 15: AUFLISTUNG DER VERWENDETEN ZWEITANTIKÖRPER            | 33 |
| TABELLE 16: VERWENDETE PROGRAMME                                  | 34 |
| TABELLE 17: ÜBERSICHT ÜBER DIE ERHALTENEN GENOTYPEN UND DEN       |    |
| VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN                                           | 85 |
| TABELLE 18: DURCHSCHNITTLICHE ANZAHL AN ZELLKERNEN PRO            |    |
| FDB MUSKELFASER                                                   | 93 |

## 7.4 Danksagung

In erster Linie danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Thomas Braun für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und die hilfreiche Unterstützung bei der Erstellung meiner Doktorarbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Adriaan Dorresteijn für die Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit seitens der Justus-Liebig-Universität Gießen bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt Dr. Thilo Borchardt und Dr. André Schneider für die produktive wissenschaftliche Zusammenarbeit und wertvolle Diskussionen. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Dr. Stefan Günther und Dr. Johnny Kim für deren hilfreiche Unterstützung, sowie für wertvolle Hinweise und kritische Ratschläge. Ein spezieller Dank geht an Dr. Thomas Schmid (*Schmiddi*), der mich beim Zusammenschreiben mit unermüdlichem Einsatz unterstützt hat.

Innerhalb der Arbeitsgruppe bedanke ich mich bei Kerstin Richter, Susanne Kreutzer, Marianne Ploch, Sonja Krüger, Moni Euler und Katja Kolditz für die methodische Ausbildung und für die Hilfe bei den experimentellen Arbeiten. Danken möchte ich auch allen Mitarbeitern, die mich auf vielfältige Weise bei meiner Arbeit unterstützt haben und an dieser Stelle nicht namentlich erwähnt sind. Ich bedanke mich bei allen Doktoranden für die gute Arbeitsatmosphäre und die moralische Unterstützung. Danke Tanja, Piera, Nadine, Katha, Kathi, Vera, Micha, Ale, Danni, Judith, Nicole, Sandra, …

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die fortwährende Unterstützung, Förderung, sowie für die motivierende und ermutigende Begleitung während meiner gesamten Ausbildung, ohne sie wäre das nie möglich gewesen. Mein ganz persönlicher Dank gilt Christian, der mich mit seinen aufmunternden Worten, viel Verständnis und seinen steten Glauben an mich immer liebevoll und tatkräftig unterstützt hat.