

**Funktionelle Analyse von *miR-1/206/133* in der  
Skelettmuskulatur von *Mus musculus***

*Functional analysis of miR-1/206/133 in skeletal muscle  
of Mus musculus*

**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

**M. Sc. Ina Klockner**

Bad Nauheim, Juli 2021

Erstgutachter: Prof. Dr. Thomas Böttger

Zeitgutachter: Prof. Dr. Dr. Thomas Braun

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, 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 oder nicht 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 29.07.2021

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim angefertigt.

## Zusammenfassung

Die Kontrolle von Genaktivität erfolgt auf transkriptioneller, epigenetischer, sowie auf posttranskriptioneller Ebene. Eine signifikante Rolle im komplexen Netzwerk der Genregulation spielen kleine nicht-kodierende RNA-Moleküle. MicroRNAs (miRs) regulieren die Genexpression negativ durch komplementäre Basenpaarung mit der mRNA ihrer Zielgene<sup>1</sup>. Die *miR-1/206/133* Familie ist in drei genomischen Clustern organisiert. Zwei *miR-1/133a* Cluster sind abundant in der Herz- und Skelettmuskulatur exprimiert. Das dritte Cluster – *miR-206/133b* – wird dagegen spezifisch im Skelettmuskel gebildet. Sein konstitutiver Verlust zeigt keinen Effekt in Hinblick auf die Vitalität der Tiere, sowie auf die Entwicklung und Regeneration des Skelettmuskels<sup>2</sup>. Die beiden *miR-1/133a* Cluster regulieren im embryonalen Herzen die Differenzierung von Kardiomyozyten durch Inhibition von typischen Genen der glatten Muskulatur<sup>3</sup>. Im adulten Skelettmuskel führt der Verlust dieser Cluster zu einer mitochondrialen Dysfunktion<sup>4</sup>. Außerdem konnte nach *miR-1/133a* Deletion eine verstärkte Expression des eng verwandten *miR-206/133b* Clusters nachgewiesen werden, was eine Kompensation des Verlusts von *miR-1/133a* durch *miR-206/133b* nahelegt. Diese Arbeit adressiert die synergistische Funktion aller im Skelettmuskel von Säugern exprimierten miRNAs der *miR-1/206/133* Familie sowohl während der Ontogenese, als auch im adulten Muskel. Der skelettmuskelspezifische Verlust aller Cluster (tKO) ist aufgrund verminderter Respiration neonatal letal. Die Analyse dieses Phänotyps identifizierte eine Beeinträchtigung der Entwicklung der neuromuskulären Synapse (NMJ) als Ursache. Dies äußert sich in einer gestörten räumlichen Organisation sowie in einer Reduktion der Zahl der postsynaptischen Acetylcholinrezeptor (AChR) Cluster. Die generelle Entwicklung der Skelettmuskulatur scheint dagegen nicht beeinflusst. Mittels Transkriptomanalyse wurden durch *miR-1/206/133* regulierte Zielgene identifiziert. Hierbei wurde das NMJ-assoziierte Adapterprotein CRK als funktionell bedeutsames Ziel von *miR-1/206/133* identifiziert. Weitere Analysen zeigten, dass die posttranskriptionelle Regulation von CRK, vermittelt durch eine synergistische Wirkung von *miR-1/206/133*, ein essentieller Prozess während der NMJ-Bildung und Homöostase ist. Protein-Protein-Interaktionsstudien suggerieren, dass CRK *downstream* des neuromuskulären LRP4-MUSK-DOK7 Komplexes mit dem postsynaptischen RAC1-GEF FARP1 interagiert. Dabei führt eine erhöhte CRK Menge zu einer Zunahme dieser Interaktion und resultiert in einer irregulären RAC1 GTPase Aktivität, die sich in einer gestörten AChR Cluster Ausbildung und Homöostase manifestiert. Zusammenfassend konnte erstmalig gezeigt werden, dass *miR-1/206/133* nicht essentiell für die frühe Muskeldifferenzierung sind. Die *miR-1/206/133* Familie ist hingegen ein kritischer Regulator der DOK7-CRK-RAC1 Signalkaskade und somit essentiell zur AChR-Stabilisierung und Verankerung im neonatalen und adulten Skelettmuskel.



## Abstract

Gene activity is controlled at transcriptional, epigenetic, as well as post-transcriptional levels. Small non-coding RNA molecules play a significant role in the complex network of gene regulation. MicroRNAs (miRs) negatively regulate gene expression through complementary base pairing with the mRNA of their target genes<sup>1</sup>. The *miR-1/206/133* microRNA family comprises three gene clusters. Two of them – the *miR-1/133a* clusters – are abundantly expressed in the heart and skeletal muscle. The third cluster – *miR-206/133b* – is specifically expressed in skeletal muscle. Knock out studies demonstrate that constitutive deletion of *miR-206/133b* does not impair the vitality, development, or regeneration of skeletal muscle<sup>2</sup>. Both *miR-1/133a* clusters regulate cardiomyocyte differentiation in the embryonic heart by inhibiting smooth muscle-type genes<sup>3</sup>. Deletion of *miR-1/133a* leads to mitochondrial dysfunction in adult skeletal muscle<sup>4</sup> and an increased expression of the remaining closely related *miR-206/133b* cluster. This finding suggests that *miR-206/133b* compensates for the loss of the two *miR-1/133a* clusters. Thus, the role of the *miR-1/206/133* family in skeletal muscle remains to be elucidated. Therefore, this study focuses on the functional analysis of synergistic *miR-1/206/133* function during ontogenesis and in adult skeletal muscle of mammals. A tissue-specific deletion was deployed to knock out all clusters in murine musculature (tKO). Initial examination uncovered that a loss of *miR-1/206/133* in skeletal muscle results in respiratory failure, leading to neonatal lethality. Detailed analysis revealed a defect at the neuromuscular junctions (NMJs). Postsynaptic acetylcholine receptor (AChR) clusters showed an aberrant disturbed spatial organization as well as a reduction in their number. Conversely, early skeletal muscle differentiation was not affected. Transcriptome analysis was employed to identify target genes regulated by *miR-1/206/133*. Here, the NMJ-associated adapter protein CRK was identified as a functionally significant novel target of *miR-1/206/133*, which is synergistically regulated by both, *miR-1/206* and *miR-133*. A balanced CRK level appeared to be essential during NMJ development as well as in NMJ homeostasis in the adult stage. Furthermore, protein-protein interaction studies suggested that CRK binds the postsynaptic RAC1-GEF FARP1 downstream of the neuromuscular LRP4-MUSK-DOK7 complex. Elevated levels of CRK results in an increase of CRK-FARP1 interaction and consequently causing irregular RAC1 GTPase activity, manifested by impaired AChR cluster formation and homeostasis. In summary, this study demonstrates for the first time that *miR-1/206/133* are not essential for early muscle differentiation but are critical for NMJ formation and homeostasis. The *miR-1/206/133* family is a critical regulator of the DOK7-CRK-RAC1 signaling cascade and thus essential for AChR stabilization and anchoring in neonatal and adult skeletal muscle.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>II</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>III</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Funktion und Biogenese von microRNAs.....	1
1.2. Anatomie und Funktion der Skelettmuskulatur.....	5
1.3. Innervierung des Skelettmuskels .....	9
1.4. Aufbau und Funktion von CRK.....	14
1.5. Funktion und Regulation der kleinen GTPase-RAC1.....	16
1.6. Zielsetzung der Arbeit.....	18
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
2.1. Verwendete Software .....	20
2.2. Versuchstierhaltung.....	20
2.3. Generierung verwendeter Mauslinien .....	21
2.3.1. Verwendete <i>miR-1/206/133</i> Knock-out Mauslinien .....	21
2.3.2 Mäuse mit CRK Überexpression .....	23
2.4. Genotypisierung von Mäusen.....	25
2.5. Tierexperimentelle Methoden und Tötung.....	27
2.6. Histologische Untersuchung von Mausgewebe und Zellen .....	28
2.7. Kultivierung und Transfektion von immortalisierten Zelllinien .....	31
2.8. Muskelstammzellisolation aus adulter Skelettmuskulatur mittels FACS .....	31
2.9. Kultivierung und Proliferationsanalyse von primären Muskelstammzellen (MuSCs) .....	32
2.10. Molekularbiologische Methoden.....	33
2.11. miRNA Target prediction Analyse .....	44
2.12. Statistische Auswertung .....	44
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>45</b>
3.1. Validierung des <i>miR-1/206/133</i> Knock-outs in der Skelettmuskulatur .....	45
3.2. Kompensatorisches Potential und funktionelle Redundanz von <i>miR-1/206/133</i> .....	47

3.3. <i>miR-1/206/133</i> Verlust beeinflusst nicht die frühe Skelettmuskulaturentwicklung und Muskelstammzellendifferenzierung .....	50
3.4. <i>miR-1/206/133</i> Verlust führt zu neonataler Letalität durch eine gestörte NMJ-Bildung .....	60
3.5. CRK ist ein primäres Target von <i>miR-1/206/133</i> .....	64
3.6. Skelettmuskelspezifische Überexpression von CRK rekapituliert den neonatalen <i>miR-1/206/133</i> Knock-out Phänotyp .....	70
3.7. <i>miR-1/206/133</i> Defizienz im adulten Skelettmuskel führt zur gestörten NMJ-Homöostase .....	75
3.8. Induzierte skelettmuskelspezifische CRK Überexpression gleicht dem <i>adulten miR-1/206/133</i> Knock-out Phänotyp .....	83
3.9. CRK-Überexpression führt zur gesteigerten GEF-Interaktion und resultiert in erhöhter GTPase-Aktivität .....	86
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>93</b>
4.1. <i>miR-1/206/133</i> besitzen kompensatorisches Potential und sind funktionell redundant .....	93
4.2. <i>miR-1/206/133</i> Expression ist nicht essentiell für die frühe Skelettmuskelentwicklung, jedoch kritisch für die NMJ-Bildung.....	94
4.3. Der Verlust von <i>miR-1/206/133</i> führt nicht zur Entwicklung von BAT im Skelettmuskel .....	95
4.4. <i>miR-1/206/133</i> sind kritische Faktoren in der NMJ-Bildung und Homöostase.....	97
4.5. <i>miR-1/206/133</i> binden an konservierte Bindestellen in der <i>Crk</i> mRNA .....	102
4.6. Die Funktionen von <i>miR-1/206/133</i> sind komplex und zum Teil stadiumsspezifisch.....	104
4.7. <i>miR-1/206/133</i> reguliert über das CRK Level RAC1 abhängiges AChR-Clustering .....	106
4.8. Fazit und Ausblick .....	109
<b>Referenzen.....</b>	<b>111</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>121</b>
Ergänzende Abbildungen .....	121
Ergänzende Tabellen .....	128
Schematische Plasmidkarten .....	129
<b>Danksagung.....</b>	<b>131</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.1.:</b> Biogenese von tierischen microRNAs.	2
<b>Abbildung 1.1.1:</b> Lokalisation und Expression von <i>miR-1/206/133</i> .	4
<b>Abbildung 1.2.:</b> Schematische Abbildung der Struktur und des Feinaufbaus der Skelettmuskulatur.	7
<b>Abbildung 1.3.:</b> Schematische Abbildung der Entwicklung und des Aufbaus von neuromuskulären Synapsen (NMJ).	11
<b>Abbildung 1.3.1:</b> Vereinfachte Darstellung der molekularen Prozesse während der postsynaptischen Differenzierung.	13
<b>Abbildung 1.4.:</b> Struktur und Funktion von CRK.	15
<b>Abbildung 1.5.:</b> Schematische Darstellung des GTPasen-Zyklus und der Aktivierung von kleinen GTPasen.	17
<b>Abbildung 3.1.1.:</b> Generiertes <i>miR-1/133/206</i> Knock-out Mausmodell (tKO).	46
<b>Abbildung 3.1.2.:</b> Analyse der Knock-out Effizienz im tKO Mausmodell im Alter E18.5.	47
<b>Abbildung 3.2.1.:</b> Die Cluster <i>miR-1/206/133</i> weisen eine hohe sequenzielle Redundanz auf, implizieren überlappenden Funktionen, sowie ein kompensatorische Potential füreinander.	49
<b>Abbildung 3.3.1.1.:</b> Analyse von <i>miR-1/206/133</i> in der frühen Myogenese.	51
<b>Abbildung 3.3.1.2.:</b> Äußere Erscheinung, Tiergröße und Gewicht im Stadium E18.5 nach <i>miR-1/206/133</i> Verlust.	52
<b>Abbildung 3.3.1.3.:</b> Wildtypische Entwicklung der Skelettmuskulatur nach Verlust von <i>miR-1/206/133</i> im Stadium E18.5.	53
<b>Abbildung 3.3.1.4.:</b> Der Verlust von <i>miR-1/206/133</i> Cluster in MuSCs führt zu keiner Beeinträchtigung der Differenzierungsleistung <i>ex vivo</i> .	55
<b>Abbildung 3.3.2.1.:</b> Deletion von <i>miR-1/206/133</i> in MuSC induziert nicht die Entwicklung von adipogen Zellen.	57
<b>Abbildung 3.3.3.1.:</b> Deletion von <i>miR-1/133a</i> oder <i>miR-1/206/133</i> führt zu keiner gesteigerten Expression von MEF2A oder des <i>Dlk1-Dio3</i> Genclusters im Stadium E18.5.	59
<b>Abbildung 3.4.1.:</b> Respiratorische Störung nach <i>miR-1/206/133</i> Deletion.	61
<b>Abbildung 3.4.2.:</b> Verlust von <i>miR-1/206/133</i> im Skelettmuskel resultiert in einer gestörten NMJ-Bildung.	62
<b>Abbildung 3.4.3.:</b> Signifikante Anreicherung von Gensets assoziiert mit der NMJ-Ausbildung in <i>miR-1/206/133</i> tKO.	64
<b>Abbildung 3.5.1.1.:</b> CRK ist NMJ-assoziiert und weist eine erhöhte Expression in <i>miR-1/206/133</i> Knock-out Tieren auf.	66

<b>Abbildung 3.5.2.1.:</b> Konservierung und Lokalisation der <i>miR-1/206</i> und <i>miR-133</i> Bindestellen in der <i>Crk</i> mRNA.	68
<b>Abbildung 3.5.2.2.:</b> Evaluierung vorhergesagter <i>miR-1/206</i> und <i>miR-133</i> Bindesequenzen in <i>Crk</i> mRNA mittels Luciferase Reporter Assay.	69
<b>Abbildung 3.6.1.1.:</b> Validierung des Transgen-basierten Mausmodells zur CRK Überexpression <i>in vivo</i> .	71
<b>Abbildung 3.6.2.1.:</b> Validierung des Crk-SPH Mausmodells zur CRK Überexpression <i>in vivo</i> .	72
<b>Abbildung 3.6.3.1.:</b> Phänotypische Analyse nach skelettmuskelspezifischer CRK Überexpression <i>in vivo</i> .	74
<b>Abbildung 3.7.1.1.:</b> Effizienz verschiedener induzierbarer Cre-Recombinasesysteme in adulten Muskelfasern.	76
<b>Abbildung 3.7.2.1.:</b> Austestung und Analyse des induzierbaren <i>miR-1/206/133</i> Knock-out Mausmodells.	78
<b>Abbildung 3.7.2.2.:</b> Molekulare Analyse nach <i>miR-1/206/133</i> Verlust im adulten Skelettmuskel.	80
<b>Abbildung 3.7.2.3.:</b> Physiologische und histologische Analyse nach <i>miR-1/206/133</i> Verlust im adulten Skelettmuskel.	82
<b>Abbildung 3.8.1.:</b> Analyse des adulten Skelettmuskels nach CRK Überexpression.	85
<b>Abbildung 3.9.1.:</b> Analyse des CRK Interaktoms nach Verlust von <i>miR-1/206/133</i> .	89
<b>Abbildung 3.9.2.:</b> CRK Überexpression führt zur gesteigerter RAC1-Aktivierung und resultiert im gestörten AChR-Clustering	91
<b>Abbildung 4.8.:</b> Arbeitsmodell der <i>miR-1/206/133</i> vermittelten Regulation von CRK und der nachfolgenden molekularen <i>downstream</i> Effekte an der neuromuskulären Synapse.	110
<b>Abbildung 5.1.:</b> Generierung verwendeter <i>miR-1/206/133</i> Mauslinien.	121
<b>Abbildung 5.2.:</b> Herstellung der verwendeten CRK Überexpressionslinien.	122
<b>Abbildung 5.3.:</b> Expression von <i>Crk-L</i> nach <i>miR-1/206/133</i> Knock-out.	122
<b>Abbildung 5.4.:</b> Keine Änderung des HDAC4 Levels nach Verlust von <i>miR-1/206/133</i> .	123
<b>Abbildung 5.5.:</b> Lokalisation der <i>miR-1/206</i> und <i>miR-133</i> Bindestellen in der <i>Crk</i> mRNA.	124
<b>Abbildung 5.6.:</b> Genotypisierung von Crk-tg Mäusen.	125
<b>Abbildung 5.7.:</b> Genotypisierung von Crk-SPH Mäusen.	125
<b>Abbildung 5.8.:</b> Phänotypische Untersuchung und molekulare Analyse von adulten <i>miR-1/206/133</i> Knock-out Tieren (adult tKO).	126
<b>Abbildung 5.9.:</b> Analyse der koordinativen Fähigkeiten von <i>miR-1/133</i> dKO Mäusen.	127

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Software	20
<b>Tabelle 2:</b> Übersicht verwendeter Cre-Rekombinase Reporter Mauslinien	21
<b>Tabelle 3:</b> Übersicht verwendeter <i>miR-1/206/133</i> Knock-out Mauslinien	21
<b>Tabelle 4:</b> Übersicht generierter Mäuse mit CRK Überexpression	23
<b>Tabelle 5:</b> Verwendete Primer zur Amplifikation des mmu- <i>Crk</i> ORF	24
<b>Tabelle 6:</b> Verwendete <i>Crk</i> sgRNA PCR-Sequenzen	24
<b>Tabelle 7:</b> Übersicht verwendeter Primer zur Genotypisierung der verwendeten Mauslinien	25
<b>Tabelle 8:</b> Übersicht verwendeter Primerkombinationen und Annealing Temperaturen	26
<b>Tabelle 9:</b> PCR Standardprogramm	26
<b>Tabelle 10:</b> Verwendete Primärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen	29
<b>Tabelle 11:</b> Verwendete Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen	29
<b>Tabelle 12:</b> Fluorochrom-markierte Proteine für Immunfluoreszenzfärbungen	29
<b>Tabelle 13:</b> Fluorochrom-markierte Proteine zur <i>whole-mount</i> Diaphragmafärbung	30
<b>Tabelle 14:</b> Verwendete immortalisierte Zelllinien	31
<b>Tabelle 15:</b> Verwendete Zellkulturmedien	31
<b>Tabelle 16:</b> Verwendete Antikörper zur APC-Selektion	32
<b>Tabelle 17:</b> Verwendete TaqMan-Sonden	34
<b>Tabelle 18:</b> Verwendete fluorochrom-markierte Proteine und primäre Antikörper	36
<b>Tabelle 19:</b> Verwendete primäre Antikörper im Western Blot	38
<b>Tabelle 20:</b> Verwendete sekundäre Antikörper im Western Blot	38
<b>Tabelle 21:</b> Transfizierte Plasmide im AChR-clustering assay	41
<b>Tabelle 22:</b> Verwendete Oligonukleotide mit miR-Bindesequenzen in 3'UTR von <i>Crk</i>	41
<b>Tabelle 23:</b> Verwendete Plasmide zur <i>WMISH</i>	42
<b>Tabelle 24:</b> Skelettmuskelspezifische Deletion von <i>miR-1/206/133</i> resultiert in neonataler Letalität.	128
<b>Tabelle 25:</b> tKO-Tiere weisen nahezu erwartete Abundanz im Stadium E18.5 auf.	128
<b>Tabelle 26:</b> Skelettmuskelspezifische CRK Überexpression ( <i>Crk</i> -SPH) resultiert in neonataler Letalität.	128

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
ACC	<i>Acceleration</i> (Beschleunigung)
ACh	Acetylcholin
AChR	Acetylcholin Rezeptor
AGO	Argonautenproteine
AGR	Agrin
AGRN	Agrin
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
BAT	Braunes Fettgewebe ( <i>brown adipose tissue</i> )
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
BTX	Bungarotoxin
bzw.	beziehungsweise
C2	C2C12-Zellen
CD31	<i>Cluster of Differentiation 31</i>
CD45	<i>Cluster of Differentiation 45</i>
cDNA	komplementäre DNA
cKO	konstitutiver Knock-out
CMS	kongenitale myasthene Syndrom (Congenital myasthenic syndromes)
Cre	<i>causes recombination Recombinase</i>
CRK	<i>C T10 regulator of a tyrosine kinase</i>
ctrl	Kontrolle
CTX	Kardiotoxin
dCAS9	<i>Endonuclease Dead CRISPR associated protein 9</i>
ddH <sub>2</sub> O	destilliertes Reinstwasser
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region 8</i>
DIO3	<i>Type III iodothyronine deiodinase</i>
dKO	Doppel Knock-out ( <i>miR-1/133a</i> Knock-out)
DLK1	<i>Delta-like homolog 1</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOK7	<i>Docking Protein 7</i>
DOX	Doxycyclin
E	Embryonales Stadium
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDL	Extensor digitorum longus
En1	<i>Engrailed-1</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>
F-Aktin	Filamentöses Aktin
FARP1	<i>FERM, ARH/RhoGEF And Pleckstrin Domain Protein 1</i>
FC	<i>Fold Change</i> (X-facher Anstieg)

FCS	Fötale Kälberserum
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
G	Gramm
G-Aktin	Globuläres Aktin
GAP	<i>GTPase-accelerating Protein</i>
GATA4	<i>GATA Binding Protein 4</i>
GDP	<i>Guanosine diphosphate</i>
GEF	<i>Guanosine triphosphate Exchange Factor</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GSEA	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
GTE <sub>x</sub>	Genotype-Tissue Expression
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEK	Human Embryonic Kidney-Zellen
HPR	Horseradish Peroxidase
HS	Pferdeserum
HSA	human skeletal $\alpha$ -actin Gen
IP	Immunpräzipitation
IRES	internal ribosomal entry site
LacZ	$\beta$ -Galactosidase
LB	Lysogeny broth
LRP4	<i>Low-density lipoprotein receptor-related Protein 4</i>
MEF2	<i>Myocyte Enhancer Factor-2</i>
Mg	Milligramm
MG	Myasthenia gravis
Min	Minute
miR	microRNA
miRNA	microRNA
mM	Millimolar
mmu	Mus musculus
MRFs	<i>Myogenic regulatory factors</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
MuSC tKO	Muskelstammzell-spezifischer tKO ( <i>miR-1/206/133</i> Knock-out)
MuSCs	Muskelstammzellen
MUSK	<i>Muscle-specific kinase</i>
Myf5	<i>Myogenic factor 5</i>
MyHC	<i>Myosin heavy chain</i>
MyLC1	<i>Myosin light chain 1</i>
MyoD	<i>Myoblast determination protein 1</i>
neo	Neomycin
ng	Nanogramm
Nkx2	NK2 homeobox 1
nm	Nanometer
NMJ	Neuromuskuläre Synapse (neuro-muscular junction)
ns	nicht signifikant
ORF	Offenes Leseraster



P	Postnataler Tag
Pax	<i>Paired box protein</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PBT	<i>Phosphate-buffered saline Tween</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PGC-1 $\alpha$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor <math>\gamma</math> coactivator 1<math>\alpha</math></i>
PGK	<i>Phosphoglycerate kinase I Promoter</i>
PLA	<i>Proximity Ligation Assay</i>
PPAR $\gamma$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor <math>\gamma</math></i>
PRDM16	<i>PRD1-BF-1-RIZ1 homologous domain containing protein-16</i>
pre-miRNA	<i>Precursor-microRNA</i>
pri-miRNA	Primäre microRNA
PS	Penicillin/Streptomycin
RAC1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RAPSN	<i>Receptor Associated Protein Of The Synapse</i>
Rcf	Relative Zentrifugalbeschleunigung
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Quantitative Echtzeit-PCR
Sca1	<i>Stemcell antigen-1</i>
SDH	Succinat dehydrogenase
sgRNA	<i>single guide RNA</i>
SH2	<i>Src-homology 2 domain</i>
SH3	<i>Src-homology 3 domain</i>
sKO	single knock-out ( <i>miR-206/133b</i> Knock-out)
snRNA	kleine nukleäre Ribonukleinsäure
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
Sol	Musculus soleus
SPH	SunTag-p65-HSF1
SRF	<i>Serum Response Factor</i>
TA	Tibialis anterior
TAM	Tamoxifen
tKO	Triple knock-out ( <i>miR-1/206/133</i> Knock-out)
TRBP	<i>Trans-activation-responsive RNA-binding Protein</i>
tSC	terminale Schwann-Zelle
UCP1	<i>Uncoupling protein 1</i>
UTR	untranslatierter Bereich
v/v	Volumenprozent
WGA	<i>Wheat Germ Agglutinin</i>
WMISH	<i>Whole Mount In Situ Hybridization</i>

# 1. Einleitung

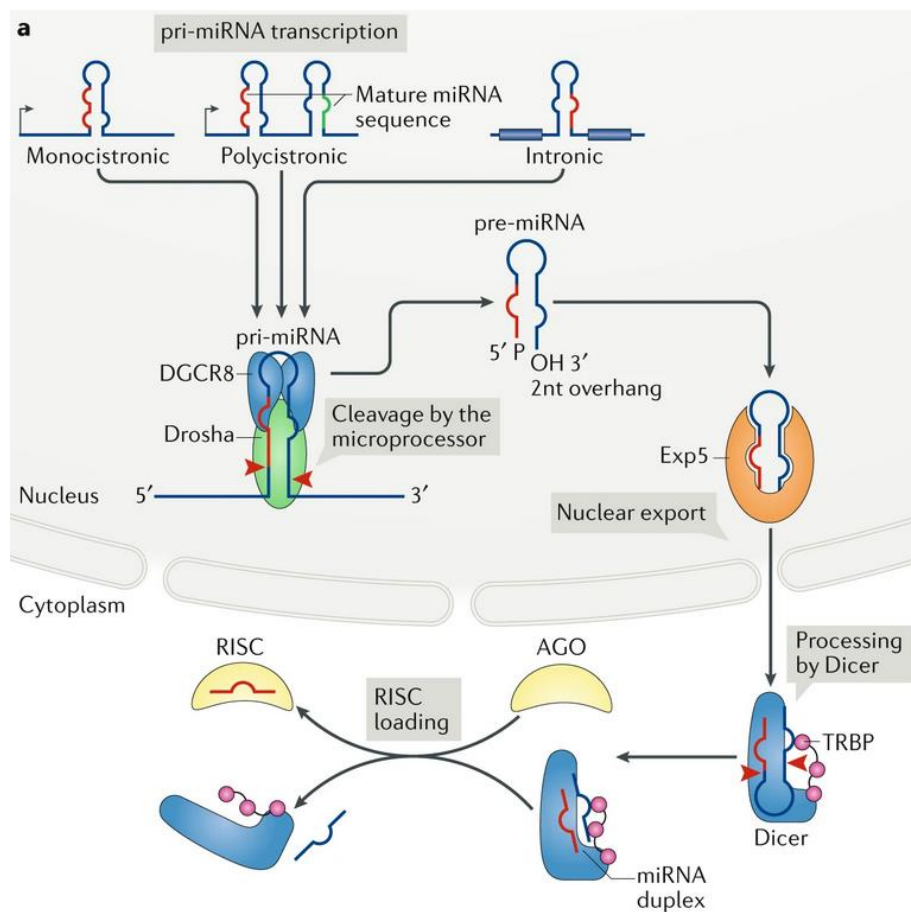
## 1.1. Funktion und Biogenese von microRNAs

Die Funktion von Ribonukleinsäuren (RNAs) umfasst nicht nur die Umsetzung von genetischer Information in Proteine, sondern auch regulatorische Prozesse. Sogenannte nichtkodierende RNAs existieren in den verschiedensten Formen. Diese reichen von zirkulären RNAs, zu microRNAs bis hin zu langen nicht kodierenden RNAs. Ihre Erforschung eröffnet einen Einblick in bislang unbekannte komplexe regulatorische Netzwerke und ist essentiell zum Verständnis dieser neuen Ebene der Regulation von Genen.

Die ersten microRNAs (miRs) wurde in den 1990er Jahren in *Caenorhabditis elegans* identifiziert. Dies Entdeckung eröffnete ein bis zu diesem Zeitpunkt völlig unbekanntes Feld in der molekularen Biologie, das der posttranskriptionellen Genregulation durch kleine nicht Protein-kodierende RNA Moleküle<sup>5,6</sup>. In den darauffolgenden Jahren wurden in allen gängigen tierischen Modellorganismen, sowohl in Invertebraten als auch in Vertebraten, microRNAs identifiziert<sup>7,8</sup>. MicroRNAs zählen mit einer Länge von bis zu 22 Nukleotiden zu den kleinen nicht kodierenden RNAs. Ihre primäre Funktion liegt in der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression<sup>1</sup>. Durch komplementäre Basenpaarung mit mRNA Molekülen können microRNAs, die Proteinexpression ihrer Zielgene negativ regulieren. Die gebundenen mRNA Moleküle werden durch einen der folgenden Prozesse oder durch eine Kombination in ihrer Funktion inhibiert: (1) endonukleolytische Zerteilung des mRNA-Stranges, (2) Destabilisierung durch Verkürzung des mRNA PolyA-Schwanzes, (3) Verminderung der ribosomalen Translation der mRNAs<sup>9-11</sup>. Im Genom können sich microRNAs auf beiden DNA-Strängen befinden und sind sowohl in kodierenden als auch in nichtkodierenden genomischen Bereichen lokalisiert. Sie können sowohl monocistronisch (als einzelnes Gen), polycistronisch (als microRNA Gen-Cluster) oder intronisch (in Introns eines Wirtsgens) vorliegen (Abb. 1.1.)<sup>1,12</sup>.

Die Biogenese von microRNAs beginnt mit ihrer Transkription, meist durch RNA-Polymerase II und seltener durch RNA-Polymerase III. Die Expression von microRNA-Genen wird durch eine Vielzahl unterschiedlicher transkriptioneller Regulatoren, RNA bindender Proteine und epigenetische Mechanismen kontrolliert. Dies geschieht meist Zell- und Entwicklungsstadiums-spezifischer Weise. Das bei der Transkription gebildete pri-miRNA Transkript wird durch einen Proteinkomplex bestehend aus Drosha und DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region 8*) und weiteren Komponenten wie RNA Helikasen p68/p72 weiter mikroprozessiert. Durch Spaltung der pri-miRNA entsteht die pre-miRNA (*precursor-miRNA*). Mit Hilfe von Exportin 5 und Ran GTP wird diese aus dem Kern in das Zytoplasma exportiert. Die weitere Prozessierung der haarnadelförmigen pre-miRNA erfolgt zunächst durch RNAase III Dicer. Der doppelsträngige 20-25 Basenpaar lange microRNA Duplex wird nun in RISC (*RNA-induced silencing complex*) integriert. Er besteht aus Dicer, AGO (*Argonaute*) Protein, TRBP (*trans-activation-responsive*

*RNA-binding protein*) und einem reifen microRNA Strang. Der zweite Strang wird abgebaut. Die entstandene reife microRNA kann nun ihre Funktion erfüllen und an entsprechende Ziel mRNA Moleküle binden<sup>13-15</sup>.



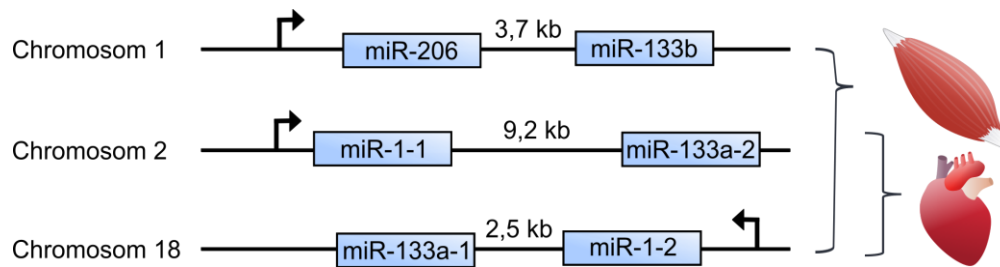
**Abbildung 1.1.: Biogenese von tierischen microRNAs.** MicroRNAs können mono-, polycistronisch oder in intronischen Regionen lokalisiert sein. Nach ihrer Transkription werden die entstandenen haarnadelförmigen primären microRNA (pri-microRNA) Moleküle durch den Mikroprozessorkomplex bestehend aus Drosha und DGCR8 (*DiGeorge critical region 8*) gespalten. Es entsteht ein pre-miRNA (*precursor-miRNA*) Molekül das durch Exportin 5 (Exp5) gebunden und in das Zytoplasma transportiert wird. Dort wird das pre-miRNA Molekül durch Dicer weiterprozessiert. Es entsteht ein miRNA Duplex. Dieses wird mit Dicer, TRBP (*trans-activation-responsive RNA-binding protein*) und einem AGO (*Argonaute*) zu einem RISC-Ladekomplex (*RNA-induced silencing complex*) assembliert. Das AGO-Protein assoziiert zu einem der beiden Stränge. Dies führt zur Bildung des RISC und zur Degradierung des zweiten verbleibenden Stranges. Abbildung modifiziert aus<sup>10</sup>.

Die Watson-Crick Basenpaarung mit der entsprechende miR-Ziel mRNA ist nicht völlig komplementär und stark abhängig von der am 5' Ende gelegenen Seed-Sequenz. Diese befindet sich zwischen der zweiten und siebten Base am 5' Ende der microRNA und trägt wesentlich zur

Spezifität der mRNA-microRNA Bindung bei <sup>16</sup>. In ihrer regulatorischen Funktion scheinen microRNAs bevorzugt an 3' UTRs (3' untranslated regions) ihrer Ziel mRNAs zu binden. Es konnte zudem gezeigt werden, dass durch das Auftreten mehrere microRNA-Bindestellen ihr regulatorischer Effekt um ein Vielfaches verstärkt werden kann <sup>17, 18</sup>. Zurzeit sind in der microRNA Datenbank *miRBase* 2654 humane microRNA gelistet, ihre tatsächliche Zahl wird jedoch um einiges höher eingeschätzt <sup>19-21</sup>. Momentane Schätzungen gehen davon aus, dass etwa 20 bis 30 % der im menschlichen Genom befindlichen Gene durch microRNAs reguliert werden können <sup>22, 23</sup>. Unter den nicht kodierenden RNAs sind die grundlegenden Mechanismen mit denen microRNAs Zielgene posttranskriptionell regulieren evolutionär betrachtet oft konserviert <sup>24</sup>. Interessanterweise gibt es auch eine Korrelation zwischen der Anzahl an microRNA Genen in einem Organismus und seiner generellen Komplexität. Es scheint, dass evolutionär betrachtet während der Expansion der bilateralsymmetrischen Tiere (Bilateria) und der vorschreitenden Entwicklung von Vertebraten, bis hin zur Entwicklung von Plazentatieren (Eutheria) eine ständige Zunahme der Anzahl von microRNA Genen im Genom stattfand <sup>25</sup>. Es ist möglich das microRNAs durch ihre zusätzlichen regulatorischen Eigenschaften ihren Beitrag in der Zunahme an Komplexität während dieser Schritte der Evolution geleistet haben <sup>26, 27</sup>.

#### **1.1.1. Skelett- und herzmuskelspezifische microRNA Familie *miR-1/206/133***

Die gewebespezifische Expression von Genen spielt eine fundamentale Rolle während der Entwicklung und Homöostase von Geweben <sup>28, 29</sup>. Viele der bisher identifizierten microRNAs weisen ebenfalls ein gewebespezifisches Expressionsmuster auf <sup>30, 31</sup>. Eine Gruppe von microRNAs, die ihre höchste Abundanz in der gestreiften Muskulatur aufweisen werden als myomiRs (*myos*, griechisch: Muskel und miR = microRNA) bezeichnet <sup>30, 32</sup>. Zu dieser Gruppe zählen unter anderen alle sechs Mitglieder der *miR-1/206/133* Familie. Sie besteht aus microRNAs *miR-1*, *miR-133a*, *miR-133b* und *miR-206*. Im murinen und humanen Genom sind diese microRNAs paarweise in drei Clustern organisiert. Jedes dieser Cluster verfügt über einen eigenen Promotor. Alle Mitglieder der *miR-1/206/133* Familie werden bicistronisch exprimiert (Abb. 1.1.1.) <sup>33</sup>. Schätzungsweise ist die Hälfte aller microRNAs in Clustern organisiert und wurden zumindest initial polycistronisch exprimiert. In den meisten Fällen besitzen polycistronische microRNAs das gleiche Expressionsmuster, wobei sich ihr relatives Expressionslevel unterscheiden kann <sup>34</sup>.



**Abbildung 1.1.1.: Lokalisation und Expression von *miR-1/206/133*.** Das skelettmuskelspezifisch exprimierte *miR-206/133b* Cluster ist auf dem Mausechromosom 1 lokalisiert. Das *miR-1-1/133a-2* Cluster liegt auf dem Mausechromosom 2. Das *miR-1-2/133a-1* Cluster befindet sich in der *antisense* Richtung zwischen zwei Exons des Genes *Mindbomb1* auf Chromosom 18. Beide *miR-1/133a* Cluster werden im Herz- und Skelettmuskel exprimiert. Alle drei microRNA Cluster verfügen über einen eigenen Promoter. *MiR-1-1/133a-2* und *miR-1-2/133a-1* werden im Herz- und Skelettmuskel exprimiert. Das *miR-206/133b* Cluster wird lediglich in der Skelettmuskulatur exprimiert. kb = Kilobasen. Abbildung nach <sup>35-37</sup>.

Im menschlichen Genom befinden sich die drei *miR-1/206/133* Cluster auf Chromosom 20, 18 und 6. In der Maus sind sie auf Chromosom 1, 2 und 18 lokalisiert. Trotz der Spezies-abhängigen Unterschiede in der Lokalisation, gleichen sich sowohl Organisation, als auch die Sequenz der reifen microRNAs der drei Cluster exakt. *MiR-1* zählt beispielsweise zu den evolutionär konserviertesten microRNAs überhaupt, mit identischer Sequenz der reifen microRNA in Nematoden und im Menschen <sup>7, 38</sup>. *MiR-1-1/133a-2* und *miR-1-2/133a-1* bilden in Maus und Mensch zwei der drei *miR-1/206/133* Cluster und werden im Herz- und Skelettmuskel exprimiert. Das dritte Cluster besteht aus *miR-206* und *-133b* und ist lediglich in der Skelettmuskulatur stark exprimiert, vor allem in langsamen, Mitochondrien-reichen Muskelfasern <sup>2, 30</sup>.

Die Expression der Cluster wird durch kardiale und skelettmuskelspezifische Transkriptionsfaktoren, sogenannte MRFs (myogenic regulatory factors) reguliert. Zu den *miR-1/206/133* Loki regulierenden Proteinen zählen GATA4 (*Gata-binding protein 4*), NKX2.5 (*NK2 homeobox 5*), Myocardin, SRF (*Serum response factor*), MEF2 (*Myocyte enhance factor 2*), MYOD, MYF5 (*Myogenic factor 5*) und weitere MRFs <sup>33, 39-41</sup>. Alle microRNAs der *miR-1/206/133* Cluster scheinen wiederum ihre Expression durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus selbst zu regulieren. Dies wird über Suppression aktivierender Faktoren wie MEF2 und SRF vermittelt <sup>4, 40, 42-44</sup>. Allerdings konnten bisher hier nicht alle regulatorischen Zusammenhänge und Regelkreise aufgeklärt werden.

Es existieren bereits zahlreiche Studien in denen die funktionelle Rolle von *miR-1/206/133* in der gestreiften Muskulatur untersucht wurde. In verschiedenen *loss of function* Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass diese miRNAs allem Anschein nach eine wichtige Rolle während der Muskelentwicklung und Homöostase innehaben. Während der Herzentwicklung scheint die Expression von *miR-1* essentiell zu sein. Mäuse mit einem vollständigen *miR-1* Verlust versterben 10 Tage nach der Geburt aufgrund eines Herzentwicklungsdefektes. Die Skelettmuskulatur

erscheint dagegen funktional und strukturell normal entwickelt<sup>45</sup>. Des Weiteren scheint der Verlust von beiden *miR-133a* microRNAs ebenfalls zu letalen Herzdefekten zu führen<sup>37</sup>. Homozygote Inaktivierung der beiden *miR-1/133a* Cluster führt bereits während der Embryogenese zu einer initialen Fehlentwicklung der Herzens. Dies führt zu einem früh-embryonalen Tod der Tiere<sup>3</sup>. Die beiden Gencluster scheinen eine überlappende Funktion zu haben, da der Knock-out von nur einem der beiden *miR-1/133a* Cluster lediglich zu einer schwachen Veränderung der elektrophysiologischen Eigenschaften des adulten Herzens führt<sup>46</sup>. Auch im Skelettmuskel scheint es eine überlappende Rolle der beiden *miR-1/133* Cluster zu geben. Der skelettmuskelspezifische Verlust beider *miR-1/133* Cluster führt zur Repremierung des direkten Zielgens MEF2A, was wiederum das für die Expression von vielen mitochondrialen Genen wichtige *Dlk1-Dio3*-Gencluster supprimiert. Diese molekularen Veränderungen resultiert letztendlich in einer gestörten mitochondrialen Funktion des adulten Skelettmuskels<sup>4</sup>. Der Verlust von *miR-206* hat wiederum keinen Effekt auf die Skelettmuskulatur. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass *miR-206* Deletion im Hintergrund einer ALS (Amyotrophic lateral sclerosis) Krankheitsmodells eine Funktion in der Regeneration von neuromuskulären Endplatten zu haben scheint<sup>47</sup>. Die Deletion des *miR-206/133b* Clusters, welches als einziges der drei *miR-1/206/133* Cluster exklusiv in der Skelettmuskulatur exprimiert wird, resultiert in keiner Veränderungen der Muskulatur<sup>2</sup>. Es fehlen direkte Evidenzen, was ein Verlust aller *miR-1/206/133* Cluster im Skelettmuskel bewirkt. Daher müssen zukünftige Experimente zeigen, ob die Hypothese zutrifft, dass diese Cluster grundlegend wichtig für die Entwicklung der Skelettmuskulatur sind oder auch eine andere, bislang unbekannte synergistische Funktion besitzen. Für eine solche *loss of function* Untersuchung muss ein konditioneller Knock-out des gesamten *miR-1/206/133* Clusters in der Skelettmuskulatur vorgenommen und analysiert werden.

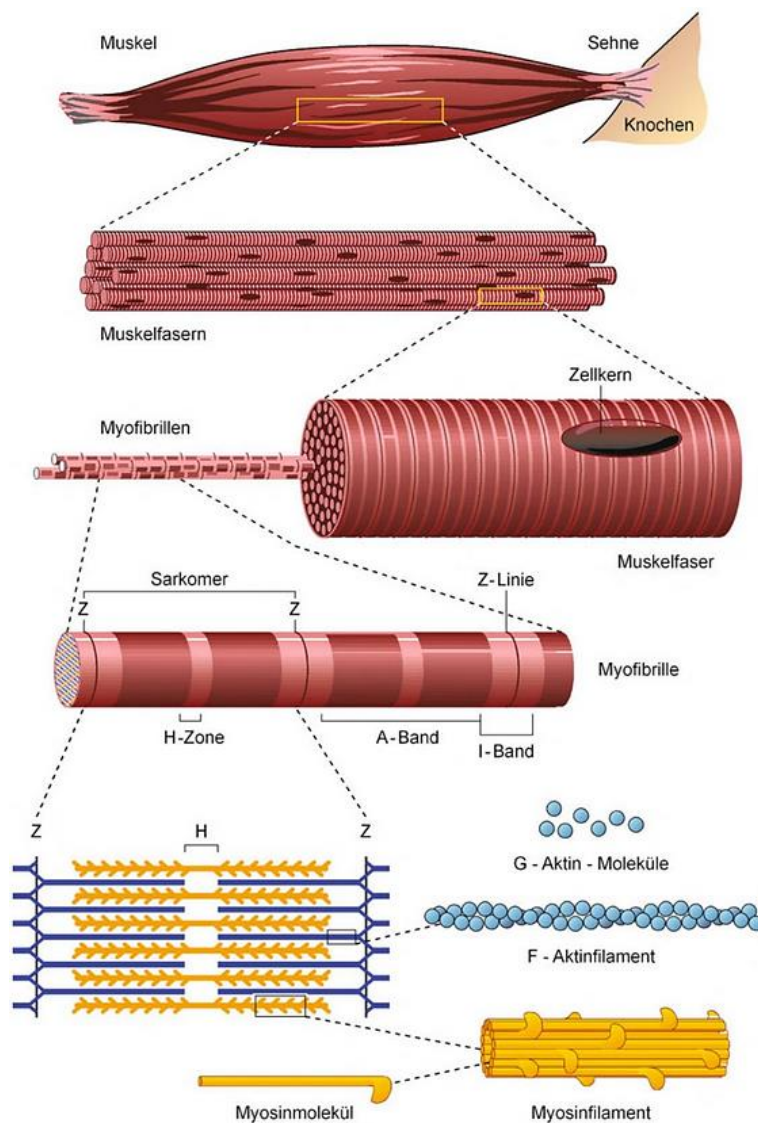
## 1.2. Anatomie und Funktion der Skelettmuskulatur

Gerichtete Bewegungen sind wesentlich für das Leben und Fortbestehen tierischer Lebensformen. Im Laufe der Evolution entwickelten sich aus primitiven Formen der aktiven Bewegung immer spezialisiertere Bewegungsabläufe. Der komplexe Bewegungsapparat des Menschen besteht unter anderem aus der Skelettmuskulatur und ist unerlässlich für Fortbewegung, Kommunikation, Nahrungsaufnahme und Atmung. Es können drei distinkte Typen kontraktiles Gewebes morphologisch und funktionell unterschieden werden: glatte Muskulatur, Herzmuskulatur und Skelettmuskel. Glatte Muskulatur und der Herzmuskel sind nicht der willkürlichen Kontrolle überlassen, während die Skelettmuskulatur aktiv gesteuert werden kann. Der Skelettmuskel macht etwa 40 % des durchschnittlichen Körpergewichtes aus und wird über das periphere Nervensystem gesteuert. Durch Arterien werden Sauerstoff und Nährstoffe zu den einzelnen Muskeln transportiert. Venen transportieren wiederum im Körperkreislauf das nun

sauerstoffärmere Blut. Die einzelnen Skelettmuskeln sind über bindegewebige Sehnen am Skelett befestigt und umhüllt durch das Epimysium. Der weitere Feinaufbau des Skelettmuskels ist hierarchisch gegliedert. Jeder Muskel besteht aus zahlreichen Faszikeln (Muskelfaserbündel), jeweils umgeben vom Perimysium. Die syncytialen Muskelfasern sind wiederum von dem Sarkolemma umhüllt. Das Sarkolemma besitzt zahlreiche transversale Tubuli (T-Tubuli). Die mehrkernigen Myotuben, welche aus fusionierten Myoblasten bestehen, setzen sich ihrerseits aus hunderten parallel zur Muskellängsachse verlaufenden Myofibrillen zusammen<sup>48</sup>.

In ihnen befinden sich die kleinsten kontraktile Einheiten des Muskels, die Sarkomere. Diese sind etwa 23 µm lang und bestehen aus einem A-Band und I-Band. Diese beiden Kompartimente geben ihnen bei der Betrachtung unter polarisiertem Licht ein quergestreiftes Erscheinungsbild. Das Ende eines Sarkomer wird durch die Z-Linie definiert (Abb. 1.2.). Die I-Bande besteht aus Aktinfilamenten, während die A-Banden aus Myosinfilamenten bestehen. Die H-Zone ist der Bereich in dem diese beiden Kompartimente im peripheren Bereich überlappen, während in der mittleren Region lediglich Myosinfilamente vorliegen. Die Aktinfilamente sind jeweils an der Z-Linie verankert. Das sogenannte *Sliding filament* Model wurde 1954 von zwei Forschergruppen (Andrew Huxley, Rolf Niedergerke und Hugh Huxley, Jean Hanson) aufgestellt und beschreibt den Prozess, der während einer Muskelkontraktion stattfindet<sup>49</sup>.

Während der Kontraktion eines Muskels kommt es zur Verkürzung der einzelnen Sarkomere. Diese Verkürzung resultiert aus der Verschiebung von Aktin- und Myosinfilamenten ineinander. Molekular betrachtet beruht diese Interaktion auf der Bindung von Myosin an Aktinfilamenten. Myosin fungiert als Motorprotein zum Antrieb der Filamentverschiebung. Myosin hydrolysiert hierfür ATP, was die Energie für diese Bewegung liefert<sup>50</sup>. Die *Sliding filament* Theorie erklärt den molekularen Mechanismus der Muskelkontraktion, der für alle muskelgesteuerten Bewegungen essentiell ist (Abb. 1.2.).



**Abbildung 1.2.: Schematische Abbildung der Struktur und des Feinbaus der Skelettmuskulatur.** Die Skelettmuskulatur besteht aus Bündeln langer mehrkerniger Zellen (Muskelfasern), welche sich durch den syncytialen Zusammenschluss einzelner reifer Myoblasten bilden. Jede Muskelfaser enthält zahlreiche Myofibrillen. Diese bestehen wiederum aus aneinander gereihten Sarkomeren. Sarkomere bilden die kleinste kontraktile Einheit des Skelettmuskels. Sie bestehen aus H-Zone, A-Band, I-Band und werden durch die Z-Linien begrenzt. Sarkomere sind als sich wiederholende Einheiten aufgebaut. Während der Muskelkontraktion kommt es zu ihrer Verkürzung aufgrund der Ineinanderschiebens von Aktin- und Myosinfilamenten. (F-Aktinfilamente = filamentöse Aktinfilamente; G-Aktin = globuläres Aktin). Abbildung aus <sup>48</sup>.

### 1.2.1. Entwicklung der Skelettmuskulatur

Der Skelettmuskel entwickelt sich im Laufe der Embryogenese aus dem paxialen Mesoderm. Das paxiale Mesoderm bildet im weiteren Verlauf der Entwicklung das präsomitische Mesoderm, aus dessen anterioren Bereich sich die Somiten entwickeln. Die sich formierenden Somiten sind segmental und paarweise, in der Längsachse des Embryos verlaufend aufgebaut <sup>51, 52</sup>.

Das präsomitische Mesoderm bildet unter dem Einfluss der Segmentalen Uhr die Somiten, durch einen oszillierend verlaufenden "clock and wave" Mechanismus. Durch das Entstehen von periodischen Pulsen von Notch-, FGF- und Wnt-Signaling, werden nach und nach die einzelnen Somiten entlang der anteroposterior Achse gebildet <sup>53</sup>. Nach der Bildung der Somiten kommt es entlang der dorsoventralen Achse zur Bildung des dorsal gelegenen Dermomyotoms und des



ventral lokalisierten Sklerotoms. Aus dem Sklerotom gehen im weiteren Verlauf der Entwicklung das Achsenskelett und die Sehnen hervor. Aus dem Dermomyotom bilden sich die Skelettmuskulatur, braunes Fett (*brown adipose tissue*, BAT) und Teile der Haut des Rückens. Braunes Fett und Skelettmuskel haben somit den selben Ursprung in der Entwicklung. Jedoch unterscheidet sich während der weiteren Differenzierung das Transkriptom der jeweiligen Vorläuferzellen stark<sup>51, 54</sup>.

Zunächst exprimieren die dermomyotomalen Vorläuferzellen *En1* (Engrailed-1) und *Myf5* (Myogenic Factor 5). Zellen, welche eine weitere Differenzierung über braune Präadipozyten zu braunem Fett durchlaufen, unterscheiden sich zunächst von den späteren Myoblasten durch die Expression von PRDM16 (*PRD1-BF-1-RIZ1 homologous domain containing protein-16*). PRDM16 hat eine wichtige Funktion in den initialen Schritten der BAT-Entwicklung. Neben PRDM16 stellen PPAR $\gamma$  (*Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$* ), PGC-1 $\alpha$  (*Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$* ) und UCP1 (*Uncoupling protein 1*) weitere wichtige funktionale Marker in der Entwicklung und Homöostase des braunen Fettes dar<sup>55</sup>.

Die Myogenese beginnt in den Somiten mit der Bildung von myogenen Vorläuferzellen und Myoblasten des Dermomyotoms. Rücken- und Rumpfmuskulatur wird dabei aus myogenen Vorläuferzellen des epaxialen Dermomyotoms gebildet. Die Muskulatur der Extremitäten wird dagegen aus migrierenden myogenen Vorläuferzellen des hypaxialen Dermomyotoms gebildet. Diese Vorläuferzellen exprimieren die funktionalen Markergene *Pax3* (*Paired homeobox 3*) und *Pax7* (*Paired homeobox 7*). Innerhalb der embryonalen Entwicklung findet die primäre Myogenese statt. Sie ist gekennzeichnet durch die Expression von sogenannten MRFs (*Myogenic regulatory factors*). Es kommt zur einer streng hierarchisch gegliederten Expression von MYF5 (*Myogenic Factor 5*) und MYOD1 (*Myogenic Differentiation 1*), gefolgt von der Expression von MRF4 (*Myogenic regulatory factor 4*) und MYOG (Myogenin)<sup>54, 56-58</sup>.

In der Maus kann Myogenin und MRF4 ab dem Stadium E8.5 und E9 im gesamten Myotom gleichmäßig detektiert werden<sup>59, 60</sup>. MRF4 wird wiederum in zwei Phasen der Myogenese verstärkt exprimiert. Es erfüllt sowohl in der Determinierungsphase (bis ~E11.5) und in der Differenzierungsphase (ab ~E16.5) eine wichtige Funktion. Unterschiede zwischen Populationen von epaxialen und hypaxialen Myoblasten manifestieren sich in einer voneinander abweichenden Expression von MYF5 und MYOD<sup>61</sup>. MRFs kontrollieren die Determinierung und Differenzierung von Skelettmuskelzellen bis in das postnatale Myogenesestadium.

Generell verläuft die Myogenese in verschiedenen Phasen der Differenzierung. In der primären Myogenese beginnt eine initiale Gruppe von embryonalen Myoblasten durch Fusionsprozesse primäre Muskelfasern zu bilden. Die Myoblasten beginnen die myogenen Faktoren MYF5 und MYOD zu exprimieren<sup>62</sup>. Die durch Zell-Zell Fusion gebildeten primären Muskelfasern exprimieren nun zusätzlich Muskelstrukturproteine wie MYHC (*Myosin heavy chain*) und MYLC1 (*Myosin light chain 1*). Die primären Muskelfasern dienen als eine Art Gerüst für die sich bildenden

sekundären Muskelfasern. Während dieser sekundären Phase der Myogenese (E14.5-17.5 in der Maus, E8+ bzw. H&H >34 im Huhn) setzt sich das Muskelwachstum fort, durch die anhaltende Proliferation von PAX7 positiven Vorläuferzellen und deren anschließender Fusion<sup>54, 56</sup>.

Während der späteren postnatalen Phase der Muskelentwicklung kommt es im Gegensatz dazu zum Muskelmassezuwachs durch Faserhypertrophie, hervorgerufen durch die Vereinigung von Myofibrillen<sup>63</sup>. Am Ende der postnatalen Entwicklungsphase begeben sich bereits einige der PAX7 positiven Satellitenzellen (SCs) oder auch Muskelstammzellen (MuSCs) in einen quieszenten Zustand. Die MuSCs finden sich bereits in ihrer Nische zwischen Basalmembran und Sarkolemma ein und können später in Rahmen von muskulären Regenerationsprozessen wieder in einen aktivierten Zustand versetzt werden<sup>64, 65</sup>.

### 1.2.2. Die Funktion von Muskelstammzellen in Regeneration und Muskelhomöostase

Im Gegensatz zu anderen adulten muskulären Geweben wie zum Beispiel dem Herz, weist die Skelettmuskulatur eine sehr hohe regenerative Kapazität auf. Diese ist auf im Skelettmuskel befindliche adulte Muskelstammzellen (MuSCs), auch Satellitenzellen (SCs) genannt, zurückzuführen. MuSCs spielen eine zentrale Rolle in der postnatalen Muskelhomöostase, Muskelwachstum und in Regenerationsprozessen. Ihr Stammzellcharakter ermöglicht es ihnen ebenfalls, durch Proliferation einen ständigen MuSC-Pool aufrecht zu erhalten. Im adulten Skelettmuskel sind MuSCs weitgehend mitotisch quieszent<sup>66</sup>, werden jedoch nach Muskelschädigung umgehend aktiviert. Quieszente MuSCs sind unter anderem durch die Expression des Transkriptionsfaktors PAX7 gekennzeichnet. Des Weiteren besitzen sie im Vergleich zu Muskelzellen einen kleinen Zellkern mit einem höheren Anteil an kondensiertem Heterochromatin. Nach ihrer Aktivierung beginnen sie zu proliferieren und exprimieren unter anderem MYOD, bevor sie in einen Differenzierungsprozess übergehen. Hierbei fusionieren die zuvor proliferierenden MuSCs mit den geschädigten Muskelfasern. Ein Charakteristikum geschädigter und regenerierender Muskelfasern stellen unter anderem in der Muskelfaser zentralisiert gelegene Myonuklei dar. Nach abgeschlossener Regeneration des Muskels sind diese wieder randständig lokalisiert<sup>67-70</sup>.

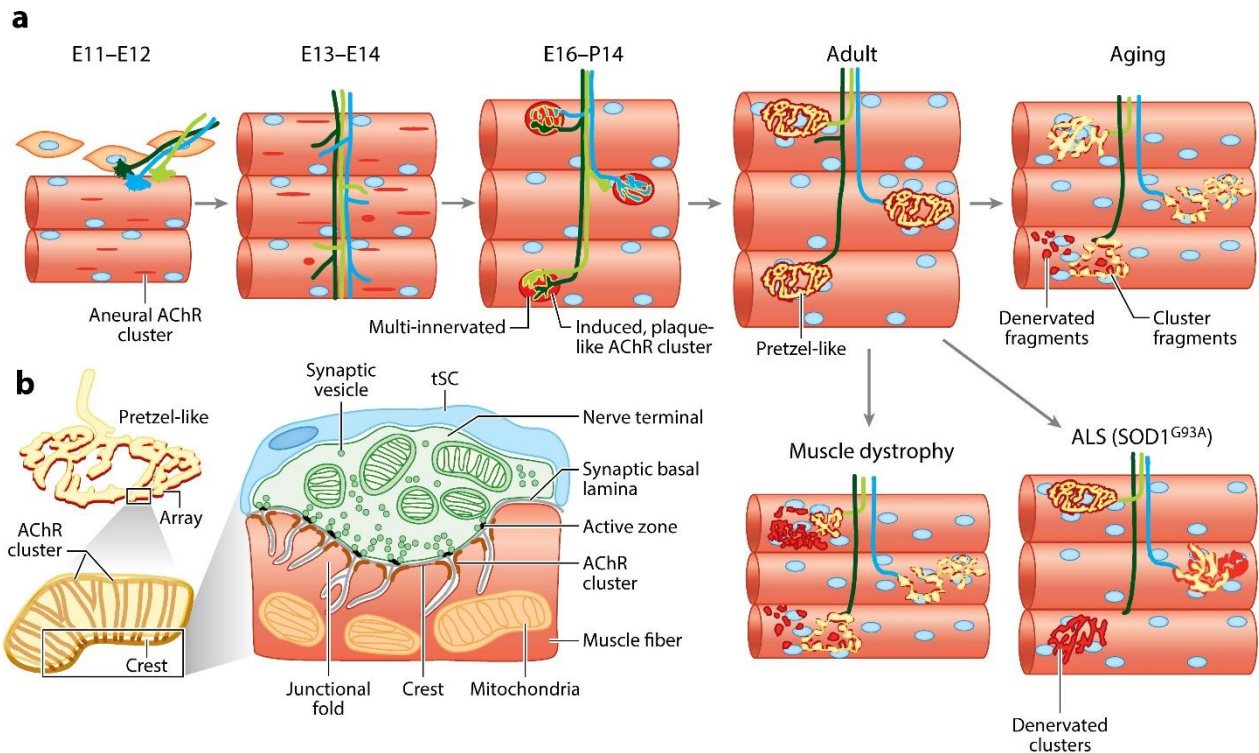
### 1.3. Innervierung des Skelettmuskels

Die motorische Endplatte oder neuromuskuläre Synapse (NMJ = *neuromuscular junction*) stellt Schnittstelle zwischen einer efferenten Nervenfasern (hier Motorneuron) und einer Faser der Skelettmuskulatur dar. Eine funktionale neuromuskuläre Synapse ist essentiell für das Überleben nach der Geburt, da sie eine essentielle Rolle in der Ausführung gerichteter Körperbewegungen und in der Aufrechterhaltung der Atmung hat. Defekte in der NMJ Entwicklung und Homöostase können schwerwiegende, zum Teil letale neuromuskuläre Erkrankungen, wie CMS (*congenital*

*myasthenic syndrome*), amyotrophe Lateralsklerose (ALS) oder Myasthenia gravis (MG) hervorrufen<sup>71-73</sup>.

NMJs zählen zu den chemischen Synapsen und besteht aus drei Elementen: (1) dem präsynaptischen Bereich (Ende des Motorneurons), (2) dem intrasynaptischen Bereich (synaptische Basallamina) und (3) der postsynaptischen Komponente (Muskelfaser und Muskelmembran). Die Präsynapse wird durch Schwann-Zellen umhüllt und gestützt<sup>74</sup>. Wenn ein Aktionspotential das Motornervende erreicht, kommt es zur Öffnung der Calciumkanäle in der Präsynapse. Calciumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) strömen nun in das Neuron und es kommt Ausschüttung des Neurotransmitters Acetylcholin (ACh) im synaptischen Spalt. Dies führt zur Aktivierung von auf der postsynaptischen Membranregion lokalisierten nikotinischen ACh-Rezeptoren (AChRs). Die AChR regen daraufhin am Sarkolemma lokalisierte DHPRs (*Voltage-gated dihydropyridine receptors*) durch die Induktion von RyRs (*Ryanodine receptors*) an. Das sarkoplasmatische Retikulum entlässt Calciumionen, was zum Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt. Im entspannten Zustand wird die Myosinbindestelle an Aktin durch Tropomyosin blockiert. Der Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration begünstigt die Bindung der Calciumionen an Troponin C. Dies führt zu einer konformationellen Veränderung des Troponinkomplexes, was zur Exponierung der Myosinbindestelle führt. Myosin bindet im Ruhezustand ATP, welches nun hydrolysiert wird und dadurch eine zuerst nieder-, dann hochaffine Bindung an Aktin ermöglicht. Diese durch die ATPase-Aktivität von Myosin bedingte Hydrolyse zu ADP, die durch erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ausgelöst wird, führt zur Freisetzung von Energie. Diese Energie wird zur Konformationsänderung von Myosin in Form einer Kippbewegung, genutzt (1. Kraftschlag). Die Loslösung von ADP führt zu einer minimalen weiteren Anwinkelung (2. Kraftschlag). Durch beide Kraftschläge wird das gebunden Aktinfilament um die Länge eines Monomers verschoben. Durch erneute Bindung von ATP löst sich Myosin von Aktin und der sogenannte Querbrückenzyklus kann von Neuem beginnen. Durch das Weitergleiten der Filamente zur Sacromermitte kommt es zur Kontraktion des Skelettmuskels (Filamentgleittheorie)<sup>49, 75</sup>.

Die Entwicklung der NMJ verläuft parallel zur Entwicklung der Skelettmuskulatur. Schon bevor der Motornerv dem Muskel erreicht (E11 bis E12), bilden die einzelnen Muskelfasern bereits kleine, in der Mitte der Faser weit verteilte primitive AChR Cluster aus (Abb. 1.3.). Das *Prepatterning* dient unter anderem den wachsenden Motorneuronen als eine Art Wegweiser und stellt somit einen wichtigen Schritt für die weitere NMJ-Ausbildung dar. Die noch unreifen plaqueförmigen AChR Cluster werden im weiteren Verlauf der Entwicklung zunächst oft von mehr als einem Motornerv erreicht (E16 bis P14). Wenn das Motornervende die Muskelfaser innerviert, induziert dies zum einen den Aufbau neuer AChR-Cluster jedoch zum anderen auch den langfristigen Abbau der nichtsynaptisch gelegenen AChR-Cluster. Die AChR Abundanz an der Muskeloberfläche wird sowohl durch elektrische Aktivität als auch durch präsynaptische Signale kontrolliert<sup>76-78</sup>.



**Abbildung 1.3.: Schematische Abbildung der Entwicklung und des Aufbaus von neuromuskulären Synapsen (NMJ).** Vor dem Erreichen des Motornervs (E11- E14), bilden die einzelnen Muskelfasern während ihrer voranschreitenden Entwicklung bereits kleine, primitive, in der Fasermittelregion gelegene AChR-Cluster aus (*Prepatterning*). Im weiteren Heranreifen werden einzelne AChR-Cluster von einem oder mehreren Motoneuronen innerviert. Dies führt zur weiteren Ausbildung dieser Cluster, bis sie sich zum Erreichen des adulten Stadiums zu brezelförmige AChR-Verbände formiert haben. Jedes Motornervende innerviert nun eine einzelne Muskelfaser. Während des Alterungsprozesses kommt es in zunehmenden Maße zur Fragmentierung der postsynaptischen AChR-Cluster. Dieses Phänomen, sowie Deinnervationsprozesse sind ebenfalls im ALS-Mausmodell SOD1<sup>G93A</sup> schon bei jüngeren Tieren zu beobachten (a). Eine vollausgebildete NMJ besitzt brezelförmige AChR-Clusterverbände. Des Weiteren bilden sich Einfaltungen der postsynaptischen Membran (*Junctional fold*) zur Oberflächenvergrößerung aus (b). ALS (amyotrophe Lateralsklerose), AChR (Acetylcholin-Rezeptoren), tSC (terminale Schwann-Zelle), E (embryonales Stadium). Abbildung modifiziert aus<sup>78</sup>.

### 1.3.1. Molekulare Kontrolle der neuromuskulären Synapsenentwicklung

Einer der wichtigsten initialen Schritte der neuromuskulären Synapsenentwicklung stellt die Aktivierung eines muskelspezifischen Ligand-Rezeptor-Tyrosinkinase-Systems dar. Am Anfang der durch dieses System vermittelten Signaltransduktion, steht der extrazelluläre Ligand Agrin (AGRN). Hierbei handelt es sich um ein Proteoglycan aus der Klasse der Heparansulfate. Agrin wird während der Embryogenese im frühen Stadium der NMJ-Entstehung von Motoneuronen produziert, zu terminalen Motornervenden transportiert und in Richtung der synaptischen Basallamina segregiert. Anschließend bindet Agrin an die N-terminale Domäne des in der postsynaptischen Membran verankerten LRP4 (*Low-density lipoprotein receptor-related protein*). LRP4 dient als Co-Rezeptor von MuSK (*Muscle-specific kinase; Muscle-specific receptor tyrosine*

kinase). Die Interaktion des Liganden Agrin mit LRP4 führt zur *trans*-Autophosphorylierung von MuSK. LRP4 und MuSK bilden daraufhin einen tetramerschen Komplex, der aus zwei Agrin-gebundenen LRP4 Heterodimeren und zwei dimerisierten MuSK Proteinen besteht. Die Bildung dieses Komplexes ermöglicht nun die Aktivierung von MuSK<sup>79, 80</sup>.

Zur vollständigen Aktivierung von MuSK ist jedoch ein drittes Molekül, DOK7 (*Adaptor docking protein-7*) essentiell. DOK7 ist ein mit der juxtamembranen Region von MuSK interagierendes zytoplasmatisches Protein. Es stimuliert die Tyrosin-Phosphorylierung von MuSK und trägt somit entscheidend zur Verstärkung der Kinaseaktivität bei. Dies ermöglicht wiederum die Rekrutierung von weiter *downstream* gelegenen Substraten, die wichtig für die weitere Signaltransduktion sind. DOK7 dient folglich als Co-Aktivatoren von MuSK. Es konnte gezeigt werden, dass dies sowohl in einer Agrin abhängigen, als auch in einer von Agrin-Stimulierung unabhängigen Weise möglich ist<sup>81-83</sup>.

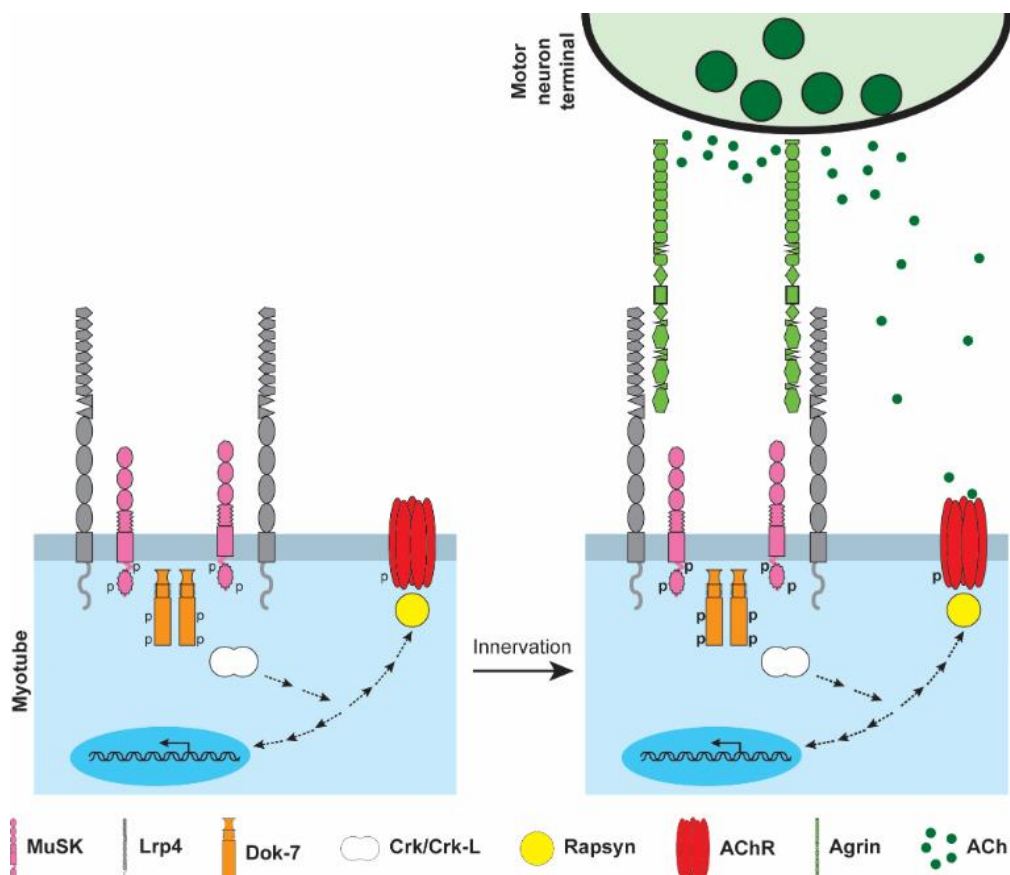
Sowohl Agrin, LRP4, MuSK, als auch DOK7 haben eine essentielle Rolle in der neuromuskulären Synaptogenese. In Funktionsverlust-Experimenten ließ sich nachweisen, dass Mäuse, die eine Defizienz für eines der genannten Proteine aufweisen keine postsynaptisch NMJ Strukturen ausbilden und kurz nach der Geburt versterben. Des Weiteren scheint der LRP4-MuSK-DOK7 Komplex ebenfalls essentiell für die *Prepatterning*-Phase der AChR Cluster<sup>81, 84-86</sup>. In dieser Phase, bevor Motorneuronen die einzelnen Muskelfasern erreichen, bilden sich kleine diffuse AChR Cluster auf der Muskelfaseroberfläche aus. Es kommt zur Aktivierung von MuSK ohne die Einwirkung von Agrin. Im Zebrafisch (*Danio rerio*) scheint diese über muskeleigene Wnt-Proteine (Wingless/Integrated) zu geschehen, die an die Frizzled (Fz)-like Domäne von MuSK binden. Im Zebrafisch können jedoch auch ohne diese MuSK-Domäne NMJs geformt werden<sup>87</sup>. Währenddessen scheint in Mäusen MuSK während des AChR-*Prepatterning* durch LRP4 aktiviert zu werden (Abb. 1.3.1)<sup>84</sup>. Es konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass die Fz-like Domäne von MuSK hier nicht essentiell zur NMJ-Bildung zu sein scheint<sup>88, 89</sup>. Ferner konnte gezeigt werden, dass eine erst im postnatalen Alter geschehende Inaktivierung von MuSK zur Ausbildung von kleinen zerstreuten AChR Clustern führt. Dies äußert sich in Verlust der Muskelkraft und einer reduzierten Lebensdauer<sup>90</sup>.

Es ist ebenfalls bekannt, dass die Stimulation von Agrin zur Phosphorylierung von zwei C-terminal gelegenen Tyrosinen von DOK7 führt. Dies wiederum resultiert in der Rekrutierung zweier Adapterproteinen, CRK und CRK-L (siehe auch Abschnitt 1.4). CRK und CRK-L scheinen ebenfalls eine essentielle Rolle in der NMJ Bildung zu spielen. Nach skelettmuskel-spezifischen CRK und CRK-L Knock-out ist die korrekte Ausbildung der NMJ gestört und die Tiere versterben ebenfalls nach der Geburt<sup>91</sup>.

Neben DOK7 und diesen beiden Adapterproteinen kommt es an der NMJ Region zur Rekrutierung einer Vielzahl an weiteren Molekülen. Diese können zum Einen eine Rolle in der weiteren Signaltransduktion und Regulation der MuSK-Aktivität spielen, und zum Anderen eine

wichtige Funktion in der AChR-Aggregation und Stabilisierung innehaben <sup>77</sup>. Eine direkte Interaktion und Bindung an die AChRs konnten lediglich bei den drei Molekülen RAPSN (*43 kDa receptor-associated protein of the synapse, rapsyn*), Src (*Src-family kinases*) und APC (*Adenomatous coli polyposis*) nachgewiesen werden. Kinasen der Src Familie scheinen eine Funktion in der Stabilisierung von AChRs zu haben. APC wiederum scheint eine Rolle in der synaptischen Differenzierung zu spielen, die jedoch noch genauerer Aufklärung bedarf <sup>77, 89, 92</sup>.

Das postsynaptische Membranprotein RAPSN ist –stimuliert durch Bindung von Agrin an LRP4, direkt an mit AChR assoziiert (Abb. 1.3.1.). RAPSN bindet an die Rezeptoren und scheint als molekularer Linker in der Verankerung der AChR zu fungieren <sup>93</sup>. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass weitere Proteine, wie das Chaperon Hsp90 $\beta$  und die Protease Calpain an diesem Prozess beteiligt sind und die Verankerung und Verteilung der AChRs in der Muskelfasermembran mit regulieren <sup>94</sup>. Jedoch konnten dieser und auch weitere Prozesse zum Teil lediglich in Zellkulturrexperimenten nachgewiesen werden. Die Funktion dieser und der vielen weiteren identifizierten NMJ assoziierten Proteinen sind unter *in vivo* Bedingungen unzureichend charakterisiert. Doch geben Maus Knock-out Studien aus dem Jahre 2001 einen Hinweis darauf, dass Agrin und MuSK, jedoch auch RAPSN essentiell für das Clustering von AChRs an der NMJ sind <sup>95</sup>.



**Abbildung 1.3.1.: Vereinfachte Darstellung der molekularen Prozesse während der post-synaptischen Differenzierung.** Die muskelspezifische Rezeptor-Tyrosinkinase (MuSK) ist essentiell für das *Prepatterning* der postsynaptischen Acetylcholin Rezeptoren (AChR). In der Maus kommt es in dieser Phase zur Aktivierung von MuSK durch LRP4<sup>88</sup>. Nach dem die Muskelfasern durch die terminalen Ender der Motorneuronen innerviert wurden, kommt es zur Segregation von Agrin. Agrin bindet an LRP4, was die Assoziation von MuSK mit LRP4 stimuliert. Nach der Phosphorylierung (P) von MuSK, kommt es in der juxtamembranen Region zur Rekrutierung und Dimerisierung von DOK7. Durch Tyrosinphosphorylierung von DOK7 kommt es zur Rekrutierung der Adapterproteinen CRK und CRK-L. Dies führt zur Aktivierung von weiter *downstream* gelegenen Signalwegen und resultiert letztendlich in der Verankerung von AChRs durch Rapsyn. Abbildung aus<sup>89</sup>.

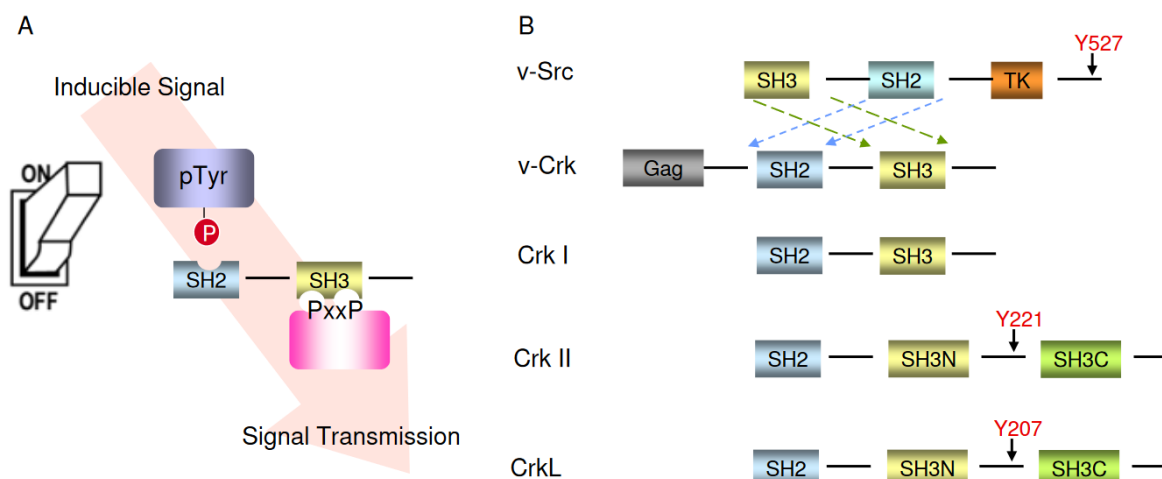
Auch durch neuromuskuläre Erkrankungen des Menschen lässt sich die funktionelle Relevanz einzelner NMJ-assoziiierter Gene deduzieren. Bei dem sehr heterogenen, erblichen Syndrom CMS (Congenital myasthenic syndrome) sind verschiedene Typen von neuromuskulären Defekten als Auslöser bekannt. Diese führen unter anderem zu erheblich erschwerter Respiration, verminderter neuromuskulärer Transmission, was in der Regel in genereller muskulärer Schwäche und dadurch in motorischen Störungen resultiert. Einige Patienten mit CMS weisen ebenfalls Mutationen im Gen RAPSN auf<sup>96</sup>. Des Weiteren konnten zahlreiche Mutationen im Genom verschiedener CMS Patienten im Gen MuSK identifiziert werden. Diese führen zum Teil zu einer verminderten MuSK Expression oder verhindern eine korrekte Interaktion mit DOK7. Dies äußert sich in verminderten AChR-Clustern und simplifizierten, zum Teil nicht ausgereiften NMJ<sup>97, 98</sup>. Auch im Gen DOK7 wurden in der Vergangenheit einige Mutationen in Patientengenomen identifiziert, die zu CMS führen. In diesen Fällen äußerte sich dies in meist verkleinerten NMJs, mit kleineren AChR Clustern und simplifiziert erscheinenden Einfaltungen der postsynaptischen Membran<sup>99</sup>. In Patienten mit CMS-Mutationen sind am häufigsten *Dok7*-Mutationen, die in einer Trunkierung der C-terminalen DOK7-Domäne resultierten, zu beobachten. Dies gibt wiederum einen Hinweis darauf, dass eine intakte C-terminale Region von DOK7 essentiell zur Ausbildung einer präzise funktionierenden NMJ *in vivo* ist<sup>100, 101</sup>.

#### 1.4. Aufbau und Funktion von CRK

CRK wurde im Jahre 1988 durch die Sequenzierung des *avian* Sarcoma Virus CT10 identifiziert. Es kodiert das retrovirale Genprodukt *Gag-Crk* oder auch *v-Crk*<sup>102</sup>. *V-Crk* besitzt die zellulären Homologe *Crk II* und *Crk I* und das Paralog *Crk-L (Crk-Like)*. Es zeigte sich, dass v-CRK paradoxerweise in der Lage ist ohne intrinsische Tyrosinkinaseaktivität gezielt und selektiv das zelluläre Tyrosinphosphorylierungs-Level zu erhöhen. V-CRK und seine Homologe gehören zu einer damals noch unbekannt Gruppe von Proteinen mit regulatorischer Wirkung, namentlich Adapterproteine. CRK entspricht in Gänze dem prototypischen Aufbau dieser Molekülklasse<sup>103</sup>. 1992 wurden seine Domänen identifiziert. Eine cDNA, die für das *CT10* Gen kodiert konnte isoliert werden. Es weist eine virale Gag Sequenz auf, jedoch auch Sequenzen ähnlich zu den



zuvor identifizierten Domänen der N-terminalen regulatorischen Region in der SRC-Kinasefamilie (Abb. 1.4.). Im Gegensatz zu SRC besitzt v-CRK jedoch keine intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität. Diese Eigenschaft von v-CRK verhalf diesem neu entdeckten Gen zu seinem Namen: *Crk* (*CT10 regulator of a tyrosine kinase*). Es besteht aus modular aufgebauten hoch konservierten SH2 (*Src Homology 2*) und SH3 (*Src Homology 3*) Domänen unterbrochen durch eine flexible Linkersequenz<sup>102, 104</sup>. Die SH2 Domäne dient der Bindung von Tyrosin-phosphorylierten Proteinen selektiv an einem pY-x-x-P Motiv. Eine SH3 Domäne vermittelt im Gegensatz dazu die spezifische Interaktion zu Bindungspartnern mit prolinreichen Peptiden (P-x-x-P-x-K Motiv)<sup>105, 106</sup>. Ebenfalls 1992 konnte CRK auch in humanen Zellen nachgewiesen werden. Es handelte sich um CRK II und CRK I, zwei alternative Spleißvarianten vom selben genomischen Locus stammend<sup>107</sup>. Adapterproteine besitzen keine eigene enzymatische Funktion, jedoch mehrere der oben genannten Domänen zur Bindung an andere Proteinen. Ihre Aufgabe beschränkt sich somit auf die Bindung ihrer Interaktionspartner. CRK und andere Adapterproteine sind in der Lage zwei oder mehrere Singalproteine miteinander zu verbinden und so die weitere Vermittlung zellulärer Signalkaskaden zu propagieren (Abb. 1.4.)<sup>108</sup>. Die Funktion und Expression von CRK ist weit gefächert. Es ist nahezu ubiquitär exprimiert und hat eine wichtige Rolle in vielen unterschiedlichen biologischen Prozessen, wie Proliferation, Zelladhäsion, Zellmigration, Phagozytose, Endozytose, Apoptose und in der Regulation von der Expression verschiedener Gene<sup>109</sup>.



**Abbildung 1.4.: Struktur und Funktion von CRK.** Extrazelluläre Signale können eine Signalkaskade in Gang setzen, die zum Anstieg des intrazellulären Tyrosinphosphorylierungslevels führt. Adapterproteine ermöglichen die weitere Vermittlung dieser Signale zu weiter *downstream* gelegenen Teilen der Signaltransduktionskette. Hierzu interagieren sie vermittelt durch ihrer modularen SH2 und SH3 Domänen mit weiteren Proteinen (A). SH2 bildet Tyrosin-phosphorylierte Proteine und SH3 interagiert mit prolinreichen Peptiden. CRK (Isoformen CRK-I und CRK-II) und CRK-L bilden prototypische Vertreter dieser Molekülklasse. Das Oncogen v-Src enthält SH2 und SH3 Domänen. Diese sind strukturell konserviert auch in v-CRK, CRK und CRK-L vorhanden (B). SH2 = *Src homology 2*; SH3 = *Src homology 3*; Gag = *viral group specific antigen*; Y221/Y207 = Phosphorylierungsstelle. TK = Tyrosinekinasedomäne. Abbildung aus<sup>103</sup>.

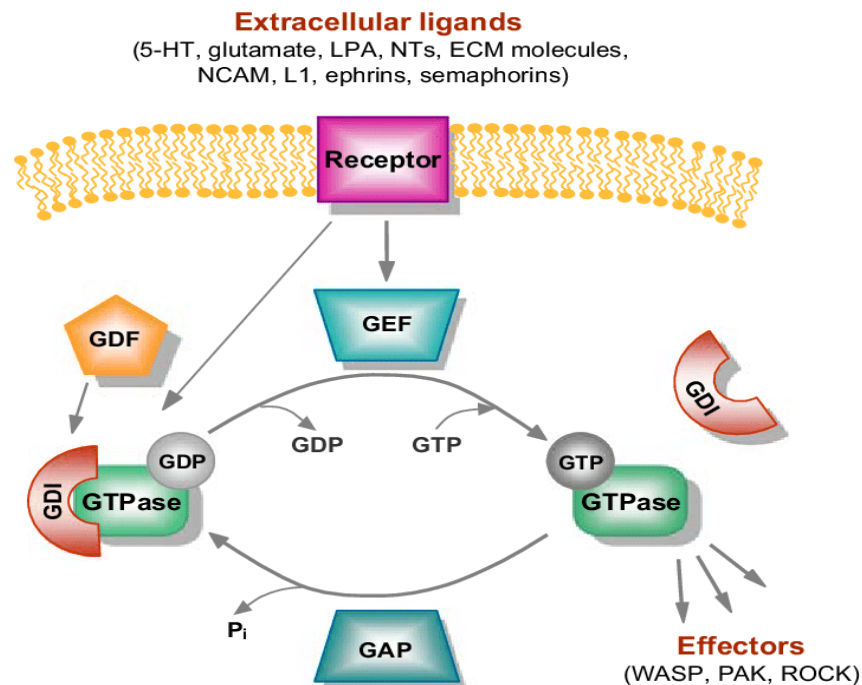


Auch in der Skelettmuskulatur ist CRK abundant vorhanden und an unterschiedlichen Prozessen beteiligt. Eine Studie suggeriert, dass CRK und CRK-L eine wichtige Rolle während der Myoblastenfusion in einem frühen Stadium der Skelettmuskelentwicklung im Zebrafisch spielen <sup>110</sup>. CRK wird ebenfalls sowohl in der Maus als auch im Menschen in der Skelettmuskulatur exprimiert <sup>111</sup>. Im Mausmodell konnte hingegen gezeigt werden, dass CRK und CRK-L an neuromuskuläre Endplatten rekrutiert werden. Mit einem skelettmuskelspezifischen Knock-out Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass sie dort eine Rolle in der Synapsendifferenzierung spielen <sup>72,91</sup>. Die Adapterproteine binden hier an Tyrosin-phosphoryliertes DOK7, welches ein essentielles Protein neben MUSK, LRP4 und AGRN in der Bildung von NMJs darstellt <sup>81, 85, 112</sup>.

### 1.5. Funktion und Regulation der kleinen GTPase-RAC1

RHO, RAC und CDC42 sind Mitglieder der RHO-Proteinfamilie und zählen zur Gruppe der kleinen GTPasen (auch kleine G-Proteine). Diese Molekülklasse fungiert als molekularer Schalter in Signaltransduktionskaskaden. Hierbei alternieren sie zwischen zwei Konformationen: ihrer inaktiven Guanosindiphosphat (GDP)-gebundenen und ihrer aktiven Guanosintriphosphat (GTP) gebundenen Form. Der Aktivitätsstatus kleiner GTPasen unterliegt der Kontrolle zweier regulatorischer Molekülgruppen. Hierbei handelt es sich um GEFs (*Guanosine triphosphate exchange factors*) und GAPs (*GTPase-activating proteins*). GEFs tauschen gebundenes GDP gegen GTP aus und aktivieren somit kleine GTPasen (Abb. 1.5.). Ihre Gegenspieler GAPs unterstützen die inhärente GTPase-Aktivität der kleinen G-Proteine. Sie beschleunigen die Hydrolyse von GTP zu GDP unter Abspaltung eines Phosphatrestes und inhibieren somit deren Aktivität Zielproteine zu binden <sup>113, 114</sup>.

**Abbildung 1.5.: Schematische Darstellung des GTPasen-Zyklus und der Aktivierung von kleinen GTPasen.** Die Aktivität von kleinen GTPasen wird oft durch extrazelluläre Signale (Liganden-vermittelt) initiiert. In ihrem aktivierten Zustand sind GTPasen an GTP und im inaktiven Zustand an GDP gebunden. Die vier Molekülklassen, die den Aktivitätsstatus von kleinen GTPasen regulieren sind GEFs (*Guanosine triphosphate exchange factors*), GAPs (*GTPase-activating proteins*) und GDIs (*Guanine nucleotide dissociation inhibitors*) und GDFs (*GDI dissociation factors*). GEFs wechseln gebundenes GDP gegen GTP aus und GAPs hydrolysieren schnell gebundenes GTP zu GDP. GDFs können GDP-gebundene GTPasen von GDI Proteinen abspalten und somit den GDP-GTP Austausch verstärken. Kleine GTPasen können in ihrer aktiven Form eine Vielzahl von *downstream*-gelegenen Effektorproteinen rekrutieren. NTs (Neurotrophins), LPA (Lysophosphatidsäure), ECM (Extrazelluläre Matrix) NCAM (neurales Zelladhensionsmoleküle). Abbildung 1.5. befindet sich auf der nachfolgenden Seite. Abbildung aus <sup>115</sup>.



RAC und RHO spielen eine wichtige Rolle in diversen zellulären Prozessen wie Migration, Endozytose, Gentranskription, Onkogenese, Vesikeltransport, im Zellzyklus, Zelldifferenzierung, Zellpolarität, sowie in der Zytoskelettorganisation und in Zelladhäsionsprozessen.<sup>116</sup> Die zur RHO-Familie zählenden kleinen GTPasen RAC1, RHOA und CDC42 gehören zu den Hauptregulatoren des zellulären Aktinzytoskeletts. RAC1 und CDC42 aktivieren hierbei insbesondere den ARP2/3 Komplex und Formine, und unterstützen dadurch Aktin-Nukleation und -Elongation. RHOA stellt ein Gegenspieler dar, der insbesondere Akto-Myosin Kontraktilität über die RHO-ROCK-MLC-Signalachse aktiviert, die zur Phosphorylierung von (nicht-muskulären) Myosinen führt<sup>117</sup>. In der Skelettmuskulatur scheinen GTPasen der RHO-Familie eine wichtige Rolle in der postsynaptischen Reifung und Organisation der NMJ zu spielen. Im Speziellen scheinen sie unter anderem eine wichtige Funktion während der AChR-Clusterausbildung zu besitzen. In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass PI3-K (Phosphoinositide 3-Kinase) Aktivität nach Agrin-induzierter RAC und CDC42 Aktivierung, die AChR-Phosphorylierung und auch das Clustering reguliert<sup>118</sup>. Eine Aktivierung von RHOA *in vivo* durch das RHOA GEF ephexin1 (*Ngef*) scheint ebenfalls zur morphologischen Reifung und Homöostase der AChR-Cluster beizutragen<sup>100, 119</sup>. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass RAC1 eine Rolle in Endozytoseprozessen von AChR spielen könnte<sup>120, 121</sup>.

In kultivierten differenzierten Muskelzellen (C2-Zellen) konnte nachgewiesen werden, dass eine Induktion von Agrin, einem von Motorneuronen segregierten Faktor zur Aktivierung von RAC1 und CDC42 führt. Dominant-negative und konstitutiv-aktive Mutanten von RAC und CDC42

fürten in diesem Kontext zu einer gestörten AChR-Cluster Ausbildung<sup>122</sup>. Drei Jahre später konnte Weston und Kollegen aufklären, dass *in vitro* Agrin-induzierte RAC1-Aktivierung anscheinend einen essentiellen Schritt in der initialen Phase der AChR-Clusterbildung darstellt. Eine initiale RAC1-Aktivierung konnte mit der Bildung von kleinen, diffusen AChR-Microclustern assoziiert werden. Die nachfolgende Aktivierung von RHO, schien wiederum notwendig zur Aggregation dieser diffusen AChR-Microclustern zur Ausbildung von AChR-Macroclustern auf der Myotubenoberfläche zu sein<sup>120</sup>. In einer rezenten Publikation konnten die damaligen Beobachtungen bestätigt werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass RAC1-Aktivierung zwar notwendig zur Agrin-induzierten AChR-Cluster-Bildung scheint, aber dass eine anhaltende Aktivierung von RAC1 nach dieser initialen Phase zur Destabilisierung beitragen kann. Die Autoren schließen weiter, dass Aktivität von RAC1 im weiteren Verlauf der Entwicklung zunehmend inhibiert wird und anscheinend nicht zur weiteren Reifung und Homöostase der NMJ AChR-Cluster benötigt wird. Es wird der Schluss gezogen, dass eine eng regulierte Aktivität von RAC1 notwendig ist, um ein normales, kontrolliertes AChR-Clustering während der NMJ Entwicklung zu ermöglichen<sup>123</sup>. Da auch diese Studie primär auf den Ergebnissen von *in vitro* Arbeiten basiert, ist weiterhin sehr wenig darüber bekannt, wie die Aktivität von RAC1 das AChR-Clustering *in vivo* beeinflusst und welche GEFs und GAPs in diesem Kontext in der RAC1-Aktivierung involviert sind.

### 1.6. Zielsetzung der Arbeit

Alle Mitglieder der *miR-1/206/133* Familie sind exklusiv in der quergestreiften Muskulatur exprimiert. In der Skelettmuskulatur sind sie die abundantesten miRNAs, was auf eine wichtige Funktion innerhalb dieses Gewebes schließen lässt. Vorangegangene Studien konnten zeigen, dass *miR-1/133a*, sowohl eine Rolle während der embryonalen Herzentwicklung, als auch während der metabolischen Reifungsprozesse des adulten Skelettmuskels spielt. Der Verlust des skelettmuskelspezifischen *miR-206/133b* Clusters zeigte dagegen keine Auswirkungen. Jedoch wurde zuvor noch nie der vollständige Verlust aller *miR-1/206/133* Cluster betrachtet. Daher konnten bisher mögliche funktionelle Redundanzen und Kompensationsprozesse nicht ausgeschlossen werden. Ziel dieser Arbeit ist, die Funktion aller Cluster umfassend zu analysieren. Nur durch einen kompletten *miR-1/206/133* Verlust können mögliche synergistische Funktionen untersucht werden. Aus diesem Grund wurde ein neuartiges skelettmuskelspezifisches *miR-1/206/133* Funktionsverlustmausmodell (*loss of function*) zur funktionellen Analyse dieser microRNAs in der Skelettmuskulaturentwicklung untersucht. Zur Betrachtung der Rolle von *miR-1/206/133* im adulten Skelettmuskel wurde erstmals ein induzierbares Knock-out Mausmodell etabliert und analysiert. Auf Basis dieser beiden Funktionsverlust-Modelle sollte die Erforschung der regulatorischen Funktion von *miR-1/206/133* durch morphologische,

physiologische, histologische und molekularbiologische Analyse vorgenommen werden. Zur Identifikation und Validierung von hierbei identifizierten, neuartigen *miR-1/206/133*-Zielgenen sollten weiterführende *in vivo* und *in vitro* Experimente angeschlossen werden. Die aus diesen Studien hervorgehenden Erkenntnisse sollen einen Einblick in die Funktion von der *miR-1/206/133* im Skelettmuskel liefern. Mit dieser Arbeit soll ein Beitrag zum tiefgreifenden Verständnis von *miR-1/206/133* vermittelten regulatorischen Prozessen und molekularen Wirkmechanismen geleistet werden.

## 2. Material und Methoden

In den folgenden Teilabschnitten wurden jeweils alle verwendeten Materialien und Methoden aufgegliedert und aufgelistet.

### 2.1. Verwendete Software

**Tabelle 1: Software**

Bezeichnung	Hersteller/Entwickler
Access, Excel, PowerPoint, Word	Microsoft
Adobe Reader	Adobe Systems Incorporated
BLAST	NCBI
CAT	Computer Administriertes Tierhaus (MPG)
EMBOSS Needle Sequence Alignment	European Molecular Biology Laboratory's European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI)
Ensembl Genome Browser	European Molecular Biology Laboratory's European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI)
EndNote	Clarivate Analytics
GIMP	The GIMP Development Team
GraphPad Prism 6.07	GraphPad Software, Inc.
GSEA 3	Broad Institute
GTE <sub>x</sub>	Genotype-Tissue Expression (GTEx) project
ImageJ	Wayne Rasband
ImageLab	Bio-Rad Laboratories
IncuCyte ZOOM 2016A	Essen BioScience
Inkscape vector graphics editor	Inkscape Community
Integrated Genome Browser (IGV)	Broad Institute
microRNA.org	<sup>124</sup>
Seqbuilder 14	DNASTAR Lasergene
Seqman Pro 14	DNASTAR Lasergene
StepOne Software v2.3	ThermoFisher
Zen 2.1	Zeiss

### 2.2. Versuchstierhaltung

Der in dieser Arbeit verwendete Modellorganismus war *Mus musculus*. Die Haltung erfolgte gemäß den Tierschutzbestimmungen. Die Mäuse wurden auf Holzstreu in separat ventilierten Kunststoffkäfigen (Aero Cage-Mouse IVC, Techniplast Italien) gehalten. Die Haltungstemperatur betrug 22 bis 23 °C und die relative Luftfeuchte 45 bis 48 %. Die Tiere wurden in einem zwölfstündigen Tag- und Nachtzyklus mit jeweils einer Stunde Dämmerung in den Übergängen gehalten. Zur Identifikation einzelner Individuen wurden den Tieren, bevor die das Alter von zwei Wochen erreichten, Ohrmarkierungen vorgenommen und eine Schwanzbiopsie entnommen. Mit der isolierten DNA der Biopsie erfolgte die Genotypisierung der Tiere mittels PCR (siehe 2.4.).

## 2.3. Generierung verwendeter Mauslinien

### 2.3.1. Verwendete *miR-1/206/133* Knock-out Mauslinien

In Tabelle 2 und Tabelle 3 sind die verwendeten und generierten *miR-1/206/133* Knock-out Mauslinien, zusätzlich verwendete Cre-Linien und Cre-Rekombinase-Reporterlinien zusammengefasst. Weitere Ausführungen zur Generierung der einzelnen Linien folgen im darunter befindlichen Text und im Anhang (Abb. 5.1.-5.2. Anhang).

**Tabelle 2: Übersicht verwendeter Cre-Rekombinase Reporter Mauslinien**

Bezeichnung	Genotyp	Hintergrund
ZAP-HSA-Cre-ERT2	<i>ZAP</i> <sup>+/-</sup> // <i>HSA-Cre-ERT2</i> <sup>+/-</sup>	Tamoxifen induzierbare myozytenspezifisch exprimierte Cre-Rekombinase in Kombination mit einem Doppelreporter zur Feststellung der Cre-Effektivität
ZAP-HSA-MCM	<i>ZAP</i> <sup>+/-</sup> // <i>HSA-MCM</i> <sup>+/-</sup>	Tamoxifen induzierbare myozytenspezifisch exprimierte Cre-Rekombinase in Kombination mit einem Doppelreporter zur Feststellung der Cre-Effektivität
ZAP- HSA-rtTA-TRE-Cre	<i>ZAP</i> <sup>+/-</sup> // <i>HSA-rtTA-TRE-Cre</i> <sup>+/-</sup>	Doxycyclin induzierbare myozytenspezifisch exprimierte Cre-Rekombinase in Kombination mit einem Doppelreporter zur Feststellung der Cre-Effektivität

**Tabelle 3: Übersicht verwendeter *miR-1/206/133* Knock-out Mauslinien**

Bezeichnung	Genotyp	Hintergrund
tKO	<i>miR-1-2/133a-1</i> <sup>lox/lox</sup> // <i>miR-1-1/133a-2</i> <sup>-/-</sup> // <i>miR-206/133b</i> <sup>-/-</sup> // <i>Pax7-Cre</i> <sup>+/-</sup>	Konstitutiver <i>miR-1-1/133a-2</i> und <i>miR-206/133b</i> Knock-out, kombiniert mit skelettmuskelspezifischen <i>miR-1-2/133a-1</i> Knock-out
MuSC tKO	<i>miR-1-2/133a-1</i> <sup>lox/lox</sup> // <i>miR-1-1/133a-2</i> <sup>-/-</sup> // <i>miR-206/133b</i> <sup>-/-</sup> // <i>Pax7-CreERT2</i> <sup>+/-</sup>	Konstitutiver <i>miR-1-1/133a-2</i> und <i>miR-206/133b</i> Knock-out kombiniert, mit Tamoxifen induzierbaren MuSC spezifischen <i>miR-1-2/133a-1</i> Knock-out
adult tKO	<i>miR-1-2/133a-1</i> <sup>lox/lox</sup> // <i>miR-1-1/133a-2</i> <sup>-/-</sup> // <i>miR-206/133b</i> <sup>-/-</sup> // <i>HSA-rtTA-TRE-Cre</i> <sup>+/-</sup>	Konstitutiver <i>miR-1-1/133a-2</i> und <i>miR-206/133b</i> Knock-out kombiniert, mit Doxycyclin induzierbaren myozytenspezifischen <i>miR-1-2/133a-1</i> Knock-out
ctKO	<i>miR-1-2/133a-1</i> <sup>-/-</sup> // <i>miR-1-1/133a-2</i> <sup>-/-</sup> // <i>miR-206/133b</i> <sup>-/-</sup>	Konstitutiver <i>miR-1-2/133a-1</i> , <i>miR-1-1/133a-2</i> und <i>miR-206/133b</i> Knock-out

**tKO.** Um Tieren mit einem totalen Verlust aller *miR-1/206/133* Cluster im Skelettmuskel zu erzeugen, wurden konstitutive *miR-1-2/133a-1* und *miR-206/133b* Knock-out Tiere, mit einer skelettmuskelspezifisch agierenden Pax7-Cre-Mauslinie <sup>125</sup> gekreuzt. Um eine Cre-abhängige Deletion des dritten miRNA-Clusters zu erreichen, wurde das Cre/loxP-Rekombinations-System verwendet. Durch das Floxen der *miR-1-2/133a-1* Allele konnte eine Deletion des *miR-1-2/133a-1* Clusters unter der Kontrolle des Pax7-Promoters bereits in Skelettmuskelvorfürerzellen als auch in späteren MuSC erreicht werden. Zur Erzeugung des verwendeten tKO Mausmodells wurden *miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>*, *miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>* und *Pax7-Cre<sup>+/-</sup>* Mäuse wie beschrieben <sup>4</sup> generiert. Die resultierenden Mäuse wurden mit *miR-206/133b* Knock-out Mäusen <sup>2</sup> gekreuzt. Durch zeitliche koordinierte Kreuzung (Plug-Check Verpaarung) resultierender heterozygoten Elterntieren, wurden *miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>//miR-206/133b<sup>-/-</sup>//Pax7-Cre<sup>+/-</sup>* tKO Mäuse mit einer Wahrscheinlichkeit von 25 % erhalten.

**MuSC tKO.** Um einen totalen Verlust aller *miR-1/206/133* Cluster in MuSCs untersuchen zu können, wurden *miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>//miR-206/133b<sup>-/-</sup>* Tiere mit einer induzierbaren Cre-Mauslinie kombiniert. Um sowohl eine räumliche, als auch zeitlich steuerbare Deletion von *miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>* in MuSCs zu erreichen, wurde die Tamoxifen-induzierbare *Pax7-CreERT2* verwendet. Bei dieser Liganden-aktivierbaren Rekombinase wurde die Cre-Rekombinase mit der modifizierten LBD (Ligandenbindungsdomäne) des Estrogenrezeptors fusioniert <sup>126</sup>. Zur Indizierung der Deletion wurde den Mäusen das synthetische Antiestrogen Tamoxifen (75 mg/kg; Sigma #T5648) intraperitoneal in fünf aufeinander folgenden Tagen im Alter von acht bis zehn Wochen injiziert.

**adult tKO.** Zur funktionellen Untersuchung der *miR-1/206/133* Cluster in adulten Mäusen, wurden erneut eine Liganden-aktivierbaren Cre-Rekombinase verwendet. Hierfür wurden zunächst mehrere induzierbare skelettmuskelspezifische Cre-Mauslinien mit einem Doppelreporter zur Feststellung der Cre-Effektivität gekreuzt ((Tabelle 2) <sup>127, 128 129, 130</sup>). Tiere der beiden Tamoxifen-induzierbaren Cre-Mauslinien wurden mit Tamoxifen (75 mg/kg) intraperitoneal an fünf aufeinander folgenden Tagen mit zwei Tagen Pause dreimal im Alter von acht bis zehn Wochen injiziert.

Die adult tKO Mauslinie wurde durch die Kombination der *miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>*, *miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>* und *miR-206/133b<sup>-/-</sup>* Allele mit der myozytenspezifisch agierenden *HSA-rtTA-TRE-Cre* <sup>128</sup> generiert. Die hierbei verwendete *HSA-rtTA-TRE-Cre* Mauslinie basiert auf dem Doxycyclin induzierbaren binären Tet-On-Rekombination-System. Die Basis dieses Systems ist zum einen ein reverser Doxycyclin-kontrollierbarer Transaktivator (rtTA) unter der Kontrolle des HSA-Promoters. Zum anderen ein Doxycyclin responsiver Promoter, der für eine gesteuerte Cre-Expression verantwortlich ist (*TRE-Cre*). Durch diese Kombination kann im Tet-On System das Doxycyclin-abhängige rtTA nur in Anwesenheit von Doxycyclin an das TRE (*Tetracycline response element*) binden und so eine Cre-Expression induzieren <sup>131</sup>. Die Doxycyclin-Applikation

erfolgte über das Trinkwasser in einer Konzentration von 2 mg/ml Doxycyclin (Sigma #D9891) mit 5 % Saccharose (Roth #9097.1) in Trinkwasser *ad libitum* für drei Wochen. Eine erneute Behandlung erfolgte alle sechs Wochen für jeweils eine Woche.

**ctKO.** Zur Erzeugung eines konstitutiven tKO Mausmodells, wurden heterozygote Tiere des konstitutiven *miR-1/133a* Cluster Doppel-Knock-outs mit *miR-206/133b* mutanten Tieren gekreuzt. Durch zeitliche koordinierte Kreuzung (Plug-Check Verpaarung) heterozygoten Elterntieren, wurden *miR-1-2/133a-1<sup>-/-</sup>//miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>//miR-206/133b<sup>-/-</sup>* ctKO Mäuse erhalten. Für diese Kreuzung konnte allerdings lediglich eine Kombination aus heterozygoten Elterntieren für das *miR-1-1/133a-2* Allel verwendet werden, da der *miR-1/133a* Cluster Doppel-Knock-out embryonal letal ist<sup>3</sup>. Eine Deletion des *miR-206/133b* Clusters führt zur keinem letalen Phänotyp<sup>2</sup>.

### 2.3.2 Mäuse mit CRK Überexpression

Bei Tabelle 4 handelt es sich um eine Übersicht aller verwendeten und generierten Mäuse mit CRK Überexpression. Weitere Ausführungen zur Generierung der einzelnen Linien folgen im darunter befindlichen Text. Für den genauen Ablauf der einzelnen Klonierungsschritte sieht Punkt 2.10.5.

**Tabelle 4: Übersicht generierter Mäuse mit CRK Überexpression**

Bezeichnung	Genotyp	Hintergrund
Crk-tg	<i>Crk-tg<sup>+/-</sup></i>	Skelettmuskelspezifische Überexpression von <i>Crk</i>
Crk-SPH	<i>Crk-sgRNA<sup>+/-</sup>//dCas9-SPH<sup>+/-</sup>//Pax7-Cre<sup>+/-</sup></i>	Skelettmuskelspezifische Aktivierung des endogenen <i>Crk</i> Lokus
adult Crk-SPH	<i>Crk-sgRNA<sup>+/-</sup>//dCas9-SPH<sup>+/-</sup>//HSA-rtTA-TRE-Cre<sup>+/-</sup></i>	Skelettmuskelspezifische induzierbare Aktivierung des endogenen <i>Crk</i> Lokus

**Crk-tg.** Für die Überexpression von CRK in muriner Skelettmuskulatur wurde der *mmu-Crk* ORF dem DNA-Buch Fantom2 FantomClones 062005 entnommen. Er repräsentiert die Spleißvarianten AK028488 (*mmu-Crk-201\_ENSMUST00000017920.13*). Der *mmu-Crk* ORF in den pSG5-HSA-MCM Vektor nach vorheriger MerCreMer-Domänen Depletion durch EcoRI-Verdau und Religation, inseriert. Der pSG5-HSA-MCM war ein Geschenk von Karyn Esser<sup>127</sup>. Der *Crk* ORF wurde durch PCR (Primer Tabelle 5) amplifiziert und über die BamHI-Schnittstelle in den entstandenen pSG5-HSA eingebracht.



**Tabelle 5: Verwendete Primer zur Amplifikation des mmu-Crk ORF**

Bezeichnung	Sequenz 5' > 3'
<i>Crk</i> -tg forward-Primer	ATCGGGATCCTGATTTTCGGGCGCTGCTGGGAGGCTG
<i>Crk</i> -tg reverse-Primer	CGACTGGATCCCCATCTGTCAGCAAACCTGTTCGAGC

Der resultierende pSG5-HSA-CRK Vektor wurde mit DrdI und PvuI verdaut. Mit dem erhaltenen Transgenfragment wurde eine Pronukleusinjektion nach einem Standardprotokoll durchgeführt. Die erhaltenen transgenen Mäuse wurden im Alter von E18.5 analysiert.

**Crk-SPH.** Als weitere Methode zur Überexpression von CRK in der murinen Skelettmuskulatur wurde eine gezielte Aktivierung des endogenen *Crk* Locus vorgenommen, um eine gesteigerte Expression von CRK hervorzurufen. Die Basis dieses Mausmodells besteht aus drei Komponenten: Erstens, transgene Cre-abhängige *CRISPR-dCas9-CAG-LSL-dCas9-SunTag-p65-HSF1* (*dCas9-SPH*) Aktivator-Mäuse<sup>132</sup>. Zweitens, eine skelettmuskel-spezifisch exprimierte Cre-Mauslinie und drittens eine *Crk* spezifische single guide RNA (sgRNA). Zur Generierung der *Crk*-SPH Mauslinie wurden zunächst *dCas9-SPH* positive Mäuse mit der skelettmuskelspezifischen *Pax7-Cre*<sup>125</sup> gekreuzt. Um gezielt den endogenen CRK-Lokus ansprechen zu können, wurden *Crk* spezifische sgRNAs designt wie in<sup>133</sup> beschrieben. Die verwendeten *Crk*-spezifischen Sequenzen entstammten wiederum der Publikation von<sup>134</sup> (*Crk* sgRNA PCR-Sequenzen siehe Tabelle 6).

**Tabelle 6: Verwendete *Crk* sgRNA PCR-Sequenzen**

Bezeichnung	Sequenz 5' > 3'
#A	gtgaaaggacgaaacaccgggccaaccgaggatgggggttttagagctagaaatag
#B	gtgaaaggacgaaacaccgggagtgcgcatgcggtctctgttttagagctagaaatag
#C	gtgaaaggacgaaacaccggggacgcccgccattgggagagtttttagagctagaaatag
#D	gtgaaaggacgaaacaccgggaggcggagtctaggctaaagtttttagagctagaaatag
#E	gtgaaaggacgaaacaccggggacccaaccgaggatgttttagagctagaaatag

Alle generierten sgRNAs wurden mittels PCR mit einem U6-Promoter aus dem Plasmid Addgene #42335 durch ausgestattet und anschließend *in vitro* getestet. Hierfür wurden C2-Zellen, immortalisierte murine Myoblasten (Tabelle 6) verwendet. Um die effektivsten sgRNAs zu selektieren, wurde jede sgRNA mit einem SP-dCas9-VPR Aktivatorsystem Vektor (Addgene #63798) co-transfiziert, RNA isoliert, cDNA präpariert und ein Taqman Assay durchgeführt (siehe hierzu 2.7., 2.10.1. und 2.10.2.). Es wurden Pronukleusinjektion des Fragments der effektivsten sgRNA vorgenommen. Um eine skelettmuskelspezifische Aktivierung von *Crk* zu erhalten wurden, Transgen-positive Mäuse mit *Pax7-Cre<sup>+/-</sup>//dCas9-SPH<sup>+/-</sup>* Mäusen gekreuzt. Die resultieren *Crk*-sgRNA<sup>+/-</sup>//*Pax7-Cre<sup>+/-</sup>//dCas9-SPH<sup>+/-</sup>* Tiere wurden im Alter von E18.5 analysiert.

**adult Crk-SPH.** Als System zur Überexpression von CRK in der adulten murinen Skelettmuskulatur wurde ebenfalls *dCas9-SPH* System<sup>132</sup> in Kombination mit den generierten *Crk*

spezifische sgRNAs verwendet. Diese *dCas9-SPH//Crk-sgRNA* positiven Mäuse wurde mit einer induzierbaren der induzierbaren, skelettmuskelspezifischen HSA-rtTA-TRE-Cre<sup>128</sup> gekreuzt. Die Doxycyclin-Applikation erfolgte im Trinkwasser in einer Konzentration von 2 mg/ml Doxycyclin mit 5 % Saccharose *ad libitum* für drei Wochen. Alle Analysen wurden in der vierten Woche nach Behandlungsbeginn vorgenommen.

#### 2.4. Genotypisierung von Mäusen

Um den Genotyp der gezüchteten Mäuse ermitteln zu können, wurden aus den entnommenen Schwanzbiopsien der Mäuse DNA isoliert (siehe 2.10.1.). Mit der isolierten DNA wurde im Anschluss eine PCR mit spezifisch designten Primern durchgeführt (Tabelle 7, Tabelle 8). Lediglich für Tiere die auf den Cre-Rekombinase Doppelreporter ZAP genotypisiert werden sollten wurden eine  $\beta$ -Galactosidase Färbung der Schwanzbiopsie vorgenommen (siehe 2.6.7).

**Tabelle 7: Übersicht verwendeter Primer zur Genotypisierung der verwendeten Mauslinien**

Bezeichnung	Sequenz 5' > 3'
AB138	cataaaacactggctgtccatgtgt
AB140	aacacgtgaattttctgtttaaca
AB144	actcagttttacgcaaagctctgg
AB147	ctgctgcagggaggcctccgcaatg
AB148	gacttttcagcacgcctgtctgct
AB151	tgggccaccctcagtctggcgaga
IK014	actgagaggtgggaagctca
IK015	ggcgagtttacgggttgta
IK016	aggtgtagagaaggcactta
IK017	ctaatcgccatcttccagca
IK026	cccgagccgagagtagcagttgtag
IK029	catctccattctaaacaacaccc
IK047	ttccatttcaggtgtcgtgacgtac
IK049	ggttctcttcagccgggtggcctcg
JD040	cattaattcactcacacaatgaaatgatcc
JD042	cagagtcttaagtgtattcagaaatgtagc
KW03	ggatagtgaacaggggcaa
KW04	gctctggatacacctgagtct
KW05	tcggccttcttaggttctgctc
TB1085	gtaaaacgacggccagtgagggcctatttccatgattc
TB1088	aggaaacagctatgaccatgaaaaaagcaccgactcgggtgccac
TB492	ttctgcgtgacaagtgcctcggagg
TB496	tgaggagagccatttgactctttcc
TB498	ccaaatgtgtcagtttcatagcctg
TB504	gaagtctgtagaggtagatttctgg
TB512	taaactggtcgagcgatggatttcc
TB513	catatctcgcggctccgacacgg

**Tabelle 8: Übersicht verwendeter Primer-Kombinationen und Annealing-Temperaturen**

PCR	Annealing [°C]	Primer-Kombination	Bandengröße
<i>Crk-sgRNA</i>	66	TB1085/TB1088	400 bp
<i>Crk-tg</i>	62	IK026/IK029	314 bp
<i>dCas9-SPH</i>	58-66	IK047/IK049	305 bp
<i>HSA-Cre-ERT2</i>	58-66	TB512/TB513	244 bp
<i>HSA-MCM</i>	58-66	TB512/TB513	244 bp
<i>HSA-rtTA</i>	62	IK014/IK015	284 bp
<i>miR-1-1/133a-2</i>	58-62	AB148/AB151/TB496	257 bp/ 400 bp
<i>miR-1-2/133a-1</i>	58-62	JD040/JD042	230 bp/ 360 bp
<i>miR-206/133b</i>	62	TB492/TB496/TB504	207 bp/ 290 bp
<i>Pax7-Cre</i>	58-66	KW03/ KW04/ KW05	465 bp / 340 bp
<i>Pax7-CreERT2</i>	58-66	TB512/TB513	244 bp
<i>TRE-Cre</i>	62	IK016/IK017	412 bp

Im Folgenden wurde die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes und der Ablauf des verwendeten PCR- Standardverfahrens dargestellt (Tabelle 9). Es wurde der Taq Plus Master Mix II Dye Plus (Vazyme #P213) verwendet.

Taq Plus Master Mix II	10 µl	Taq Plus Master Mix II	10 µl
Primer 1	1 µl	Primer 1	1 µl
Primer 2	1 µl	Primer 2	1 µl
<u>DNA</u>	1 µl	Primer 3	1 µl
mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen	25 µl	<u>DNA</u>	1 µl
		mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen	25 µl

**Tabelle 9: PCR Standardprogramm**

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	3 min	
Denaturierung	94°C	30 s	35x
Annealing	63°C	30 s	
Elongation	72°C	30 s	
Finale Elongation	72°C	5 min	
Halten	10°C	∞	

Nach der PCR wurde das amplifizierte Produkt in einem 2 % Agarosegel (Biozym #840004) elektrophoretisch aufgetrennt und ausgewertet.

### 2.5. Tierexperimentelle Methoden und Tötung

Jeder aufgeführte Tierversuch wurde jeweils in TVA B2/1052 oder TVA B2/1234 genehmigt und wie dort beschrieben durchgeführt.

#### 2.5.1. Lungenschwimmtest

Um neugeborene Tiere auf eine ausreichende die Expansion der Lunge durch Atmung nach der Geburt zu testen, wurde die Schwimmfähigkeit der Lunge ermittelt. Hierzu wurden tKO-Tieren und ihren Geschwistertieren im Alter von E18.5 durch einen Kaiserschnitt isoliert. Nach einer Wartezeit von 15 min, in der die Tiere auf einer Wärmeplatte platziert waren, wurden die Lungen der Tiere nach der Tötung entnommen. Die jeweiligen Lungen wurden in 1xPBS gegeben und die Schwimmleistung sofort dokumentiert. Im Anschluss wurden die getesteten Neugeborenen genotypisiert (siehe 2.4.). Die ermittelten Daten der Lungenschwimmprobe wurden den entsprechenden Tieren zugeordnet und analysiert.

### 2.5.2. Beurteilung von Bewegungskoordination und Motorik in adulten Tieren

#### 2.5.2.1. Rotarod Analyse

Um zu beurteilen ob Tiere zu koordinierten Bewegungsabläufen fähig sind, wurde eine Analyse mittels Rotarod (LE8200, Panlab) vorgenommen. Dieses standardisierte Testverfahren basiert darauf, dass jeweils eine Maus auf einem rotierenden Stab platziert wird. Durch ständige Rotation mit ansteigender Geschwindigkeit wird gezielt die Bewegungskoordination getestet. Hierfür wurden die Mäuse zunächst an das Gerät bei 5 rpm für 1 min gewöhnt. Erst nach erfolgreich angeschlossener Trainingsphase wurden jeweils vier Durchläufe pro Tag und Tier bei ansteigender Geschwindigkeit von 4 rpm bis 40 rpm innerhalb 1 min durchgeführt. Es wurden Laufdauer und die maximal erreichte Geschwindigkeit dokumentiert. Eine erhöhte Tendenz zum frühen Herunterfallen der Mäuse deutet auf Beeinträchtigungen der Motorik hin <sup>135</sup>.

#### 2.5.2.2. Footprint Assay

Mit diesem vielfach genutzten Verfahren wurde ebenfalls die Fähigkeit von Mäusen zu koordinierten, zielgerichteten Bewegungsabläufen getestet <sup>135</sup>. Während des Laufens platzieren Mäuse typischerweise den Hinterfuß fast auf derselben Stelle, wo zuvor die entsprechende Vorderpfote derselben Körperseite aufgetreten ist. Eine Störung der Motorik beeinflusst sowohl die Fußabdrücke, als auch die Gangart. Um eine Beurteilung der Gangart während freien Laufens vorzunehmen, wurden die Fußsohlen jeweils mit ungiftiger Lebensmittelfarbe (Wusitta) benetzt. Die Vorderfüße wurden mit roter und die Hinterfüße mit grüner Farbe markiert. Anschließend wurden die Maus vor einem mit Papier ausgelegten Gang platziert, den sie freiwillig durchquerte um in eine Box zu gelangen. Hierbei wurden die Fußabdrücke auf dem Papier hinterlassen.

Anschließend wurde der Papierbogen entfernt, getrocknet und analysiert. Jede Maus absolvierte zwei bis drei Durchläufe.

### **2.6. Histologische Untersuchung von Mausgewebe und Zellen**

#### **2.6.1. Anfertigung von Kryoschnitten**

Das Gewebe wurde entnommen und in einem 2 ml Reaktionsgefäß ausgerichtet. Durch eine Mischung von flüssigen Stickstoff gekühltem Propangas, versetzt mit gekühlten Isopentan (2:1) wurden das Präparat anschließend eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Im Kryotom (CM1950, Leica) wurde das Gewebe mit TissueTek (Leica) auf der Probenhalterung fixiert. Es wurden 10 µm dicke Kryoschnitte bei -25 °C angefertigt und mit Superfrost Objektträgern (ThermoFisher #J3800AMNZ) aufgenommen. Bis zu Verwendung wurden die Schnitte bei -80 °C aufbewahrt

#### **2.6.2. Immunfluoreszenzfärbung von Geweben, Gewebeschnitten und Zellen**

Dieses Verfahren dient der Sichtbarmachung bestimmter Proteine mittels spezifischer Antikörper, die an ein Fluorochrom gekoppelt wurden. Diese spezifische Fluoreszenzmarkierung konnte anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert werden. Zur Durchführung von Immunfluoreszenzfärbung von adhären, kultivierten Zellen oder 10 µm dicken getrockneten Kryoschnitten, wurden die Proben zunächst für 7 min 4 % PFA (Sigma #6148-1KG) in PBS fixiert. Es folgten drei Waschschrte mit 0,3 % Triton X-100 (Sigma #X100-100ML) in PBS für jeweils 10 min, gefolgt von einem fünfminütigen Waschschrte mit PBS. Das Blocken erfolgte für 1 h bei RT. Die Blockierlösung wurde im Verhältnis 1:10 aus 0,01 % Triton X-100 in PBS und Blocking One (Nacalai #03953-95) angesetzt. Wenn der später verwendete Primärantikörper aus der Maus stammte, wurde zusätzlich im Verhältnis 1:25 Mouse on Mouse Blocking Reagent (Vektorlabs #MKB-2213) zugesetzt. Hiernach erfolgte wieder ein Inkubationsschrte mit PBS. Nun wurden die Präparate mit in Solution A (Nacalai #02272-74) verdünnten Primärantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert (Tabelle 10). Am nächsten Tag erfolgten zunächst drei Waschschrte für 10 min mit 0,01 % Triton X-100 in PBS. Zwischenzeitlich wurde der entsprechende Sekundärantikörper in Solution B (Nacalai #02297-64) verdünnt und die Proben eine 1 h bei RT mit der Antikörperlösung inkubiert. Spezifisch bindende bereits Fluorochrom-markierte Proteine wurden ebenfalls der Sekundärantikörper zugegeben (Tabelle 11, Tabelle 12). Erneut wurde zweimal mit 0,01 % Triton X-100 in PBS für jeweils 10 min gewaschen. Es folgte falls benötigt ein fünfminütiger Färbungsschrte mit einer 1:1000 Dapi-Lösung (Merck #D9542) in PBS. Die Färbung wurde abgeschlossen mit einem weiteren Waschschrte in PBS. Für die mikroskopische Auswertung von gefärbten Zellen wurden diese in PBS belassen. Gewebeschnitte wurden mit Fluoromount W (Serva #21634.01) eingedeckt. Der Objektträger wurde zusätzlich mit Nagellack versiegelt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei 4 °C.

**Tabelle 10: Verwendete Primärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen**

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung
Anti-Laminin (Sigma #L939)	Kaninchen	1:1000
Anit-CRK (BDBiosciences #610035)	Maus	1:1000
Anti-GFP (ThermoFisher #A-11122)	Kaninchen	1:1000

**Tabelle 11: Verwendete Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen**

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung
Anit-Kaninchen IgG Alexa488 (Invitrogen #A11070)	Ziege	1:1000
Anit-Kaninchen IgG Alexa680 (Invitrogen #A21076)	Ziege	1:1000
Anit-Maus IgG Alexa488 (Invitrogen #A21121)	Ziege	1:1000

**Tabelle 12: Fluorochrom-markierte Proteine für Immunfluoreszenzfärbungen**

Bezeichnung	Verdünnung
$\alpha$ -Bungarotoxin (BTX) Alexa594 (ThermoFisher # B13423)	1:300
$\alpha$ -Bungarotoxin Alexa Fluor555 (ThermoFisher #B35451)	1:300

### 2.6.3. Whole-mount Diaphragmafärbung

Die *whole-mount* Diaphragmafärbung diente zur Analyse der Innervierung des Skelettmuskels. Störungen der Innervierung, im speziellen des Verteilungsmusters von AChRs können auf Grund des sehr distinkten Innervierungsverlaufs gut beurteilt werden. Bei der Durchführung dieses Verfahrens wurde sich an einem bereits publizierten Protokoll orientiert <sup>95</sup>. Zur Färbung des Diaphragmas wurde dieses, Tieren im Stadium E18.5 entnommen und auf Eis in PBS aufbewahrt. Die Fixierung des Gewebes erfolgte über Nacht in 2 % PFA (Sigma #6148-1KG) in PBS. Am Folgetag wurden die Proben zunächst für 10 min mit PBS gewaschen und anschließend in einer 0,1 M Lösung Glycin (Sigma G8898) inkubiert. Hiernach erfolgte erneut ein Waschschrift mit PBS gefolgt von einer dreistündigen Inkubation mit 0,5 % Triton X-100 (Sigma #X100-100ML).

Die Proben wurden über Nacht mit  $\alpha$ -Bungarotoxin Alexa Fluor555 (Tabelle 13) gefärbt und am darauffolgenden Tag erneut wie beschrieben mit 0,5 % Triton X-1 gewaschen. Nach einem letzten Waschschrift in PBS wurde das Diaphragma flach auf dem Objektträger liegenden in Fluoromount W (Serva #21634.01) eingebettet. Der Objektträger wurde zusätzlich mit Nagellack versiegelt und Lagerung erfolgte bei 4 °C.

**Tabelle 13: Fluorochrom-markierte Proteine zur *whole-mount* Diaphragmafärbung**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Verdünnung</b>
$\alpha$ -Bungarotoxin Alexa Fluor555 (ThermoFisher #B35451)	1:300

#### **2.6.4. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)**

Dieses mikroskopische Verfahren diente der direkten Abbildung der Feinstruktur des Skelettmuskels und seinen kontraktiven Einheiten mithilfe von Elektronenstrahlen. Hierzu wurden Quadriceps-Muskeln von Tieren im Alter E18.5 präpariert. Die Fixierung erfolgte in 1,5 % PFA (Sigma #6148-1KG), 1,5 % Glutaraldehyd (Sigma #G5882) und 0,15 M HEPES (Sigma #H3375) in ddH<sub>2</sub>O bei 4 °C für mindestens 24 h. Die Proben wurden mittels 1 % Osmiumtetroxidlösung (Sigma #75633) und Uranylacetat (Agar Scientific #AGR1260A) kontrastiert und nachfixiert. Anschließend wurden die Muskeln durch eine aufsteigende Ethanol-Reihe entwässert. Epoxydharz (Agar 100 Resin, Agar Scientific #AGR1031) wurde zum Einbetten verwendet. Nun wurden Ultradünnschnitte der Präparate mittels Ultramikrotom angefertigt und diese mit dem TEM (Zeiss EM 902/ Zeiss LEO 906) analysiert.

#### **2.6.5. Hämatoxylin-Eosin Färbung**

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung (H&E) diente der Visualisierung und Analyse der zellulären Morphologie des Skelettmuskels. Zunächst wurden die Kryoschnitte bei RT getrocknet. Nun wurden die Präparate für 2 min in ddH<sub>2</sub>O inkubiert, um anschließend für 10 min mit Hämalun (Gills Nr. 3, Sigma #GHS332) gefärbt zu werden. Anschließend erfolgte Waschschrift in Leitungswasser für 10 min. Nun wurden die Schnitte kurz in 70 % Ethanol mit 0,37 % HCl in ddH<sub>2</sub>O getaucht und erneut mit Leitungswasser gewaschen. Es folgte eine Eosin-Färbung (Merck #921 K11613835) für 7 min. Mittels aufsteigender Ethanol-Reihe (70 %, 80 %, 90 % und 100 % Ethanol) wurden die Präparate entwässert. Das Eindecken erfolgte mit Entellan (Merck #1.07960).

#### **2.6.6. Succinat Dehydrogenase Färbung**

Zur Analyse von Mitochondriendichte und –morphologie wurden frisch angefertigte Skelettmuskelschnitte mit der SDH-Färbelösung (10 % 0,2 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 38 % 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 % 0,2 M Bernsteinsäure, 2 % 10%tige NBT-Lösung (Roche #10214221)) für etwa zwei Stunden in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte zweimal für jeweils 5 min mit PBS gewaschen. Das Eindecken der Präparate erfolgte mit Fluoromount W (Serva #21634.01). Zusätzlich wurden die Schnitte mit Nagellack umrandet.

### 2.6.7. $\beta$ -Galactosidase- alkalische Phosphatase (LacZ-AP) Färbung

LacZ-AP Färbung diente dem Nachweis der  $\beta$ -Galactosidase oder alkalische Phosphatase Expression. Die LacZ-Färbung wurden mit Kryoschnitten wie beschrieben bei 30 °C durchgeführt<sup>130</sup> und durch das Waschen mit PBS gestoppt. Die AP-Färbung wurde im Anschluss nach den Angaben des Kit-Herstellers (Sigma #F4523) durchgeführt. Die Präparate wurden im Anschluss mit Fluoromount W (Serva #21634.01) eingebettet und mit Nagellack umrandet.

### 2.7. Kultivierung und Transfektion von immortalisierten Zelllinien

Alle immortalisierten Zelllinien (Tabelle 14) wurden mit den unter Tabelle 15 gelisteten Medien in Kultur gehalten. Bei längerer Kultivierung von Zellen wurde mindestens alle zwei Tage das Medium erneuert. Zum Passagieren von adhären Zellen wurden diese zunächst mit Trypsin (Sigma #T4049) abgelöst. Anschließend wurden der Prozess durch die Zugabe serumhaltigen Mediums gestoppt. Die Zellen wurden pelletiert und anschließend in ausgesät. Zur Transfektion von Zellen wurde das Lipofectamine 3000- Kit (ThermoFisher #L3000075) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

**Tabelle 14: Verwendete immortalisierte Zelllinien**

Bezeichnung	Beschreibung
C2 (C2C12)	Immortalisierte murine Myoblasten (Differenzierungsfähig)
HEK-293	Immortalisierte humane embryonale Nierenzellen

**Tabelle 15: Verwendete Zellkulturmedien**

Bezeichnung	Zusammensetzung
Proliferationsmedium	DEMEM (Merck #D5796) 10 % fötales Kälberserum (Sigma #F7524-500ML) 1 % Penicilin-Streptomycin-Glutamin (ThermoFisher #10378016)
Differenzierungsmedium	DEMEM (Merck #D5796) 2 % Pferdeserum (Sigma #H0146-5ML) 1 % Penicilin-Streptomycin-Glutamin (ThermoFisher #10378016)
MuSC Medium	DMEM Glutamax (ThermoFisher #31966-021) 20 % fötales Kälberserum (Sigma #F7524-500ML) 1 % Penicilin-Streptomycin (ThermoFisher #15140122) 500 ng bFGF (Peprtech #100-18B)

### 2.8. Muskelstammzellisolation aus adulter Skelettmuskulatur mittels FACS

Dieses Verfahren diente der Gewinnung von isolierten adulten Muskelstammzellen (MuSCs). Etwaige Unterschiede zwischen verschiedener Mausgenotypen in Bezug auf Eigenschaften der MuSCs wie Proliferationsleistung und Differenzierung konnten so analysiert werden. Die Isolation und Kultivierung wurde wie bereits beschrieben<sup>66</sup> durchgeführt. In Kürze, Skelettmuskeln von



einzelnen Tieren wurden in 2 % Penicilin-Streptomycin DMEM (Merck #D5796) gesammelt. Anschließend wurde das Gewebe fein zerkleinert und mit Dispase und Collagenase II bei 37 °C verdaut. Der Verdau wurde im Anschluss mit FCS gestoppt und die Suspension gefiltert (100 µm, 70 µm und 40 µm Cell Easystainer). Nach Zentrifugation wurden die verbleibenden Zellen mit einer Kombination aus verschiedenen Antikörpern markiert (Tabelle 16).

**Tabelle 16: Verwendete Antikörper zur APC-Selektion**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Spezies</b>	<b>Ziel</b>	<b>Verdünnung</b>
anti-CD45-APC (eBioscience #17-0451)	Ratte /IgG2b	Hämatopoetische Zellen	1:100
anti-CD31-APC (eBioscience #17-0311)	Ratte /IgG2a	Endothelzellen (Leukozyten und Thrombozyten)	1:100
anti-Ly-6A/E (Sca-1)- APC (eBioscience #17-5981)	Ratte /IgG2a	Hämatopoetische Stammzellen (periphere T und B Zellen)	1:100
anti-CD34-Alexa450 (eBioscience #48-0311- 80)	Ratte /IgG2a	Satellitenzellen (MuSCs)	1:100
anti- $\alpha$ 7 Integrin-FITC (MBL #K0046-4)	Maus /IgG1	Satellitenzellen (MuSCs)	1:100

Nun wurden die Zellen gewaschen und mit anti-APC MicroBeads inkubiert. Es folgte mittels Milteny AutoMACS ein Depletionsschritt aller CD31, CD45 und Sca-1 positiven Zellen (keine MuSCs). Um tote Zellen während des FACS (BD Biosciences BD FACS ARIA III) identifizieren zu können, wurden die verbleibenden Zellen Propidiumiodid oder DAPI behandelt.

### **2.9. Kultivierung und Proliferationsanalyse von primären Muskelstammzellen (MuSCs)**

Die durch FACS isolierten MuSCs (siehe 2.8.) wurden zur Analyse ihrer Proliferationsfähigkeit mit einer Dichte von 60 000 Zellen/cm<sup>2</sup> auf mit Matrigel (ThermoFisher #CB356238) beschichteten Zellkulturplatten (Greiner) ausgesät. Zur Kultivierung der primären MuSCs wurde DMEM Glutamax (ThermoFisher #31966-021) mit 20 % FCS, 1 % PS und 500 ng bFGF (Peprotech #100-18B) verwendet. Das die Hälfte des Mediums wurde mindestens alle zwei Tage erneuert. Zur Beschichtung der Zellkulturschalen wurde das Matrigel 1:50 mit Satellitenzellmedium verdünnt. Es wurde in einer dünnen Schicht in der Zellkulturschale ausgebracht und für jeweils 20 min bei RT und dann bei 37 °C inkubiert. Zur Analyse der Proliferation und Differenzierung der MuSCs wurde die Konfluenz konstant über 120 h hinweg mindestens alle 3 h durch das IncuCyte Zoom Live Imaging System (Essen Bioscience) ermittelt. Ausgewertet wurde jeweils der durchschnittliche prozentuale Bedeckungsgrad von jeweils vier Sichtfeldern pro Tier über den gesamten genannten Zeitraum hinweg.

### 2.10. Molekularbiologische Methoden

#### 2.10.1. Extraktion von DNA aus Mausgewebe

Zur Extraktion von DNA aus Schwanzbiopsien und anderen Geweben, wurden diese zunächst mit Hilfe von 0,01 mg/ml Protease K (Sigma #P2308-100MG) über Nacht bei 56 °C verdaut. Der Verdau wurde in 500 µl Tail-Lyse-Puffer (5 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl pH 8,5; 200 mM NaCl, 0,2 % SDS) angesetzt. Am darauffolgenden Tag wurden die Proben bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß übertragen. Es folgte die Fällung der DNA durch die Zugabe von 0,8 Volumenanteilen 2-Propanol (Roth # 6752.4). Nach einem 10-minütigen Inkubationsschritt wurde die DNA durch Zentrifugation pelletiert. Anschließend folgte ein Waschschrift mit 70 % Ethanol (Roth #0911.4). Nun wurde das Ethanol entfernt und die DNA-Pellets getrocknet. Die Pellets wurden in 100 µl T<sub>1/10</sub>E Puffer über Nacht bei 56 °C gelöst.

#### 2.10.2. RNA Extraktion aus Gewebe oder aus Zellen

Um RNA aus Mausgewebe oder aus Zellen extrahieren zu können mussten diese zunächst aufgeschlossen werden. Im Falle von Zellen wurden diese zunächst mit PBS gewaschen. Nun wurde Trizol (ThermoFisher #15596018) auf die Zellen gegeben, diese mit Hilfe eines Zellschabers geerntet und durch scheren lysiert. Zur Entnahme von Gewebeproben wurde die Maus getötet, mit PBS perfundiert und das Gewebe in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Aufschließung der Gewebeproben wurden diese mit Trizol in 2 ml Reaktionsgefäße gegeben. Durch die Zugabe einer kleinen Stahlkugel konnte das Gewebe unter Verwendung einer Schwingmühle zerkleinert werden. Nach dem Zerkleinerungsprozess wurden sowohl Zell-, als auch Gewebeproben bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in einem neuen Reaktionsgefäß mit 20 v/v 2-Propanol versetzt. Die Proben wurden gevortext, 5 min inkubiert und bei 5 min bei 12000 g zentrifugiert. Die entstandene wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur RNA-Präzipitation wurden 50 v/v pro eingesetztem Milliliter Trizol zugegeben und die Proben nach 10 min Inkubation bei 4 °C erneut zentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit 75 % Ethanol in Reinstwasser (ThermoFisher #10572211; #11548015) gewaschen. Die Pellets wurden erneut zentrifugiert, getrocknet und zum Lösen mit Reinstwasser versetzt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Spektrophotometrie (NanoDrop 2000c). Die RNA-Proben wurden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### 2.10.2. Reverse Transkriptase Reaktion und Taqman Assay

In diesem Verfahren wird durch Reverse Transkriptase RNA in DNA katalysieren. Der anschließende Taqman Assay (qRT-PCR), dient der qualitativen und quantitativen Analyse der Expression von spezifischen Genen auf Transkriptomebene. Zunächst wurde die RNA wie unter Punkt 2.10.2. beschrieben extrahiert. Es erfolgte nun die Generierung von cDNA. Für microRNAs wurde das MicroRNA Reverse Transkription Kit (#4366596) verwendet. Zum Nachweis anderer

Gene wurde das PrimeScript RT Reagent Kit (TaKaRa #RR047A) nach Angaben des Herstellers verwendet. Der Ablauf gliederte sich in zwei Schritte: Erstens die Reverse Transkriptase Reaktion, und zweitens, den Taqman Assay. Die Expression reifer microRNAs und anderer Gene wurde durch Fluorophor-markierte Taqman-Sonden (Tabelle 17) quantifiziert. Zur späteren Normalisierung wurden VIC markierte Sonden spezifisch für endogene Kontrollgene verwendet. Im Falle von microRNAs wurde die *snRNA U6* und bei anderen getesteten Genen *Gapdh* zur Normalisierung genutzt. Die relative Expression wurde mittels  $\Delta\Delta C_t$  Methode kalkuliert.

**Tabelle 17: Verwendete Taqman-Sonden**

Zielgen	Label	Bezeichnung
<i>Crk</i>	FAM	ThermoFisher #Mm00467065_m1
<i>Gapdh</i>	VIC	ThermoFisher #Mm999999915
<i>miR-1</i>	FAM	ThermoFisher #002222
<i>miR-133</i>	FAM	ThermoFisher #002246
<i>miR-206</i>	FAM	ThermoFisher #000510
<i>snRNA-U6</i>	VIC	ThermoFisher #001973

#### **2.10.4. Micro Array und Transkriptomanalysen mittels GSEA**

Mit diesem Verfahren konnte ein Großteil des Transkriptoms eines Gewebes oder eines Zelllysats generiert und anschließend analysiert werden. Hierfür wurde zunächst die RNA wie unter Punkt 2.10.2. beschrieben präpariert. Als Plattform wurde der Maus Transkriptom-Array 1.0 ST (#P/N 902513) von Affymetrix verwendet. Zur Qualitätskontrolle der RNA-Proben wurde der Agilent Bioanalyser und das RNA 6000 Nano Kit nach Herstellerangaben verwendet. Eine Degradation der RNA konnte anhand der ribosomalen 28 S und 18 S rRNAs bewertet werden. 200 ng quantitativ und qualitativ geeigneter RNA wurden weiter für die weiteren Schritte verwendet. Zur Generierung des Transkriptoms von einzelnen Muskeln wurde GeneChip WT PLUS Reagent Kit (P/N 902280), für MuSCs wurde hingegen GeneChip WT Pico Kit (#P/N902623) verwendet. Die weitere Durchführung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll von Affymetrix (#P/N 703174 Rev. 2). Die RNA wurde zunächst mit Fluoreszenz-Farbstoffen markiert und anschließend auf dem entsprechenden Chip hybridisiert. Nun folgte der Scann-Prozess des Chips und die Analyse der Daten (Affymetrix Expression Console) Die statistische Analyse (t-Test) der Daten wurde mit Star ArrayStar12 mit der RMA Quantil-Methode durchgeführt. Das Testverfahren wurde von Sylvia Thomas und die erste Analyse der Rohdaten wurde von Prof. Dr. Thomas Böttger durchgeführt. Die erhaltenen Daten wurden weitergehen analysiert und ausgewertet. Einen wichtigen Bestandteil dieser Betrachtung stellte die *Gene Set Enrichment* Analyse (GSEA) dar. Mit dieser Methode können Transkriptomdaten weitergehend in Bezug auf signifikante Unterschiede in der Expression von Genen einzelner vor definierten Gensets. Diese Methode wurde mit der GSEA Java Desktop Software v3.0 mit Standarteinstellungen mit dem Permutationstyp „Geneset“ durchgeführt.

### 2.10.5. Kolonierungsarbeiten

Bei den im Folgenden beschriebenen Methoden, handelt es sich um Verfahren zur Generierung neuer Vektoren durch das Einfügen gewünschten DNA-Fragment. Des Weiteren sollten identische Vervielfältigungen einzelner auf gereinigter Plasmide gewonnen werden.

#### 2.10.5.1. Restriktion und Ligation

Zum enzymatischen Verdau von DNA wurden spezielle Restriktionsenzyme der Unternehmen Jena Bioscience oder NEB verwendet. Hierbei wurde sich bei der Verwendung nach den jeweiligen Angaben der Hersteller in Bezug auf die Pufferwahl und Temperatur orientiert. Um zueinander kompatible Überhänge von Plasmid und einzufügenden DNA-Fragmenten zu ermöglichen wurde eine T4 DNA-Ligase (Promega #M1801) mit entsprechendem Puffer verwendet. Bei der Durchführung der Ligation wurde sich an den Herstellerangaben orientiert. Sie erfolgte über Nacht bei 16 °C.

#### 2.10.5.2. Gelextraktion von DNA Fragmenten und Sanger-Sequenzierung

Um gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente aus einem Agarosegel aufreinigen zu können wurde zunächst die gewünschte Bande ausgeschnitten. Das Lösen und Aufreinigen der im Gel befindlichen DNA erfolgte nach Herstellerangaben mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (ThermoFisher #12303368). Falls anschließend eine Sequenzierung des Fragmentes gewünscht wurde, wurden 1,4 µg Vektor-DNA oder 200 ng PCR-Produkt mit entsprechenden Primern pro Ansatz benötigt. Die Sequenzierungsreaktion wurde von dem Unternehmen SeqLab Sequence Laboratories GmbH aus Göttingen durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden anschließend mit der Software Seqman Pro von DNA Star verglichen und ausgewertet.

#### 2.10.5.3. Transformation von DNA und Vektor Maxi-Präparation

Zur Vervielfältigung eines genierten Vektor-Insert-Konstrukts wurde dieses in elektrokompente Bakterien eingebracht. Die auf den Plasmiden enthaltenen Antibiotikum-Resistenzgene ermöglichten anschließend eine gezielte Selektion der Bakterien. Elektrokompente *E. coli* (XL1-Blue Stratagene) wurden mit entsalztem (Merck #VSWP02500) Ligationsansatz (siehe 2.10.5.1.) versetzt. Der Ansatz wurde in eisgekühlte Elektroporationsküvetten (VWR #732-2916) überführt. Die Elektroporation erfolgt bei 2,5 kV, 250 µFD, 200 Ω und 25 µF (BTX ECM 830). Sofort wurden SOC-Medium (0,5 % w/v Hefeextrakt, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 8,56 mM NaCl) zugegeben. Die Bakterien wurden nun für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte das Ausplattieren des jeweiligen Ansatzes auf LB-Agar-Platten mit entsprechend gewählten Antibiotikum. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C. Am nächsten Tag wurde eine Einzelkolonie in Antibiotikum-haltiges LB-Medium übertragen und über Nacht bei 37 °C unter schütteln vermehrt. Die Aufreinigung des Plasmids erfolgten mit dem NucleoBond Xtra Maxi Kit (Macherey-Nagel #740414.50).

### 2.10.6. *In situ* Proximity-Ligation Assay

Durch *in situ* Proximity Ligation Assays (PLA) konnten endogene Protein-Protein Interaktionen in Zelllinien oder isolierten primären Stammzellen nachgewiesen werden (*DuoLink PLA fluorescence technology*, Sigma #DUO92101)). Die Methode ist in der Lage Protein-Protein Interaktionen auf Einzelmolekülebene darzustellen. Aus diesem Grund ist es möglich sowohl eine Aussage über die Lokalisation, also auch über die Anzahl an Interaktionen zu treffen. Die Basis dieser Co-Lokalisationstechnik stellt erstens die Bindung zweier spezifischer primärer Antikörper dar. Dies geschah über Nacht bei 4 °C (Tabelle 18). Die verwendeten Antikörper sollten zum einen spezifisch an jeweils eins der potentiell interagierenden Proteine binden. Zum anderen sollten sie aus verschiedenen Spezies stammen. Im nächsten Schritt wurden speziesspezifische PLA-Sonden, die an kurze spezifischen Oligos gekoppelt sind an die primären Antikörper gebunden. Im Falle einer direkten Nähe der beiden potentiell interagierenden Proteine, sind auch die beiden PLA-Sonden in direkter Nähe zueinander. Ist diese der Fall, so kann durch einen Ligationsschritt einer *rolling circle* DNA Synthese-Reaktion initiiert werden. Hierdurch kommt es zu einer massiven Amplifikation der DNA. Durch die nachfolgende Bindung von komplementären Fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid-Sonden konnte eine starke Amplifikation des Fluoreszenzsignals erreicht werden. Diese Fluoreszenzsignale können nun mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden. Als Material dienten isolierte MuSCs (siehe 2.8.). Es wurden 20 000 Zellen/Well in eine 96 Well Zellkulturplatte (Greiner #655090) ausgesät. Nach Differenzierung wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert und dreimal mit 0.3% Triton X-100 in PBS gewaschen. Die nun folgende PLA-Reaktion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurde eine Färbung mit WGA (*Wheat germ agglutinin*) Alexa Fluor 488 durchgeführt wie unter Punkt 2.6.2. beschrieben.

**Tabelle 18: Verwendete Fluorochrom-markierte Proteine und primäre Antikörper**

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung
anti-CRK (Santa Cruz #sc-390132)	Maus	1:1000
anti-FARB (ThermoFisher #PA5-99105)	Kaninchen	1:1000
WGA Alexa Fluor 488 konjugiert (ThermoFisher #W11261)	-	1:300

### 2.10.7. Western Blot

Mit dieser Methode konnten spezifische Proteine in Acrylamidgelen elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt und auf eine Trägermembran übertragen werden. Hierauf konnten unter Verwendung von spezifischen Antikörpern Proteine detektiert und quantifiziert werden. Lysate von Gewebe und Zellen wurden Sonifizierung (Bandelin Sonoplus) der Proben in Puffer bei den Einstellungen 30 % Power und Stufe 5 Cycle für 30 bis 60 s hergestellt. Nach dem Aufschließen

der Proben wurden diese zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der ab dem Sonifizierungsprozess verwendete Extraktionspuffer setzte sich wie folgt zusammen: 0,1 M Tris/HCl (pH 8.0) (Roth #9090.4), 0,01 M EDTA (pH 8.0) (Roth #8040.3), 10 % SDS (Roth #8040.3) und *Complete Protease Inhibitor Cocktail* (Sigma #04693132001). Nach vorgenommener Konzentrationsbestimmung der Proteinlysate wurde zusätzlich 0,04 M DTT (Roth #6908.2) den Proben zugegeben. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben wurde ein Bradford Assay durchgeführt. Hierbei wurde die Proteinkonzentration der einzelnen Proben colormetrisch bestimmt. Der Assay wurde nach Herstellerangaben mit dem Kit DC Protein Assay (Bio-Rad #5000111) durchgeführt. Die Messung der Proben und der Standardkurve erfolgte mit dem Mikroplatten Reader (MTX Lab Systems #BMG FLUOstar Galaxy).

Es wurden 10-40 µg pro Probe für ein Western Blot Gel eingesetzt. Die Proben wurden mit Lagepuffer versetzt, denaturiert und nacheinander auf ein NuPAGE 4-12 % Bis-Tris-Proteingel (ThermoFisher #NP0321BOX) geladen. Als Puffer für die elektrophoretische Auftrennung wurde MES Puffer (50 mM MES, 0,1 % SDS, 50 mM Tris, 1 mM EDTA) in die Kammer (ThermoFisher #EI0001) und in den Zwischenraum der Gele gegeben. Als Proteinmarker wurde die *Prestained Protein Ladder* (ThermoFisher #BP3603500) verwendet. Zunächst wurde das Gel für 15 min bei 70 V und anschließend für etwa eine Stunde bei 180 V laufen gelassen. Das Blotting der aufgetrennten Proteine auf Nitrocellulose Membran (Merck #WHA10402506) geschah für 2 h bei 30 V mit dem Xcell Blot Modul (ThermoFisher #EI9051). Der verwendete Transferpuffer setzte sich wie folgt zusammen: 20 % Methanol, 0,5 M Bicine, 0,5 M BisTris, 20,5 mM EDTA. Nach dem Blotting wurde die Trägermembran mit RedAlert (Merck #71078) gefärbt und eingescannt.

Nun wurde die Membran bei Bedarf für die nachfolgende Antikörperbehandlung zugeschnitten und anschließend für 20 min in ddH<sub>2</sub>O inkubiert. Es folgt das Blocken für eine Stunde in 3 % BSA (Roth #8040.3) oder 5 % Milchpulver (Roth #T145.3) in TBS-T (Sigma #T6664-10PAK, 1 % Tween20 Sigma Aldrich #P1379). Nun wurde die Membran sechsmal für jeweils 5 min mit TBS-T gewaschen. Über Nacht erfolgte die Inkubation des primären Antikörpers bei 4 °C.

Das Verdünnen der primären und sekundären Antikörper (Tabelle 19,

Tabelle 20) jeweils gleichen verwendeten Block-Lösung. Am darauffolgenden Tag erfolgte erneut die beschriebenen Waschschriffe. Anschließend wurde ein spezifischer sekundärer Antikörper für eine Stunde inkubiert. Es folgten erneut die erwähnten Waschschriffe. Danach wurde die Membran für eine zusätzliche Stunde mit TBA-T gewaschen. Die Detektion der Chemilumineszenz der HRP (*Horseradish peroxidase*) gekoppelten sekundär Antikörper erfolgte mit dem Pico-Kit (ThermoFisher#35065) im *ChemiDoc-Imaging* System (BioRad #1708280). Die Auswertung erfolgte mit der ImageLab Software (Bio-Rad Laboratories).

**Tabelle 19: Verwendete primäre Antikörper im Western Blot**

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung
anti-CRK (Santa Cruz #sc-390132)	Maus	1:1000
Anti-Mef2A (Cell Signalling #9736)	Kaninchen	1:1000
anti-HA-tag (Covance #MMS-101P)	Kaninchen	1:1000
anti-RALA (BD Bioscience s#610222)	Maus	1:1000

**Tabelle 20: Verwendete sekundäre Antikörper im Western Blot**

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung
anti-Maus-HRP (ThermoFisher #31450)	Kaninchen	1:5000
anti-Kaninchen-HRP (ThermoFisher #31460)	Ziege	1:5000

### 2.10.8. Co-Immunpräzipitation

Mit Hilfe dieser *Pull-down* Methode konnten mittels eines spezifischen Antikörpers ein Antigen aus einem Gewebelysat konzentriert. Protein-Protein Interaktionen konnten anschließend mittels Massenspektrometrie (MS) analysiert. In dieser Arbeit sollten mittels Immunpräzipitation (IP) Unterschiede im Interaktom von CRK in Anwesenheit und Abwesenheit der *miR-1/206/133* Cluster analysiert werden. Als Ausgangsmaterial wurde Muskelgewebe der kompletten Beinmuskulatur von Tieren im Stadium E18.5 verwendet. Zur Gewinnung von Proteinlysaten wurden die isolierten Muskeln in RIPA-Puffer (50 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 1 % N-P40, 0.25 % Na-Deoxycholate, *Protease Inhibitor Cocktail* Tablette) wie unter 2.10.7. beschrieben sonifiziert. Nun folgte eine Inkubation der Lysate bei 4 °C unter ständigem rotieren für 30 min. Hiernach wurden die Proben für 20 min bei 20000 rcf zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Es wurde wie beschrieben (2.10.7.) eine Protein-konzentrationsbestimmung durchgeführt. Zur Vorbereitung der G-Sepharose-Beads (Millipore #P3296) wurden pro Probe 60 µl Beatsuspension entnommen und zweimal mit RIPA- Puffer gewaschen. Das Per-Blocken der Beads erfolgte für eine Stunde in 3 % BSA (Sigma #A7284) in RIPA-Puffer unter Rotation bei 4 °C. Nun wurden die Beads erneut zweimal gewaschen und in 30 µl RIPA-Puffer resuspendiert. Es wurden pro Tier 500 µg Proteinlysate in 300 µl RIPA-Puffer eingesetzt. Das Proteinlysate wurde mit 30 µl Beadsuspension für eine Stunde bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Hierdurch sollten unspezifische Proteinbindungen reduziert werden. Hiernach wurde nach Zentrifugation der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 4 µg anti-CRK Antikörper (Santa Cruz #sc-390132) zugegeben. Außerdem wurden 30 µl der verbleibenden

pre-geblockten Beatsuspension zugegeben und über Nacht bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Am nächsten Tag wurden der Überstand verworfen. Die Beads wurden dreimal mit RIPA-Puffer gewaschen mit 10-minütiger zwischenzeitlicher Inkubation im neuzugegebenen Puffer bei 4 °C. Hiernach wurden die Proben massenspektrometrisch von der Servicegruppe Massenspektrometrie des MPI-HLR analysiert (siehe 2.10.9.).

### 2.10.9. Massenspektrometrie

Die Methode der Massenspektrometrie erlaubt es unter anderem das gesamte Proteom verschiedener Gewebe oder Zellen zu untersuchen. Hierzu werden die zu analysierenden Moleküle in eine Gasphase überführt und ionisiert. Anschließend wird zur Identifikation der Moleküle das Masse-zu-Ladung-Verhältnis ( $m/z$  oder  $m/q$ ) bestimmt. Die massenspektrometrischen Messungen wurden von der Servicegruppe Massenspektrometrie des MPI-HLR vorgenommen.

#### 2.10.9.1. Probenvorbereitung zur Bestimmung des Skelettmuskel-Gesamtproteoms

Quadriceps Muskeln von wildtypischen und tKO Tieren aus dem Stadium E18.5 wurden durch Kunststoff *Douncer* (Merck # P0485-1EA) und Lysepuffer (4% SDS, 100 mM Tris, pH 7.6) aufgeschlossen. Die Proteinmenge wurde mittels DC Protein Assay Kit nach den Angaben des Herstellers (Bio-Rad #5000111) durchgeführt. 100 µg der Proben wurden eingesetzt um einen In-Solution-Verdau für 3 h bei RT durchzuführen. Hierzu wurden die Proben mit Lysyl Endopeptidase-R (1:50; Wako Chemicals GmbH #4987481285620) behandelt und anschließend mit 25 mM TEAB (ThermoFisher #90114) versetzt. Die Proben wurden nun über Nacht typsinisiert (1:50, Serva #37286.01). Die Konzentration der erhaltenen Peptidlösung wurde anschließend mittels Pierce *Fluorometric Peptide Assay* (ThermoFisher #23290). Das Isotop-Labeling der Peptide erfolgte mittels Formaldehyd-H<sub>2</sub> und Natriumcyanoborhydrid (*“light”*), oder Formaldehyd-<sup>13</sup>C-D<sub>2</sub> und Natriumcyanoborhydrid (*“heavy”*). Die Kontrollproben wurden zur massenspektrometrischen Messungen *“light”* markiert und die *miR-1/206/133* (tKO) Proben wurden *“heavy”* markiert.

#### 2.10.9.2. Probenvorbereitung zur Bestimmung des CRK Interaktoms nach Co-Immunpräzipitation

Zunächst wurden die Proben von wildtypischen und tKO Tieren aus dem Stadium E18.5 nach erfolgter CRK-Co-IP (siehe 2.10.8.) auf einem NuPAGE 4-12 % Bis-Tris-Proteingel (ThermoFisher #NP0321BOX) aufgetrennt (siehe 2.10.7.). Es folgte nun ein In-Gel-Verdau der Proben wie beschrieben <sup>136</sup>. Die aufgetrennten Proteine wurden aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend reduziert (10 mM Dithiothreitol) und Alkyliert (55 mM Iodacetamid). Es folgte ein Trypsin-Verdau wie beschrieben (2.10.9.1.).



### 2.10.9.3. Proteomische Analyse der aufgearbeiteten Proben

Die Proben wurden mittels flüssig Chromatographie/tandem-Massenspektrometrie (LC/MS2) unter Verwendung analysiert. Alle relevanten Parameter wurden durch MARMoSET<sup>137</sup> extrahiert. Die Peptide/Spektrum-Zuordnung erfolgte durch den MaxQuant Algorithmus (proteome: v. 1.6.0.1; interactome: v. 1.6.6.0<sup>138-140</sup>). Desweiteren wurde hierfür die Datenbank von UniProt ((proteome: downloaded 2017/04/20, 97484 entries; interactome: downloaded 2019/08/19, 86161 entries; (UniProt, 2019)) verwendet. Die nachfolgenden bioinformatischen Auswertungen wurde eine limma-basierte R-Pipeline (<https://github.com/bhagwataditya/autonomics><sup>141</sup>) genutzt.

### 2.10.10. Aktive RAC1 Pull-down Assay

Um Änderungen in der Aktivierung der kleinen GTPase RAC1 im Kontext einer CRK Überexpression betrachten zu können wurde Aktive RAC1 Pull-down Assay durchgeführt. Hierfür wurde wie unter 2.7. beschrieben C2 Zellen kultiviert und mit einem CRK Überexpressionsplasmid für 24 h transfiziert. Zur Generierung dieses CRK Überexpressionsplasmids wurden der pSG5-HSA-CRK Vektor (siehe 2.3.2.) mit BamHI verdaut. Der ORF von *Crk* wurden in die BamHI-Schnittstelle des pIRES2-EGFP Plasmides (Clontech #6029-1) wie unter 2.10.5 beschrieben inseriert. Nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet. Dies, sowie auch die nachfolgenden Schritte des Assays wurden nach Angaben des Herstellers unter Verwendung des *Active RAC1 Pull-down and Detection Kits* (ThermoFisher #16118) durchgeführt. Der Pull-down verlief nach dem folgenden Prinzip: ein GST-fusionsprotein, bestehende aus der PBD (p21-Bindedomäne) von PAK1 (*Human p21-activated protein kinase 1*) wurden in Verbindung mit Glutathion Agarosegranulat zum von spezifischen Pull-down von RAC1-GTP genutzt. Bei RAC1-GTP handelt es sich um die aktive Form dieser kleinen GTPase. Nur an diese aktivierte Form von RAC1 kann die Bindung der PBD-Domäne an RAC1-GTP stattfinden. Zur Detektion von RAC1-GTP und des totalen RAC1-Levels von jedem verwendeten Lysat wurde ein im Kit enthaltener anti-RAC1 Antikörper verwendet. Es wurde 30 µl der Pull-down Reaktion und 15 µg des Input-Zelllysats auf ein Western Blot Gel geladen. Der Western Blot wurde wie unter 2.10.7. beschrieben durchgeführt. Der Pull-down Assay wurden mit Proben von voneinander unabhängigen Transfektionen und unter Einsatz der jeweils gleichen Proteinmenge durchgeführt. Zur Auswertung wurde das Verhältnis von RAC1-GTP zur totalen RAC1 Menge betrachtet.

### 2.10.11. AChR-Clustering Assay

96 Well Platten (Greiner #655090) wurden mit Matrigel beschichtet und anschließend C2 Zellen ausgesät. Sobald die Konfluenz der Zellen etwa 80 % betrug, wurde von Proliferations- zu Differenzierungsmedium gewechselt. Die Zellen wurden für fünf bis sieben Tage zu Myotuben differenziert und das Medium alle zwei Tage gewechselt. Es folgte eine Transfektion mit pMX GFP

RAC G12V (Addgene #14567) und pIRESII-EGFP-CRK Vektor (siehe 2.10.10.). Die Transfektion wurde für alle verwendeten Vektoren (Tabelle 21) für 48 h durchgeführt.

**Tabelle 21: Transfizierte Plasmide im AChR-Clustering Assay**

Bezeichnung	Ziel
pIRESII-EGFP-CRK	Ektopische transiente Expression von CRK in Verbindung mit einem eGFP-Reporter
pMX GFP RAC G12V	Ektopische transiente Expression von konstitutiv aktiven RAC1 in Verbindung mit einem GFP-Reporter

Im Anschluss erfolgte die Stimulation der Myotuben mit 0,1 µg/ml löslichem rekombinanten Agrin-Protein (R&D Systems #550-AG-100) in frischem Differenzierungsmedium für 16 h. Agrin ist ein Signalmolekül und wird während der NMJ Entwicklung vom terminalen Ende des Motornervs sezerniert. Hierdurch wird das Agrin-Induzierte Acetylcholin Rezeptor Clustering auf postsynaptischen Membran des Skelettmuskels initiiert. Durch diesen Assay-Schritt kommt es ebenfalls auf der Membran der C2-Myotuben zur Stimulation des Agrin-Induzierten Acetylcholin Rezeptor Clustering <sup>142</sup>. Am nächsten Tag wurden die Zellen wie unter Punkt 2.6.2. beschrieben fixiert und gefärbt. Die Färbung erfolgte mit BTX, zur Markierung AChR und mit einem Antikörper gegen GFP.

### 2.10.12. Luciferase-Reporter-Assay

Der Luciferase-Reporter-Assay dient der Validierung potentieller microRNA Bindesequenzen. Hierzu wurden die Sequenz der jeweiligen identifizierten potentiellen Zielsequenzen in 3'UTR der mRNA von CRK in den pmirGLO Dual-Luciferase Vektor (Promega #E1330) kloniert. Dies geschah über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme NheI und XhoI. Hierfür wurden 5'-phosphorierte Oligonukleotide, mit den entsprechenden potentiellen miR-Bindesequenzen designt (Tabelle 22). Als Kontrolle wurden zusätzlich Oligonukleotide mit mutierten miR-Bindesequenzen generiert. Die Mutationen wurden lediglich in dem Bereich der CRK-mRNA Sequenz vorgenommen in der die Seed-Sequenz der jeweiligen microRNA binden würde.

**Tabelle 22: Verwendete Oligonukleotide mit miR-Bindesequenzen in 3'UTR von CRK**

miR-Bindestelle	Sequenz 5' > 3'
<i>miR-1/206</i>	ggauaauguauaucuuc <u>cauuccagaggauaauguauaucuuc</u> cauuccagaggauaaugua uauuc <u>uuc</u> cauuccagaggauaauguauaucuuc <u>ca</u> ga
Mutierte <i>miR-1/206</i>	ggauaauguauaucuugaaacgagaggauaauguauaucuugaaacgagaggauaaugua uauuc <u>uugaaac</u> gagaggauaauguauaucuugaaacgaga
<i>miR-133</i>	ucuacuuggaguggaaggaccaaucucuacuuggaguggaaggaccaaucucuacuuggag uggaaggaccaaucucuacuuggaguggaaggaccaauc
Mutierte <i>miR-133</i>	ucuacuuggaguggaaccaggauucucuacuuggaguggaaccaggauucucuacuuggag uggaaccaggauucucuacuuggaguggaaccaggauuc

Der für dieses Experiment verwendete pmirGLO Dual-Luciferase Vektor exprimiert Firefly Luciferase und Renilla Luciferase unter zwei verschiedenen Promotoren. Wird nun eine potentielle microRNA Bindesequenz hinter den Reporter Firefly Luciferase kloniert, so wird die Bildung von funktionalem Firefly Luciferase Protein nach Bindung einer entsprechenden microRNA inhibiert werden. Findet kein Bindungsereignis an der potentiellen miR-Zielsequenz statt, so kommt es nicht zu diesem inhibitorischen Effekt in der Translation. Das Proteinlevel der zweiten Reporter-Luciferase (Renilla) bleibt hiervon jedoch jeweils unbeeinflusst und dient als interne Kontrolle zur Normalisierung. Zur Durchführung des Luciferase-Reporter-Assays wurden proliferierende C2-Zellen bei einer Konfluenz von etwa 70 % mit den genierten pmirGLO Dual-Luciferase Vektoren für 24 h transfiziert (siehe 2.7.).

Jede Transfektion wurde mit 100 ng DNA/24-well mindestens als Triplikat durchgeführt. Proben von proliferierenden C2-Zellen wurden direkt nach der Transfektion geerntet und lysiert. Für Proben differenzierter C2-Zellen wurden die Zellen nach der Transfektion in Differenzierungsmedium weiter kultiviert. Nach einer Woche wurden auch diese Zellen lysiert. Die jeweilige Luciferaseaktivität wurde unter Verwendung des Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega #E1910) durchgeführt. Die Messung der Biolumineszenz wurde mit dem Mithras LB940 *plate reader* (Berthold) durchgeführt. Zur Analyse wurden die jeweiligen ermittelten Firefly Luciferase Biolumineszenz mit Hilfe der ebenfalls in der Probe gemessenen Renilla-Luciferase-Signale normalisiert.

### 2.10.13. Whole mount *in situ*-Hybridisierung

Die Methode der *whole mount in-situ*-Hybridisierung (WMISH) diente dem Nachweis von spezifischen Nukleinsäuren in ganzen Embryonen.

Die Herstellung und Digoxigenin Markierung der RNA-Sonden erfolgte auf Basis von Prof. Dr. Böttger (AG Böttger) genierten Plasmids. Dieses beinhaltet die Sequenz des entsprechenden Gens zur Herstellung spezifischer komplementärer RNA Sonden (Riboprobs). Zur Sondensynthese wurden die Plasmid wie beschrieben mit Restriktionsenzymen verdaut (2.10.5., Tabelle 23).

**Tabelle 23: Verwendete Plasmide zur WMISH**

Plasmid	Gen	Restriktionsenzym	Polymerase
pT7T3D-Pacl	Myogenin ( <i>MyoG</i> )	XhoI (NEB #R0146S)	T3 (Merck #11031163001)

Die Nukleinsäure-Aufreinigung erfolgte mittels Phenol/Chloroform (Merck #P2069) und Natriumacetat. Die Synthese markierter anti-sense RNA-Sonde durch *in vitro* Transkription bei 37 °C für zwei Stunden im folgenden Reaktionsansatz:

Verdautes Plasmid	1 µg
5x Transkriptionspuffer	4 µl
10x DIG-RNA labeling Mix	2 µl
RNAsin (100 U/ml)	1 µl
<u>RNA-Polymerase (T3; T7)</u>	<u>1 µl</u>
add RNase freies H <sub>2</sub> O	20 µl

Der Ansatz wurde im Anschluss mit 2 µl DNase (2000 units/ml; NEB #M0303S) bei 37 °C für 30 min behandelt. Die Fällung und Aufreinigung der RNA-Sonde erfolgte mittels Ethanol/ 4 M LiCl. Abschließend wurde die Sonde in RNase freies H<sub>2</sub>O gelöst.

Die Durchführung der WMISH orientierte sich an bereits erprobten Protokollen <sup>143</sup>. Zunächst wurden Embryonen im Alter von etwa E10.5 aus dem Uterus herauspräpariert. Die Embryonalhülle wurde ebenfalls isoliert und diente der DNA Gewinnung und anschließenden Genotypisierung der Embryonen (siehe 2.4). Anschließend wurden die Embryonen in bei 4 °C in 4 % PFA für etwa 2 h fixiert und zweimal mit PBT (0.1 % Tween-20 in PBS) gewaschen. Hiernach wurden die Embryonen durch Inkubation mit 6 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBT gebleicht und anschließend erneut dreimal mit PBT gewaschen. Nun wurden die Proben in 10 µg/ml Proteinase K (Merk #P6556) in PBT für 15 min angedaut und im Anschluss in 2mg/ml Glycin (Roth #3187.3) in PBT inkubiert. Nun erfolgten erneut zwei PBT Waschschrte.

Die Embryonen wurden nun mit 0,2 % Glutaraldehyd/ 4 % PFA/PBT für 20 min fixiert. Nach einem weiteren Waschschrte mit PBT, erfolgte eine einstündige Inkubation der Proben bei 70 °C in Prä-Hybridisierungslösung (50 % Formamid, 5 x SSC pH 4,5, 1 % SDS, 50 µg/ml Hefe-RNA, 50 µg/ml Heparin). Hiernach erfolgte die Hybridisierung der Sonden über Nacht durch Zugabe von 1 µl/ml DIG-markierter RNA-Sonde in Prä-Hybridisierungslösung. Am darauffolgenden Tag wurden die Proben für eine Stunde in Lösung 1 (:50 % Formamid; 5 x SSC; 1 % SDS) inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen für 15 min in einer 1:1 Mischung von Lösung 1 und Lösung 2 (0.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl; 0,1 % Tween-20) bei RT und für 15 min in Lösung 2 bei 70 °C gewaschen. Es folgte eine Inkubation in Lösung 3 (50 % Formamid, 2 x SSC) für 5 min bei RT und danach für 30 min bei 65 °C. Nun wurden die Proben 10 min in MAB (100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl) gewaschen und anschließend eine Stunde in Blocking-Lösung (Roche #11096176001) inkubiert. Nun wurde über Nacht ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter anti-DIG (1:2000, Roche #1093274) Antikörper bei 4 °C zu den Embryonen gegeben.

Danach wurden sie für vier Stunden in MAB gewaschen. Die Proben wurden nun über Nacht in NTMT (100 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl; 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 % Tween-20; 2 mM Levamisole) bei 4 °C überführt. Am nächsten Tag erfolgten drei Waschschrte für 10 min mit NTMT. Das Färben der gebundenen Sonden erfolgte mit Färbelösung (100 mM TrisHCl; 100 mM NaCl; 0,1% Tween-

20) mit NBT. Die Reaktion wurde durch mehrere PBT-Waschschritte abgebrochen. Eine Lagerung der Embryonen erfolgte bei 4 °C Embryonen in 80 % Glycerin/PBT.

### 2.11. miRNA Target prediction Analyse

Potentielle microRNA Ziel-mRNAs wurden mithilfe der miRNA *Target Prediction Database* [microrna.org](http://www.microrna.org) (<http://www.microrna.org>) bestimmt. Die Einstellungen wurden wie folgt vorgenommen: *mouse; all mirSVR scores; conserved miRNA target site prediction; high mirSVR score; non-conserved miRNA target site prediction*. Die so erhaltenen potentiellen Kandidaten wurden zusätzlich auf eine erhöhte Expression auf RNA und Protein-Level im *miR-1/206/133 loss of funktion* Modell untersucht. Zur weiteren Validierung diente beispielsweise ein Luciferase-Reporter-Assay (2.10.12.).

### 2.12. Statistische Auswertung

Die Statistische Auswertung wurde mit der GraphPad Prism 6.07 Software durchgeführt. Soweit nicht anders vermerkt wurden alle ermittelten Werte mit der Standardabweichung des Mittelwertes graphisch dargestellt. Daten mit mehr als drei Replikaten pro zu vergleichender Gruppe wurden auf eine Normalverteilung der Werte getestet. Wenn eine Gauß-Verteilung der Werte vorlag wurde ein Students t-test durchgeführt. Im Falle, das die Daten keine Normalverteilung aufwiesen wurde ein nicht-parametrisches Testverfahren verwendet, wie jeweils angegeben.

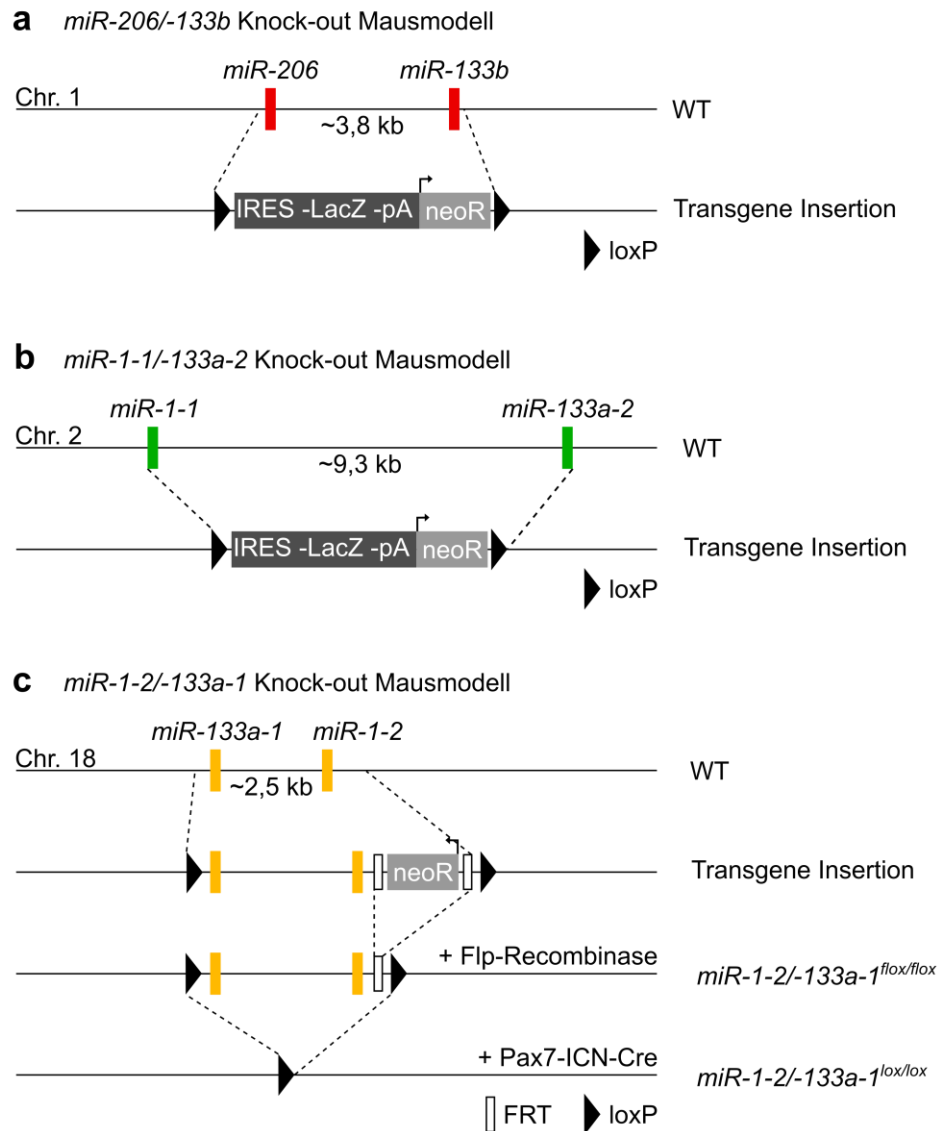
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Validierung des *miR-1/206/133* Knock-outs in der Skelettmuskulatur

Vorrausgegangene Arbeiten konnten zeigen, dass ein konstitutiver Verlust von jeweils einem der beiden *miR-1/133a* Cluster keine Konsequenz für die Ausbildung und Funktion der Skelettmuskulatur hat<sup>3, 46</sup>. Jedoch führt der konstitutive Verlust von beiden *miR-1/133a* Clustern zu Störungen in der embryonalen Herzentwicklung. Konstitutive *miR-1/133a* Knock-out Tiere sterben etwa am Embryonaltag (E) 11.5 an einem Herzdefekt<sup>3</sup>. Der konstitutive Verlust des lediglich in der Skelettmuskulatur exprimierten *miR-206/133b* Clusters führte in einer vorausgegangenen Studie ebenfalls zu keiner sichtbaren Veränderung der Skelettmuskulaturentwicklung oder -struktur<sup>2</sup>. Lediglich in der Skelettmuskulatur werden alle drei microRNA-Cluster exprimiert. Ein kompletter Verlust aller drei, möglicherweise redundanten, *miR-1/206/133* Cluster wurde bisher noch nicht analysiert.

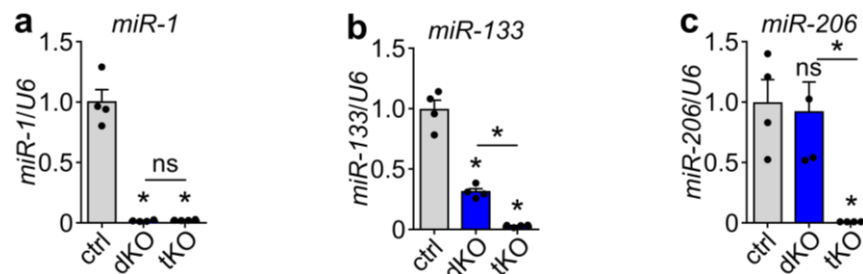
Zur Untersuchung der Skelettmuskulatur nach einem funktionellen Verlust von *miR-1/206/133*, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein *miR-1/206/133* Knock-out Mausmodell etabliert und seine Effizienz validiert (Abb. 3.1.1.). Hierfür wurde eine Mauslinie mit einem konditionellen skelettmuskelspezifischen *miR-1-2/133a* Verlust, einem konstitutiven *miR-1-1/133a-2* und *miR-206/133b* Knock-out generiert. Dafür wurden Mäuse *miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>*<sup>4</sup> mit *miR-206/133b* Knock-out Tieren<sup>2</sup> verpaart. Um eine skelettmuskelspezifischen Deletion des *miR-1-2/133a-1* Clusters zu ermöglichen, wurde die skelettmuskelspezifisch exprimierte Cre-Rekombinase der Pax7-Cre Linie<sup>125</sup> eingekreuzt. Schlussendlich konnten *miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>//miR-206/133b<sup>-/-</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//Pax7-Cre<sup>+/-</sup>* Tiere gewonnen werden. Diese Tiere werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit als tKO (*Tripel Knock-out*) bezeichnet. Zur Validierung der Knock-out Effizienz des verwendeten tKO Mausmodelles wurde das Expressionslevel von *miR-1*, *miR-206* und *miR-133* im Quadriceps (*Musculus quadriceps femoris*) im Stadium E18.5 mittels Taqman Assay analysiert. Als Kontrollen dienten zum einem *miR-1/133a* Cluster Doppel-Knock-out Tiere (im Weiteren als dKO bezeichnet) und zum anderen *miR-1-1/133a-2<sup>+/+</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-206/133b<sup>+/+</sup>//Pax7-Cre<sup>+/+</sup>* (ctrl) im Stadium E18.5 (Abb. 3.1.2.).

Es konnte nahezu keine Expression von *miR-1*, *miR-133* und *miR-206* in Muskeln von tKO Tieren nachgewiesen werden. Das Expressionslevel von *miR-1* war sowohl im dKO, als auch im tKO Hintergrund um etwa 98 % reduziert (Abb. 3.1.2. a). Die Detektion von *miR-133* und *miR-206* lag im tKO bei unter 3 % (Abb. 3.1.2. b-c). In *miR-1/133a* dKO Tieren dieses Stadiums lag die Expression von *miR-133* erwartungsgemäß bei etwa 33 % der Kontrollgruppe.



**Abbildung 3.1.1.: Generiertes *miR-1/133/206* Knock-out Mausmodell (tKO).** a-c Schematische Illustration des genomischen Lokus von *miR-206/133b* (a, rot), *miR-1-1/133a-2* (b, grün) und *miR-1-2/133a-1* (c, gelb). Die konstitutive Deletion des *miR-206/133b* und *miR-1-1/133a-2* Clusters erfolgte wie beschrieben<sup>2,3</sup>. Die für die jeweiligen microRNA Cluster kodierende Region wurde durch eine IRES-LacZ-pA-PGK-Neomycin-Selektionskassette ersetzt. c Der konstitutive Verlust des *miR-1-2/133a-1* Clusters beruht auf der Substitution einer Neomycin-Selektionskassette, flankiert mit FRT-Sequenzen (weißes Rechteck). Diese wurde unter Verwendung des Flp/FRT-Systems entfernt. Die *miR-1-2/133a-1* kodierende Region wurde mit loxP (schwarzes Dreieck) Sequenzen flankiert, um eine Cre-abhängige Deletion zu ermöglichen. Der konditionelle skelettmuskelspezifische Knock-out des *miR-1-2/133a-1* Clusters wurde wie beschrieben durchgeführt<sup>4</sup>. Cre= *causes recombination Recombinase*, IRES= *internal ribosomal entry site*, LacZ=  $\beta$ -Galactosidase, neo=Neomycin, PGK= Phosphoglyceratkinase I Promoter.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sowohl mit der dKO-, als mit der tKO-Mauslinie ein effizientes Funktionsverlustmodell vorliegt. Ein effizienter Knock-out konnte bereits im Stadium E18.5 validiert werden. Durch die Etablierung der tKO Mauslinie können erstmals kompensatorische Effekte verbleibender *miR-1/206/133* Cluster untersucht und Auswirkungen eines funktionellen Verlustes dieser microRNAs analysiert werden. Durch die Generierung der *miR-1/206/133* tKO Mauslinie konnte im weiteren Verlauf dieser Arbeit ebenfalls potentielle synergistische Funktionen dieser microRNAs im Skelettmuskel adressiert werden.



**Abbildung 3.1.2.: Analyse der Knock-out Effizienz im tKO Mausmodell im Alter E18.5.** Detektion der Expression von *miR-1* (a), *miR-133* (b) und *miR-206* (c) in *miR-1/206/133* tKO, *miR-1/133a* dKO und Kontrolltier- Quadriceps Muskeln durch quantitative RT-PCR (*miR-1/133* Taqman Assay, n = 4/4/4, *miR-206* Taqman Assay n = 4/3/4, Kolmogorov–Smirnov U Test, zweiseitig, \*p= <0,05, ns = nicht signifikant, ctrl = *miR-1-1/133a-2*<sup>+/+</sup>// *miR-1-2/133a-1*<sup>lox/lox</sup>// *miR-206/133b*<sup>+/+</sup>// *Pax7-Cre*<sup>+/+</sup>).

### 3.2. Kompensatorisches Potential und funktionelle Redundanz von *miR-1/206/133*

Alle drei *miR-1/206/133* Cluster sind abundant in der Skelettmuskulatur exprimiert<sup>144, 145</sup>, jedoch auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert. Die microRNAs *miR-1-1* und *miR-1-2* weisen eine identische reife microRNA Sequenz auf. Die Sequenz von *miR-206* unterscheidet sich durch vier Nukleotide, jedoch zeigen sich keine Unterschiede in der Seedsequenz zwischen *miR-1-1*, *miR-1-2* und *miR-206*. Selbiges gilt für die Seedsequenzen von *miR-133a-1*, *miR-133a-2* und *miR-133b*. *MiR-133a-1* und *miR-133a-2* besitzen die gleiche reife microRNA Sequenz, während sich die Sequenz von *miR-133b* durch ein Nucleotid von *miR-133a* unterscheidet (Abb. 3.1.3. a).

Diese starken Ähnlichkeiten sowohl im Expressionsmuster, als auch in der reifen microRNA Sequenzen suggerieren eine funktionelle Redundanz. Um einen möglichen kompensatorischen Effekt der einzelnen microRNA-Cluster für einander zu analysieren, wurde eine quantitative RT-PCR zur Bestimmung des *miR-206* Levels durchgeführt. Hierbei sollte festgestellt werden ob der Verlust der beiden *miR-1/133a* Cluster im dKO zu einer Veränderung in der Expression des einzigen verbleibenden microRNA Clusters *miR-206/133b* führt. Zu diesem Zweck wurden Proben von adulten Kontroll- und dKO-Tieren miteinander verglichen. Es zeigte sich ein signifikanter

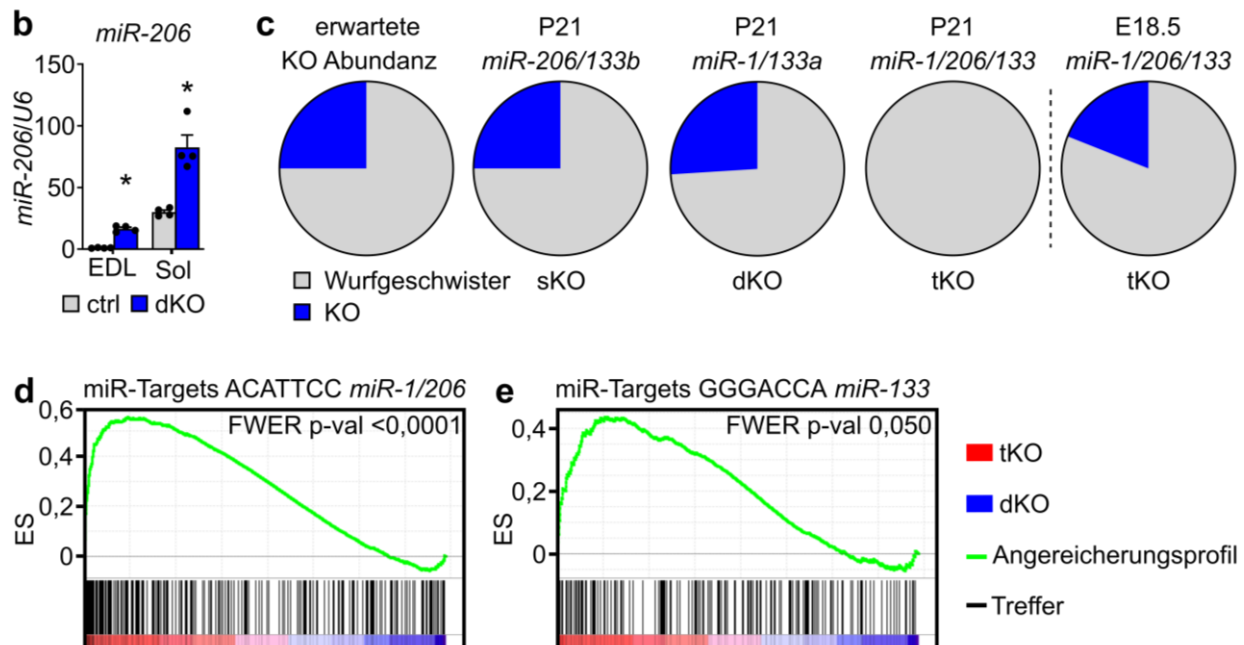


Anstieg der *miR-206* Expression sowohl in primär glykolytischen (EDL; *Extensor digitorum longus*), als auch primär oxidativen Muskeltypen (Sol) (Abb. 3.1.3. b). Diese um mehr als das Zweifache erhöhte Expression von *miR-206* nach Verlust der beiden *miR-1/133a* Cluster deutet einen kompensatorischen Effekt an. Zur weiteren Analyse der Auswirkungen des Verlustes von *miR-1/206/133* Clustern wurden konstitutive *miR-206/133b*- (sKO), *miR-1/133a*- (dKO) und *miR-1/206/133*- (tKO) Knock-out Tiere miteinander verglichen. Es wurde jeweils der prozentuale Anteil der jeweiligen microRNA Knock-out Tiere im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern drei Wochen nach der Geburt (P21) analysiert (Abb. 3.1.3. c). Hierbei zeigte sich, dass der Anteil der geborenen sKO und dKO Tieren mit 25 % bzw. 26 % nahezu exakt der anzunehmenden mendelschen Verteilung der Genotypen von 25 % entsprach. Im Kontrast hierzu konnten keine tKO Tiere im Stadium P21 beobachtet werden. Im neonatalen Stadium E18.5 konnten jedoch durchschnittlich 19 % von zu erwartenden 25 % der Jungtiere eines Wurfes als tKO identifiziert werden (siehe auch Tabelle 24, 25, Anhang). Diese pränatale Letalität, trat nur bei Tieren mit tKO Genotyp auf. Jungtiere mit dem Verlust einzelner *miR-1/206/133* Cluster (sKO, dKO) im Skelettmuskel überlebten.

Um die posttranskriptionelle Regulation von potentiellen miR-Zielgenen (Targets) durch *miR-1/206/133* zu adressieren, wurden Transkriptomdaten von Tieren aus dem Stadium E18.5 erhoben. Die Expression bioinformatisch vorhergesagter Zielgene<sup>146</sup> wurden im Hintergrund eines partiellen Verlustes (dKO) oder des vollständigen Verlustes aller *miR-1/206/133* Cluster (tKO) analysiert. Für diese Analyse wurde eine GSEA (*Gene set enrichment analysis*) von entsprechenden Transkriptomdaten durchgeführt. Die erhaltenen Daten zeigten eine signifikante Anreicherung potentieller *miR-1/206* und *miR-133* Zielgenen<sup>146</sup> im tKO Skelettmuskel im Vergleich zu dKO-Proben (Abb. 3.1.3. d, e). Die Expression potentieller Zielgenen scheint somit nach dem vollständigen Verlust aller *miR-1/206/133* im tKO deutlich gesteigert. Allem Anschein nach kann im Stadium E18.5 durch die Expression des verbleibenden *miR-206/133b* Clusters eine Reprimierung von *miR-1/206/133* Zielgenen zum Teil aufrechterhalten werden.

**a** Sequenzen der reifen microRNAs

Chr. 1	miR-206	UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG	miR-133b	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUA
Chr. 2	miR-1-1	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU	miR-133a-2	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG
Chr. 18	miR-1-2	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU	miR-133a-1	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG



**Abbildung 3.2.1.: Die Cluster *miR-1/206/133* weisen eine hohe sequenzielle Redundanz auf, implizieren überlappenden Funktionen, sowie ein kompensatorische Potential füreinander.** **a** Die für die microRNAs der *miR-1/206/133* Familie kodierenden Regionen sind in drei Clustern, auf Chromosom 1, 2 und 18 lokalisiert. Die Sequenz der reifen *miR-1/133a* ist identisch. Die Sequenz von *miR-206* unterscheidet sich durch vier Basen von *miR-1*, während sich *miR-133b* von der Sequenz von *miR-133* durch lediglich eine Base unterscheidet (rot). Die für die Erkennung von Zielgenen entscheidende Seed-Sequenz ist zwischen *miR-1/206* und *miR-133a/133b* identisch (fett). **b** *MiR-206* Expression in adulter wildtypischer (ctrl) und *miR-1/133a* defizienter (dKO) Muskulatur, ermittelt durch eine quantitative RT-PCR im *Soleus*- (*Sol*) und *Extensor digitorum longus* Muskel (*EDL*) (Taqman Assay, n = 4/4, n = 4/4 [Männchen/Weibchen, 13-17 Wochen alt], Mann-Whitney U Test, einseitig, \*p= <0,05). **c** Abundanz von *miR-206/133b* (sKO), *miR-1/133a* (dKO) und *miR-1/206/133* (tKO) Knock-out Tieren am postnatalen Tag 21 (P21) und tKO im perinatalen Alter E18.5 im Vergleich zu entsprechenden Wurfgeschwistern (P21: n= 147/48 Wurfgeschwister/sKO, n= 100/35 Wurfgeschwister/dKO, n= 34/0 Wurfgeschwister/tKO; E18.5: n= 26/6 Wurfgeschwister/tKO). **d-e** Vergleichende *Gene set enrichment* Analyse (GSEA) von vorhergesagten *miR-1/206* und *miR-133* Zielgenen von *miR-1/206/133* tKO und *miR-1/133a* dKO Quadriceps Muskeln (n = 4/4, ES = *Enrichment score*, FWER= *Familywise-error rate* [E18.5]).

### 3.3. *miR-1/206/133* Verlust beeinflusst nicht die frühe Skelettmuskulaturentwicklung und Muskelstammzellendifferenzierung

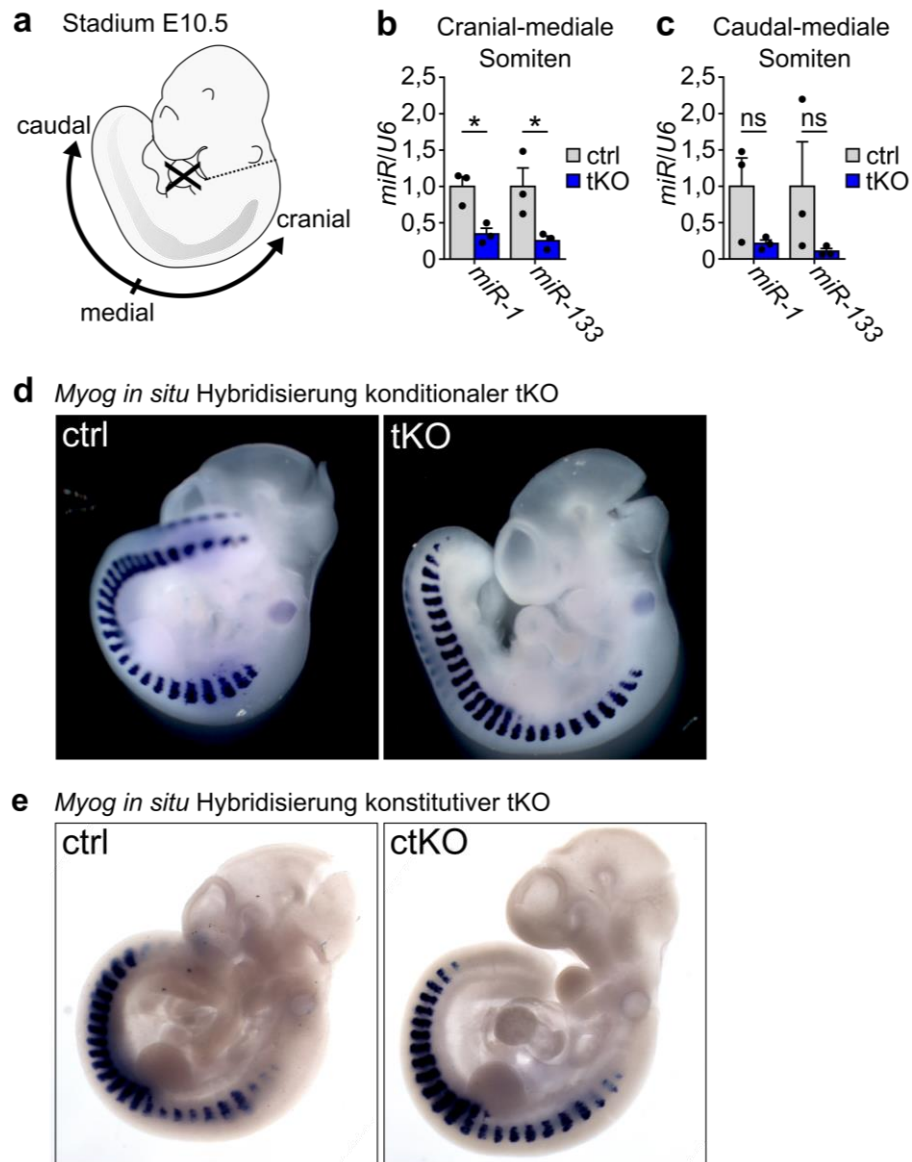
Um die physiologischen Ursachen der neonatalen Letalität im Hintergrund des vollständigen Verlustes der *miR-1/206/133* Cluster im tKO zu ermitteln, wurden die äußere Morphologie, die Entwicklung und die Struktur der Skelettmuskulatur untersucht.

#### 3.3.1. *miR-1/206/133* Expression ist nicht essentiell für die frühe Skelettmuskelentwicklung

Vorangegangene Studien suggerieren, dass *miR-1* und *miR-133* eine Funktion in der Modulation der Proliferation und Differenzierung von Skelettmuskelzellen haben könnten<sup>33, 147</sup>. Um aufzuklären, ob die *miR-1/206/133* Cluster Expression Auswirkungen auf die Entwicklung der Skelettmuskulatur hat, wurde eine Analyse der Myogenese an *miR-1/206/133* Knock-out Tieren vorgenommen.

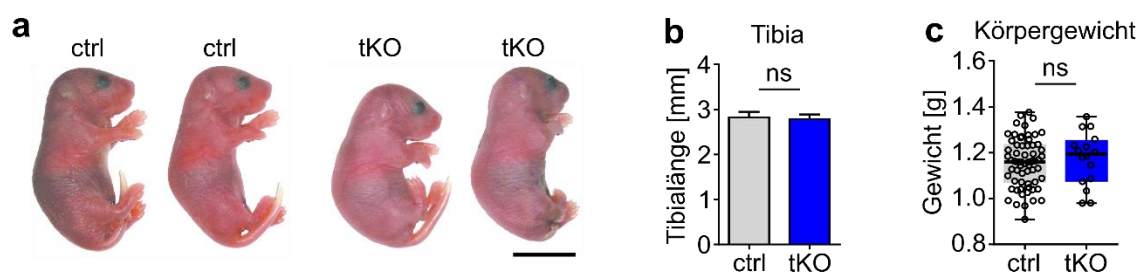
Mit Einsetzen der Myogenese exprimieren myogene Vorläuferzellen im Dermomyotom *Pax7* als ein funktionales Markergen<sup>54, 148</sup>. Da die im tKO Mausmodell verwendete *Pax7-Cre*-Rekombinase erst ab diesem Zeitpunkt aktiv ist und es sich bei *miR-1/206/133* zudem um sehr abundante und stabile Moleküle handelt, wurde zunächst die Effizienz des genierten konditionellen *miR-1/206/133* Knock-out Mausmodells (tKO) im Stadium embryonalen E10.5 geprüft. Mittels quantitativer RT-PCR an RNA gewonnen von cranial-medialen Somiten (Abb. 3.3.1.1. a) konditionelle *miR-1/206/133* Knock-out Embryonen (tKO) konnte gezeigt werden, dass bereits im Stadium E10.5 eine signifikante Reduktion des *miR-1* und des *miR-133* Levels vorliegt (Abb. 3.3.1.1. b). Jedoch zeigte im Kontrast hierzu die Expressionsanalyse von *miR-1* und des *miR-133* in caudal-mediale gelegenen Somiten keine signifikante Reduktion der microRNA Level (Abb. 3.3.1.1. c). Aus diesem Grund wurden zur Untersuchung der embryonalen Myogenese, sowohl konditionelle *miR-1/206/133* Knock-out (tKO) Embryonen, als auch konstitutive *miR-1/206/133* Knock-out (ctKO) Embryonen im Stadium E10.5 verwendet. Mit der folgenden Untersuchung der Embryonen sollte zudem ausgeschlossen werden, dass Veränderungen nach *miR-1/206/133* Verlust nur während der frühen embryonalen Myogenese sichtbar sind und später durch kompensatorische Mechanismen nicht mehr erkennbar sind.

Die Analyse erfolgte mittels *whole mount in situ* Hybridisierung basierter Detektion von Myogenin (*MyoG*), eines für die Myogenese essentiellen Transkriptionsfaktors an tKO- und ctKO-Embryonen. ctKO-Embryonen wurden hierfür durch Verpaarung heterozygoter Elterntiere der *miR-1/133a* Knock-out Mauslinie<sup>3</sup> und *miR-206/133b* (sKO) Knock-out Mauslinie<sup>2</sup> gewonnen. In der vergleichenden Analyse der *whole mount in situ* Hybridisierung von tKO, ctKO und der Kontrollen (Abb. 3.3.1.1. d-e), zeigten sich sowohl in der Abundanz und Lokalisierung der Expression *MyoG*, als auch im generellen Erscheinungsbild der Somiten keine sichtbaren Unterschiede nach dem Verlust von *miR-1/206/133*.



**Abbildung 3.3.1.1.: Analyse von *miR-1/206/133* in der frühen Myogenese.** **a** Schematische Darstellung eines Mausembryos im Stadium E10.5. Es wurden die Bereiche markiert, die für die Expressionsanalyse von *miR-1* und *miR-133* (**b**, **c**) verwendet wurden. Es wurde der cranial-mediale Bereich und der caudal-mediale Bereich der Somiten (dunkleres grau) zur Analyse präpariert. Sowohl Kopf- (gestrichelte Linie), als auch Herzregion (mit x markiert) wurden zuvor abgetrennt. Quantitative Analyse der *miR-1* und *miR-133* Expression im cranial-medialen (**b**) und caudal-medialen Bereich (**c**) im Vergleich zu Wurfgeschwister-Embryonen (ctrl) (n= 3/3; n=3/3; Taqman Assay, ctrl = *miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>// miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-206/133b<sup>+/+</sup>// Pax7-Cre<sup>+/+</sup>*; Mann-Whitney U Test, einseitig, \*p = 0,05; ns = nicht signifikant; [E10.5]). (**d-e**) *whole mount in situ* Hybridisierung (WISH) von *MyoG* an tKO (**d**), ctKO (**e**) und entsprechende Wurfgeschwister-Embryonen (ctrl) im Stadium E10.5 (tKO= *miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-206/133b<sup>-/-</sup>// Pax7-Cre<sup>+/+</sup>*; ctKO= *miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>// miR-1-2/133a-1<sup>-/-</sup>// miR-206/133b<sup>-/-</sup>*).

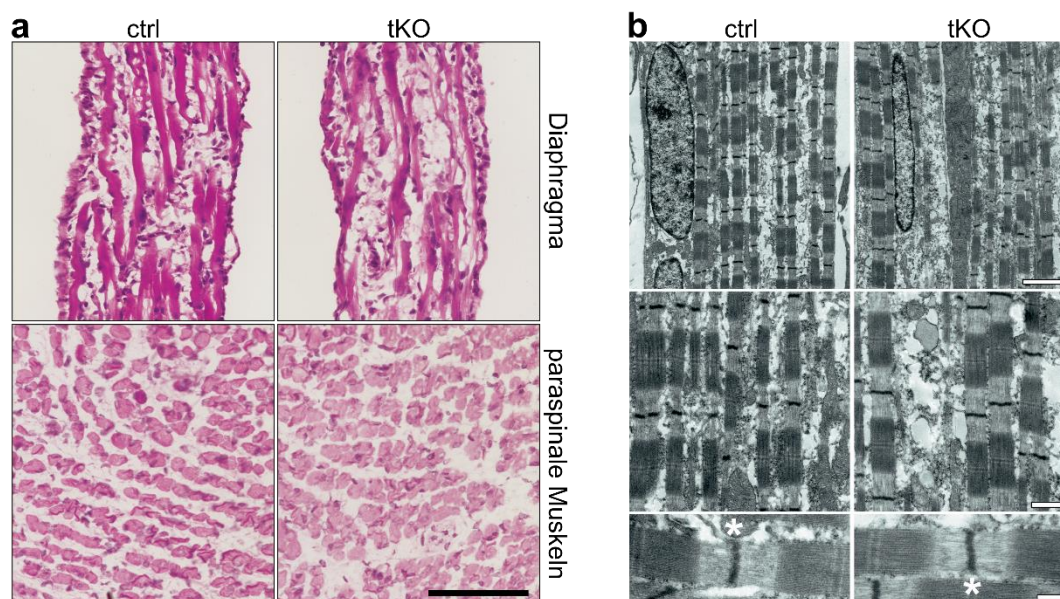
Da im Stadium E10.5 keine Veränderungen der Muskulatur festgestellt werden konnten, sollten tKO Tiere zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt betrachtet werden. Nach Verlust von *miR-1/206/133* in der Skelettmuskulatur konnten keine überlebenden tKO Tiere drei Wochen nach der Geburt (P21) vorgefunden werden, was auf ein vorzeitiges neonatales Versterben der tKO Tiere hinweist (Abb. 3.2.1. c). Aus diesen Grund wurden in dieser Arbeit weitere Analysen im Stadium E18.5, kurz vor der Geburt durchgeführt. Die durch Kaiserschnitt gewonnenen Tiere sind in diesem Stadium theoretisch bereits überlebensfähig<sup>149</sup>. Zunächst wurde eine äußere phänotypische Betrachtung der Tiere durchgeführt. Hierbei konnten keine offenkundigen Unterschiede zwischen *miR-1/206/133* defizienten tKO Tieren und den Wurfgeschwistern anhand ihrer äußeren Morphologie festgestellt werden (Abb. 3.3.1.2. a). Es zeigte sich auch kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Größe der Tiere (Tibialänge) oder ihr Körpergewicht (Abb. 3.3.1.2. b-c).



**Abbildung 3.3.1.2.: Äußere Erscheinung, Tiergröße und Gewicht im Stadium E18.5 nach *miR-1/206/133* Verlust.** a Vergleich der äußeren Morphologie von tKO und Wurfgeschwistern (ctrl) nach durchgeführtem Kaiserschnitt (Skala= 1 cm). Vergleichende Analyse der Tibialänge (n=7/5; Mann-Whitney U Test, einseitig; ns = nicht signifikant) (b) und des Körpergewichts (n= 63/16; Kolmogorov–Smirnov U Test, zweiseitig, ns = nicht signifikant) von tKO und Wurfgeschwistern (ctrl) (c). Die Tibialänge diente hierbei als Maß zur Abschätzung der Größe der Tiere.

Des Weiteren wurden an den tKO Tieren im Stadium E18.5 histologische Untersuchungen der Skelettmuskulatur vorgenommen. Es konnten mittels Hämatoxylin-Eosin (H&E) Färbung keine offensichtlichen Unterschiede in der Skelettmuskelmorphologie in verschiedenen sich noch entwickelnden Muskeln (paraspinale Muskulatur und Diaphragma) von tKO Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren festgestellt werden (Abb. 3.3.1.3 a). Bei der ultrastrukturellen Analyse des Skelettmuskels zeigten sich sowohl in Kontrolle, also auch im tKO in longitudinalen Schnitten eine distinkte parallele Anordnung der Muskelfasern. Auch der Feinaufbau der einzelnen kontraktile Einheiten lies keine Unterschiede zwischen den Genotypen erkennen. Es zeigten sich klar

sichtbare I- und A-Banden, sowie eine definierte H-Zone und Z-Linie (Abb. 3.3.1.3 b). Zusammenfassend lassen sich sowohl im histologischen als auch im ultrastrukturellen Aufbau der Muskulatur keine Abweichungen zwischen Kontroll- und tKO-Tieren im Stadium E18.5 feststellen.



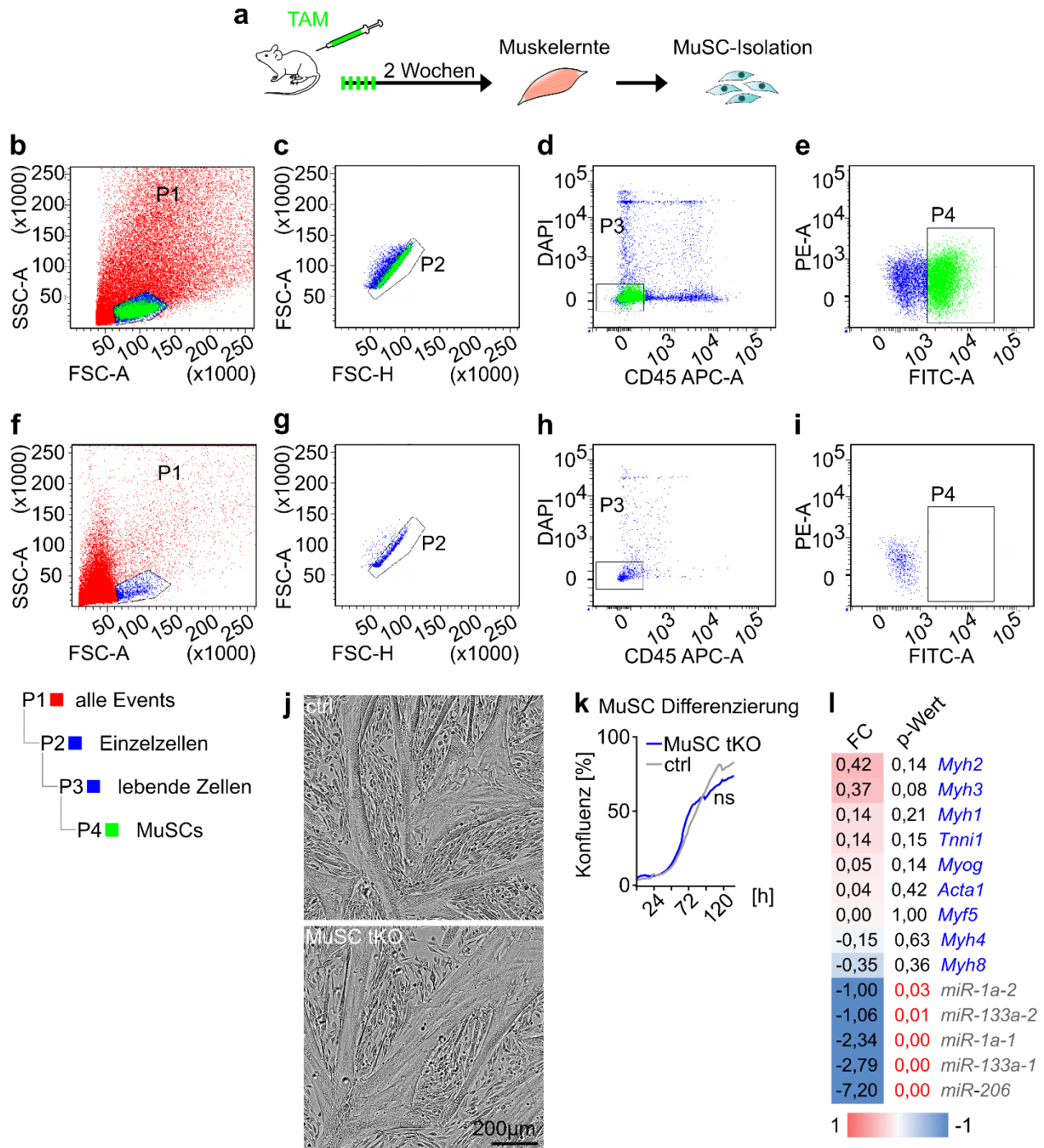
**Abbildung 3.3.1.3.: Wildtypische Entwicklung der Skelettmuskulatur nach Verlust von *miR-1/206/133* im Stadium E18.5.** a-b Histologische Analyse von tKO und Kontrollen (ctrl) zeigt keine sichtbaren Unterschiede in der Skelettmuskelmorphologie und –ultrastruktur im Stadium E18.5. a H&E-Färbung von Diaphragma (obere Reihe) und paraspinale Muskelquerschnitten (untere Reihe) (ctrl = Wurfgeschwister, Skala = 50  $\mu$ m). b Elektronenmikroskopische Aufnahmen von longitudinalen Quadriceps Muskelschnitten. \* markiert die Z-Linie (ctrl = Wildtyp, Skala = obere Reihe 5200 nm, mittlere Reihe 1000 nm, untere Reihe 500 nm).

Durch die gezielte Isolation von primären *miR-1/206/133* defizienten MuSCs (MuSC tKO) sollte ebenfalls das Proliferation- und Wachstumsverhalten, sowie die Differenzierungsleistung *ex vivo* analysiert werden. Um einen totalen Verlust aller miRNA Cluster in Muskelstammzellen untersuchen zu können, wurden *miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>//miR-206/133b<sup>-/-</sup>* Tiere mit einer Tamoxifen-induzierbare *Pax7-CreERT2*<sup>126</sup> gekreuzt. Zur Induktion der *miR-1-2/133a-1* Deletion wurden den Mäusen intraperitoneal Tamoxifen injiziert und nach einer zweiwöchigen Karenzzeit die Skelettmuskulatur entnommen (Abb. 3.3.1.4 a). Zur MuSCs-Gewinnung wurde anschließend die Muskulatur aufgereinigt und die MuSCs mittels spezifischer Antikörper für die Isolation markiert (MuSCs FITC-positiv). Die Isolation erfolgte mittels FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) (Abb. 3.3.1.4 b-i). Die *Scatterblots* zeigen die Kriterien zur Isolation der



FITC-positiven MuSCs (Abb. 3.3.1.4 b-e). Zum Vergleich wurden ebenfalls FITC-negativen MuSCs mittels FACS analysiert, um eine saubere Isolation der FITC-positiv MuSCs gewährleisten zu können (Abb. 3.3.1.4 f-i). Abb. 3.3.1.4 b, f stellt die Gesamtheit aller Events (P1) aufgetragen gegen Seitwärts- (SSC-A) und Vorwärtsstreulicht (FSC-A) dar. Weiter wurden die identifizierten Einzelzellen (P2) gegen Vorwärtsstreulicht A (FSC-A) und Vorwärtsstreulicht H (FSC-H) aufgetragen (Abb. 3.3.1.4 c, g). Aus der Population P2 wurden alle toten, DAPI-gefärbten Zellen aussortiert (Abb. 3.3.1.4 d, h). Zur Isolation dieser dritten Population (P3) wurden die Zellen aus P2 auf DAPI-Intensität gegen APC-Gehalt getestet, um während des Aufreinigungsprozesses nicht depletierte APC-markierte CD31-, CD45- und SCA1-positive Zellen auszusondern. In der Population P4 befanden sich nun alle lebenden FITC-positiven und PE- (Phycoerythrin 594) negative MuSCs (Abb. 3.3.1.4 e). Es konnten keine Zellen innerhalb dieser Population nachgewiesen werden (Abb. 3.3.1.4 i), was auf eine reine Endpopulation von primären MuSCs (Abb. 3.3.1.4 e) schließen lässt.

Alle nachfolgenden *ex vivo* Experimente wurden mit nach diesen Kriterien isolierten MuSCs vorgenommen. Zunächst wurde die Konfluenz und Differenzierungsleistung von kultivierten primären MuSCs untersucht. Hierbei zeigte sich, dass sowohl Kontroll-MuSCs (*miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>//miR-206/133b<sup>-/-</sup>//Pax7-CreERT2<sup>+/+</sup>*), als auch *miR-1/206/133* defiziente MuSCs (MuSC tKO) *ex vivo* keine Unterschiede in ihrer Differenzierungsleistung aufweisen. Nach 120 h in Kultur bildeten die MuSCs beider Genotypen synzytiale Fasern aus (Abb. 3.3.1.4 j). Es wurde ebenfalls der Bedeckungsgrad der Zellen stündlich bis 120 h nach der Isolation betrachtet. Diese Untersuchung erfolgte in Aktivierungs- und Proliferationsphase bis hin zur Differenzierungsphase mittels Konfluenz-Analyse. Hierbei zeigte sich keine signifikante Abweichung zwischen Kontroll- und MuSC tKO-Zellen (Abb. 3.3.1.4 k). Zur Untersuchung von differentiell exprimierten Genen nach *miR-1/206/133* Verlust, wurde eine Transkriptom-Analyse von isolierten Differenzierten Kontroll- und MuSC tKO-Zellen nach neun Tagen *ex vivo* Kultur vorgenommen. Es zeigten sich keine signifikanten Abweichungen in der Expression von Faktoren, die für die Muskelentwicklung und Differenzierung entscheidend sind (Abb. 3.3.1.4 l). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der Verlust von *miR-1/206/133* in MuSCs keinen starken Einfluss auf das Wachstum und die Differenzierungsleistung von isolierten primären MuSCs zu haben scheint.



**Abbildung 3.3.1.4.: Der Verlust von *miR-1/206/133* Cluster in MuSCs führt zu keiner Beeinträchtigung der Differenzierungsleistung *ex vivo*.** **a** Schematische Darstellung des Experimentverlaufs zur Induktion der Deletion von *miR-1-2/133a-1* durch Tamoxifen-Injektion (TAM, grüne Rechtecke = Injektionstage) bis zur MuSC-Isolation bei *miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>//miR-206/133b<sup>-/-</sup>//Pax7-CreERT2<sup>+/-</sup>* Tieren (MuSC tKO) und Kontrollen (ctrl = *miR-1-2/miR-133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-1-1/miR-133a-2<sup>-/-</sup>//miR-206/133b<sup>-/-</sup>// Pax7-CreERT2<sup>+/-</sup>*). **b-i** Isolation von MuSC mittels FACS. FACS Partikel (alle Events) nach enzymatischer



Aufschließung und Depletion von CD31, CD45 und SCA1 positiven Zellen aus der der Skelettmuskulatur im Vorwärtsstreulicht (FSC = *Forward Scatter*) und Seitwärtsstreulicht (SSC = *Side Scatter*) (**b, f**). Population 1 (P1) im Vorwärtsstreulicht-A und dem Vorwärtsstreulicht-H zur Sortierung von Einzelzellen (P2) (**c, g**). Aus Population P2 wurden nun mittels DAPI-Färbung tote Zellen aussortiert. Alle Ereignisse von P2 wurden gegen APC geplottet, um verbliebene CD45 positive Zellen auszusortieren (**c, g**). Zellen, negativ für beide Floreszenzen bildeten die dritte Population (P3) (**d, h**). Population P3 geplottet gegen PE- (Phycoerythrin 594) und Integrin-FITC (FITC-A). Bei Integrin-FITC positiven Zellen handelte es sich um die zu isolierende MuSC-Population (P4) (**e, i**). Mittels anschließender Reanalyse von Integrin-FITC negativen MuSCs wurde das *Gating*, Effizienz und Reinheit der sortierten Population überprüft (**f-i**). **j** Isolierte MuSCs von MuSC-tKO und Kontrollen sind in der Lage unter *ex vivo*-Bedingungen zu differenzieren. **k** Die Konfluenz von isolierten, gleichermaßen ausgesäte MuSCs von ctrl und MuSC tKO zeigen keine Unterschiede über einen Zeitraum von 120 Stunden (h) in Kultur. **l** Transkriptomanalysen von isolierten MuSCs. Ctrl gegen MuSC-tKO nach neun Tagen in Kultur (Affymetrix Micro Array Analyse n = 2/3, FC = *Fold Change* log<sub>2</sub>, Students t-Test, einseitig, ctrl = *miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-206/133b<sup>-/-</sup>//Pax7-CreERT2<sup>+/+</sup>*).

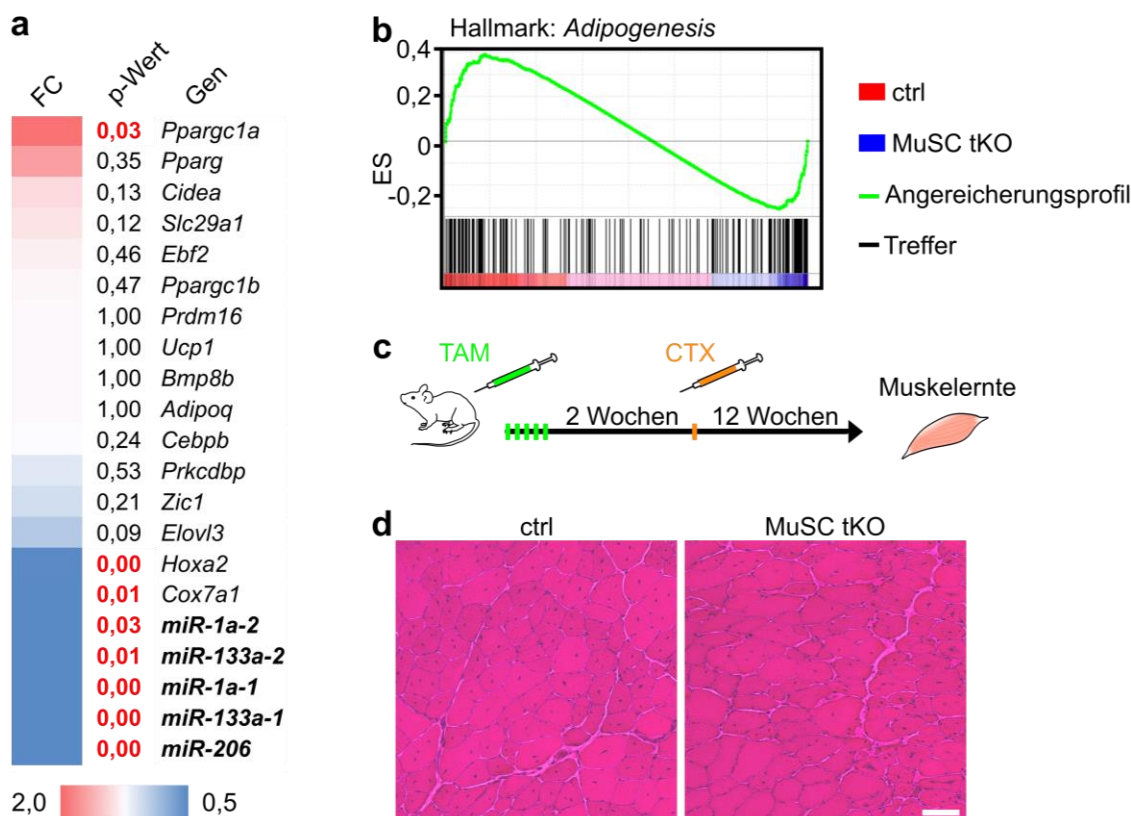
### 3.3.2. *miR-1/206/133* Deletion in Muskelstammzellen induziert nicht die Entwicklung von adipogenen Zellen

Publikationen der letzten 10 Jahren suggerierten, dass *miR-133* einen Einfluss auf die Entwicklung von adipogenen Zellen im Skelettmuskel durch die transkriptionelle Regulation von PRDM16 hat. Die Autoren dieser Studien beobachteten nach Reduktion des *miR-133* Levels, die Entwicklung von braunen Fettzellen (BAT) im Skelettmuskel und bei differenzierenden MuSCs. Daraus wurde geschlossen, dass die fehlende PRDM16-Repression die Entwicklung von braunem Fettgewebe fördert<sup>150-152</sup>. Da in der vorliegenden Arbeit untersuchten *miR-1/206/133* Knock-out Mausmodellen ebenfalls eine Deletion aller *miR-133* microRNAs vorliegt, wurde der Skelettmuskel, sowie MuSCs auf Anzeichen einer Bildung von adipogene Zellen überprüft.

Da MuSCs und adipogenen Vorläuferzellen während der Embryogenese ihren Ursprung in derselben Zellpopulation haben, wurden zunächst *miR-1/206/133* defiziente isolierte MuSCs (MuSC tKO) im Hinblick auf die Entwicklung von BAT (*Browning*) hin analysiert. Eine transkriptionelle Analyse von isolierten, für neun Tage *ex vivo* differenzierten, MuSC zeigte keine verstärkte Expression von *Prdm16* nach *miR-1/206/133* Verlust (Abb. 3.3.2.1 a). Des Weiteren konnten ebenfalls keine signifikant veränderte Expression von wichtigen BAT-Markergenen<sup>55, 152, 153</sup> festgestellt werden. Die BAT-Markergene *Hoxa2* und *Cox7a1* zeigten sogar eine verminderte Expression im MuSC tKO. Lediglich *Ppargc1a* wurde verstärkt in differenzierten MuSC tKO Zellen exprimiert. Des Weiteren zeigte eine mit den Transkriptomdaten durchgeführte GSEA keine Anreicherung für das Genset „*Adipogenesis*“ in MuSC tKO Zellen (Abb. 3.3.2.1 b).

Auch *in vivo* wurde untersucht ob *Browning*, initiiert durch den Verlust von allen *miR-1/206/133* Clustern in MuSCs stattfindet, wie es zuvor nach *miR-133* Knock-down angenommen wurde<sup>151</sup>. Zunächst wurde durch Tamoxifen-Injektion die Deletion von *miR-1-2/133a-1* in *miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>//miR-206/133b<sup>-/-</sup>//Pax7-CreERT2<sup>+/+</sup>* Mäusen induziert. Als Kontrolle

dienten *miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>//miR-206/133b<sup>-/-</sup>//Pax7-CreERT2<sup>+/+</sup>* Mäuse. Nachfolgend wurde nach einer zweiwöchigen Karenzzeit eine Schädigung eines TA-Muskels durch eine intramuskuläre CTX-Injektion vorgenommen, um eine MuSC vermittelte Regeneration des Muskels hervorzurufen. Nach einer 12-wöchigen Regenerationsphase wurden die Muskeln geerntet (Abb. 3.3.2.1 c). Bei einer histologischen Analyse konnten nach dieser langen Regenerationsphase noch immer Anzeichen der vorausgegangenen Muskelschädigung (zentralisierte Myonuklei) in beiden Genotypen identifiziert werden. Es konnten jedoch erneut keine morphologischen Anzeichen einer Entwicklung von braunem Fett in der durch MuSCs regenerierten TA-Muskeln von MuSC-tKO Tieren nachgewiesen werden (Abb. 3.3.2.1 d).



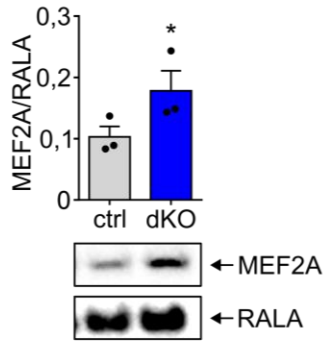
**Abbildung 3.3.2.1.: Deletion von *miR-1/206/133* in MuSC induziert nicht die Entwicklung von adipogenen Zellen.** **a** Transkriptomanalysen von isolierten MuSCs von ctrl gegen MuSC-tKO nach neun Tagen in Kultur (*Affymetrix Micro Array analysis*  $n = 2/3$ , FC= Fold Change  $\log_2$ , Students t-Test, zweiseitig, rot = signifikant  $<0,05$ , ctrl = *miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-206/133b<sup>-/-</sup>//Pax7-CreERT2<sup>+/+</sup>*). **b** Vergleichende *Gene set enrichment* Analyse (GSEA) von vorhergesagten *miR-1/206* und *miR-133* Zielgenen von isolierten MuSCs von ctrl gegen MuSC-tKO nach neun Tagen in Kultur ( $n = 2/3$ , ES = *Enrichment score*). **c-d** H&E Färbung von TA-Muskelquerschnitten nach vorausgegangener Tamoxifen (TAM, grüne Rechtecke symbolisieren Injektionstage) induzierter Deletion von *miR-1/206/133* in MuSCs und nachfolgender Muskelschädigung mittels Cardiotoxin (CTX, oranges Rechteck symbolisiert Injektionstag) von MuSC-tKO Tieren ( $n = 3/3$ , ctrl = *miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-206/133b<sup>-/-</sup>//Pax7-CreERT2<sup>+/+</sup>*, Skala = 50  $\mu\text{m}$ , Männchen im Alter von 21 Wochen).

### 3.3.3. *miR-1/206/133* defiziente neonatale Tiere weisen keinen mitochondrialen Phänotyp auf

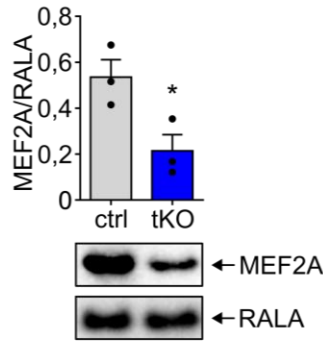
Es ist umfangreich belegt, dass es sich bei *Mef2a* um ein primäres Ziel von *miR-1* und *miR-133* handelt<sup>37, 43</sup>. Vorrangegangene Arbeiten zeigten ebenfalls, dass es nach Verlust beider *miR-1/133a* Cluster (dKO) zu einer signifikanten Erhöhung des Proteinlevels von MEF2A im adulten Skelettmuskel kommt. Dies führte wiederum zu einer kontinuierlichen Expression des *Dlk1-Dio3* miR-Genclusters, was in einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Morphologie und Funktion in adulten dKO-Tieren resultierte<sup>4</sup>. Mittels Western Blot Analyse konnte die beschriebene signifikante Erhöhung des MEF2A Proteinlevels im adulten Quadriceps Muskel nach Verlust von *miR-1/133a* (dKO)<sup>4</sup> bestätigt werden (Abb. 3.3.3.1. a). Zur Analyse der Expression des *Dlk1-Dio3* miR-Genclusters in Muskeln adulter dKO Tiere wurden bereits etablierte Marker-microRNAs (*miR-411, -541, -543*)<sup>4</sup> verwendet. Anhand ihres Expressionslevels ließen sich so Rückschlüsse auf die Expression des gesamten *Dlk1-Dio3* miR-Gencluster ziehen. Es konnte bestätigt werden, dass eine gesteigerte Expression von *miR-411, -541 und -543* bzw. des *Dlk1-Dio3* miR-Genclusters in Muskeln adulter dKO vorliegt (Abb. 3.3.3.1. b-d).

In der vorliegenden Arbeit sollte festgestellt werden, ob der Verlust aller *miR-1/206/133* Cluster im tKO ebenfalls zu einem mitochondrialen Phänotyp mit den beschriebenen molekularen Veränderungen führt. Aufgrund der neonatalen Letalität der tKO Tiere wurden alle Analysen mit Tieren im Stadium E18.5 durchgeführt. Als Kontrollen wurden hierbei Wurfgeschwister und dKO Tiere im selben Alter verwendet. Es konnten nachgewiesen werden, dass es im Kontrast zu adulten dKOs, zu einer signifikanten Reduktion des MEF2A Levels im Skelettmuskel von tKO Tieren kommt (Abb. 3.3.3.1. b). Außerdem zeigte die quantitative RT-PCR Analyse von *miR-411, -541 und -543*, weder in dKO, noch in tKO Tieren im Stadium E18.5 eine signifikant gesteigerte Expression dieser *Dlk1-Dio3* Marker-microRNAs (Abb. 3.3.3.1. f-h). Es konnte lediglich eine signifikante Reduktion des *miR-541* Levels in dKO Tieren im Stadium E18.5 festgestellt werden (Abb. 3.3.3.1. g). Um die Expression des *Dlk1-Dio3* Genclusters insgesamt beurteilen zu können, wurde zusätzlich die Expression mittels Transkriptomdaten von Kontroll- und tKO-Tieren im Stadium E18.5 analysiert. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der quantitativen RT-PCR (Abb. 3.3.3.1. f-h), zeigte sich keine signifikante Expressionserhöhung der Mehrheit der *Dlk1-Dio3* Cluster microRNAs. Lediglich *miR-882* zeigte eine signifikant erhöhte Expression, während *miR-1188, -370, -496a, -452, -494, -379 und -341* eine signifikant niedrigere Expression in tKO Skelettmuskeln aufwiesen. Um festzustellen ob in tKO Tieren Mitochondrien morphologisch verändert sind, wie zuvor im dKO beschrieben<sup>4</sup>, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von Kontroll- und tKO-Skelettmuskeln im Stadium E18.5 angefertigt. Die ultrastrukturelle Analyse ergab keine sichtbaren Unterschiede in der mitochondrialen Struktur und Morphologie in *miR-1/206/133* defizienter Skelettmuskulatur. Sowohl in Kontrolle, als auch im tKO sind die einzelnen angeschnittenen Cristae-Strukturen klar erkennbar (Abb. 3.3.3.1. j).

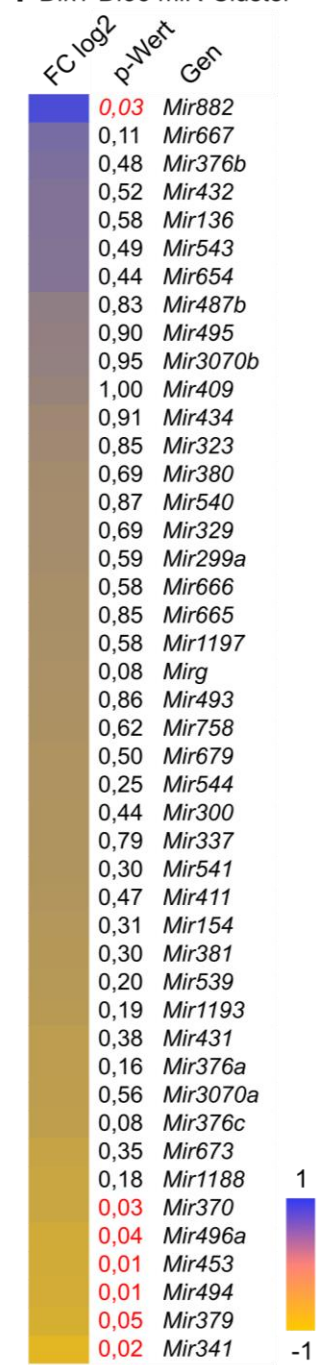
**a** MEF2A Expression im Adultus



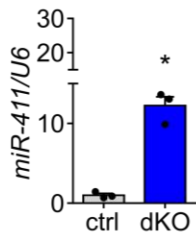
**e** MEF2A Expression in E18.5



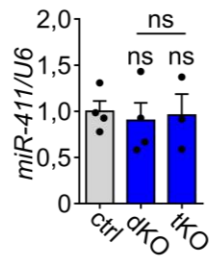
**i** *Dlk1-Dio3* miR-Cluster



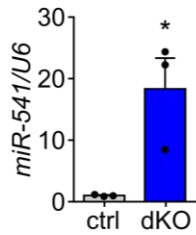
**b** *miR-411* im Adultus



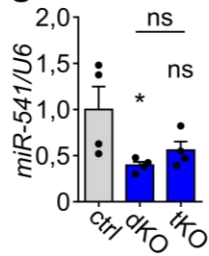
**f** *miR-411* in E18.5



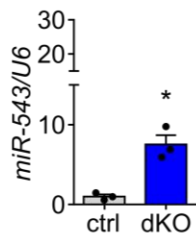
**c** *miR-541* im Adultus



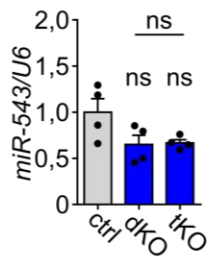
**g** *miR-541* in E18.5



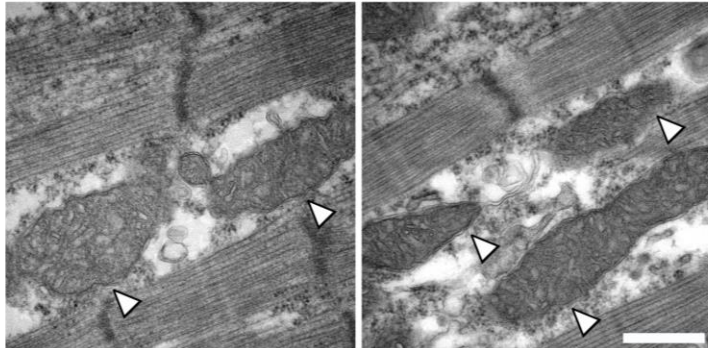
**d** *miR-543* im Adultus



**h** *miR-543* in E18.5



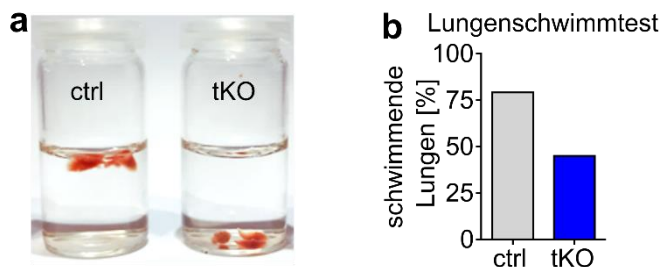
**j** ctrl tKO



**Abbildung 3.3.3.1.: Deletion von *miR-1/133a* oder *miR-1/206/133* führt zu keiner gesteigerten Expression von MEF2A oder des *Dlk1-Dio3* Genclusters im Stadium E18.5.** **a** Western Blot-Analyse bestätigt bereits publizierte Daten eines signifikanten Anstiegs der MEF2A- Expression in adulten *miR-1/133a* dKO Tieren <sup>4</sup> (n= 3/3, ctrl= *miR-1-1/133a-2<sup>+/+</sup>// miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>// miR-206/133b<sup>+/+</sup>// Pax7-Cre<sup>+/+</sup>*, Mann-Whitney U Test, einseitig, \*p= 0,05, Quadriceps Muskeln [Weibchen und Männchen, 14-18 Wochen alt]). **b-d** Taqman Assays bestätigen veröffentlichte Daten einer erhöhten Expression einzelner miRs (*miR-411*, *miR-541*, *miR-543*) aus dem *Dlk1-Dio3* Gencluster in adult *miR-1/133a* dKO Tieren <sup>4</sup> (n=3/3, ctrl = *miR-1-1/133a-2<sup>+/+</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-206/133b<sup>+/+</sup>//Pax7-Cre<sup>+/+</sup>*, Mann-Whitney U Test, einseitig, \*p= 0,05; Quadriceps Muskeln [Weibchen und Männchen, 14-18 Wochen alt]). **e** Western Blot-Analyse zeigt keine signifikante Änderung der MEF2A Expression in tKO-Quadriceps Muskeln (n= 3/3, ctrl= *miR-1-1/133a-2<sup>+/+</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>+/+</sup>//miR-206/133b<sup>+/+</sup>//Pax7-Cre<sup>+/+</sup>*, Mann-Whitney U Test, einseitig, \*p= 0,05, [E18.5]). **f-h** Taqman Assays zeigen keinen signifikanten Anstieg der Expression einzelner miRs (*miR-411*, *miR-541*, *miR-543*) aus dem *Dlk1-Dio3* Gencluster in dKO und tKO Tieren in Quadriceps Muskeln (n = 4/4/4, ctrl = *miR-1-1/133a-2<sup>+/+</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-206/133b<sup>+/+</sup>//Pax7-Cre<sup>+/+</sup>*, Mann-Whitney U Test, einseitig, \*p = 0,0143, ns = nicht signifikant [E18.5]). **i** Transkriptomanalysen zeigt keine erhöhte Expression des gesamten *Dlk1-Dio3* Clusters in *miR-1/206/133* defizient (tKO) Quadriceps Muskeln im Vergleich zur Kontrolle (ctrl) im Stadium E18.5 (Affymetrix Micro Array, n = 4/4/4, FC log<sub>2</sub>= *Fold Change* log<sub>2</sub>, ctrl = *miR-1-1/133a-2<sup>+/+</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>+/+</sup>//miR-206/133b<sup>+/+</sup>// Pax7-Cre<sup>+/+</sup>*, Students t-test, zweiseitig, signifikante Unterschiede in Rot, p = <0,05 [E18.5]). **j** Histologische Analyse der mitochondrialen Ultrastruktur. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von tKO und wildtypischen (ctrl) zeigen keine sichtbaren Unterschiede der Morphologie der Mitochondrien (weiße Pfeile) in longitudinalen Quadriceps Muskelschnitten (Skala = 1000 nm, [E18.5]).

### 3.4. *miR-1/206/133* Verlust führt zu neonataler Letalität durch eine gestörte NMJ-Bildung

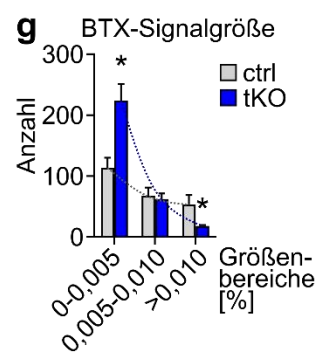
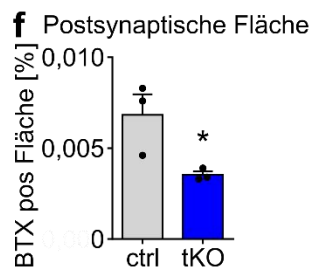
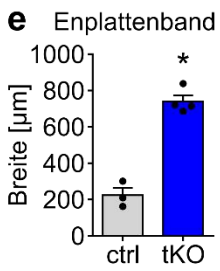
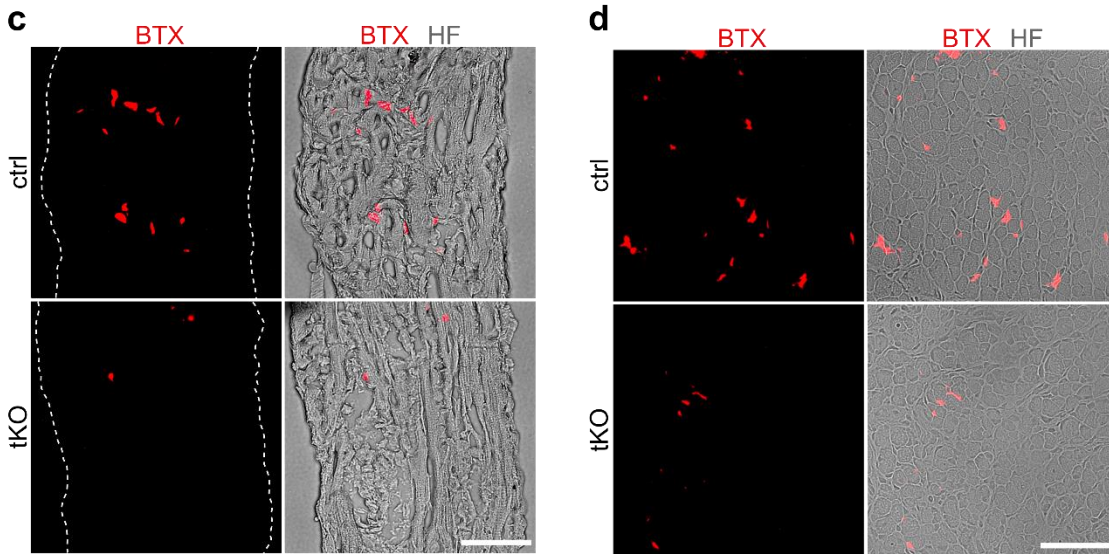
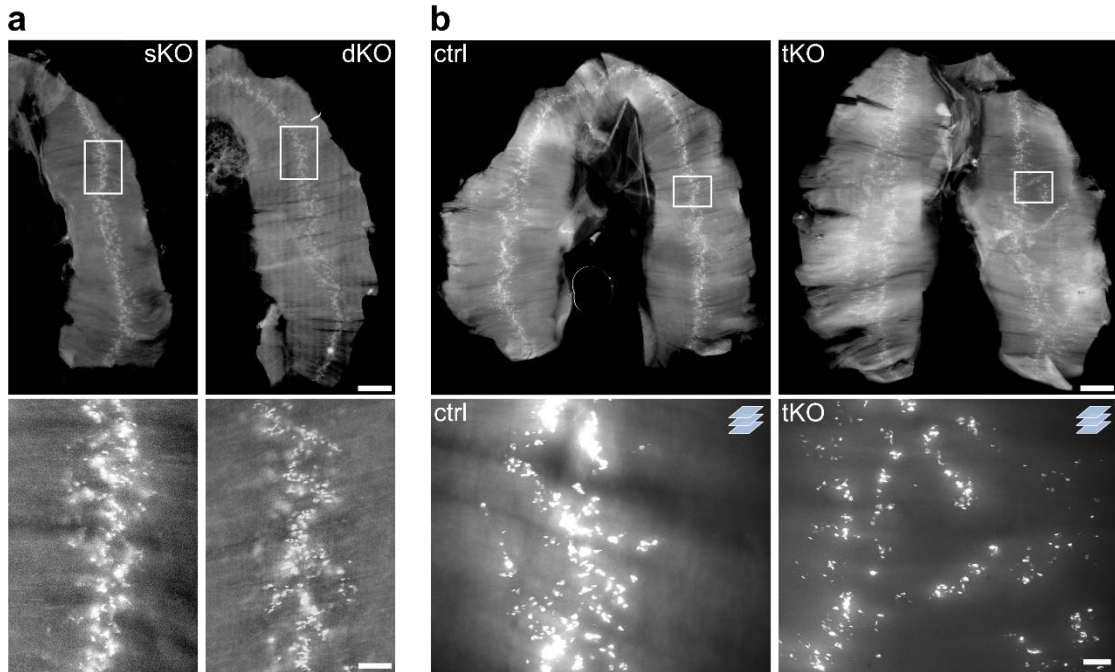
Wie unter Punkt 3.2. bereits beschrieben, führt der Verlust aller *miR-1/206/133* Cluster in der Skelettmuskulatur zur neonatalen Letalität von tKO Tieren. Unter Punkt 3.3. konnte bereits gezeigt werden, dass die Ausbildung der Muskulatur im embryonalen (E10.5) und neonatalen Alter (E18.5), nach Verlust von *miR-1/206/133* keine Störungen aufweist. Frühere Studien konnten zeigen, dass neben einer gestörten Ausbildung der Muskulatur, auch Defekte der Innervierung des Skelettmuskels zu einem frühzeitigen neonatalen Tod bei Menschen und Mäusen führen können. Solche Defekte können zu einer fehlenden oder mangelnden Ventilation der Lunge und damit zum Ersticken nach der Geburt führen <sup>154</sup>. Aus diesem Grund wurden tKO-Tiere im Hinblick auf neuromuskuläre Defekte untersucht. Um zu testen, ob eine gehemmte Ventilation der Lunge vorlag, wurde eine Lungenschwimmprobe bei Kontroll- und tKO- Tieren 15 min nach vorgenommenen Kaiserschnitt im Stadium E18.5 durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein etabliertes Verfahren zur Feststellung von neonataler Letalität aufgrund von mangelnder Respirationsfähigkeit <sup>155, 156</sup>. Es konnte somit determiniert werden, ob die Tiere nach der Entnahme aus dem Muttertier in der Lage waren selbstständig zu Atmen und die Lungen mit Luft zu füllen. Es zeigte sich, dass 79 % der tKO Wurfgeschwister eine luftgefüllte, schwimmende Lunge aufwiesen. Dagegen konnte nur bei 45 % der tKO Tieren eine schwimmende Lunge festgestellt werden, was auf eine verminderte Respirationsfähigkeit hindeutete (Abb. 3.4.1.).



**Abbildung 3.4.1.: Respiratorische Störung nach *miR-1/206/133* Deletion.** **a** Lungenschwimmprobe zeigt eine verminderte Respirationsfähigkeit von tKO-Tieren im Stadium E18.5 15 min nach erfolgtem Kaiserschnitt im Vergleich zu Kontrolltieren (ctrl). **b** Darstellung der prozentualen Anteile von schwimmenden Lungen nach erfolgter Lungenschwimmprobe von ctrl und tKO Tieren (Prozent der schwimmenden Lungen jeder Gruppe; n = 28/11 von 8 Würfen, ctrl = Wurfgeschwister [E18.5]).

Es kann angenommen werden, dass diese Defekte mit einer fehlenden oder defekten Innervierung des Diaphragmas in Zusammenhang stehen könnten. Ähnliche respiratorische Störungen bei Mäusen konnten zuvor auf eben diese Weise erklärt werden <sup>156</sup>. Neben den interkostalen Muskeln, ist das Diaphragma (Zwerchfell) der hauptsächlich an der Atmung beteiligte Teil der Skelettmuskulatur. Seine Oberfläche weist ein sehr distinktes Innervierungsmuster auf <sup>91</sup>. Zur Beurteilung der postsynaptischen Region der neuromuskulären Synapse (NMJ) wurde eine Färbung mit Fluorochrom-gekoppeltem Bungarotoxin (BTX) durchgeführt. Dieses bindet an nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (AChR) und stellt damit einen hochspezifischen Marker für die Postsynapse da <sup>81</sup>. Die Färbung wurde mit Diaphragmen von sKO-, dKO-, tKO- und Kontroll-Tieren aus dem Stadium E18.5 vorgenommen. Hierbei zeigte sich, dass lediglich Muskeln von tKO Tieren Defekte in der postsynaptischen NMJ-Differenzierung bzw. –Ausbildung aufwiesen. Nur nach Verlust aller *miR-1/206/133* Cluster zeigte sich eine diffusere und breitere Verteilung der AChR-Cluster auf der Muskeloberfläche. In sKO, dKO und Kontrolltiere hingegen das typischerweise medial lokalisierte, definierte motorische Endplattenband (Abb.3.4.2 a-b). Die Ausmessung der motorischen Endplattenband-breite zeigte eine Erhöhung um mehr als das Doppelte in tKO Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren (Abb.3.4.2 e). Eine Analyse der AChR-Clusterfläche zeigte, neben einer reduziert erscheinenden BTX-Färbung im tKO Diaphragma, ebenfalls eine signifikante Reduktion der postsynaptischen Gesamtfläche der AChR-Cluster in Querschnitten paraspinaler Muskeln. Eine Verminderung der AChR-Clusterfläche konnte auch in Gewebeschnitten des Diaphragmas (Abb.3.4.2 c-d, f) nachgewiesen werden. Es wurde weiter eine detailliertere Auswertung der AChR-Signale vorgenommen, um die Größenverteilung der AChR-Cluster in Muskelquerschnitten zu beurteilen. Diese Analyse zeigte, dass in tKO Muskeln nicht nur eine generelle Reduktion von AChR-Clustern vorliegt, sondern dass der Anteil sehr kleiner AChR-Cluster (<0,005 % der Fläche) in Relation zur Gesamtmenge erhöht war, während der Anteil großer AChR-Cluster (>0,010 % der Fläche) vermindert war (Abb.3.4.2 g).



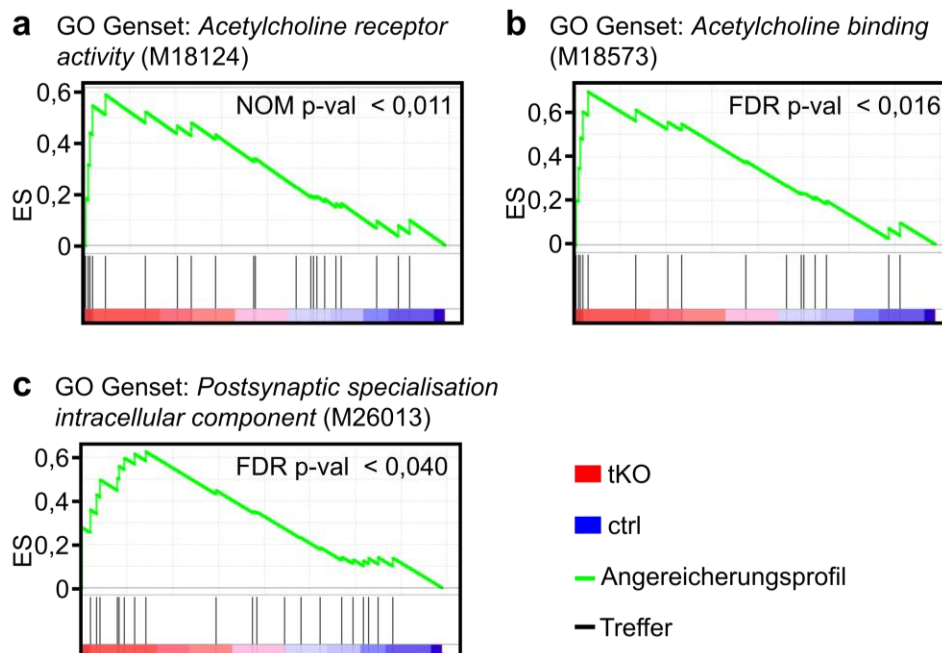


**Abbildung 3.4.2.: Verlust von *miR-1/206/133* im Skelettmuskel resultiert in einer gestörten NMJ-Formation.** **a** *Whole-mount* Diaphragmafärbung mit Bungarotoxin (BTX) von Hemi-Diaphragmen von *miR-206/133b* (sKO) und *miR-1/133a* (dKO) Tieren (Skala = 600  $\mu$ m obere Reihe/ 100  $\mu$ m untere Reihe [E18.5]). **b** *Whole-mount* BTX-Diaphragmafärbung von Kontroll- (ctrl) und *miR-1/206/133* tKO Tieren (ctrl = Wurfgeschwister, Skala = 600  $\mu$ m untere Reihe/ 100  $\mu$ m obere Reihe Z-Stacks in 50  $\mu$ m Schritten [E18.5]). **c-d** Analyse der postsynaptischen Region von Kontroll- (obere Reihe) und *miR-1/206/133* tKO (untere Reihe) Transversalschnitten von Diaphragmen und paraspinale Muskeln (ctrl = *miR-1-1/133a-2<sup>+/+</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-206/133b<sup>+/+</sup>//Pax7-Cre<sup>+/+</sup>*, Skala = 50  $\mu$ m, HF = Hellfeld [E18.5]). **e** Quantifizierung der durchschnittlichen motorischen Endplattenbandbreite von ctrl und *miR-1/206/133* tKO Diaphragmen (n = 3/4, ctrl = Wurfgeschwister, Mann-Whitney U Test, einseitig, \*p = 0,0286 [E18.5]). **f** Quantifizierung der durchschnittlichen postsynaptischen Fläche in paraspinale transversale Muskelschnitten von ctrl und *miR-1/206/133* tKO (n = 3/3, ctrl = *miR-1-1/133a-2<sup>+/+</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-206/133b<sup>+/+</sup>//Pax7-Cre<sup>+/+</sup>*, Mann-Whitney U Test, einseitig, \*p = 0,05 [E18.5]). **g** Quantifizierung der BTX-Signalgröße in paraspinale transversale Muskelschnitten von ctrl und *miR-1/206/133* tKO (n = 3/3, ctrl = *miR-1-1/133a-2<sup>+/+</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-206/133b<sup>+/+</sup>//Pax7-Cre<sup>+/+</sup>*, Mann-Whitney U Test, einseitig, \*p = 0,05 [E18.5]).

Um Aufschluss über transkriptionellen Missregulationen, sowie die molekularen Mechanismen zu erhalten, die dem neuromuskulären Phänotyp im tKO-Hintergrund zugrunde liegen, wurden Transkriptomanalysen durchgeführt. Es wurden Transkriptom-Datensätze von Kontroll- und tKO-Muskeln (Quadriceps) im Stadium E18.5 generiert. Auf Basis dieser Daten wurde eine GSEA durchgeführt. Hierbei zeigte sich in den tKO Proben eine signifikante Anreicherung von Gensets, die mit der AChR-Funktion und -Spezifizierung assoziiert sind (Abb.3.4.3 a-c). Zusammenfassend legen die Ergebnisse nahe, dass lediglich der Verlust aller *miR-1/206/133* Cluster im Skelettmuskel zur neonatalen Letalität durch eine gestörte NMJ-Bildung und -Funktion führt.

**Abbildung 3.4.3.: Signifikante Anreicherung von Gensets assoziiert mit der NMJ-Ausbildung in *miR-1/206/133* tKO.** **a-c** Anreicherung von NMJ-Bildungs-assoziierten Gensets in Transkriptomdaten-basierter GSEA von Kontroll- (ctrl, blau) und *miR-1/206/133* tKO (rot) Quadriceps Muskeln (n = 4/4, ctrl = *miR-1-1/133a-2<sup>+/+</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-206/133b<sup>+/+</sup>//Pax7-Cre<sup>+/+</sup>*, ES = *Enrichment Score*, NOM = normalisierter p-Wert, FDR = *False discovery rate* [E18.5]). Abbildung 3.4.3. befindet sich auf der nachfolgenden Seite.





### 3.5. CRK ist ein primäres Target von *miR-1/206/133*

Zur Aufklärung des molekularen Mechanismus hinter dem festgestellten neonatal letalen NMJ-Phänotyp von tKO Tieren, wurden Analysen zur Identifikation von primären *miR-1/206/133* Zielgenen (Targets) durchgeführt.

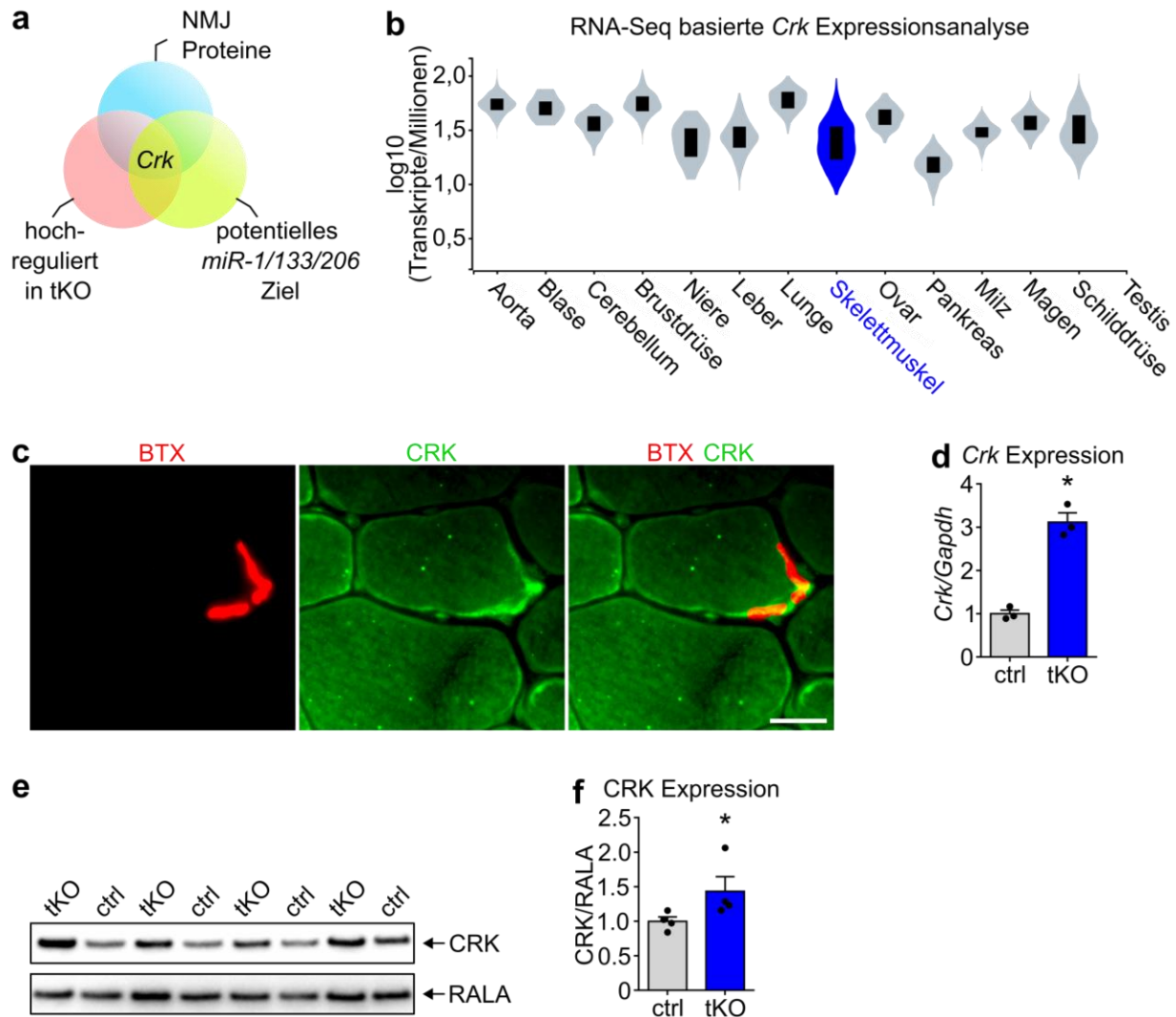
#### 3.5.1. CRK ist NMJ-assoziiert und ist nach *miR-1/206/133* Knock-out verstärkt exprimiert

Um einen Einblick in die in tKO Tieren ablaufenden molekularen Prozesse zu erhalten, die in den NMJ-Phänotyp resultieren, wurde zunächst ein Screening nach potenziellen *miR-1/206/133* Zielgenen durchgeführt.

Als erstes wurden mit der Zielgenvorhersage-Software miRANDA ([www.microrna.org](http://www.microrna.org)) mögliche Ziel mRNAs der microRNAs *miR-1/206* und *miR-133* bioinformatisch identifiziert. Zweitens wurden für das Target-Screening Transkriptom-Datensätze von Kontroll- und tKO-Muskeln (Quadriceps) im Stadium E18.5 herangezogen. Zur Identifikation von potenziellen durch *miR-1/206/133* inhibierte Zielgenen, wurden aus den Transkriptomdaten alle im tKO signifikant (p-Wert < 0,05) hochregulierten Gene mit einem *Fold Change* von > 1,35 selektiert. Als drittes wurden bereits beschriebene, NMJ-assoziierte Proteine bestimmt<sup>89, 154</sup>. Diese drei Datensätze wurden nun in einem Venn-Diagramm auf eine überlappende Schnittmenge hin analysiert. Hierbei wurde das Adapterprotein CRK als ein vielversprechender Kandidat für weitere Untersuchungen identifiziert (Abb. 3.5.1.1. a). CRK ist im Transkriptom-Datensatz signifikant hochreguliert (p-Wert

0,001; FC 1,4), ist ein laut Literatur NMJ assoziiert<sup>89, 91</sup> und ist ein bioinformatisch vorhergesagtes Ziel von *miR-1/206/133*.

Nachdem CRK als ein potenzielles primäres *miR-1/206/133* Zielgen identifiziert werden konnte, wurde sein Expressionsprofil analysiert, da lediglich im Skelettmuskel exprimierte Kandidaten für weitere Untersuchungen in Frage kamen. CRK weist in einer RNA-Seq basierten Analyse ein ubiquitäres Expressionsprofil auf und ist somit auch im Skelettmuskel abundant exprimiert (GTEx Portal <https://www.gtexportal.org>, Stand 11.2020) (Abb. 3.5.1.1. b). Zur detaillierteren Analyse der Lokalisation von CRK in diesem Gewebe, wurden eine Antikörper- und BTX-Färbung von wildtypischen TA-Muskelquerschnitten durchgeführt. Es zeigte sich, dass CRK im Skelettmuskel primär in der postsynaptischen Region der NMJ lokalisiert war (Abb. 3.5.1.1. c). Aus der Literatur ist bekannt, dass CRK und CRK-L im Skelettmuskel eine kritische Rolle während der NMJ Ausbildung spielen<sup>72, 91, 101</sup>. Zur Validierung eines erhöhten CRK-Levels nach *miR-1/206/133* Verlust (tKO), wurde die Expression sowohl auf Transkriptom-, als auch auf Proteom-Ebene kontrolliert. Mit Hilfe von quantitativer RT-PCR konnte das signifikant erhöhte Expressionslevel von *Crk* in tKO Quadriceps-Muskeln (E18.5) bestätigt werden (Abb. 3.5.1.1. d). Währenddessen war das Expressionslevel des *Crk*-Paralogs *Crk-L* unverändert (Abb. 5.3. Anhang). Da miRs auf posttranskriptioneller Ebene die Expression von Genen regulieren, wurde zudem das Proteinlevel von CRK mittels Western Blot Analyse in tKO Tieren überprüft. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der CRK Expression (etwa um 1/3) im tKO Diaphragmamuskel im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 3.5.1.1. e-f). Im Gegensatz dazu zeigte das in der Literatur beschriebene *miR-206* Target HDAC4<sup>47</sup> keine signifikante Änderung im Proteinlevel (Abb. 5.4. Anhang). Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die mRNA des NMJ-assoziierte Adapterprotein CRK ein vorhergesagtes Ziel aller Mitglieder der *miR-1/206/133* Familie darstellt. Mittels quantitativer RT-PCR und Western Blot konnte die verstärkte Expression von CRK im Skelettmuskel in *miR-1/206/133* defizienten tKO Tieren validiert werden.

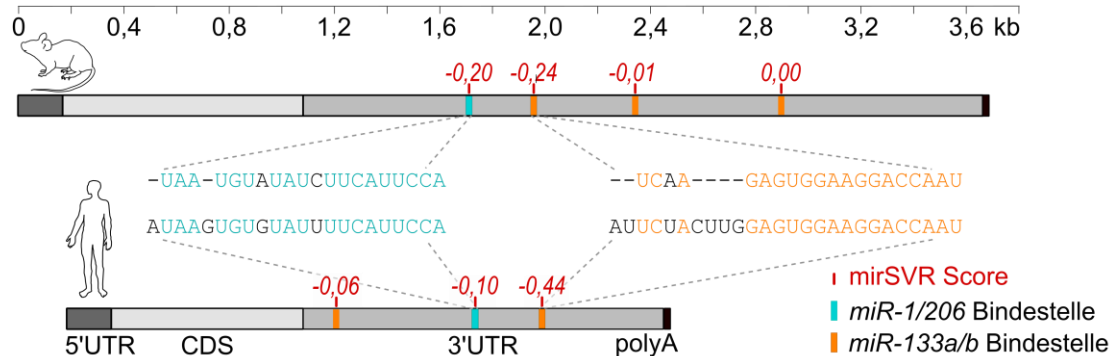


**Abbildung 3.5.1.1.: CRK ist NMJ-assoziiert und weist eine erhöhte Expression in *miR-1/206/133* Knock-out Tieren auf.** **a** Überlappende Schnittmenge von Transkriptomanalysen (signifikant hochreguliert in tKO mit *Fold Change* >1,35 [n= 4/4, E18.5]), vorhergesagten *miR-1/206/133* (miRANDA Software) und bekannten NMJ-assoziierten Genen identifiziert das CRK als Top-Kandidat für weiterführende Untersuchungen. **b** RNA-Seq basierten Expressionsdaten von CRK in unterschiedlichen Geweben (Daten von <https://www.gtexportal.org>). **c** CRK-Immunfluoreszenzfärbung und BTX-Färbung von wildtypischen TA-Muskelquerschnitten zeigt eine Assoziation von CRK zur NMJ (Skala = 20  $\mu$ m, BTX =Bungarotoxin [14 Wochen]). **d** Taqman Assay bestätigt signifikant erhöhte *Crk* Expression in *miR-1/206/133* defizienten Muskeln im Vergleich zu Kontroll-Quadriceps-Muskeln (n = 3/3, ctrl = *miR-1-1/133a-2<sup>+/+</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-206/133b<sup>+/+</sup>//Pax7-Cre<sup>+/+</sup>*, Mann-Whitney U Test, einseitig, \*p = 0,05 [E18.5]). **g-h** Western Blot Analyse zeigt erhöhte CRK-Proteinmenge in *miR-1/206/133* defizienten Diaphragma-Muskeln im Vergleich zur Kontrolle (ctrl), RALA diene als Ladekontrolle (n = 4/4, ctrl = *miR-1-1/133a-2<sup>+/+</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-206/133b<sup>+/+</sup>//Pax7-Cre<sup>+/+</sup>*, Mann-Whitney U Test, einseitig, \*p > 0,015 [E18.5]).

### 3.5.2. *Crk* ist ein primäres *miR-1/206/133* Ziel mit evolutionär konservierten miR-Bindestellen

Es konnte gezeigt werden, dass das mit der postsynaptischen Region assoziierte Protein CRK nach Verlust von *miR-1/206/133* im Skelettmuskel eine signifikant erhöhte Expression aufweist (Punkt 3.5.1.). Dies könnte wiederum auf eine Funktion von *miR-1/206/133* in der Regulation des *Crk* Expressionslevels *in vivo* hindeuten. Durch Nutzung der Zielgenvorhersage-Software miRANDA ([www.microrna.org](http://www.microrna.org)) wurde die mRNA von *Crk* als potentielles Ziel von *miR-1/206* und *miR-133* bioinformatisch identifiziert. Hierbei konnten multiple potentielle *miR-1/206* und *miR-133* Bindesequenzen sowohl in der murinen, als auch in der humanen mRNA von *Crk* identifiziert werden (Abb. 3.5.2.1). Es konnten eine potentielle *miR-1/206* und drei potentielle *miR-133* miR-Bindestellen in der murinen und zwei *miR-133*, sowie eine *miR-1/206* Bindestelle in der humanen *Crk* mRNA festgestellt werden (Abb. 3.5.2.1; Abb. 5.5. a, b, Anhang). Alle potentiellen miR-Binderegionen befanden sich in der 3'UTR der *Crk* mRNA. Zur qualitativen Bewertung der einzelnen Bindesequenzen wurde mirSVR Score (Runterregulierungs-Score; [www.microrna.org](http://www.microrna.org)) verwendet. Hierbei handelte es sich um eine auf maschinellem Lernen basierte Methode zur Bewertung potentieller miR-Bindesequenzen. Der Algorithmus beurteilte hierbei die Qualität der potentiellen komplementären Bindung, speziell die der miR-Seed-Sequenz, sowie die Position in der mRNA Sequenz und die evolutionäre Konservierung der Bindesequenzen<sup>157</sup>. Es zeigte sich, dass die miR-Bindestellen mit dem niedrigsten Score (*miR-1/206* -0,20 und -0,10/ *miR-133* -0,24 und -0,44) eine große sequenzielle Übereinstimmung im *Alignment* von muriner und humanen *Crk* mRNA 3'-UTR Bindesequenzen aufwiesen. Aufgrund der ähnlichen Lokalisation, der niedrigen mirSVR Score Werte und der hohen sequenziellen Ähnlichkeit, könnte bei den identifizierten miR-Bindestellen eine speziesübergreifende funktionell relevante Konservierung vorliegen. Alle anderen identifizierten miR-Bindestellen mit einem höheren mirSVR Score (murine mRNA: -0,01, 0,00/ humane mRNA: -0,06) zeigten zudem keine Übereinstimmung in Lokalisation und Sequenz.

**a** Konservierte *miR-1/206* und *miR-133a/b* Bindestellen in muriner und humaner *Crk* 3'UTR



**Abbildung 3.5.2.1.: Konservierung und Lokalisation der *miR-1/206* und *miR-133* Bindestellen in der *Crk* mRNA.** **a** Konservierte in der Zielgenvorhersage-Software miRANDA ([www.microrna.org](http://www.microrna.org)) vorhergesagte microRNA-Bindestellen in der murinen und humanen mRNA von *Crk*. Putative Zielregion von *miR-1/206* dargestellt in Cyan, Zielregion von *miR-133a/b* dargestellt in orange. Qualitative Wertung der potentiellen Bindestellen mittels mirSVR Score in Rot (Runterregulierungs-Score; < 0). CDS= Kodierender Sequenzbereich (*coding sequence*), kb= Kilobasen, polyA= poly-A-Schwanz, UTR= Untranslatierte Region.

Zur Validierung der vielversprechenden identifizierten potentiellen *miR-1/206* und *miR-133* Bindestellen in der 3'UTR der *Crk* mRNA (Abb. 3.5.2.1) wurde ein Luciferase Reporter Assay durchgeführt. Für diesen Assay wurden murine Skelettmuskelzellen (C2 Zellen) verwendet. Da die Analyse der potentiellen Interaktion der microRNAs mit den identifizierten *Crk*-mRNA Bindestellen mit dem in C2 Zellen endogen vorhanden microRNAs durchgeführt werden sollte, wurde zunächst die Expression der microRNAs in diesen Zellen überprüft. Als Negativkontrolle dienten eine Nierenzelllinie (HEK). Es wurden Lysate sowohl von proliferierenden Myoblasten, als auch von differenzierten Myotuben präpariert und die Expression durch eine qualitative RT-PCR ermittelt. Die proliferierenden Myoblasten zeigten eine im Gegensatz zu HEK Zellen detektierbare, jedoch niedrige Expression sowohl von *miR-1*, als auch von *miR-133*. Im Kontrast hierzu konnte eine um das Vielfache gesteigerte miR-Expression in differenzierten Myotuben festgestellt werden. Diese drastische Steigerung des miR-Level deckte sich mit bereits publizierten Daten (Abb. 3.5.2.2. f, h) <sup>4, 144, 158</sup>.

Zur Durchführung des Luciferase Reporter Assays zwecks Beurteilung der miR-*Crk* mRNA Interaktion, wurden C2 Zellen mit Reporter Konstrukten mit den jeweiligen *Crk* mRNA Zielsequenzen der miRs transfiziert (Abb. 3.5.2.2 a-c). Als zusätzliche Kontrolle wurden ebenfalls Reporter Konstrukte mit mutierten Bindesequenzen (Seed-Sequenzbindestelle) generiert und transfiziert (Abb. 3.5.2.2 d). Anschließend wurden Lysate sowohl von proliferierenden Myoblasten, als auch von differenzierten Myotuben präpariert und getestet. Es konnte ein signifikant



**Abbildung 3.5.2.2.: Evaluierung vorhergesagter *miR-1/206* und *miR-133* Bindesequenzen in *Crk* mRNA mittels Luciferase Reporter Assay.** **a-c** Schematische Darstellung des verwendeten Luciferase Reporter Vektors und seiner Funktion als genetisches Reportersystems. Erfolgt eine Bindung der microRNA an die Zielsequenz kommt es zur Inhibierung der Translation des Reporters Firefly Luciferase und zur verminderten Luciferase-Aktivität. **d-e** Illustration der wildtypischen (wt) und mutierten (mut) Sequenzen der putativen microRNA-Bindesequenzen, die in den Luciferase Reporter Vektor kloniert wurden (miR-Sequenz= blau; Seed-Sequenz= fett, mutierte Basen= grau). **f, h** Ermittlung der endogenen *miR-1* und *miR-133* Expression in proliferierenden (prol) und differenzierten (diff) C2-Zellen mittels Taqman Assay. Keine detektierbare Expression in nichtmuskulären HEK293-Zellen (HEK) (n = 3/3/3, n = 3/3/3, biologische Replikate). **g-i** Repression der relativen Luciferase-Aktivität durch wildtypische, jedoch nicht durch mutierte microRNA-Bindesequenzen aus der 3'UTR von *Crk*. Repression der relativen Luciferase-Aktivität durch entsprechende wildtypische miR-Bindesequenzen kann in proliferierenden, jedoch verstärkt in differenzierten C2-Zellen nachgewiesen werden (getestete *miR-1/206* Bindesequenz n = 6/6, getestete *miR-133a/b* Bindesequenz n = 3/3, jedes biologische Replikat entspricht einer von den anderen unabhängig durchgeführten Transfektion, Mann-Whitney U Test, einseitig, \*\*p = 0,0011; \*p = 0,05). MCS= Polylinker (*Multiple Cloning Site*), PGK= Phosphoglycerin Kinase, SV40= Simianvirus 40-Poly(A) Signal.

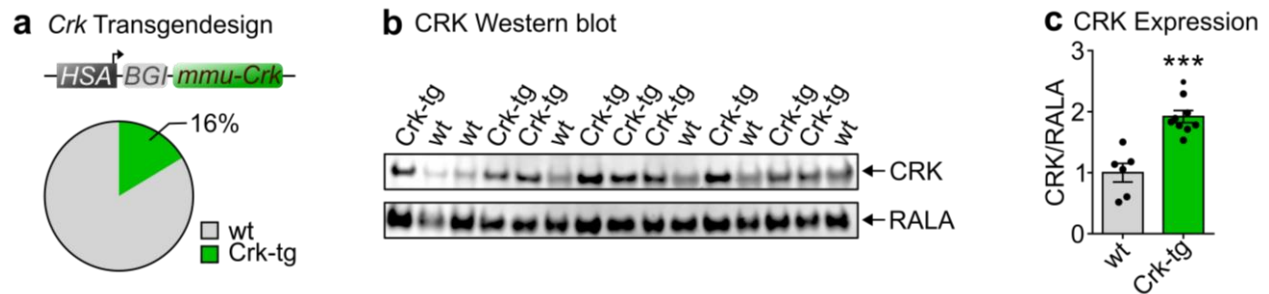
### 3.6. Skelettmuskelspezifische Überexpression von CRK rekapituliert den neonatalen *miR-1/206/133* Knock-out Phänotyp

Um aufzuklären, ob der Verlust des reprimierenden Einflusses von *miR-1/206/133* auf das CRK Level im tKO-Skelettmuskel tatsächlich der Hauptgrund für den festgestellten NMJ-Phänotyp darstellt, wurden zwei CRK Überexpressions-Mausmodelle generiert. Es wurden hierfür durch Pronukleusinjektion eines Transgens Mäuse mit CRK Überexpression im Skelettmuskel erzeugt (Punkt 3.6.1.). Außerdem wurde ein skelettmuskelspezifisches Cre-abhängiges Aktivatorsystem zur Aktivierung des endogenen *Crk* Locus verwendet (Punkt 3.6.2.).

#### 3.6.1. Validierung transgener Mäuse mit CRK Überexpression im Skelettmuskel

Zur Erzeugung von CRK-überexprimierenden Tieren, wurde ein *Crk*-Transgen via Pronukleusinjektion in murine Zygoten eingebracht. Zur skelettmuskelspezifischen Expression wurde das *Crk*-Transgen unter die Kontrolle eines HSA-Promoters (*Human skeletal actin*) gestellt<sup>127</sup>. Um hierbei eine *miR-1/206/133*-vermittelte Repression zu vermeiden wurde die 3'UTR mit den enthaltenen microRNA Bindesequenzen in das Konstrukt nicht inkludiert. Die resultierenden Tiere (*Crk-tg*) wurden im Stadium E18.5 per Kaiserschnitt gewonnen, genotypisiert (Abb. 5.6., Anhang) und analysiert. Von insgesamt 61 Tieren, konnten 16 % der Tiere als Transgen-positiv identifiziert werden (Abb. 3.6.1.1.a). Bei diesen Tieren lag eine Integration des Transgens in das Mausgenom vor. Zur Validierung der CRK Überexpression im Skelettmuskel, wurden alle positiv genotypisierten *Crk-tg* Tiere auf eine verstärkte CRK-Expression mittels Western Blot getestet. Hierbei zeigten alle *Crk-tg* Tiere eine im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern signifikant gesteigerte CRK Expression im Quadriceps Muskel (Abb. 3.6.1.1.b-c). Somit konnte die Funktionalität dieses CRK Überexpressionsmodell für nachfolgende Analysen (siehe Punkt 3.6.3.) im Stadium E18.5 validiert werden.





**Abbildung 3.6.1.1.: Validierung des Transgen-basierten Mausmodells zur CRK-Überexpression *in vivo*.** **a** Schematische Darstellung des verwendeten CRK-Transgens zur skelettmuskelspezifischen CRK-Überexpression durch einen HSA-Promotor (*human  $\alpha$ -skeletal actin*). Pronukleusinjektion. 16 % der nach erfolgten Pronukleusinjektion erhaltenen Tiere waren Transgen-positiv (Crk-tg) dargestellt in grün (wt = Wurfgeschwister; n = 51/10 [E18.5]) BGI= Betaglobin Intron. **b-c** Western Blot-Analyse zur Bestimmung der CRK-Proteinmenge in Quadriceps-Muskeln von Transgen-positiven Crk-tg Tieren. RALA diente als Ladekontrolle (n = 6/9, wt = Wurfgeschwister, Mann-Whitney U Test, zweiseitig, \*\*\*p = 0,0004 [E18.5]).

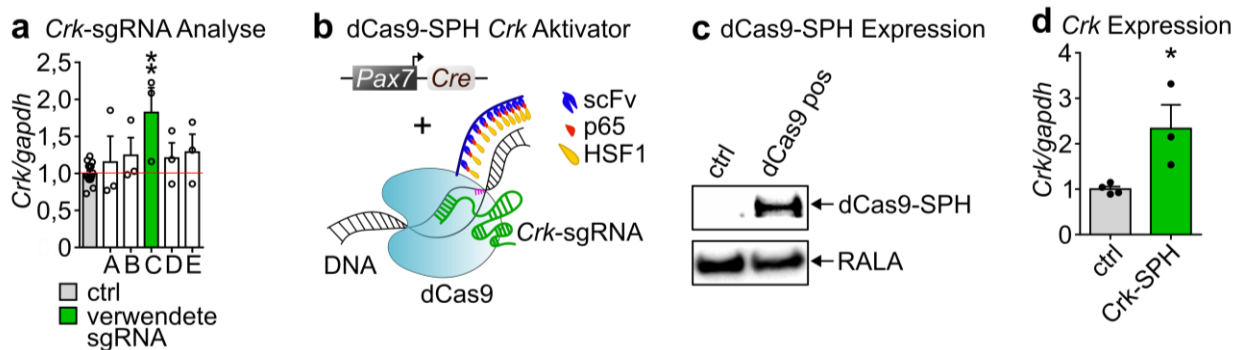
### 3.6.2. Validierung des skelettmuskelspezifischen Cre-abhängigen Aktivatorsystems zur Aktivierung des endogenen *Crk* Lokus *in vivo*

Zur Überprüfung, ob die verminderte *Crk* Regulation durch *miR-1/206/133* im Skelettmuskel in tKO Tieren tatsächlich den primären Grund für den beobachteten NMJ-Phänotyp darstellt, wurde zusätzlich ein zweites, unabhängiges Mausmodell mit *Crk* Überexpression generiert. Des Weiteren, sollte mit diesem zweiten Mausmodell die zu erwartende neonatale Letalität der Crk-tg Foundertiere umgangen werden. So könnten durch gezielte Verpaarungen immer neue Tiere mit stabiler CRK-Überexpression erzeugt werden. Zur Generierung dieser Mauslinie wurde das *dCas9-SPH* basierte System<sup>132</sup> zur Aktivierung des endogenen *Crk* Lokus unter der Kontrolle einer skelettmuskelspezifischen Cre-Rekombinase verwendet.

Um eine gesteigerte Expression von CRK im Skelettmuskel zu erreichen, wurden für die TSS (*Transcription start site*) von *Crk*, spezifische sgRNAs (*Single guide RNAs*) designt. Um die Funktionalität dieser sgRNAs für den späteren Einsatz *in vivo* zu validieren, wurden diese zunächst mit dem dCAS9-VPR Aktivatorsystem<sup>159</sup> mit Muskelzellen *in vitro* getestet. Hierzu wurden die jeweiligen sgRNA unter der Kontrolle eines *U6* Promotors und dem dCAS9-VPR Vektor in C2 Zellen Co-transfiziert. Die Analyse des *Crk* Levels erfolgte mittels quantitativer RT-PCR. Anhand der Höhe des *Crk* Expressionslevels wurde die Effektivität der jeweiligen sgRNAs beurteilt. Es wurden fünf (A-E) verschiedene *Crk*-spezifische sgRNAs ausgetestet. Als Kontrolle dienten Transfektionen von unabhängigen Kontroll-sgRNAs. In drei voneinander unabhängigen Analysen, zeigte der Einsatz von sgRNA C als einzige zuverlässig ein signifikant erhöhtes Expressionslevel von *Crk* (Abb. 3.6.2.1. a).



Die selektierte sgRNA wurde zur Generierung von transgenen, sgRNA C exprimierenden Mäusen verwendet. Durch Kreuzung dieser Mäuse mit Tieren, die positiv für das Cre-Rekombinase abhängige *CAG-LSL-dCas9-SPH* Aktivatorsystem<sup>132</sup> und für die *Pax7-Cre*<sup>125</sup> waren, konnten *sgRNA<sup>+/-</sup>//Pax7-Cre<sup>+/-</sup>//CAG-LSL-dCas9-SPH<sup>+/-</sup>* positive Mäuse gewonnen werden (Abb. 3.6.2.1. b; Abb. 5.7., Anhang). Diese Tiere werden im Folgenden als Crk-SPH bezeichnet. Die aus gezielten Verpaarungen resultierenden Crk-SPH-Tiere, wurden im Stadium E18.5 auf die Expression des *dCas9-SPH* Systems in der Muskulatur und auf eine vorhandene *Crk* Lokus Aktivierung hin getestet. Mittels Western Blot konnte eine spezifische Expression von *dCas9-SPH* in der Muskulatur von positiv genotypisierten Tieren nachgewiesen werden (Abb. 3.6.2.1. c). Mittels quantitativer RT-PCR konnte ebenfalls eine signifikant erhöhte Expression von *Crk* in der Muskulatur von Crk-SPH Tieren nachgewiesen werden (Abb. 3.6.2.1. d). Somit konnte die Funktionalität dieses skelettmuskelspezifischen Cre-abhängigen Systems zur Aktivierung des endogenen *Crk* Lokus *in vivo* für nachfolgende Analysen (siehe Punkt 3.6.3.) validiert werden.



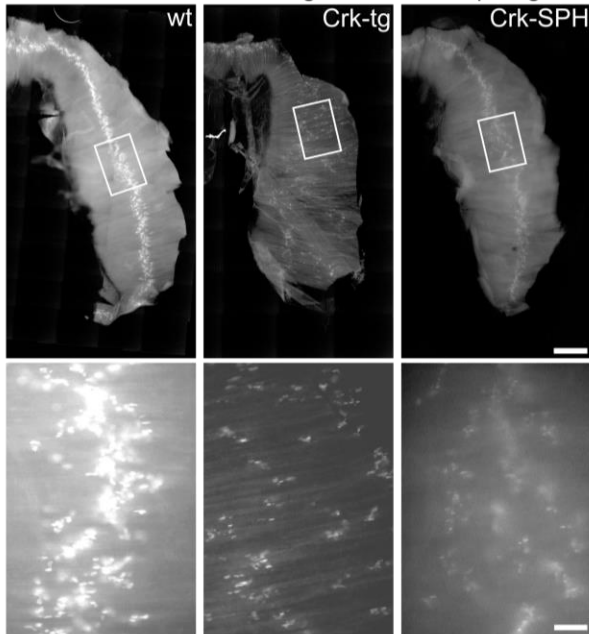
**Abbildung 3.6.2.1.: Validierung des Crk-SPH Mausmodells zur Crk Überexpression *in vivo*.** **a** Taqman Assay basierte Expressionsanalyse von *Crk* nach Co-Transfektionen des SPH-dCas9-VPR64 Vektors und *Crk* spezifischer sgRNAs (A-E) zur selektiven Aktivierung des *Crk* Lokus in C2 Zellen. Die selektierte sgRNA C wurde für weitere Analysen verwendet, dargestellt in grün (ctrl = Transfektionen von unabhängigen Kontroll-sgRNAs n = 15, sgRNAs A-E wurden in voneinander unabhängigen Transfektionen getestet n = 3, Mann-Whitney U Test, einseitig, \*\*p = 0,0049). **b** Schematische Darstellung des Pax7-Cre-abhängigen *dCas9-SPH* Aktivierungssystems mit selektierter sgRNA C. Das SPH-System kombiniert das scFv-Fragment (blau) des SunTag-Systems mit dem p65-HSF1 des SAM-Systems (rot, gelb)<sup>132</sup>. **c** Western Blot Analyse zeigt Pax7-Cre-abhängige *dCas9-SPH* Expression exklusiv in Quadriceps-Muskel Lysaten von *Pax7-Cre<sup>+/-</sup>//CAG-LSL-dCas9-SPH<sup>+/-</sup>* Mäusen (*dCas9<sup>+/-</sup>*) im Stadium E18.5. RALA diente als Ladekontrolle. **d** Taqman Assay basierte Analyse der *Crk* Expression in Quadriceps-Muskeln unter Verwendung des Pax7-Cre abhängigen *dCas9-SPH* Aktivierungssystems mit der zuvor selektierten sgRNA C (ctrl = *sgRNA<sup>+/-</sup>* Wurfgeschwister; n = 4/3, Mann-Whitney U Test, einseitig, \*p < 0,03 [E18.5])

### 3.6.3. Skelettmuskelspezifische Überexpression von CRK rekapituliert den *miR-1/206/133* Knock-out Phänotyp *in vivo*

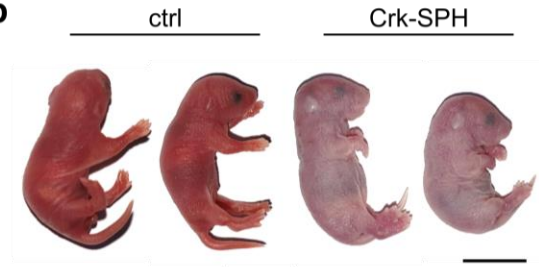
Zur Überprüfung, ob ein gesteigertes *Crk* Level im Skelettmuskel einem dem tKO ähnlichen Phänotyp hervorruft (Phänokopie), wurden die zwei zuvor validierten CRK-Überexpressions-Mausmodelle (siehe Punkt 3.6.1. und 3.6.2.) in Bezug auf NMJ-assoziierte Störungen hin untersucht. Zunächst wurde die Verteilung der AChR-Cluster auf dem Diaphragma mittels *whole-mount* BTX-Färbung im Stadium E18.5 beurteilt. Im Vergleich zur wildtypischen Kontrolle wiesen Tiere beider CRK Überexpressionsmodelle, *Crk-tg* und *Crk-SPH* positive Tiere, eine gestörte Verteilung der postsynaptischen AChR-Cluster auf (Abb. 3.6.3.1. a). Des Weiteren konnte ein vorzeitiges neonatales Versterben der *Crk-SPH* Tiere im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern innerhalb von drei Wochen (P21) nach der Geburt nachgewiesen werden (Abb. 3.6.3.1. b-c; Tabelle 26, Anhang). Es zeigten sich jedoch keine Unterschiede in der generellen Morphologie oder im Körpergewicht im Vergleich zu Wurfgeschwistern (Abb. 3.6.3.1. b, d). *Crk-SPH* positive Tiere erschienen einige Minuten nach dem Kaiserschnitt jedoch zyanotisch. Um den NMJ-Phänotyp der CRK-überexprimierenden Tiere im Detail zu analysieren und mit tKO Tieren vergleichen zu können, wurde die postsynaptische Fläche in der paraspinalen Muskulatur quantifiziert. *Crk-tg* Tiere wiesen im Stadium E18.5, wie auch tKO-Tiere, neben der auffallend erhöhten motorischen Endplattenbandbreite, eine signifikante Reduktion der postsynaptischen Fläche auf (Abb. 3.6.3.1. e). Zur molekularen Analyse von Tieren mit erhöhtem CRK Level in der Skelettmuskulatur, wurden Transkriptomdaten von *Crk-tg* und Wurfgeschwistern im Stadium E18.5 erhoben. Zur vergleichenden Untersuchung dieser Tiere wurde eine GSEA durchgeführt. Hierbei wiesen *Crk-tg* Tiere eine signifikante Anreicherung von Gensets auf, die mit Synapsenbildung und -funktion assoziiert waren (Abb. 3.6.3.1. f-g). Zusammenfassend konnte durch CRK Überexpression in zwei voneinander unabhängigen Mausmodellen der in *miR-1/206/133* defizienten Tieren festgestellte NMJ-Phänotyp *in vivo* rekapituliert werden (vergl. Punkt 3.4.).

**Abbildung 3.6.3.1.: Phänotypische Analyse nach skelettmuskelspezifischer CRK Überexpression *in vivo*.** **a** *Whole-mount* Bungarotoxin (BTX) Färbung von Hemi-Diaphragmen von wildtypischen (wt) im Vergleich zu CRK-Überexprimierenden *Crk-tg* und *Crk-SPH* (Skala= 600 µm obere Reihe/100 µm untere Reihe [E18.5]). **b** Vergleich der äußeren Morphologie von *Crk-SPH* und Wurfgeschwistern (ctrl) nach durchgeführtem Kaiserschnitt. Die *Crk-SPH* Tiere erscheinen zyanotisch (Skala= 1 cm). **c** Abundanz von *Crk-SPH* positiven Tieren am postnatalen Tag 21 (P21) nach entsprechenden Verpaarungen (Wahrscheinlichkeit für *Crk-SPH* positive Tiere 12.5 %). Analyse der *Crk-SPH* Genotypabundanz zeigte keine überlebenden Tiere an P21 nach der Geburt (n = 38/0; ctrl= Wurfgeschwister). **d** Vergleichende Analyse des Körpergewichts (n = 5/6, ctrl = *sgRNA*<sup>+/+</sup> Wurfgeschwister, Mann-Whitney U Test, einseitig, ns = nicht signifikant [E18.5]). **e** Quantifizierung der durchschnittlichen postsynaptischen Fläche in paraspinalen transversalen Muskelschnitten von Wildtypen und *Crk-tg* Tieren (n= 3/3, wt = Wurfgeschwister, Mann-Whitney U Test, einseitig, \*p = 0,05 [E18.5]). **f-g** Anreicherung von NMJ-Formation-assoziierten Gensets in Transkriptomdaten-basierter GSEA von wt (blau) und *Crk-tg* Tieren (rot) Quadriceps Muskeln (n= 3/3, wt= Wurfgeschwister, ES= *Enrichment Score*, NOM= normalisierter p-Wert [E18.5]). Abbildung 3.6.3.1. befindet sich auf der nachfolgenden Seite.

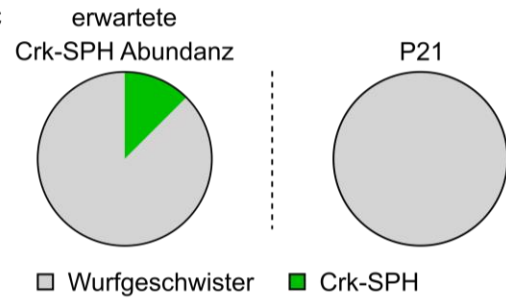
**a** Whole mount BTX-Färbung von Hemi-Diaphragmen



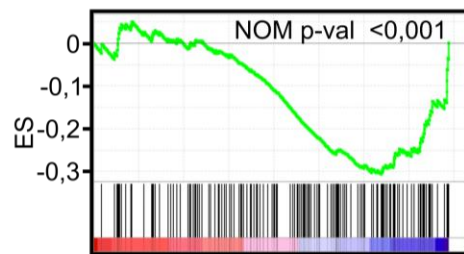
**b**



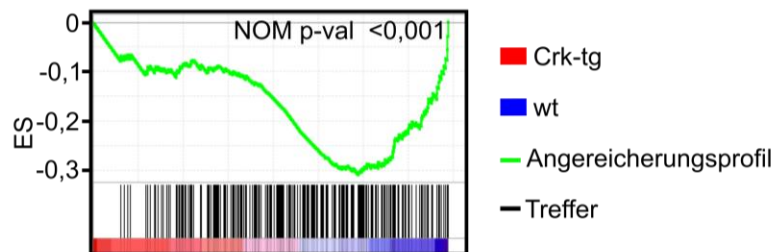
**c**



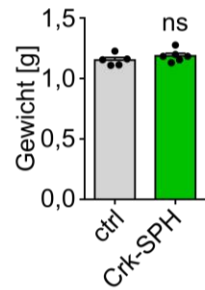
**f** GO Genset: *Synapse assembly* (M16902)



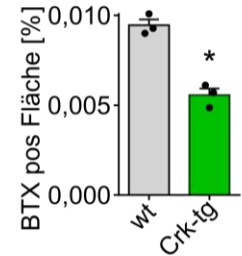
**g** GO Genset: *Neurotransmitter transport* (0006836)



**d** Körpergewicht



**e** Postsynaptische Fläche



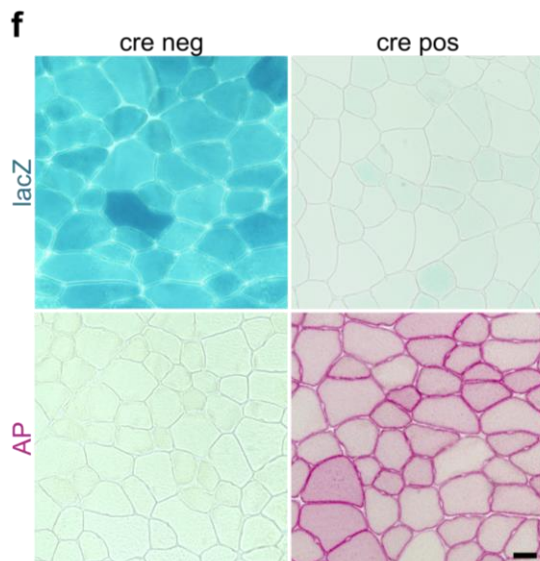
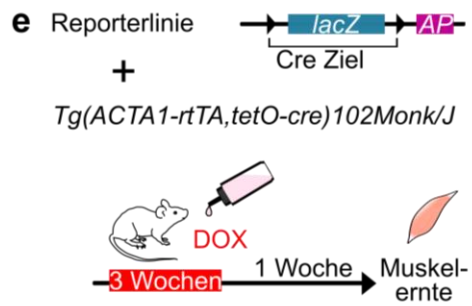
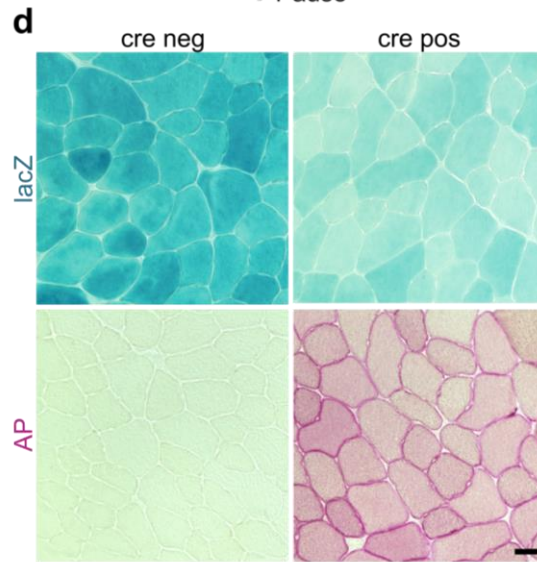
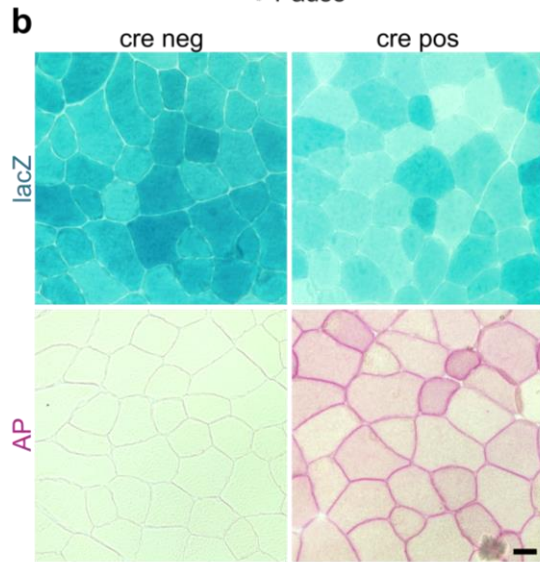
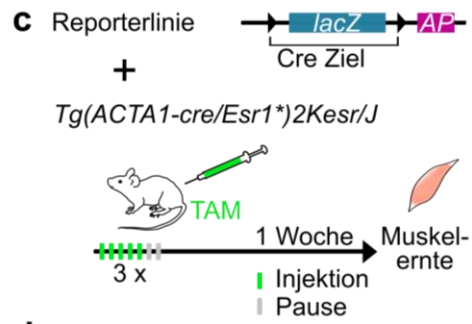
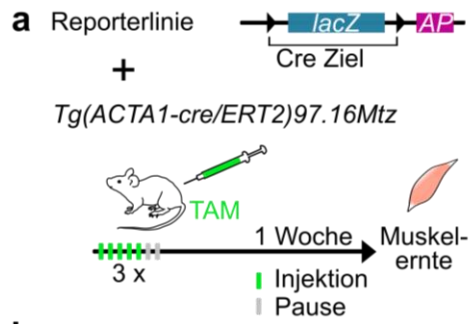
### 3.7. *miR-1/206/133* Defizienz im adulten Skelettmuskel führt zur gestörten NMJ-Homöostase

Da *miR-1/206/133* defiziente tKO Tiere einen neonatal letalen Phänotyp aufweisen, konnte bisher noch nie die Funktion dieser microRNAs in der adulten Skelettmuskulatur analysiert werden. Um dies erstmals zu ermöglichen, wurde ein induzierbares *loss of function* Mausmodell generiert. Das entwickelte *miR-1/206/133* Knock-out Mausmodell wurde zunächst funktionell validiert und anschließend morphologisch, histologisch, sowie molekularbiologisch analysiert. Tiere dieses *miR-1/206/133* Funktionsverlust-Modells wurden im Folgenden als adulte tKO bezeichnet.

#### 3.7.1. Etablierung eines induzierbaren, skelettmuskelspezifischen *miR-1/206/133* Knock-out Mausmodells

Um die Funktion der *miR-1/206/133* Cluster in der Muskulatur von adulten Mäusen untersuchen zu können, wurde eine Liganden-aktivierbare, induzierbare Cre-Rekombinase verwendet. Es wurden zunächst mehrere induzierbare skelettmuskelspezifische Cre-Mauslinien<sup>127-129</sup> zur Feststellung der Cre-Rekombinase-Effektivität mit einem Doppelreporter<sup>130</sup> gekreuzt und getestet. In allen Cre-Rekombinase-Linien erfolgte die Expression unter der Kontrolle des skelettmuskelspezifischen HSA-Promotors. Die Induktion der Cre-Expression erfolgte in den drei getesteten Cre-Rekombinase-Linien für drei Wochen. Nach einer weiteren Woche wurden die Muskeln der behandelten Tiere präpariert und Kryoschnitte angefertigt. Anschließend wurde eine LacZ- und AP-Färbung vorgenommen (Abb.3.7.1.1. a-f). Die Effektivität der jeweiligen verwendeten Cre-Rekombinase-Mauslinie konnte anhand der Färbeintensität der AP-Färbung beziehungsweise an einer Reduktion der LacZ-Färbung beurteilt werden. Eine unvollständige Cre-vermittelte Rekombination lag bei einer gleichzeitigen LacZ- und AP-Färbung vor. Nach erfolgter Analyse zeigte sich, dass die Doxycyclin-induzierbare Cre-Rekombinase *Tg(ACTA1-rt,tetO-cre)102Monk/J*<sup>128</sup> die effizienteste der getesteten induzierbaren Cre-Rekombinase-Mauslinien darstellte. Sie wurde zur Generierung des induzierbaren *miR-1/206/133* Knock-out Mausmodells (adult tKO) verwendet (Abb.3.7.1.1. e-f).

**Abbildung 3.7.1.1.: Effizienz verschiedener induzierbarer Cre-Recombinasesysteme in adulten Muskelfasern. a-f** Kombination des ZAP-Doppelreporters<sup>130</sup> mit unterschiedlicher Liganden-aktivierbarer Cre-Rekombinase<sup>127-129</sup> zur Feststellung der Cre-Effektivität. **a, c, e** Schematische Darstellung der Behandlung der Tiere zur Induktion der Cre-induzierten Deletion von LacZ bis zur Muskelelekte. Applikation von Tamoxifen (grüne Rechtecke = Injektionstag) erfolgte via intraperitonealer Injektion und Doxycyclin-Behandlung (rot) erfolgte über das Trinkwasser. **b, d, f**  $\beta$ -Galactosidase- alkalische Phosphatase (LacZ- AP) Färbung von TA-Muskelquerschnitten von Cre-Rekombinase positiven Tieren (cre pos) und Kontrolltieren (cre neg) mit *ZAP*<sup>+/+</sup>, Skala = 50  $\mu$ m. Abbildung 3.7.1.1. befindet sich auf der nachfolgenden Seite.



### 3.7.2. Molekulare und physiologische Untersuchung adulter *miR-1/206/133* Knock-out Mäuse

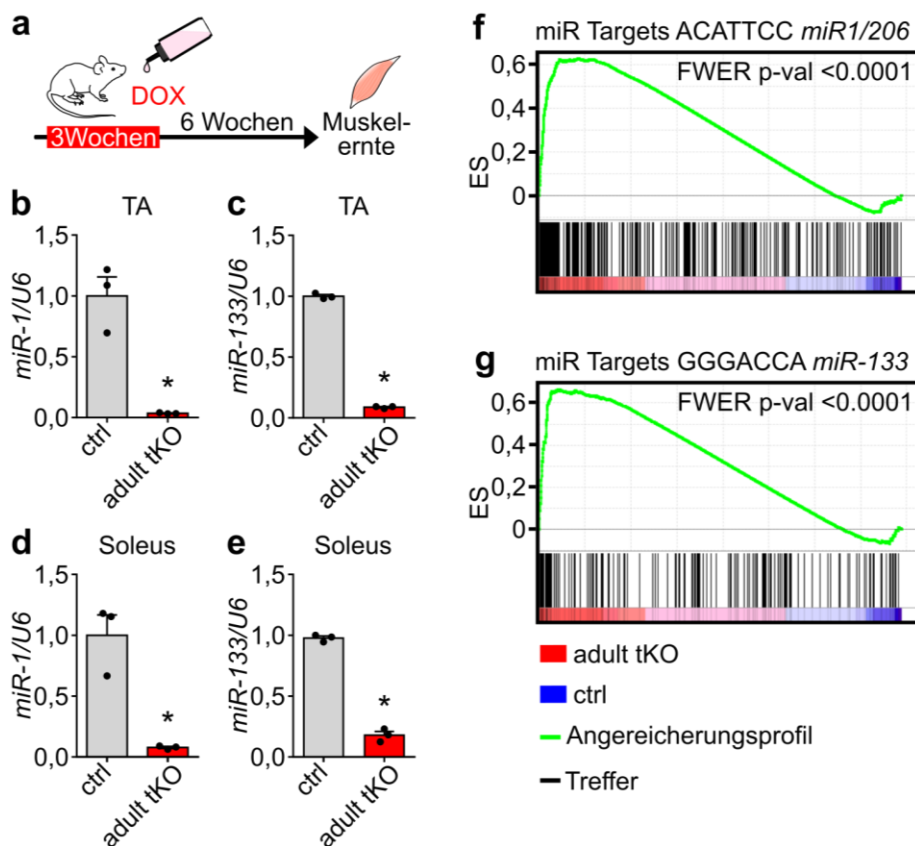
Nachdem die Effektivität der *Tg(ACTA1-rt,tetO-cre)102Monk/J (HSA-rtTA-TRE-Cre)* Mauslinie durch Verpaarung zur ZAP-Reportermauslinie validiert werden konnte (siehe Punkt 3.7.1.), wurden *miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>//miR-206/133b<sup>-/-</sup>* Tiere, mit Tieren dieser Doxycyclin-induzierbaren Linie gekreuzt. Durch diese Kreuzung wurden adulte tKO Tiere (*miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>//miR-206/133b<sup>-/-</sup>//HSA-rtTA-TRE-Cre<sup>+/-</sup>*) generiert. Die Verwendung dieser induzierbaren Cre-Rekombinase ermöglichte neben der gewebespezifischen Deletion von *miR-1/206/133* zusätzlich eine temporäre Kontrolle der Deletion.

Zur Induktion der skelettmuskelspezifischen Deletion des *miR-1-2/133a-1* Clusters wurde für drei Wochen Doxycyclin über Trinkwasser verabreicht. Nach einer sechswöchigen Karenzzeit wurden TA- und Soleus-Muskeln isoliert (Abb. 3.7.2.1. a). Diese Karenzzeit wurde gewählt, da es sich laut Literatur bei microRNAs um stabile und im Falle von *miR-1/206/133* um äußerst abundante microRNAs in der Muskulatur handelt <sup>4</sup>. In diesem Zeitfenster sollten bereits transkribierte microRNAs abgebaut werden. Mittels quantitativer RT-PCR wurde dies überprüft. Es konnte nach neun Wochen nach Versuchs Beginn eine signifikante Reduktion in TA (~96 % Reduktion) und Soleus (~92 % Reduktion) von *miR-1* festgestellt werden (Abb. 3.7.2.1. b-d). Ebenfalls *miR-133* zeigte eine signifikante Reduktion in getesteten beiden Muskeln (TA ~91 % Reduktion, Soleus ~82 % Reduktion; Abb. 3.7.2.1. c-e). Anhand dieser Daten konnte die Effizienz der generierten adulten tKO Mauslinie validiert werden. Es zeigten sich zunächst jedoch zu diesem Zeitpunkt keine phänotypische Veränderung der adulten tKO Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren (Abb. 5.8. a, Anhang).

Da neun Wochen nach Induktionbeginn zwar eine signifikante Reduktion des miR-Levels festgestellt, jedoch keine Aussage über langfristigen Effekte des *miR-1/206/133* Verlustes getroffen werden konnten, wurde der Analysezeitraum verlängert. Hierfür wurden Kontrolltiere (*miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>//miR-206/133b<sup>-/-</sup>//HSA-rtTA-TRE-Cre<sup>+/-</sup>*) und adulte tKO Tiere im Alter von acht bis 10 Wochen zunächst initial für drei Wochen mit Doxycyclin behandelt. Nach einer Karenzzeit von sechs Wochen, erfolgte eine erneute, einwöchige Doxycyclin-Behandlung, um sicherzustellen, dass neu mit Muskelfasern fusionierende Nuklei ebenfalls rekombiniert wurden. Diese Behandlung wurde für etwa 24 Wochen vorgenommen (Abb. 5.8. a, Anhang). Nach insgesamt etwa 31 Wochen Versuchslaufzeit, zeigte sich im adulten tKO eine signifikante Abnahme des Körpergewichtes (Abb. 5.8. a, b, Anhang). Zur genaueren Analyse wurde das Gewichtes von unterschiedlichen Muskeln (Quadriceps- und TA-Muskel) überprüft und eine signifikante Reduktion festgestellt (Abb. 5.8. g, f, Anhang). Währenddessen zeigten sich keine statistischen Unterschiede in der Tibiallänge, weshalb von einer vergleichbaren Körpergröße ausgegangen werden kann (Abb. 5.8. c, Anhang). Somit scheint der Grund für die Körpergewichtsreduktion in adulten tKO Tieren eine Verminderung des Skelettmuskelgewichtes zu



sein. Da aus der Literatur bereits bekannt ist, dass der Verlust von *miR-1/133a* in der adulten Skelettmuskulatur (dKO) zu einem Phänotyp mit funktionalen und morphologischen Veränderungen von Mitochondrien führt <sup>4</sup>, wurde eine H&E- und eine SDH-Färbung zur histologische Analyse durchgeführt (Abb. 5.8. g, f, Anhang). Mittels H&E-Färbung konnten zunächst keine offenkundigen Unterschiede in der Morphologie der querangeschnittenen Muskelfasern festgestellt werden. Die SDH-Färbung hingegen zeigte im Kontrast zur Kontrolle, wie bereits in adulten dKO-Tieren beobachtet, dass die Verteilung des mitochondrialen Netzwerkes in den angeschnittenen Fasern auch in adulten tKO-Tieren gestört war (Abb. 5.8. g, f, Anhang). Somit rekapitulierten adulte tKO Tiere den bei adulten dKO Tieren bereits bekannten Phänotyp auf histologische Ebene. Um festzustellen ob dies ebenso auf molekularer Ebene der Fall war, wurden Transkriptomdaten von adulten tKO- und Kontroll-Tieren generiert. Es wurde die Expression des im adulten dKO hochregulierten miR-Targets *Mef2a* und des ebenfalls hochregulierten *Dlk1-Dio3* Megaclusters kontrolliert (Abb. 5.8. i Anhang). Es zeigte sich, dass adulte tKO Tiere, vergleichbar zum adulten dKO, eine signifikante Hochregulation des *Dlk1-Dio3* Megaclusters, sowie von *Mef2a* auf Transkriptomebene aufwiesen. Somit konnte der nach *miR-1/133a* Knock-out im adulten dKO auftretende Phänotyp auch auf molekularer Ebene für adulte tKO Tieren bestätigt werden.

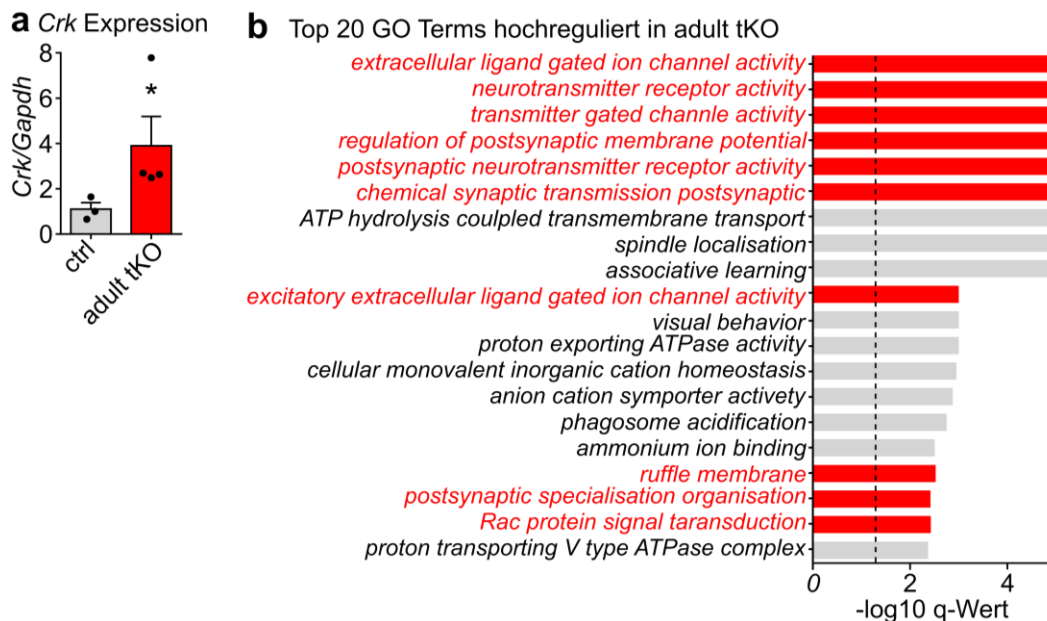


**Abbildung 3.7.2.1.: Austestung und Analyse des induzierbaren *miR-1/206/133* Knock-out Mausmodells.** **a** Schematische Darstellung der Behandlung der Tiere zur Induktion der Cre-induzierten Deletion bis zur Muskelernste. Die Applikation von Doxycyclin (DOX, rot) erfolgte über das Trinkwasser. **b-e** Analyse der Deletion von *miR-1/133* im adulten Muskel nach erfolgter Doxycyclin-Applikation von *miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-206/133b<sup>-/-</sup>//HSA-rtTA-TRE-Cre<sup>+/-</sup>* Tieren. Taqman Assay basierte Analyse der *miR-1* (**b, d**) und der *miR-133* (**c, e**) in TA- (**b, c**) und Soleus-Muskeln (**d, e**) von Kontrolltieren und adult tKO-Mäusen (n = 3/3, ctrl = *miR-1-1/133a-2<sup>+/+</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-206/133b<sup>+/+</sup>//HSA-rtTA-TRE-Cre<sup>+/+</sup>*, Mann-Whitney U Test, einseitig, \*p = 0,05 [Männchen, 15-17 Wochen alt]). **f, g** GSEA basierend auf Transkriptomdaten von *miR-1/206/133* adult tKO (rot) und ctrl (blau) TA-Muskeln zeigt eine Anreicherung von vorhergesagten *miR-1/206* (**f**) und *miR-133* Zielgenen (**g**) in adult tKO (n = 2/3, ctrl = *miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-206/133b<sup>-/-</sup>//HSA-rtTA-TRE-Cre<sup>+/+</sup>* [Männchen, ~44 Wochen alt]). ES= Enrichment Score, FWER= Familywise-error rate p-Wert.

Um weitere molekulare Veränderungen nach *miR-1/206/133* Verlust im adulten tKO zu adressieren zu können, wurde eine auf den Transkriptomdaten-basierende GSEA von adulten tKOs durchgeführt. Hierbei konnten Unterschiede in der posttranskriptionellen Genregulation *miR-1/206/133* Zielgenen festgestellt werden. Es zeigte sich, dass der vollständige Verlust aller miR-Cluster im adult tKO zur verstärkten Expression vorhergesagter *miR-1/206/133* Zielgene<sup>146</sup> führt. Es konnte eine hochgradig signifikante Anreicherung potentieller *miR-1/206* und *miR-133* Zielgene im adulten tKO, ähnlich zu neonatalen tKO Tieren identifiziert werden (Abb. 3.1.3 d, e; Abb. 3.7.2.1. f-g). Um in diesem Kontext festzustellen ob der Verlust von *miR-1/06/133* im adulten Skelettmuskel einen ähnlichen Einfluss auf das Expressionslevel des zuvor identifizierten *miR-1/206/133* Targets *Crk* besitzt, wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Es zeigte sich ebenfalls eine signifikante Erhöhung des *Crk* Expressionslevels in der Skelettmuskulatur adulter tKO Tiere, analog zu neonatalen tKO Tieren (Abb. 3.7.2.2. a). Des Weiteren konnten in den GSEA Daten im adulten tKO innerhalb der Top 20 hochregulierten GO Terms zahlreiche signifikant angereicherte Gensets mit einer Assoziation zur postsynaptischen NMJ-Region und der Signaltransduktion der kleinen GTPase RAC festgestellt werden (Abb. 3.7.2.2. b).

**Abbildung 3.7.2.2.: Molekulare Analyse nach *miR-1/206/133* Verlust im adulten Skelettmuskel.** **a** Taqman Assay basierte Analyse der CRK-Expression im adult tKO (rot) im Vergleich zur Kontrolltieren (n= 3/4, ctrl = *miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-206/133b<sup>-/-</sup>//HSA-rtTA-TRE-Cre<sup>+/+</sup>* [Männchen und Weibchen, ~44 Wochen alt]). **b** Auf Transkriptomdaten basierte Analyse der Top 20 deregulierten Gensets einer GSEA von *miR-1/206/133* adult tKO TA-Muskeln zeigt eine Anreicherung von NMJ-assoziierten Prozessen und einen Anstieg von RAC-Signaltransduktion in adult tKO in Rot (n = 2/3, ctrl = *miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-206/133b<sup>-/-</sup>//HSA-rtTA-TRE-Cre<sup>+/+</sup>*, Balken von Gensets > gestrichelte Linie = signifikant verändert (>0,05) [Männchen, ~44 Wochen alt]). Abbildung 3.7.2.2. befindet sich auf der nachfolgenden Seite.



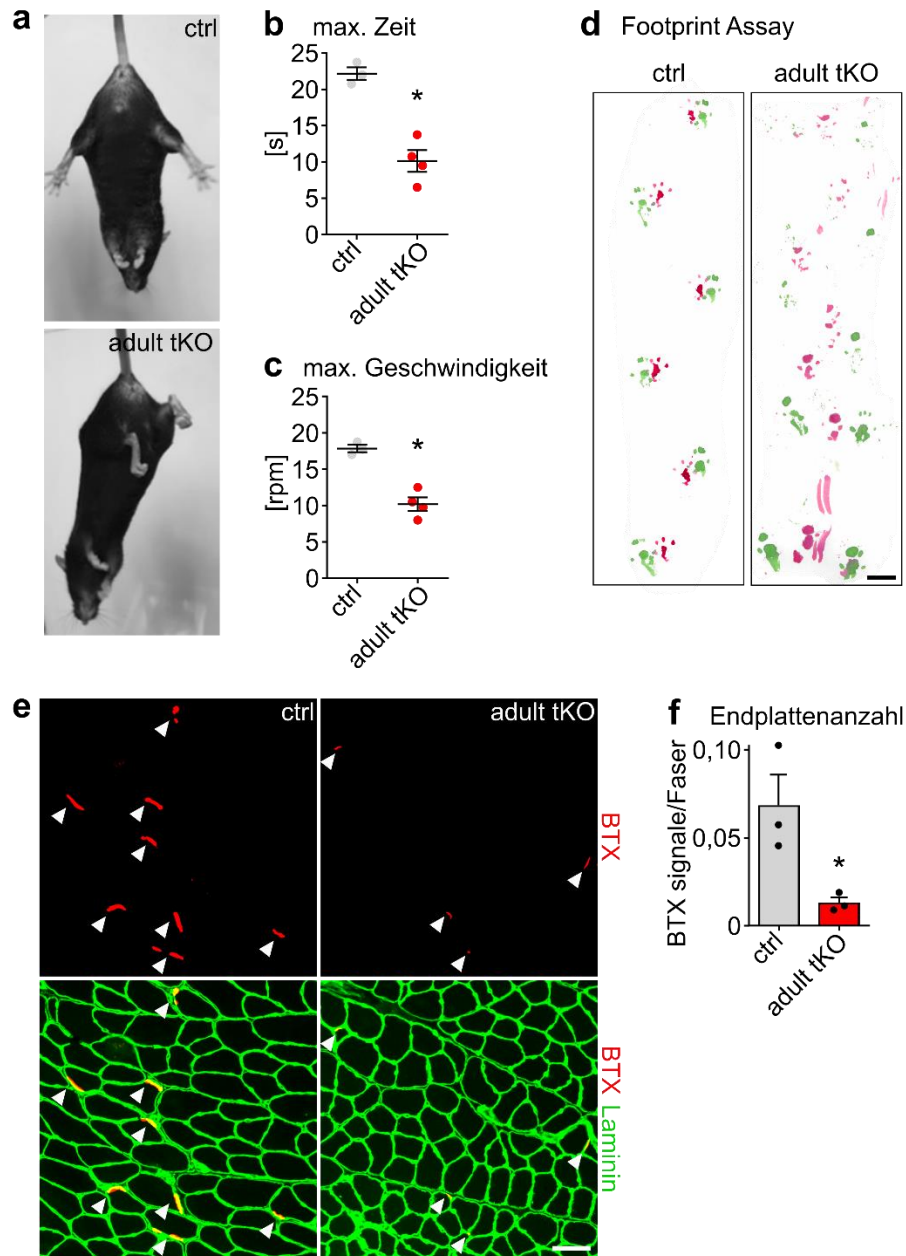


Da sowohl eine erhöhte Expression des *miR-1/206/133* Zielgens *Crk*, als auch eine signifikante Anreicherung von GSEA-Gensets mit NMJ- Assoziation im adulten tKO vorlag, sollte mittels verschiedener Analysen neuromuskulären Beeinträchtigungen auf physiologischer Ebene beurteilt werden. Zur grundsätzlichen Einschätzung von motorischen Auffälligkeiten wurde eine gängige Untersuchung durchgeführt, bei der die Tiere am Schwanz angehoben und ihr Verhalten beobachtet wurde<sup>160, 161</sup>. Adulte tKO Tiere zeigten 28 Wochen nach Versuchsbeginn hierbei ein abnormales Klammern der Hinterfüße (Abb. 3.7.2.3. a). Um unmittelbar die motorische Leistung und Koordinationsfähigkeit der Tiere testen zu können, wurden ebenfalls Rotarod Tests und Footprint Assays durchgeführt<sup>135, 162</sup>. Die Rotarod Experimente zeigten bei adulten tKO Tieren im Vergleich zu Kontrollen eine signifikante Reduktion der Verweildauer auf dem rotierenden Stab. Es konnte ebenfalls eine signifikante Reduktion der Geschwindigkeit bis zum Herunterfallen detektiert werden (Abb. 3.7.2.3. b-c). Der durchgeführte Footprint Assay zeigte in Übereinstimmung mit den erhobenen Rotarod Daten ebenso Anzeichen für eine verminderte motorische Leistung, in Form einer massiv gestörten Gangart der adulten tKO Tiere.

Bei gleichaltrigen dKO Tieren konnten im Kontrast hierzu weder in Rotarod-Tests, noch im Footprint Assay motorischen Ausfälle festgestellt werden (Abb. 5.9., Anhang). Ausschließlich adulte tKO Tiere mit einem vollständigen Verlust aller *miR-1/206/133* Cluster im Skelettmuskel wiesen die beschriebenen motorischen Ausfallerscheinungen auf. Nach dem die vorangegangene physiologische Beurteilung der NMJ-Funktion auf massive motorische Defizite hindeutete, sollte die Skelettmuskulatur von adulten tKO Tiere mittels histologischer Analyse der neuromuskulären

Region untersucht werden. Hierfür wurden transversale Schnitte des TA-Muskels mit BTX und Laminin gefärbt und motorische Endplatten- Anzahl quantifiziert. Die statistische Auswertung dieser Quantifizierung ergab, eine signifikante Reduktion der motorischen Endplatten pro Faser im Vergleich zu Kontrollgruppe (Abb. 3.7.2.3. e-f).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die *miR-1/206/133* Expression nicht nur einen kritischen Faktor in der Entstehung der neuromuskulären Synapse darstellt, sondern auch eine wichtige, möglicherweise analoge Funktion in der Homöostase der NMJ durch *Crk* Regulation im adulten Muskel hat.



**Abbildung 3.7.2.3.: Physiologische und histologische Analyse nach *miR-1/206/133* Verlust im adulten Skelettmuskel. a** Kontroll- und adult tKO Tiere nachdem sie durch Halten des Schwanzes hochgehoben wurden (ctrl = *miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-206/133b<sup>-/-</sup>//HSA-rtTA-TRE-Cre<sup>+/+</sup>* [~44 Wochen alt]). **b-c** Rotarod-Assay und Footprint Assay mit Kontroll- und adult tKO Tieren (n= 3/4, ctrl = *miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-206/133b<sup>-/-</sup>//HSA-rtTA-TRE-Cre<sup>+/+</sup>*; Mann-Whitney U Test, einseitig, \*p < 0,05, Skala= 1 cm [Männchen und Weibchen, ~44 Wochen alt]). **e-f** Quantifizierung von BTX-markierten postsynaptischen Regionen in TA-Muskelquerschnitten (Skala = 50 µm, BTX =Bungarotoxin (n =3/3 ctrl = *miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-206/133b<sup>-/-</sup>//HSA-rtTA-TRE- Cre<sup>+/+</sup>*, Mann-Whitney U Test, einseitig, \*p = 0,05, Skala= 50 µm [Männchen, ~44 Wochen]).

### 3.8. Induzierte skelettmuskelspezifische CRK Überexpression gleicht dem *adulten miR-1/206/133* Knock-out Phänotyp

Um festzustellen ob CRK ebenfalls eine kritische Funktion in der Homöostase der NMJs in adulter Skelettmuskulatur hat, wurde ein induzierbares CRK Überexpressions-Mausmodell entwickelt. Mit diesem Modell sollte der Effekt einer gesteigerten CRK Expression unabhängig vom Knock-out von *miR-1/206/133* in der Skelettmuskulatur adressiert werden.

Dieses CRK Überexpressionsmodell basierte auf dem *dCas9-SPH* System zur Aktivierung des endogenen *Crk* Locus unter der Kontrolle einer skelettmuskelspezifischen Cre-Rekombinase. Um eine gesteigerte Expression von *Crk* zu erreichen, wurden die bereits validierte *Crk*-sgRNA-exprimierende Mauslinie (siehe Abschnitt 3.6.2.) verwendet. Diese Tiere wurden mit dem Cre-Rekombinase abhängigen *CAG-LSL-dCas9-SPH* Aktivatorsystem (*dCas9-SPH*)<sup>132</sup> kombiniert. Zur Induktion des Aktivatorsystems wurde die Doxycyclin-induzierbare, skelettmuskelspezifische *HSA-rtTA-TRE-Cre* Mauslinie eingekreuzt. Durch die Verwendung dieser induzierbaren Cre-Rekombinase wurde neben einer gewebespezifischen Expression ebenfalls eine temporäre Kontrolle der CRK Überexpression ermöglicht. Die entstandenen Tiere mit dem Genotyp *sgRNA<sup>+/-</sup>//dCas9<sup>+/-</sup>//HSA-rtTA-TRE-Cre<sup>+/-</sup>*, werden im Folgenden als adulte Crk-SPH bezeichnet.

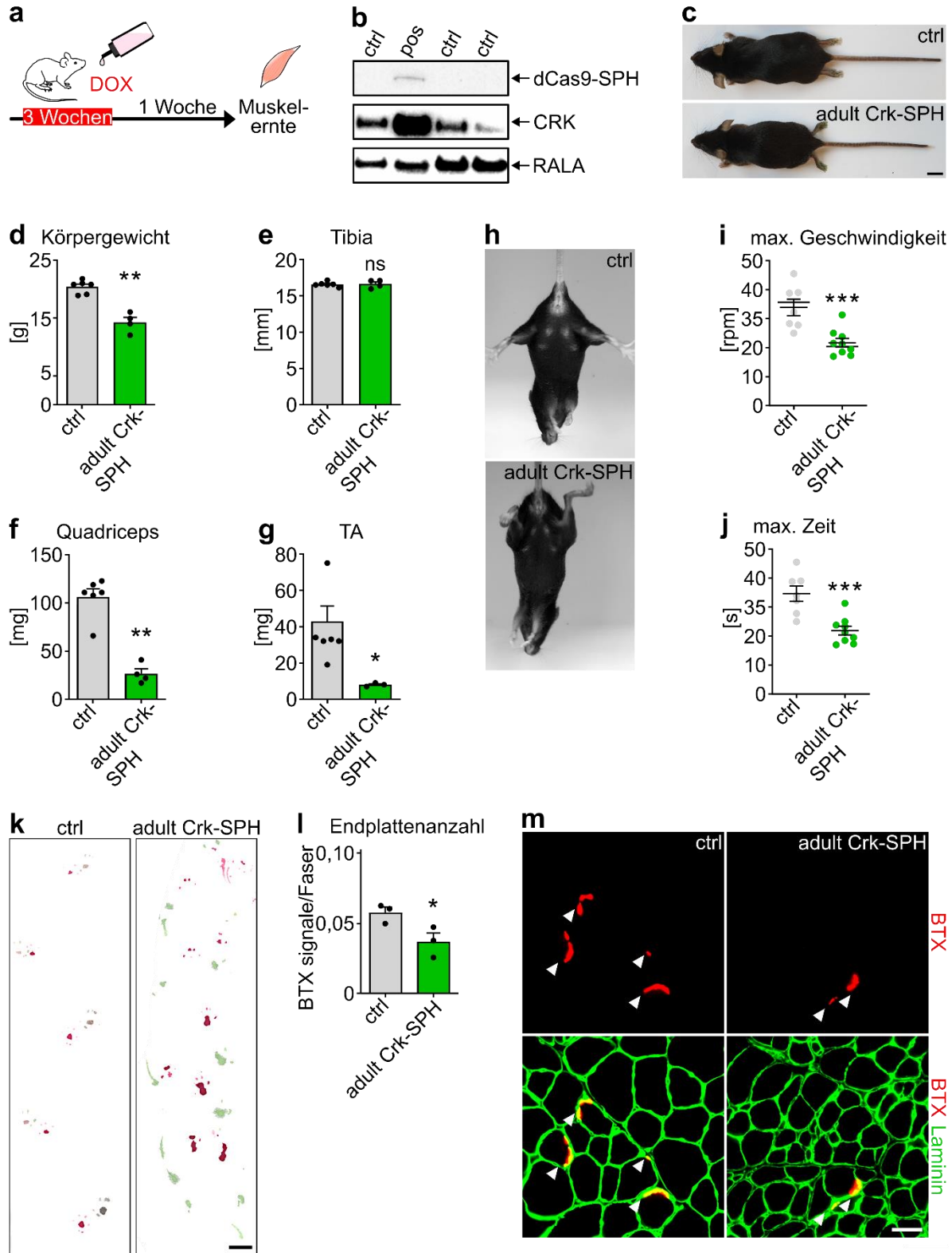
Die Induktion der Cre-Rekombinase erfolgte durch eine dreiwöchige Doxycyclin-Applikation über das Trinkwasser der Tiere. Nach einer weiteren Woche wurden die Muskeln der behandelten Tiere präpariert (Abb. 3.8.1. a). Das entwickelte Mausmodell (adult Crk-SPH) wurde zunächst funktionell validiert, anschließend morphologisch, histologisch, sowie physiologisch analysiert. Zur Validierung der Funktionalität dieses Mausmodells, wurde zunächst die Cre-Rekombinase-abhängige Expression des *dCas9-SPH* Systems getestet. Hierfür wurde eine Western Blot Analyse nach dreiwöchiger Induktion der Tiere mit Doxycyclin durchgeführt. Die Analyse des Proteinlevels zeigt eine *HSA-rtTA-TRE-Cre* abhängige Expression von *dCas9-SPH*, exklusiv in Quadriceps-Muskeln von adulten Crk-SPH Tieren im Vergleich zu ebenfalls Doxycyclin-behandelten Wurfgeschwistern. Des Weiteren konnte in der Skelettmuskulatur in adulten Crk-SPH Tieren ein gesteigertes Proteinlevel von CRK im Vergleich zum endogenen CRK Level der Wurfgeschwister verifiziert werden (Abb. 3.8.1. b).

Nach dem die Funktionalität des entwickelten Mausmodells erfolgreich getestet werden konnte, wurde mit weiterführenden physiologischen Analysen der induzierten adulten Crk-SPH Tiere begonnen. Bei der Messung des Körpergewichts der Crk-SPH Tiere, zeigte sich eine signifikante Reduktion (Abb. 3.8.1. c). Die Tibialänge diente zur Beurteilung der Körpergröße und war unverändert (Abb. 3.8.1. e). Zur genaueren Analyse der Ursache des Gewichtsverlusts, wurde das Gewicht von einzelnen Skelettmuskeln bestimmt. Es konnte eine signifikante Reduktion des Gewichtes von sowohl Quadriceps-, als auch TA-Muskel festgestellt werden (Abb. 3.8.1. c-e). Der Grund für die Verringerung des Körpergewichtes bei adulten Crk-SPH-Tieren könnte die

Reduktion des Skelettmuskelgewichtes sein. Analoges konnte zuvor in adulten tKO Tieren festgestellt werden (Abschnitt: 3.7.2; Abb. 5.9., Anhang).

Um physiologische Veränderung nach induzierter CRK-Überexpression im adulten Muskel beurteilen zu können, wurden dasselbe Testverfahren zur Analyse von motorischer Beeinträchtigungen durch neuromuskulären Störungen wie bei adulten tKO Tieren durchgeführt (Punkt 3.7.2.) Die Tiere wurden am Schwanz angehoben und ihr Verhalten beobachtet. Adulte Crk-SPH Tiere wiesen motorische Auffälligkeiten in Form von einem abnormalen Klammern der Hinterfüße auf (Abb. 3.8.1. h). Zur weiteren Beurteilung von motorischen Ausfallerscheinungen, wurden ebenfalls Rotarod Analysen und ein Footprint Assay durchgeführt. Die Rotarod Experimente zeigten eine signifikant reduzierte Verweildauer und eine reduzierte Geschwindigkeit der adulten Crk-SPH Tiere im Vergleich zu Kontrolltieren. Im durchgeführte Footprint Assay wiesen adulte Crk-SPH Tiere in Übereinstimmung mit den Rotarod Experimenten eine massiv gestörte Koordinationsfähigkeit mit erheblich beeinträchtigten Gangart auf. Es zeigten somit in beiden Testverfahren lediglich adulte Crk-SPH Tiere motorischen Ausfallerscheinungen (Abb. 3.8.1. i-k).

Nachdem die vorangegangenen Analysen eine Reduktion des Muskelgewichtes und motorische Störungen aufzeigten, sollte die Skelettmuskulatur von adulten Crk-SPH Tiere auch einer histologischen Untersuchung zur Beurteilung der NMJ-Region untersucht werden. Hierfür wurden transversale Schnitte des TA-Muskels mit BTX und Laminin gefärbt und die Anzahl motorischer Endplatten quantifiziert. Diese Analysen ergaben, dass adulte Crk-SPH Tiere eine signifikante Reduktion der BTX-gefärbten motorischen Endplatten pro Faser im Vergleich zu Kontrolltieren aufwiesen (Abb. 3.8.1. l-m). Dieses Ergebnis gleicht ebenfalls den von adulten tKO Tieren erhobenen Daten. Zusammenfassend konnte somit mittels CRK-Überexpressionsmodell der in adulten *miR-1/206/133* defizienten tKO Tieren beobachtete NMJ-Phänotyp *in vivo* rekapituliert werden.



**Abbildung 3.8.1.: Analyse des adulten Skelettmuskels nach CRK Überexpression.** **a** Schematische Darstellung der Behandlung der Tiere zur Induktion der Cre-induzierten Deletion bis zur Muskeleernte. Die Applikation von Doxycyclin (DOX, rot) erfolgte über das Trinkwasser. **c** Western Blot Analyse zeigt eine *HSA-rtTA-TRE-Cre* abhängige gesteigerte CRK Expression und eine *dCas9-SPH* Expression exklusiv in Quadriceps-Muskeln von adulten *sgRNA<sup>+/+</sup>//HSA-rtTA-TRE-Cre<sup>+/+</sup>//CAG-LSL-dCas9-SPH<sup>+/+</sup>* Mäusen (adult Crk-SPH) (ctrl= Wurfgeschwister *HSA-rtTA-TRE-Cre<sup>+/+</sup>* oder *CAG-LSL-dCas9-SPH<sup>+/+</sup>*, [10-14 Wochen alt]). RALA diente als Ladekontrolle. **c-e** Vergleichende Analyse der äußeren Morphologie (**c**), des Körpergewichtes (**d**) und der Tibiallänge (**e**) von adult Crk-SPH Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren nach Induktion (n=6/4, ctrl = Wurfgeschwister *HSA-rtTA-TRE-Cre<sup>+/+</sup>* oder *CAG-LSL-dCas9-SPH<sup>+/+</sup>*, Mann-Whitney U Test, einseitig, \*\*p = 0,005, ns= nicht signifikant, Skala= 1 cm [Weibchen, 15-17 Wochen alt]). **f**, **g** Vergleichende Analyse des Muskelgewichts von Quadriceps- (**f**) und TA-Muskeln (**g**) von adult Crk-SPH Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren nach Induktion (n=6/3, ctrl = Wurfgeschwister *HSA-rtTA-TRE-Cre<sup>+/+</sup>* oder *CAG-LSL-dCas9-SPH<sup>+/+</sup>*, Mann-Whitney U Test, einseitig, \*p = 0,0119, \*\*p = 0,0048, [Weibchen, 15-17 Wochen alt]). **h** Kontroll- und adult Crk-SPH Tiere nach dem sie durch Anheben am Schwanz hochgehoben wurden (ctrl = Wurfgeschwister *HSA-rtTA-TRE-Cre<sup>+/+</sup>* oder *CAG-LSL-dCas9-SPH<sup>+/+</sup>* [15-17 Wochen alt]). **i-k** Rotarod-Assay und Footprint Assay mit Kontroll- und adult Crk-SPH Tieren (n= 6/8, Wurfgeschwister *HSA-rtTA-TRE-Cre<sup>+/+</sup>* oder *CAG-LSL-dCas9-SPH<sup>+/+</sup>* [15-17 Wochen alt]); Mann-Whitney U Test, einseitig, \*\*\*p < 0,0007, Skala= 1 cm [Weibchen, 15-17 Wochen alt]). **l-m** Quantifizierung von BTX-markierten postsynaptischen Regionen in TA-Muskelquerschnitten (BTX =Bungarotoxin (n =3/3 Wurfgeschwister *HSA-rtTA-TRE-Cre<sup>+/+</sup>* oder *CAG-LSL-dCas9-SPH<sup>+/+</sup>*, Mann-Whitney U Test, einseitig, \*p = 0,05; Skala= 50 µm [Weibchen 15-17 Wochen alt]).

### 3.9. CRK-Überexpression führt zur gesteigerten GEF-Interaktion und resultiert in erhöhter GTPase-Aktivität

Zur Aufklärung des molekularen Mechanismus der *downstream* der *miR-1/206/133* vermittelten Regulation des CRK Expressionslevels im Skelettmuskel stattfindet, wurden Analysen zur Identifikation von CRK Interaktionspartnern durchgeführt. Außerdem wurden die molekularbiologischen Effekte dieser Interaktionen untersucht.

#### 3.9.1. CRK zeigt nach *miR-1/206/133* Verlust eine gesteigerte Interaktion mit dem RAC1-GEF FARP1

Um weiter *downstream* gelegene CRK Interaktionspartner identifizieren zu können, wurde eine Immunpräzipitation (IP) von CRK mittels CRK-spezifischer Antikörper mit anschließender Interaktom-Analyse durchgeführt. Im Vorfeld wurde der spezifische *Pull-down* von CRK aus wildtypischen Skelettmuskel-Lysaten mittels IP durch eine Western Blot Analyse validiert. Hierbei zeigte sich keine Bande in der IgG-Negativkontrolle. Lediglich in der Input-Kontrolle und in der Lysatprobe konnte eine spezifische Bande für das CRK Protein detektiert werden (Abb. 3.9.1 a). Somit konnte nachgewiesen werden, dass das CRK-Protein mit dem IP-Verfahren angereichert werden konnte.

Um Veränderungen im CRK Interaktom nach dem Verlust von *miR-1/206/133* feststellen zu können, wurden Skelettmuskel-Lysate der Beinmuskulatur von tKO und wildtypischen Tieren im

Stadium E18.5 für ein IP-Experiment hergestellt. Die Proben wurden nach erfolgter CRK-Anreicherung mittels IP zur differentiellen Identifikation potentieller Interaktionspartner mittels Massenspektrometrie (MS) analysiert. Hierdurch sollten Rückschlüsse auf kritische Interaktionen von CRK in Bezug auf NMJ-Funktion und -Homöostase im Skelettmuskel gezogen werden. Die nach der massenspektrometrischen Analyse durchgeführte Hauptkomponentenanalyse (PCA, *Principal Component Analysis*) ist ein gängiges mathematisches Verfahren zur Darstellung und Beurteilung von Varianzen innerhalb eines Datensets<sup>163</sup>. Die qualitative Kontrolle der CRK-IP durch PCA ergab eine eindeutige Separierung der einzelnen Versuchsgruppen (Wildtyp (wt), tKO und IgG-Kontrolle). Es konnte zudem eine geringe Varianz zwischen den einzelnen Replikaten belegt werden (Abb. 3.9.1 b).

Es folgte die Analyse der CRK-IP zur Aufklärung eines in tKO Tieren veränderten CRK-Interaktoms und zur anschließenden Identifikation konkreter CRK-interagierender Proteine. Es konnten insgesamt 492 Proteine in wt und tKO E18.5 Muskelgewebe identifiziert werden. Diese Proteine wurden nicht in der IgG Kontrolle detektiert, was auf eine potentiell spezifische CRK-Interaktion hindeutet. Im direkten Vergleich von wt und tKO, konnte unter den Top 10 eine signifikante Anreicherung des RAC1-GEFs FARP1 (*FERM, ARH/RhoGEF And Pleckstrin Domain Protein 1*) in tKO nachgewiesen werden (Abb. 3.9.1 c). Als einziges identifiziertes GEF war FARP1 somit ein vielversprechender Kandidat für weitere Analysen.

Zur Validierung einer spezifischen endogenen Protein-Protein Interaktion von CRK und FARP1 in Muskelzellen, wurde ein *in situ* Proximity Ligation Assay (PLA) durchgeführt. Die Analyse dieser potentiellen Protein-Protein Interaktion wurde mit primären, *ex vivo* differenzierten MuSCs, isoliert von Kontroll- und MuSC-tKO Tieren durchgeführt (Abb. 3.9.1 d). Durch dieses Verfahren konnte zum einen die Existenz einer endogenen CRK-FARP1 Interaktion validiert und zum anderen konnten Unterschiede zwischen den Kontroll- und *miR-1/206/133* defizienten MuSCs beurteilt werden. In Kontroll-MuSCs konnten eine große Anzahl an CRK-FARP1 PLA-Signalen nachgewiesen werden. Kohärent mit den CRK-IP Ergebnissen, zeigten sich in von MuSC-tKO Tieren gewonnenen Zellen eine weitaus höhere Anzahl an CRK und FARP1 spezifischen PLA Signalen (Abb. 3.9.1 e). Die Quantifizierung der PLA bestätigte eine signifikant erhöhte Anzahl an Signalen in *miR-1/206/133* defizienten MuSCs (Abb. 3.9.1 f).

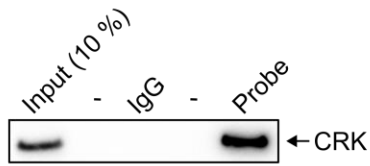
Bei dem identifizierten Interaktionspartner FARP1 handelt es sich um ein spinalen, postsynaptischen GTP-Austauschfaktor (GEF)<sup>164</sup>. Die primäre Funktion von GEFs liegt in der Aktivierung von kleinen GTPasen. In diesem Kontext konnte in Transkriptomdaten-basierten GSEA das Genset „*GTPase Binding*“ mit einer hochsignifikanten Anreicherung in *miR-1/206/133* Knock-out tKO im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Abb. 3.9.1 g). Beim Abgleich von hochsignifikant veränderten (*core enriched*) Genen desselben GSEA-Gensets von *miR-1/206/133* defizienten tKO Tieren im Stadium E18.5 und von adulten tKOs, sowie von Crk-tg Tieren (E18.5), zeigten sich in der überlappenden Schnittmenge lediglich fünf Gene. Eines dieser



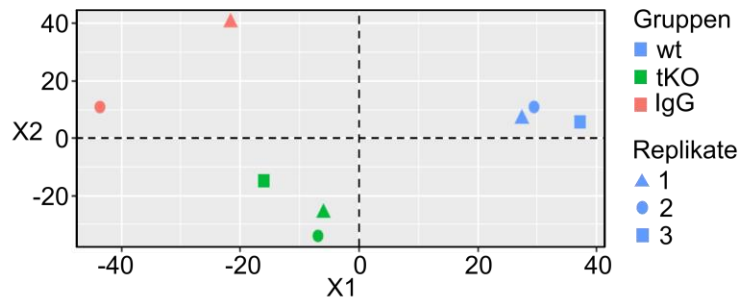
kernangereicherten Gene war ebenfalls FARP1 (Abb. 3.9.1 h). Zusammenfassend zeigte sich, dass das von *miR-1/206/133* regulierte CRK und der GTP-Austauschfaktor FARP1 direkte Interaktionspartner sein könnten und dass diese Interaktion bei Verlust von *miR-1/206/133* bzw. bei CRK Überexpression massiv verstärkt war. Offen bleibt inwieweit die gesteigerte Interaktion zwischen CRK und dem spezifischen GEF FARP1 allein wesentlich für den beobachteten Phänotyp sein könnte.

**Abbildung 3.9.1.: Analyse des CRK-Interaktoms nach Verlust von *miR-1/206/133*.** **a** Western Blot Analyse der CRK-Anreicherung nach vorrangegangener Immunpräzipitation (IP). **b** Hauptkomponentenanalyse (PCA) der einzelnen Replikate (1-3) der einzelnen Gruppen (wt, tKO und IgG-Kontrolle) nach erfolgter IP mit massenspektrometrischer (MS) Analyse. Streuungen innerhalb der Gruppen sind prozentual in zwei Dimensionen (X1, X2) abgebildet. **c** Co-Immunpräzipitation von potentiell mit CRK interagierender Proteinen aus Beinmuskel-Lysaten von wt und tKO im Stadium E18.5 (n= 3/3). Die MS-Analyse detektierte 492 mit CRK, jedoch nicht mit der IgG-Kontrolle Co-präzipitierte Proteine. 10 Proteine waren signifikant (\*p= <0,05) in tKO Muskels-Lysaten im Vergleich zur Kontrolle (wt) angereichert. Das einzige identifizierte GEF mit gesteigerter CRK-Interaktion im tKO war RAC1-GEF FARP1. **d-f** Die Proximity Ligation Assay (PLA) basierte Protein-Protein Interaktionsstudie bestätigt eine gesteigerte endogene Annäherung von CRK und FARP1 im Zytoplasma von differenzierten tKO MuSCs (n=3/3, Mann-Whitney U Test, einseitig, \*p = 0,05, voneinander unabhängige MuSC Isolationen, zwei technische Replikate für jedes Tier, ctrl= *miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-206/133b<sup>-/-</sup>//Pax7-CE Cre<sup>+/+</sup>*, tKO MuSC = *miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-206/133b<sup>-/-</sup>//Pax7-CE Cre<sup>+/+</sup>*, Skala= 20 µm). TAM = Tamoxifen-Injektionen (grün) **g** Auf Transkriptomdaten basierte GSEA von Kontrolle (blau) und tKO (rot) Quadriceps [E18.5] zeigt Anreicherung von in GTPase Bindung involvierten Transkripten, NOM= normalisierter p-Wert. **h** Venn-Diagramm von GSEA Genset „*GTPase Binding*“ zeigt überlappende Schnittmenge von in tKO (blau [E18.5]), adult tKO (rot) und in Crk-tg (grün [E18.5]) kernangereicherten (hochsignifikanten) Transkripten. Unter den fünf Genen der überlappenden Schnittmenge dieser drei Mausmodelle fand sich GEF-FARP1 (tKO: ctrl vs. *miR-1/206/133* tKO Quadriceps-Muskeln [n = 4/4, ctrl = *miR-1-1/133a-2<sup>+/+</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-206/133b<sup>+/+</sup>//Pax7-Cre<sup>+/+</sup>*, E18.5] / Crk-tg: wt vs. Crk-tg Quadriceps-Muskeln [n = 3/3, wt = Wurfgeschwister, E18.5]/ adult tKO: *miR-1/206/133* adult tKO vs. ctrl TA-Muskeln [n = 2/3, ctrl= *miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-206/133b<sup>-/-</sup>//HSA-rtTA-TRE-Cre<sup>+/+</sup>*, Männchen, ~44 Wochen alt]).  
Abbildung 3.9.1. befindet sich auf der nachfolgenden Seite.

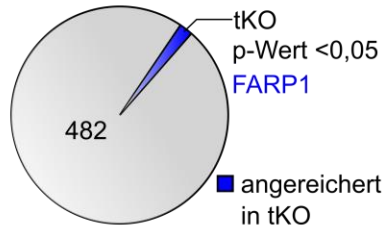
**a** CRK IP Western Blot



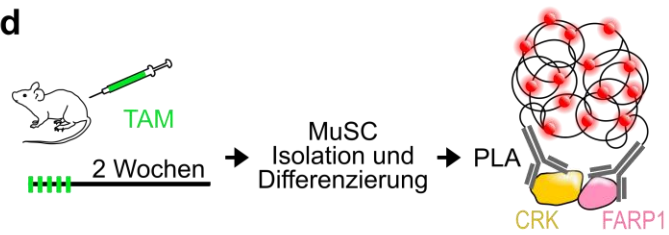
**b** PCA



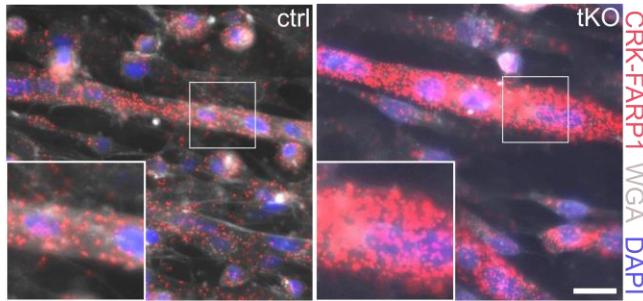
**c** CRK Immunpräzipitation



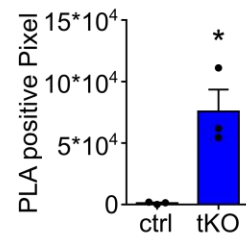
**d**



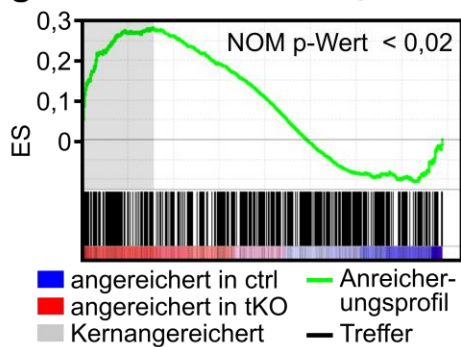
**e** CRK-FARP1 PLA mit isolierten MuSC



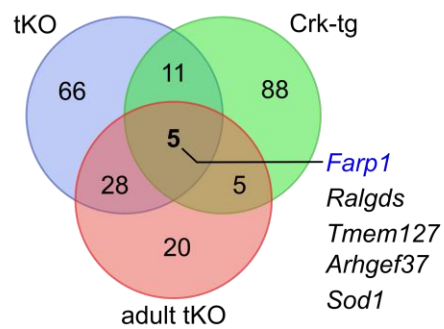
**f** CRK-FARP1 PLA



**g** GO Genset: *GTPase Binding*



**h** Überlappung von kernangereicherten Genen

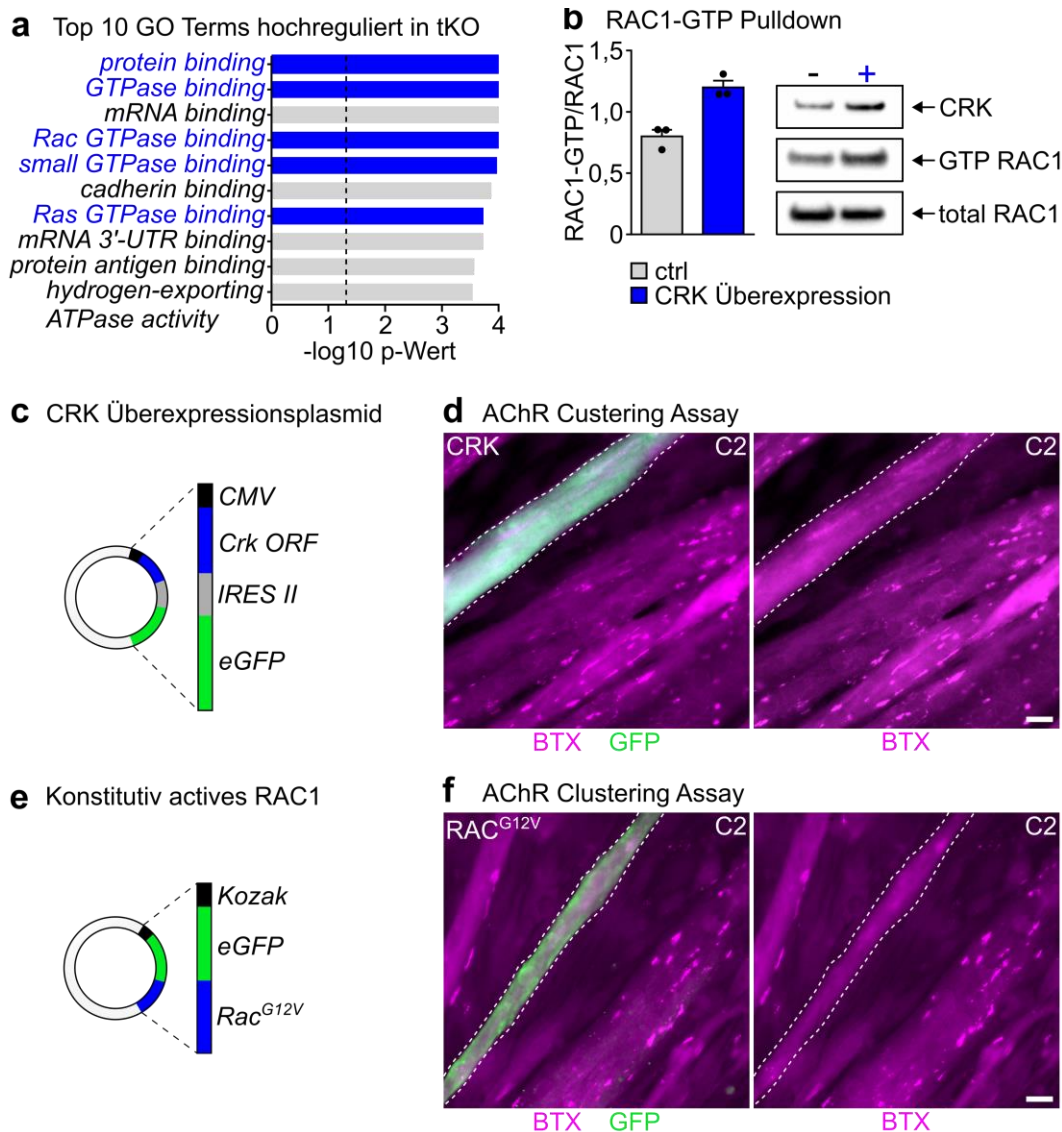


### 3.9.2. CRK-Überexpression resultiert in erhöhter RAC1-Aktivität und beeinflusst die AChR-Clusterbildung

Die primäre Funktion eines GTP-Austauschfaktors ist es kleine GTPase zu aktivieren <sup>113, 114</sup>. Forschungsergebnisse zeigten, dass das postsynaptisch lokalisierte GEF FARP1 eine starke Assoziation zur kleinen GTPase RAC1 hat und dessen Aktivitätsstatus reguliert <sup>164</sup>. Zuvor konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es nach *miR-1/206/133* Verlust, auf Grund der fehlenden reprimierenden Regulation von CRK, zu dessen verstärkter Expression kommt. In massenspektrometrischen Proteom-Analysen von wildtypischen und tKO-Tieren im Stadium E18.5 zeigten sich Hinweise auf eine gesteigerte Aktivität von kleinen GTPasen im tKO. Bei der Analyse der Top 10 signifikant angereicherten GO Terms in tKO Muskelproben, lieferten die Hälfte dieser Gensets Hinweise auf eine gesteigerte Signaltransduktion von kleinen GTPasen (Abb. 3.9.2. a). Da ein erhöhtes CRK-Level scheinbar zu einer verstärkten Interaktion mit dem GEF FARP1 führt (Abschnitt 3.9.1), was wiederum für die Aktivierung der kleinen GTPase RAC1 zuständig ist <sup>164</sup>, wurde die Aktivität von RAC1 nach CRK-Überexpression analysiert. Zur Ermittlung des RAC1-GTP Levels (aktiviertes RAC1) wurde ein *aktive RAC1 Pull-down Assay* durchgeführt. Hierfür wurden Lysate von C2 Muskelzellen mit regulären, endogener CRK Expression, mit Zellen mit einer transienten CRK-Überexpression verglichen. Eine Erhöhung der CRK-Expression konnte in drei voneinander unabhängigen transienten Transfektionen mit einem CRK-Überexpressionsvektor mittels Western Blot Analyse bestätigt werden. Die Auswertung von drei voneinander unabhängigen RAC1-GTP *Pull-down Assays* zeigten eine signifikante Erhöhung von RAC1-GTP in allen Lysaten mit CRK-Überexpression, normalisiert zum endogenen RAC1-Protein Level (Abb. 3.9.2. b). Es konnte somit eine vom CRK-Level abhängige Aktivierung der kleinen GTPase RAC1 in Skelettmuskelzellen nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung der physiologischen Relevanz einer erhöhten RAC1 Aktivierung in Muskelzellen im Hinblick auf die postsynaptische Ausbildung von AChR-Clustern (Acetylcholinrezeptoren-Clustern) wurde ein AChR-Clustering Assay etabliert. Hierfür wurden C2 Muskelzellen zunächst differenziert, die entstandenen Myotuben partiell transfiziert und anschließend mit dem synaptischen Signalmolekül Agrin stimuliert. Durch diesen Schritt kommt es auf der Oberfläche der C2 Myotuben zur Stimulation des AChR-Clustering. Durch diesen Assay wurde die Fähigkeit zur Ausbildung großer AChR-Makrocluster in Abhängigkeit des CRK-Expressionslevels und nach der Aktivierung von RAC1 analysiert. Zur Erhöhung des CRK Levels wurde ein CRK-Überexpressionsvektor mit GFP-Reporter generiert und zur Transfektion verwendet (Abb. 3.9.2. c). Auf der Oberfläche von Myotuben mit einem erhöhten CRK Level bildeten sich, kohärent mit dem beobachteten *in vivo* NMJ-Phänotyp im tKO, nahezu keine großen Makro-AChR-Cluster aus. Es zeigten sich lediglich kleine diffuse AChR-Cluster auf der Myotubenoberfläche. Myotuben mit endogenen CRK-Level (GFP negativ) bildeten hingegen nach Agrin-Stimulation große Makro-AChR-Cluster aus (Abb. 3.9.2. d). Zur Erhöhung des RAC1-GTP

Levels in Myotuben wurde ein Vektor mit einer konstitutiv aktiven Form von RAC1 (RAC<sup>G12V</sup>) in Verbindung mit einem GFP-Reporter verwendet (Abb. 3.9.2. e) <sup>165</sup>. Es konnte bestätigt, werden, dass sich auf der Oberfläche von Myotuben mit einem erhöhten RAC1-GTP Level, ebenfalls keine großen AChR-Makrocluster ausbildeten (Abb. 3.9.2. f) <sup>123</sup>. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der CRK Expression in Muskelzellen, ebenfalls zur Steigerung der Aktivität der kleinen GTPase RAC1 führt. Weiter konnte nachgewiesen werden, dass die Fähigkeit zur Ausbildung großer AChR-Makrocluster sowohl nach einer Steigerung der CRK Expression, als auch durch eine Erhöhung der RAC1-GTP Abundanz beeinträchtigt ist. In beiden Fällen kommt es zur vermehrten Ausbildung kleiner AChR-Cluster, ähnlich zum *miR-1/206/133* Knock-out Phänotyp (tKO; adulter tKO) oder nach CRK Überexpression (Crg-tg; Crk-SPH; adulter CRK-SPH) *in vivo*.



**Abbildung 3.9.2.: CRK-Überexpression führt zur gesteigerter RAC1-Aktivierung und resultiert im gestörten AChR-Clustering.** **a** Top 10 der hochregulierten „*Molecular function*“ GO (*Gene Ontology*) - *Terms* von wt vs. tKO Proteom-Daten zeigen eine Anreicherung von GTPase Aktivität und Proteinbindung assoziierten Prozessen (blau) (n=3/3, Quadriceps-Muskeln [E18.5]) **b** Der *Active RAC1 Pull-down Assay* zeigt eine signifikant erhöhte RAC1-Aktivierung (RAC1-GTP) nach CRK-Überexpression in Skelettmuskelzellen (C2) (n=3/3 voneinander unabhängige Transfektionen und *Pull-down Assays*, Mann-Whitney U Test, einseitig, \*p = 0,05). **c-d** Ektopische Expression von konstitutive-aktivem RAC1 in C2 Myotuben. Die transfizierten Myotuben wurden mit Agrin stimuliert zur Induktion von AChR-Clustering. RAC<sup>G12V</sup>-GFP positive Myotuben zeigten weniger und diffusere BTX-positive AChR-Makro-Cluster (gefärbt durch Alexa Fluor594-konjugiertes BTX; Skala= 20 µm). **e-f** CRK-Überexpression in C2-Myotuben durch Vektor mit CMV-Promoter und IRESII vermittelter GFP Co-Expression (**e**). **f** Transfizierte Myotuben wurden mit Agrin behandelt zur AChR-Clustering Induktion. GFP-positive, CRK überexprimierenden Myotuben zeigten weniger und diffusere BTX-positive AChR-Makro-Cluster (gefärbt durch Alexa Fluor594-konjugiertes BTX; Skala= 20 µm).

## 4. Diskussion

### 4.1. *miR-1/206/133* besitzen kompensatorisches Potential und sind funktionell redundant

Die im Rahmen dieser Arbeit analysierte microRNA-Familie *miR-1/206/133* ist im murinen und humanen Genom in drei Clustern mit jeweils eigenem Promotor organisiert<sup>44</sup>. Im menschlichen Erbgut befinden sich die drei microRNA Cluster auf Chromosom 20, 18 und 6 und im Mausgenom auf Chromosom 1, 2 und 18. Trotz dieser Unterschiede, gleichen sich sowohl Organisation, als auch Sequenz der reifen microRNAs exakt. Eine Organisation von microRNAs in miR-Clustern und sowie Redundanz einzelner miR-Gene kommt bei Vertebraten vielfach vor. Genau wie im Falle der *miR-1/206/133*, kommen etwa 50 % der microRNA Gene in Clustern vor, die als polycistronische Transkripte transkribiert werden<sup>7, 8, 166</sup>. Die meisten dieser Cluster sind das Produkt von Gen-Duplikationen. Allerdings können auch nicht miteinander verwandte microRNAs im selben Cluster lokalisiert sein und zum Teil funktionelle Redundanz aufweisen. Auch ganze miR-Cluster können im Laufe der Evolution von Duplikationsevents betroffen sein. So können aus zwei oder mehr distinkten Clustern die gleichen reifen miRNAs hervorgehen. Ein solches Duplikationsevent wurde bereits zuvor als der Ursprung der drei miR-Cluster der *miR-1/206/133* Familie diskutiert<sup>167, 168</sup>. Das Vorkommen solcher redundanten Cluster kann damit erklärt werden, dass das gesamte System robuster gegenüber äußerer Einflüssen ist und ein Wegfallen einzelner Cluster leichter kompensieren werden kann<sup>169, 170</sup>.

Ein solcher, kompensatorischer Effekt konnte bereits im Falle der beiden *miR-1/133a* Cluster während der Herzentwicklung dokumentiert werden. Die Expression dieser Cluster ist essentiell für die embryonale Herzentwicklung. Beide *miR-1/133a* Cluster reprimieren in embryonalen Herzmuskelzellen die Expression von Myocardin, sowie weitere Gene die üblicherweise in glatter Muskulatur exprimiert werden. Dies trägt zur weiteren Differenzierung der noch unreifen Kardiomyozyten bei. Nur der Verlust beider Cluster erwies sich, aufgrund von Herzentwicklungsdefekten während der Embryogenese, als letal<sup>3</sup>. Erfolgt dagegen die Deletion lediglich eines der beiden *miR-1/133a* Cluster, so überleben die Tiere und wiesen lediglich im adulten Herzen einen milden Repolarisierungsdefekt auf<sup>46</sup>. Dies impliziert einen massiven kompensatorischen Effekt des verbleibenden *miR-1/133a* Clusters für den Verlust des zweiten *miR-1/133a* Clusters.

Da die beiden *miR-1/133a* Cluster neben dem Herzen ebenfalls abundant im Skelettmuskel exprimiert werden, liegt die Vermutung nahe, dass ein kompletter skelettmuskelspezifischer Verlust ebenfalls zu einem drastischen letalen Phänotyp führen könnte. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden. In einer vorangegangenen Arbeit konnte gezeigt werden, dass *miR-1/133a* posttranskriptionell die Expression des MEF2A Proteins in Myozyten reguliert<sup>4</sup>. Die Deletion beider Cluster im Skelettmuskel (dKO) resultierte in einer gesteigerten MEF2A Expression, was zur transkriptionellen Aktivierung des *Dlk1-Dio3* Megaclusters und in der Folge zu einer

mitochondrialen Dysfunktion im adulten Skelettmuskel führt. Darüber hinaus weisen *miR-1/133a* dKO Tiere weder eine Beeinträchtigung in ihrer Überlebensfähigkeit, noch eine Veränderung der Innervierung der Skelettmuskulatur auf. Daher kann vermutet werden, dass das eng verwandte *miR-206/133b* Cluster, welches als einziges Cluster der *miR-1/206/133* Familie skelettmuskelspezifisch exprimiert wird, den Verlust der beiden *miR-1/133a* Cluster zumindest teilweise kompensieren kann. Ein deutlicher Hinweis darauf, ist die um mehr als das Doppelte erhöhte Expression von *miR-206/133b* im adulten *miR-1/133a* dKO Muskel, die in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte. Während im Herzen der Verlust beider *miR-1/133a* Cluster embryonal letal ist, scheint es, als ob im Muskel das in der Folge verstärkt exprimierte *miR-206/133b* Cluster eine funktionell redundante Rolle besitzt und so den Verlust der *miR-1/133a* kompensiert. Unterdessen hat der alleinige Verlust des *miR-206/133b* Clusters in der Maus keine Auswirkung auf die Entwicklung und Differenzierung der Skelettmuskulatur <sup>2</sup>.

Eine ähnlich funktionelle Redundanz von miR-Clustern konnte auch außerhalb der *miR-1/206/133* microRNA Familie nachgewiesen werden. So konnte gezeigt werden, dass die beiden miR-Cluster, *miR-34b/c* und *miR-449* synergistisch in der Gehirnentwicklung und der Spermatogenese wirken. Es zeigte sich ebenfalls nach der Inaktivierung eines der beiden Cluster ein Expressionsanstieg des jeweils anderen <sup>170</sup>. Des Weiteren wurden der Pluripotenz-assoziierten *miR-290/302* Familie und weiteren microRNAs eine funktionell redundante Rolle in der ESC (*Embryonic stem cells*) zu EpiLC (*Epiblast-like cells*) Transition nachgewiesen <sup>171</sup>. Somit scheint eine funktionelle Redundanz von microRNAs mit einer zum Teil synergetischen Wirkungsweise ein generell existierendes kompensatorisches Prinzip von microRNAs in Säugetieren darzustellen.

#### **4.2. *miR-1/206/133* Expression ist nicht essentiell für die frühe Skelettmuskelentwicklung, jedoch kritisch für die NMJ-Bildung**

Um die zuvor beschriebene Kompensation im Skelettmuskel zu umgehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein kompletter Verlust (*loss of function*) aller Mitglieder der *miR-1/206/133* Familie durchgeführt. Dadurch konnte – nach heutigem Kenntnisstand zum ersten Mal – die Funktion der *miR-1/206/133* Familie in der Skelettmuskulatur *in vivo* untersucht werden.

Vorangegangene Studien lieferten Hinweise, dass *miR-1* und *miR-133* eine Rolle in der Modulation der Proliferation und Differenzierung von Skelettmuskelzellen innehaben könnten. Die experimentelle Evidenz für solche Funktionen lieferten *in vitro* Studien an kultivierten Myoblasten und Analysen an *Xenopus laevis* Embryonen *in vivo* <sup>33</sup>. In weiteren zellkultur-basierten Überexpressions- und Knock-down Experimenten wurde ebenfalls eine Funktion von *miR-1*, *miR-133* und *miR-206* in der Muskelentwicklung und -differenzierung beobachtet. Erhöhte Expression von *miR-1* und *miR-133* führte in Zellkulturexperimenten mit C2-Zellen zu einer verminderten Differenzierung, einhergehend mit einer gesteigerten Proliferation. Knock-down Experimente

suggerierten einen gegenteiligen Effekt<sup>33, 147</sup>. Währenddessen wurde ebenfalls auf Basis von *in vitro* Analysen eine Rolle von *miR-206* in der Differenzierung von Skelettmuskelzellen durch die posttranskriptionelle Regulation einer Komponente der DNA-Polymerase, Follistatin-1 (*Fstl1*) und Utrophin (*Utrn*) vorgeschlagen<sup>147, 172</sup>. Diese Ergebnisse stehen wiederum im Kontrast zu später publizierten *in vivo*-Studien in *Mus musculus*. Auf Basis eines konstitutiven *miR-206/133b* Knock-out Mausmodells konnte gezeigt werden, dass der Verlust dieser microRNAs weder einen Einfluss auf die embryonale, noch auf die weitere Entwicklung und Differenzierung der Skelettmuskulatur hatte<sup>2</sup>.

In dem in dieser Arbeit verwendeten Knock-out Mausmodell (tKO) konnten keine Veränderungen in der Skelettmuskularentwicklung bis zum neonatalen Alter der Tiere nachgewiesen werden. Zur Betrachtung der frühen Phase der Skelettmuskelentwicklung wurden zusätzlich Embryonen im Stadium E10.5 analysiert. In diesem Stadium findet die sogenannte embryonale, primäre Phase der Myogenese statt<sup>54</sup>. Es zeigten sich im Stadium E10.5 keine Abweichungen der Expression von *MyoG* und in der Anordnung der Somiten nach konditionellen (tKO), sowie nach konstitutiven (ctKO) Verlust aller *miR-1/206/133* Cluster. Des Weiteren konnte ebenfalls bei primären, isolierten, *ex vivo* differenzierten *miR-1/206/133* Knock-out MuSCs keine veränderte Differenzierungsleistung beobachtet werden. Auch im neonatalen Stadium von *miR-1/206/133* defizienten Tiere konnten, nachdem sich bereits in der sekundären Phase der Myogenese die fetale Faser ausbildeten, keine morphologischen Abweichungen festgestellt werden. Dieser Befund steht in Diskrepanz zu bereits publizierten Daten, die eine Rolle der microRNAs in der frühen Myogenese postulieren. Im Gegensatz hierzu handelt es sich jedoch bei der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen um Daten aus *in vivo* Analysen an einem Säugetier-Modellorganismus. Daher lassen diese Resultate in höherem Maße Rückschlüsse auf die Funktion der homologen miR-Cluster in der humanen Physiologie und Pathologie zu.

Der skelettmuskelspezifische Verlust aller *miR-1/206/133* Cluster führt zu einem neonatal letalen Phänotyp. Dieser rührt nicht von Defekten der Skelettmuskulatur her, sondern von Störungen während der Ausbildung der neuromuskulären Synapse. Die Tiere versterben nach der Geburt an einer verminderten Respirationsfähigkeit vermittelt durch eine gestörte neuromuskuläre Reizübertragung. Aus diesem Grund kann keine Aussage über eine Rolle der microRNAs in der weiteren postnatalen Skelettmuskelentwicklung getroffen werden. Zukünftige Untersuchungen auf Basis eines induzierbaren *miR-1/206/133* Knock-out Mausmodells sind für eine funktionelle Analyse in der frühen postnatalen Skelettmuskularentwicklung notwendig.

#### **4.3. Der Verlust von *miR-1/206/133* führt nicht zur Entwicklung von BAT im Skelettmuskel**

Im Verlauf der frühen Myogenese kommt es entlang der dorsoventral-Achse unter anderem zur Entstehung des dorsal gelegenen Dermomyotoms. Aus diesem bilden sich in der weiteren Entwicklung die Skelettmuskulatur und das braune Fettgewebe (*brown adipose tissue*, BAT),



sowie Teile der dorsalen Haut. BAT und der Skelettmuskel entstehen daher aus denselben Vorläuferzellen<sup>51, 54</sup>. Während der weiteren Differenzierung unterscheiden sich Skelettmuskelvorläuferzellen und BAT-Vorläuferzellen in ihrem Expressionsprofil. Dermomyotomale Vorläuferzellen exprimieren beispielsweise EN1 und MYF5, sowie im weiteren Verlauf der Entwicklung PAX3 und PAX7. Zellen, welche zu BAT differenzieren, exprimieren unter anderem PRDM16, PPAR $\gamma$ , PGC-1 $\alpha$  und UCP1<sup>55</sup>. Bereits publizierte Studien implizieren hierbei eine regulatorische Funktion von *miR-133* auf das Expressionslevel des Transkriptions-Co-Regulators PRDM16<sup>150-152</sup>. In der Muskulatur des in dieser Arbeit verwendeten tKO Mausmodells, ist der Verlust aller *miR-133* Clusters mit inbegriffen. Es konnten allerdings keine Anzeichen einer BAT- oder Präadipozyten-Entwicklung im Skelettmuskel detektiert werden. Es ist jedoch anzumerken, dass in dem genutzten tKO Mausmodell auf Grund der verwendeten Pax7-Cre-Rekombinase kein vollständiger *miR-133* Verlust während der gesamten frühen Myogenese vorliegt.

Um die Auswirkungen des miR-Verlusts ebenfalls in Muskelstammzellen (MuSCs) beurteilen zu können wurde im Rahmen dieser Arbeit ein induzierbares, MuSC-spezifisches *miR-1/206/133* Knock-out Mausmodell generiert. Eine Analyse dieses Zelltyps bietet sich an, da es sich bei MuSC um quieszente multipotente Stammzellen im adulten Skelettmuskel handelt. MuSCs sind noch nicht vollständig ausdifferenziert und spielen eine zentrale Rolle in der postnatalen Muskelhomöostase, im Muskelwachstum und in Muskelregenerationsprozessen. Ihr Stammzellcharakter ermöglicht es ihnen, einen fortwährenden MuSC-Pool aufrecht zu erhalten. Nach einer Muskelschädigung werden die mitotisch quieszenten, PAX7-exprimierenden MuSCs aktiviert. Nach Aktivierung beginnen sie zu proliferieren und fusionieren schließlich mit den geschädigten Muskelfasern<sup>67-69</sup>. Eine vorangegangene Studie impliziert ebenfalls eine Rolle von *miR-133* in der posttranskriptionellen Regulation von PRDM16 in MuSCs. Hierbei soll *miR-133* die Transdifferenzierung von BAT aus MuSCs der Skelettmuskulatur durch negative Regulation von PRDM16 bewirken<sup>151</sup>.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden zunächst das Transkriptom von primären, isolierten, *ex vivo* differenzierten *miR-1/206/133* Knock-out MuSCs untersucht. Hierbei zeigte sich jedoch weder eine verstärkte Expression von *Prdm16*, noch eine signifikant veränderte Expression von wichtigen BAT-Markergenen. Lediglich *Ppargc1a* wurde verstärkt in differenzierten in MuSC tKO Zellen exprimiert. Dieses spielt zwar unter anderem eine Rolle in der BAT-Thermogenese<sup>153</sup>, besitzt jedoch keine BAT-spezifische Expression und ist auch im Skelettmuskel abundant vorhanden<sup>173-175</sup>. Des Weiteren zeigte eine mit den Transkriptomdaten durchgeführte GSEA keine Anreicherung des Gensets „*Adipogenesis*“ in MuSC tKO Zellen. Diese Ergebnisse deuten somit auf keine wichtige Rolle von *miR-133* in der Regulation von Genen zur BAT-Entwicklung in MuSCs hin. Neben diesen molekularen Analysen mit primären isolierten MuSCs wurden ebenfalls *in vivo* Experimente durchgeführt und die Muskulatur auf Anzeichen

eines *Brownings* nach *miR-1/206/133* Verlust untersucht. Nach Tamoxifen-induzierter Deletion aller miR-Cluster in MuSCs erfolgte eine Schädigung eines TA-Muskels mittels intramuskulärer CTX-Injektion. Hierdurch wurde eine MuSC-vermittelte Regeneration hervorgerufen. Nach einer 12-wöchigen Regenerationsphase wurden die Muskeln histologisch analysiert. Es konnten erneut keine Anzeichen einer Entwicklung von braunem Fettgewebe in den regenerierten Muskelbereichen nachgewiesen werden. Dieser Befund steht erneut im Kontrast zu publizierten Studien. Dort wurden bereits nach acht bis neun Wochen die Bildung von im Muskelinterstitium lokalisierten braunen Adipozyten detektiert<sup>151</sup>. Die Diskrepanz dieser Ergebnisse aus *in vitro* und *in vivo* Analysen zur Literatur<sup>151</sup> kann möglicherweise mit dem dort angewandten Methoden erklärt werden. Es wurde lediglich ein Knock-down von *miR-133* vorgenommen. In diesem Zusammenhang ist es wichtig, darauf hinzuweisen, dass die Daten dieser Arbeit auf einem sauberen genetischen Modell beruhen, was potenzielle *Off-Target*-Effekte vermeidet, die unweigerlich mit dem Einsatz von Antagomiren, GAPmern oder anderen ähnlichen Techniken verbunden sind<sup>176-178</sup>. Andererseits kann die Inaktivierung von Genen in der Keimbahn kompensatorische Mechanismen in Gang setzen, die spezifische Funktion deletierter Gene verbergen können. Dies könnte die Unterschiede zwischen dem miRNA-*Silencing* durch Antagomirs und genetischen Ansätzen erklären. Um Klarheit über eine potentielle funktionelle Rolle von *miR-133a/b* in der Induktion von BAT-Differenzierung in Skelettmuskelzellen zu erhalten, müssen weiterführende Studien durchgeführt werden. Um ausschließen zu können, dass *miR-133a/b* eine Funktion in der braunen Fettentwicklung oder in Transdifferenzierungsprozessen hat, wurde bereits gezielt ein *miR-133* Knock-out Mausmodell entwickelt. Dieses *in vivo* Modell soll Zukunft gemeinsam mit den in dieser Arbeit verwendeten tKO Mausmodellen für anknüpfende Analysen verwendet werden.

#### **4.4. *miR-1/206/133* sind kritische Faktoren in der NMJ-Bildung und Homöostase**

Die neuromuskuläre Synapse stellt die Schnittstelle zwischen dem somatischen Nervensystem und der Skelettmuskulatur dar. Die Ausbildung und Homöostase der NMJ im Skelettmuskel ist daher essentiell für alle Bewegungen der Skelettmuskulatur, wie beispielsweise für die Respiration<sup>77</sup>. Daher ist ein Verständnis der zugrundeliegenden molekularen Prozesse während der neuromuskulären Entwicklung und Aufrechterhaltung essentiell, um die physiologischen und pathologischen Abläufe an der NMJ zu verstehen. Die vorliegende Arbeit konnte einen Beitrag zur Aufklärung einer neuen und unerwarteten Funktion der microRNA Familie *miR-1/206/133* in der Skelettmuskulatur leisten. Die vollständige Deletion im Skelettmuskel scheint weder eine Auswirkung auf die embryonale bzw. fetale Skelettmuskelentwicklung noch eine Funktion in der Regulation der BAT-Entwicklung zu haben. Jedoch konnte basierend auf physiologischen molekularen und histologischen Analysen gezeigt werden, dass der Verlust von *miR-1/206/133* dramatische Folgen sowohl für die Ausbildung, als auch für die Homöostase von neuromuskulären

Synapsen zu haben scheint. Die neuromuskulären Veränderungen im neonatalen und adulten Alter der *miR-1/206/133* Knock-out Tiere scheinen in beiden Fällen auf demselben Wirkmechanismus zu beruhen: der posttranskriptionellen Regulation von CRK durch *miR-1/206/133*.

#### **4.4.1. *miR-1/206/133* Expression ist essentiell zur Bildung der NMJ im neonatalen Muskel**

Die Entwicklung einer funktionalen NMJ benötigt ein komplexes Zusammenspiel zwischen perisynaptischen Schwann-Zellen, präsynaptischen Motoneuron und der postsynaptischen Region des Skelettmuskels. Kommt es während der Entwicklung zur einer gestörten Ausbildung einer dieser Komponenten, resultiert dies in den meisten Fällen in einer Beeinträchtigung der gesamten NMJ-Funktion.

Der Verlust der kompletten *miR-1/206/133* Familie in der Skelettmuskulatur resultierte in neonataler Letalität. Der Grund hierfür scheint eine neuromuskuläre Dysfunktion zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass *miR-1/206/133* tKO Tiere eine verminderte Respirationsfähigkeit im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern aufwiesen. Eine nach der Geburt beeinträchtigte Lungenventilation ist, neben genereller Schwäche der Muskulatur und Störungen in der Koordination, typisch im Zusammenhang mit neuromuskulären Funktionsstörungen<sup>179-181</sup>. Dies würde eine Erklärung für die beobachtete postnatale Letalität der Tiere liefern. Neben den physiologischen Aspekten des *miR-1/206/133* tKO Phänotyps konnten ebenfalls molekulare Veränderungen während der NMJ-Ausdifferenzierung festgestellt werden. Es zeigten sich in diesem Zusammenhang ebenso auf histologischer Ebene morphologische Abweichungen.

Die Bildung der NMJ verläuft parallel zur Entwicklung der Skelettmuskulatur. Auf der Oberfläche der Muskelfasern bilden sich kleine primitive und weit verteilte AChR-Cluster, schon bevor der Motornerv den Muskel erreicht. Die noch unreifen plaqueförmigen AChR-Cluster werden im weiteren Verlauf der Entwicklung von einem Motornerv innerviert. Dies induziert zum einen den Aufbau und die Akkumulation neuer AChR-Cluster und zum anderen den langfristigen Abbau der nicht innervierten AChR-Cluster. Dies geschieht im Zeitraum kurz vor der Geburt bis ins neonatale Alter der Tiere<sup>77, 89</sup>. Im tKO zeigte sich eine Störung bei der Bildung von AChR-Clustern auf der Muskelfaseroberfläche. Es konnten weniger, größere und zusammenhängende AChR-Clustern (Makrocluster) ausgebildet werden. Außerdem konnten eine verminderte Größe und eine Reduktion der Anzahl an AChR-Cluster festgestellt werden. Das Diaphragma im Wildtyp weist im Zeitraum um die Geburt bereits ein distinktes Innervierungsmuster mit einem schmalen, klar begrenzten Endplattenband auf. In tKO Tieren zeigte sich dort eine gestreute Verteilung der vorhandenen AChR-Cluster auf der Muskelfaseroberfläche des Diaphragma-Muskels. Dies stellte ebenfalls einen Hinweis für die Funktion der *miR-1/206/133* in der Ausbildung und Differenzierung der neuromuskulären Region dar.

In der vorliegenden Arbeit konnten außerdem die diesem Phänotyp zugrundeliegenden – bislang unbekannt – regulatorischen Prozesse weiter aufgeklärt werden. Es ist bekannt, dass es sich bei den Mitgliedern der *miR-1/206/133* microRNA Familie um die abundantesten microRNAs in der Skelettmuskulatur handelt<sup>4, 182</sup>. In dieser Arbeit konnte ein bisher unbekanntes neues primäres Target dieser microRNA Familie – das Adapterprotein CRK – identifiziert werden. Alle Mitglieder der *miR-1/206/133* Familie scheinen synergistisch das CRK Level im Skelettmuskel zu regulieren, da sowohl für *miR-1* und *-206* als auch *miR-133a* und *-133b* konservierte miR-Bindestellen in der *Crk* mRNA identifiziert und eine miR-mRNA Bindung nachgewiesen werden konnten. Bei dem Protein CRK handelt es sich um ein ubiquitär exprimiertes Adapterprotein mit einer Vielzahl an unterschiedlichen Funktionen in verschiedenen Geweben. Diese umfassen Zellproliferation, Zelladhäsion, Zellmigration, Phagozytose, Endozytose, Apoptose und die Regulation von Genexpression<sup>183-185</sup>. Im Skelettmuskel scheint seine Expression von den gewebespezifisch exprimierten *miR-1/206/133* kontrolliert zu werden. Durch eine gewebespezifische Expression der microRNAs kann die posttranskriptionelle Regulation eines sonst ubiquitär exprimierte Ziel mRNA erreicht werden. Dieser Fall zeigt deutlich, dass die regulatorische Wirkung von microRNAs nicht nur in Abhängigkeit zu ihrer mRNA-Target-Sequenz steht, sondern auch einem zellulären Kontext untergeordnet sein kann.

CRK stellt mit seinem Aufbau ein prototypisches Adapterprotein dar. Es besitzt SH2 und SH3 Domänen. Die SH2-Domäne vermittelt hierbei die Bindung an Tyrosin-phosphorylierte Interaktionspartner<sup>103, 186, 187</sup>. Vorrangegangene Studien konnten bereits zeigen, dass CRK im Skelettmuskel in der postsynaptischen Region *downstream* von des LRP4-MuSK Komplexes mit der C-terminalen Tyrosin-phosphorylierten Region von DOK7 interagiert. DOK7 ist ein essentielles postsynaptisches Protein während der NMJ-Ausbildung<sup>78</sup>. Die Wichtigkeit dieser Interaktionen mit DOK7 wird durch eine spezielle Form des humanpathologischen kongenitalen myasthenen Syndroms (CMS, *Congenital myasthenic syndrome*) deutlich<sup>98, 188</sup>. Bei CMS handelt es sich um eine heterogene Gruppe von angeborenen Störungen in der Signaltransduktion zwischen Motornerv und Skelettmuskel. Eine Form dieser humanen Erkrankung stellt das *Dok7*-CMS dar. Die häufigste Form des *Dok7*-CMS stellt eine Mutation dar, die in der Trunkierung des C-terminalen Bereiches von *Dok7* resultiert, mit dem auch CRK interagiert. Dies äußert sich wiederum in einer neuromuskulären Synaptopathie. Das phänotypische Spektrum des Krankheitsbilds umfasst Symptome wie muskuläre Schwäche, Schwierigkeiten beim Schluckvorgang und bei der Atmung, sowie eine auffällig gestörte Gangart<sup>188, 189</sup>. Dieses klinische humane Krankheitsbild ähnelt wiederum stark dem Phänotyp des *miR-1/206/133* tKOs.

Des Weiteren gibt es Studien bei denen in Patientenproben, mittels genomweiten Micro Array Screenings, Mikro-Deletionen und -duplikationen auf Chromosom 17 im genomischen Lokus (17p13.3) unter anderem von CRK entdeckt wurden. Es konnten mehrere nicht miteinander verwandte Individuen mit pathologischen Mikroduplikationen in diesem Bereich identifiziert

werden. Interessanterweise wiesen diese Patienten neben autistischen Symptomen und schwachen Entwicklungsverzögerungen ebenfalls motorische Störungen auf<sup>190</sup>. Dies könnte ein Hinweis auf eine neuromuskuläre Dysfunktion sein, ähnlich dem *miR-1/206/133* tKO bzw. dem Phänotyp des CRK-Überexpressionsmodells. Mit der in dieser Arbeit vorgenommenen Analyse und Aufschlüsselung des durch *miR-1/206/133* regulierten molekularen Mechanismus, konnte möglicherweise ein Beitrag zum besseren Verständnis des angeborenen humanen kongenitalen myasthenen Syndroms und der pathologischen Micro-Duplikationen im *Crk* Locus geleistet werden. Es sind weiterführende Studien notwendig um einen direkten Zusammenhang zwischen gestörter CRK Funktion, wie sie auch die *miR-1/206/133* Knock-out auftritt, und diesen humanpathologischen Krankheitsbildern zu schaffen.

#### **4.4.2. *miR-1/206/133* sind wichtige Faktoren in der NMJ-Homöostase im adulten Skelettmuskel**

Die Rolle der *miR-1/206/133* Familie wurde nach heutigem Wissensstand zuvor noch nie im Ganzen – als funktionelle Einheit – in der adulten Skelettmuskulatur betrachtet. Der komplette skelettmuskelspezifischer Knock-out von *miR-1/206/133* erwies sich im Rahmen dieser Arbeit als neonatal letal. Daher konnte die Rolle dieser microRNAs nicht in der Muskulatur von adulten Tieren analysiert werden. Um dies ermöglichen, wurde eine Liganden-aktivierbare, induzierbare Cre-Rekombinase verwendet um ein konditionelles *loss of function* Mausmodell (adult tKO) zu generieren. Dieses wurde zunächst funktionell validiert und anschließend morphologisch, histologisch, sowie molekularbiologisch analysiert. Interessanterweise wiesen die adulten *miR-1/206/133* Tiere ebenfalls einen neuromuskulären Phänotyp auf. Erwartungsgemäß zeigte sich jedoch ebenfalls ein mitochondrialer Phänotyp, wie er bei adulten *miR-1/133a* dKO Tieren auftritt<sup>4</sup>. Durch vergleichende Analysen mit gleichaltrigen adulten dKO Tieren konnte jedoch in dieser Arbeit ausgeschlossen werden, dass *miR-1/133a* Knock-out Tiere einen neuromuskulären Phänotyp im Alter von etwa 44 Wochen entwickeln. Dies könnte mit einem möglichen kompensatorischen Effekt des im *miR-1/133a* dKO noch vorhandenen *miR-206/133b* Clusters begründet werden (siehe 4.1). Somit zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass der Verlust aller *miR-1/206/133* Clustern phänotypisch nicht dem bereits publizieren *miR-1/133a* dKO gleicht, sondern eine neue Qualität mit sich bringt. So scheint MEF2A nicht das einzige relevante Target der *miR-1/206/133* im adulten Skelettmuskel darzustellen. Zum einen scheint der Verlust des *miR-206/133b* Clusters durch die beiden verbleibenden *miR-1/33a* Cluster ausgeglichen werden zu können. Zum anderen wird allem Anschein nach dem Verlust von lediglich zwei der drei *miR-1/206/133* Cluster durch das verbliebene, skelettmuskelspezifische Cluster *miR-203/133b* im dKO kompensiert.

Defizite in der NMJ Formation, jedoch auch im speziellen in ihrer Homöostase verursachen neuromuskuläre Erkrankungen wie CMS, Myasthenia gravis (MG) oder amyotrophe

Lateralsklerose (ALS). Diese Krankheiten haben gemeinsam, dass es letztendlich eine Störung im Zusammenspiel von Bestandteilen der neuromuskulären Synapse gibt. Zu diesen Bestandteilen zählen beispielsweise die AChRs. Vorangegangene Arbeiten implizieren hier eine Rolle von Mitgliedern der *miR-1/206/133* Familie in der Regulation. So soll laut einer Studie *miR-1* eine Funktion an der neuromuskulären Prä- und Postsynapse von *C. elegans*, durch Kontrolle zweier AChR-Untereinheiten und Regulation von MEF-2 besitzen<sup>191</sup>. Dies soll wiederum einen Einfluss auf die presynaptischen ACh-Sekretion und die postsynaptische Sensitivität haben. Dieser Mechanismus ist jedoch wahrscheinlich nicht auf Maus oder Mensch übertragbar. Zwar handelt es sich bei *miR-1* um eine evolutionär äußerst konservierte microRNA, die sowohl in *Drosophila melanogaster* und *C. elegans*, als auch im Menschen vorkommt, jedoch sind die AChR-Untereinheiten weitaus weniger stark konserviert<sup>192, 193</sup>. Es konnten lediglich eine Konservierung der entsprechenden *miR-1* Bindesequenzen in den mRNAs der AChR-Untereinheiten im mit *C. elegans* nahe verwandten Nematoden *C. briggsae* wiedergefunden werden<sup>194</sup>.

Auch im Kontext der Vertebraten-NMJ wurde die Funktion von Mitgliedern der *miR-1/206/133* Familie zuvor untersucht. Eine auf Mausmodellen basierte Studie impliziert eine Rolle von *miR-206* bei der Unterstützung der NMJ-Homöostase und in der NMJ-Regeneration im ALS-Krankheitsbild<sup>195</sup>. In reinen *miR-206* Knock-out Mäusen zeigte sich jedoch kein Einfluss auf die NMJ-Homöostase. Dies deckt sich mit Ergebnissen späterer *miR-206/133b* Knock-out Studien<sup>2</sup>. Es zeigte sich jedoch, dass *miR-206*, allem Anschein nach, eine wichtige Rolle bei Reinnervierungsprozessen im ALS Mausmodell (G93A-SOD1) durch Regulation von HDAC4 spielt. HDAC4 trägt laut der Studie in diesen Kontext zur Kontrolle der neuromuskulären Genexpression bei<sup>195</sup>. Anhand von Untersuchungen von reinen *miR-206* Knock-out Mäusen wurde auch nach Nervschädigung eine Rolle dieser microRNA durch Regulation von HDAC4 im Reinnervierungsprozess impliziert. In dem in der vorliegenden Arbeit analysierten *miR-1/206/133* Knock-out Mausmodell (tKO) zeigte sich jedoch keine gesteigerte Expression von HDAC4 auf Proteinebene nach Verlust von *miR-1/206/133*. Eine gesteigerte Expression von HDAC4 müsste nach Verlust von sowohl *miR-206*, als auch *miR-1* verstärkt auftreten, da *miR-206* und *miR-1* sehr ähnliche Sequenzen mit gleicher Seed-Sequenz aufweisen. Außerdem ist bekannt, dass HDAC4 ebenfalls ein potentielles *miR-1* Target darstellt<sup>196</sup>. Beide putative miR-Bindestellen in der *Hdac4*-mRNA von *miR-1* und von *miR-206* weichen kaum voneinander ab. Bei einer putativen *miR-1* Bindung an die *Hdac4*-mRNA zeigt sich lediglich ein Unterschied von einer Basenpaarung im Vergleich zur *miR-206* Bindung. Daher wäre eine Untersuchung einer potentiellen *miR-1* Funktion im Krankheitsbild von ALS nur konsequent und ein guter Ansatz weiterführender Studien.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Homöostase der adulten NMJ abhängig von der Expression von *miR-1/206/133* zu sein scheint. Wegen der fehlenden Änderung der HDAC4 Expression im tKO wird von keiner regulatorischen Funktion der microRNAs auf die

*Hdac4*-mRNA in diesem Kontext ausgegangen. Nach induziertem Verlust von *miR-1/206/133* zeigte sich dagegen, wie auch im neonatalen tKO Mausmodell, eine gesteigerte Expression des zuvor identifizierten miR-Targets CRK. Hieraus ergibt sich die Vermutung, dass *miR-1/206/133* im adulten Skelettmuskel die CRK Proteinmenge kontrolliert, genauso wie während der NMJ-Entwicklung. Diese Hypothese wird durch die schnelle Degeneration der NMJs nach der Überexpression von CRK im Skelettmuskel bekräftigt. Es traten die gleichen phänotypischen Veränderungen auf, wie sie auch nach Verlust von *miR-1/206/133* beobachtet werden konnten. In dieser Arbeit konnte somit eine neuartige regulatorische Funktion von *miR-1/206/133* im adulten Skelettmuskel in der Erhaltung der NMJ aufgedeckt werden. Das hierfür neu entwickelte induzierbare *miR-1/206/133* Verlustmodell ermöglicht ebenso weiterführende Studien der *miR-1/206/133* Funktion. Ob diese microRNAs beispielsweise eine Rolle in NMJ-Regenerationsprozessen im Muskel spielen müssen zukünftige Experimente zeigen.

#### 4.5. *miR-1/206/133* binden an konservierte Bindestellen in der *Crk* mRNA

Um die Funktion der *miR-1/206/133* Familie zu entschlüsseln, wurden *loss of function* basierte, funktionelle Analysen in der Skelettmuskulatur durchgeführt. Wie beschrieben schien der auftretende neuromuskuläre Phänotyp im neonatalen Alter, als auch die in adulten Tieren auftretenden neuromuskulären Defizite nach *miR-1/206/133* Knock-out gleichermaßen auf dem Verlust der reprimierenden Wirkung der microRNAs auf ihre Ziel-mRNA von *Crk* zu beruhen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit untersucht ob eine spezifische Bindung der *Crk* mRNA durch *miR-1/206/133* vorliegt und in welchen Sequenzbereichen diese stattfindet. Es ist bekannt, dass die 3'UTR einer potentiellen Ziel-mRNA die mRNA-Region mit den häufigsten und effektivsten regulatorischen microRNA-Bindeevents in Bilateria darstellt<sup>197, 198</sup>. Vorangegangene Publikationen konnten zudem zeigen, dass durch das Auftreten multipler microRNA-Bindestellen ihr regulatorischer Effekt um ein vielfaches verstärkt werden kann<sup>17, 18</sup>. Es konnten auf bioinformatischer Zielgen-Vorhersage-Software basierend potentielle Binderegionen in der 3'UTR der *Crk* mRNA für alle Mitglieder der *miR-1/206/133* Familie identifiziert werden. Durch ein genetisches Reportersystem konnte die Bindung der miRs an die vorhergesagten Bindestellen in der 3'UTR von *Crk* in Skelettmuskelzellen validiert werden. Weitere Studien konnten zeigen, dass einige regulatorisch relevante microRNA-mRNA Interaktionen innerhalb der Vertebraten sehr stark konserviert sein können<sup>198-200</sup>.

In der vorliegenden Arbeit konnten potentielle Bindestellen ebenfalls in der 3'UTR der humanen *Crk* mRNA sowohl für *miR-1/206*, als auch für *miR-133a/b* identifiziert werden. Die Bindungen zwischen *miR-1/206* und *miR-133* und der 3'UTR von *Crk* könnte somit evolutionär konserviert sein. Ein weiterer Hinweis hierfür liefert der verwendete Algorithmus mirSVR Score. Er bewertet zum einen die Qualität einer putativen Bindung, zum anderen aber auch ihre

evolutionäre sequenzielle Konservierung<sup>157</sup>. Auf Alignment basierte Sequenzabgleichung zeigten ebenfalls eine große sequenzielle Übereinstimmung der entsprechenden murinen und humanen *Crk* mRNA 3'-UTR Sequenzen. Unterstützend zeigte sich, dass diese *miR-1/206/133* Bindestellen in der *Crk* mRNA gleichzeitig jene mit dem besten mirSVR-Score waren. Des Weiteren sind die reifen microRNA Sequenzen der *miR-1/206/133* Familie identisch zwischen Maus und Mensch<sup>38, 201</sup>. All dies impliziert eine potentielle evolutionäre Konservierung und funktionelle Relevanz der *miR-1/206/133* Interaktion mit der *Crk* mRNA *in vivo*. Um festzustellen ob tatsächlich eine evolutionäre Konservierung der *miR-1/206/133* vermittelten Repression von *Crk* im Menschen vorliegt, müssen die hier vorgestellten Experimente in humanen Zellkultursystemen rekapituliert werden.

Die reprimierenden Wirkung von *miR-1/206/133* auf die *Crk* mRNA wurde im Rahmen dieser Arbeit nach heutigem Wissensstand erstmalig beschrieben. Es ist bekannt, dass das Protein CRK oft gemeinsam mit seinem Paralog CRK-L überlappende Funktionen übernimmt. Dies konnte beispielsweise im Reelin-Signalweg während der Gehirnentwicklung gezeigt werden<sup>202</sup>. Im Skelettmuskel scheint eine völlige funktionelle Überlappung von CRK und CRK-L jedoch nicht der Fall zu sein. Eine vorrangegangene Studie zeigte, dass der skelett-muskelspezifische Knock-out von CRK und CRK-L die Ausbildung der neuromuskulären Region beeinträchtigt<sup>91</sup>. Die vorliegende Arbeit konnte jedoch mit mehreren voneinander unabhängigen CRK-Überexpressionsmausmodellen zeigen, dass scheinbar allein die Repression der CRK mRNA durch *miR-1/206/133* kritisch für die Ausbildung und Homöostase der NMJ zu sein scheint. Von einer Regulation des CRK-L Levels durch *miR-1/206/133* wird nicht ausgegangen. Es zeigte sich weder das CRK-L Level nach *miR-1/206/133* Verlust signifikant verändert, noch konnten potentielle microRNA Bindestellen in der *Crk-L* mRNA identifiziert werden.

Die Cluster *miR-1-1/133a-2* und *miR-1-2/133a-1* sind im Herzmuskel abundant vorhanden. Aus diesem Grund stellt sich die Frage, ob *miR-1/133a* hier ebenfalls regulatorisch auf das CRK-Level einwirkt. Es konnte gezeigt werden, dass *miR-1/133a* bereits eine essentielle Funktion während der Herzentwicklung erfüllen. Sie regulieren posttranskriptionell unter anderem Myocardin und tragen damit zur weiteren Differenzierung der noch unreifen Kardiomyozyten bei. Ein kompletter Verlust dieser microRNAs erwies sich als embryonal letal aufgrund von Herzentwicklungs-Defekten. Mittels Überexpressions-Mausmodellen konnte diese regulatorische Funktion *in vivo* bestätigt werden<sup>3</sup>. Dies scheint somit die primäre regulatorische Aufgabe von *miR-1/133a* während der Herzentwicklung darzustellen. Interessanterweise kommt es in CRK-Nullmutanten Mäusen eher zu kardiovaskulären und kraniofacialen Entwicklungsdefekten, als zu einer gestörten Entwicklung der Herzmuskelzellen<sup>203</sup>. Daher könnte CRK dort eventuell eine Rolle in der vaskulären Entwicklung spielen. Ob *miR-1/133a* dennoch einen Einfluss auf die posttranskriptionell Kontrolle des CRK Levels im Herzen hat, ist unklar. Eine Funktion dieser



microRNAs in der Regulation des CRK Levels in der Herzentwicklung oder im adulten Herzen müsste in weiterführenden Studien analysiert werden.

#### **4.6. Die Funktionen von *miR-1/206/133* sind komplex und zum Teil stadiumsspezifisch**

Die Ergebnisse dieser Arbeit heben gemeinsam mit vorangegangenen Studien wichtige Aspekte von microRNA Funktionen hervor. Zum einen scheinen Mitglieder aus der *miR-1/206/133* Familie eine zum Teil redundante Funktion zu besitzen und hierdurch für den Verlust einzelner miR-Cluster kompensieren zu können. Zum anderen agieren die Mitglieder der *miR-1/206/133* microRNA-Familie gewebsspezifisch. Eine wichtige Frage in der Erforschung dieser miRs ist, ob sie während der Entwicklung fortwährend dieselbe Funktion haben, oder stadiumsspezifisch unterschiedliche Targets besitzen.

Im Herzen ist in diesen Zusammenhang bereits eine gewebespezifische und stadiumsspezifische Funktion der beiden *miR-1/133a* Cluster bekannt. In diesem Gewebe haben die miRs eine essentielle Rolle während der embryonalen Herzentwicklung<sup>3</sup>. Aufgrund der auftretenden frühen embryonalen Letalität konnte eine funktionelle Analyse der beiden *miR-1/133a* Cluster im adulten Herzen mittels Funktionsverlust basierter Strategie bisher nicht durchgeführt werden. Jedoch weisen weiterführende Studien auf Basis eines induzierbaren Funktionsverlustmodells darauf hin, dass *miR-1/133a* ebenfalls eine wichtige Rolle in der adulten Herzmuskulatur spielt (Valussi, unveröffentlichte Daten). Zuvor wurden diese microRNAs lediglich getrennt voneinander, und nicht als eine funktionelle Einheit in diesem Gewebe untersucht<sup>34, 37, 45</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass eine Deletion beider *miR-1/133a* Cluster in adulten Kardiomyozyten in der Expression von fetalen und Zellzyklus-assoziierten Genen und in einem Wechsel von Fettsäureoxidation hin zur Glykolyse resultiert (Valussi, unveröffentlichte Daten). Somit konnten distinkte Rollen der beiden herzmuskelspezifisch exprimierten *miR-1/133a* Cluster sowohl während der Herzentwicklung, als auch in der adulten Herzmuskulatur nachgewiesen werden.

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass diese microRNAs in der adulten Skelettmuskulatur posttranskriptionell das MEF2A Level regulieren<sup>4</sup>. Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass ein kompletter *miR-1/206/133* Verlust zum neonatalen Tod führt, ist es interessant, ob der beschriebene Mechanismus in diesem Kontext ebenfalls im neonatalen Alter eine Rolle spielt. Es wurden hierbei zum einen Tiere mit einem kompletten Verlust aller Skelettmuskel exprimierten *miR-1/206/133* Familienmitgliedern (tKO) und ebenso Tiere mit einem Verlust von lediglich beiden *miR-1/133a* Clustern (dKO) bei diesen Analysen betrachtet. Hierbei zeigte sich, dass selbst nach einem vollständigen Verlust aller *miR-1/206/133* Cluster im Skelettmuskel keine gesteigerte Expression von MEF2A und keine Erhöhung der Expression *Dlk1-Dio3* Megaclusters im neonatalen Alter festgestellt werden kann. Auch die normal entwickelte mitochondriale Feinstruktur liefert weitere Evidenz, dass diese regulatorische Kaskade im neonatalen Stadium,

auf Grund einer entwicklungsstadiumspezifischen Regulation von MEF2A durch *miR-1/133a* nicht relevant zu sein scheint. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Regulation von MEF2A durch die miRs auf das adulte Stadium beschränkt zu sein scheint.

Im Kontrast hierzu scheint die Kontrolle des CRK Levels durch *miR-1/206/133* sowohl im neonatalen Alter, sowie in der adulten Skelettmuskulatur für die NMJ-Entwicklung und Homöostase essenziell zu sein (siehe 4.4.). Zudem scheint die synergistische Wirkung aller *miR-1/206/133* für diesen Prozess unabdingbar. Es ist bekannt, dass der skelettmuskelspezifische Verlust von CRK- und CRK-L zu einer gestörten neuromuskulären Entwicklung führt<sup>91</sup>. Interessanterweise konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass lediglich ein gesteigertes CRK Expressionslevel zu einer Störung der NMJ-Formation und -Homöostase führt. Dies lässt den Schluss zu, dass das Level von CRK sowohl während der Entwicklung, als auch in der adulten Skelettmuskulatur einer engen Kontrolle unterliegen muss. Somit scheint es sich bei der Regulation der CRK Expression um keinen Prozess, der nur in einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt auftritt zu handeln. Dies bedeutet, dass es sich bei der durch die *miR-1/206/133* vermittelte Kontrolle des CRK Levels um keine Entwicklungsstadiums-spezifische Funktion handelt.

Dies zeigt, dass die regulatorische Funktion von *miR-1/206/133* komplex ist und verschiedene Targets zum Teil stadiumsspezifisch reguliert werden, während andere scheinbar einer durchgängigen Kontrolle durch die miRs unterliegen müssen. All das scheint zudem stark abhängig von spezifischen zellulären Anforderungen zu sein. Die Kontrolle verschiedener Zielgene durch die selben miRs zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten, ist zum einen denkbar durch eine zeitlich unterschiedlich gesteuerte Expression der miR-Targets. Diese wäre wiederum abhängig von weiteren Molekülen wie Transkriptionsfaktoren. Zum anderen hängt die miR-vermittelte Regulation nicht nur von der Abundanz der Zielgene ab, sondern auch von der Expression der miRs, sowie von ihrer Stabilität<sup>204</sup>. Ein möglicher Mechanismus der Regulation der miR-Abundanz wäre beispielsweise eine Rückkopplungsschleife, wie sie bereits während der Herzentwicklung gezeigt werden konnte. Das Zielgen Myocardin reguliert hierbei positiv die Expression von *miR-1/133a* und bildet damit eine negative Rückkopplungsschleife, die für die frühe Herzentwicklung wesentlich ist<sup>3</sup>. Ein ähnliches regulatorisches Prinzip konnte auch für *miR-14* in der Modulierung der Ecdysonrezeptor-Aktivität gezeigt werden<sup>204, 205</sup>. All dies fügt eine weitere Ebene der Komplexität der posttranskriptionellen regulatorischen Aktivität dieser microRNAs hinzu und muss durch zukünftige Arbeiten weiter aufgeschlüsselt werden.

#### 4.7. *miR-1/206/133* reguliert über das CRK Level RAC1 abhängiges AChR-Clustering

##### 4.7.1. CRK Überexpression rekapituliert *miR-1/206/133* Knock-out Phänotyp *in vivo*

Der Knock-out von *miR-1/206/133* in der Skelettmuskulatur führt zu einer erhöhten Expression CRK, sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene. Eine gesteigerte CRK Expression kann nach Verlust der microRNAs während der Muskelentwicklung (tKO), als auch im adulten, voll ausdifferenzierten Skelettmuskel detektiert werden. Hieraus ergab sich die Hypothese, dass es sich bei der *Crk* mRNA um ein mögliches Ziel der microRNAs handeln könnte. Mittels bioinformatische Target-Prediction Software, in Kombination mit dualen Luciferase Reporterogene-Assays konnte *Crk* als ein neues, primäres Target der *miR-1/206/133* Familie in Skelettmuskelzellen validiert werden. Da der Verlust von *miR-1/206/133* im Skelettmuskel neben CRK einige weitere Gene reguliert, ergab sich die Frage, ob CRK tatsächlich, dass in diesem Fall das kritische regulatorische Ziel von *miR-1/206/133* darstellt.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden mehrere von den miRs unabhängige *in vivo* CRK Überexpressionsmodelle erzeugt und auf morphologisch-makroskopischer, histologischer und molekularer Ebene untersucht. Zur Analyse einer CRK Überexpression während der Skelettmuskelentwicklung wurden zwei voneinander unabhängige Mausmodelle etabliert (Crk-tg, Crk-SPH). Die beiden CRK Überexpressionsmausmodelle dienten der Überprüfung des Effekts einer erhöhten CRK Expression während der NMJ-Entwicklung. Mittels dieser beiden Modelle konnte eine mit dem tKO in etwa vergleichbare Expressionserhöhung von CRK auf RNA- bzw. Protein-Level erreicht werden. Es konnte zudem ebenfalls vergleichbar zum tKO eine neonatale Letalität bei unveränderter äußerer Morphologie und Körpergewicht festgestellt werden. In diesen *in vivo*-Modellen konnte eine phänotypisch analoge Veränderung der Innervierung des Diaphragmas, molekularen Änderungen in der GSEA und bei gleichzeitiger Reduktion der postsynaptischen Fläche festgestellt werden. Im Ganzen weisen beide Mauslinien auf allen Ebenen einen dem *miR-1/206/133* tKO Mausmodell sehr ähnlichen, neonatal letalen Phänotyp auf.

Zur Analyse adulter Mäuse, wurde ein Mausmodell mit einer induzierbaren skelettmuskelspezifischen CRK-Überexpression entwickelt (adult Crk-SPH). Dieses Modell diente der Analyse einer gesteigerten CRK-Expression im adulten ausdifferenzierten Skelettmuskel, wie sie auch im adulten tKO Mausmodell (adult tKO) auftritt. Interessanterweise ergab sich auch ein dem adulten tKO phänotypisch ähnliches Bild für dieses Modell im Skelettmuskel adulter Tiere. Morphologische, histologische und molekulare Analysen zeigten, dass sowohl in adulten induzierten *miR-1/206/133* tKO Tieren, als auch adulten Crk-SPH Tieren eine Störung der Homöostase der postsynaptischen Region der neuromuskulären Endplatten vorlag. Es zeigt sich in diesem Mausmodell auch Vergleichbares in Bezug auf Auswirkungen auf die postsynaptische neuromuskuläre Region, eine Verringerung des Muskelgewichts und Veränderungen in ihrer Motorik bzw. Koordinationsfähigkeit. Unterschiede zum adulten tKO wiesen die adulten CRK-Überexpressionsmäuse jedoch in der Geschwindigkeit der Ausbildung des neuromuskulären

Phänotyps auf. Die zeitliche Differenz bis zum Auftreten des Phänotyps könnte zum einen damit begründet werden, dass bei den adulten tKO Tieren erst die bereits im Muskel vorhandene microRNAs abgebaut werden müssen. Bei microRNAs handelt es sich um vergleichsweise stabile RNA-Moleküle<sup>200, 206</sup>. Des Weiteren gehören die Mitglieder der *miR-1/206/133* Familie zu den abundantesten microRNAs im Skelettmuskel überhaupt<sup>4, 182</sup>. Als Konsequenz hieraus wäre eine verstärkte Erhöhung des primären miR-Targets CRK auch erst später, nach entsprechender microRNA-Reduktion zu erwarten. Bei dem CRK-Überexpressionsmausmodell wird dagegen direkt eine verstärkte Expression von CRK getriggert, was die frühere Ausprägung des Phänotyps erklären könnte.

Durch vergleichende Untersuchungen von gleichaltrigen, entsprechenden adulten dKO Tieren konnte ausgeschlossen werden, dass *miR-1/133a* Knock-out Tiere ebenfalls einen neuromuskulären Phänotyp aufweisen. Dies könnte mit dem vermuteten kompensatorischen Effekt des im *miR-1/133a* dKO noch vorhandenen *miR-206/133b* Clusters begründet werden (siehe 4.1.). Zusammenfassend zeigte sich, dass alle CRK-Überexpressionsmodelle im jeweiligen Stadium (adult und neonatal) einen sehr ähnlichen Phänotyp (Phänokopie) auf allen Ebenen auf zu den korrespondierenden *miR-1/206/133* tKO Tieren aufwiesen. Dies zeigt deutlich, dass hauptsächlich die Überexpression von CRK für den tKO-Phänotyp sowohl im neonatalen, als auch im adulten Stadium verantwortlich ist. Somit scheint die posttranskriptionelle Regulation von CRK durch *miR-1/206/133* sowohl kritisch während der NMJ-Ausbildung, als auch für die Homöostase der postsynaptischen neuromuskulären Region zu sein.

#### **4.7.2. CRK Überexpression beeinflusst neuromuskuläres AChR-Clustering über RAC1 Aktivierung**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte mit der Aufklärung der posttranskriptionellen Regulation des CRK Levels durch *miR-1/206/133* zum weiteren Verständnis der Rolle von CRK in molekularen Prozessen während der NMJ-Entwicklung und Homöostase beigetragen werden. Es war bis zu diesem Zeitpunkt noch weitestgehend unklar welche weiteren CRK-vermittelten molekularen Vorgänge sich *downstream* der DOK7-CRK Interaktion abspielten. Wie beschrieben, interagiert CRK vermittelt durch seine SH2 Domäne mit DOK7 an der NMJ<sup>72, 91</sup>. Die SH3 Domäne von CRK ist wiederum in der Lage Interaktionen mit vielen verschiedenen Bindungspartnern mit Prolin-reichen Motiven zu vermitteln<sup>109, 207</sup>. Verschiedene Methoden, basierend auf der Analyse von Protein-Protein-Interaktionen dienten hierbei als Instrument zur Identifikation neuer, weiter *downstream*-gelegener CRK-Interaktionspartner. Unter den mit der SH3 Domäne von CRK-interagierenden Proteinen wurden in Fibroblasten in der Vergangenheit ebenfalls GEFs (*Guanosine triphosphate exchange factors*) identifiziert<sup>208</sup>. Diese Moleküle können wiederum positiv auf den Aktivierungsstatus von unter anderem kleinen GTPasen einwirken. In dieser Arbeit wurde basierend auf Co-Immunpräzipitation und Proximity Ligation Assays das Protein FARP1

(*FERM, ARH/RhoGEF And Pleckstrin Domain Protein 1*) als möglicher Interaktionspartner im Skelettmuskel identifiziert. Es konnte mittels dieser beiden voneinander unabhängiger Methoden gezeigt werden, dass die nach Verlust von *miR-1/206/133* erhöhte CRK Expression eine gesteigerte CRK-FARP1 Interaktion mit sich bringt.

Aus der Literatur ist bekannt, dass es sich bei FARP1 um ein postsynaptisches RAC1-GEF mit Prolin-reichen P-x-x-P-x-K Motiven handelt. Es vermittelt RAC1-Aktivierung in der postsynaptischen Region der Wirbelsäule und spielt dort eine Rolle in der postsynaptisch Zytoskelett-Dynamik *downstream* von SynCAM (*Synaptic cell adhesion molecule*)<sup>164</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte CRK-Expression in Skelettmuskelzellen, ebenfalls zu einer gesteigerten Aktivierung der kleinen GTPase RAC1 führt. Dies könnte wiederum durch eine potentielle CRK-FARP1 Interaktion vermittelt sein. Jedoch müssten weitere Analysen einen direkten Zusammenhang und Relevanz dieser Interaktion und einer gesteigerten RAC1-Aktivität im Skelettmuskel *in vivo* zeigen. Das postsynaptisch lokalisierte CRK könnte in diesem Kontext möglicherweise eine Rolle in der Rekrutierung von FARP1 und eventuell auch weiterer GEFs zu postsynaptischen Region *in vivo* vermitteln. Jedoch sind weitere Untersuchungen in diesen Zusammenhang notwendig.

Durch vorangegangenen Studien ist bekannt, dass eine gesteigerte RAC1-Aktivierung während der NMJ-Formation in einem gestörten Clustering von AChRs in der postsynaptischen Region resultiert. RAC1 und RHO scheinen hierbei antagonistisch im Prozess der Steuerung der Bildung und Aufrechterhaltung von neuromuskulären AChR-Clustern zu wirken<sup>123</sup>. Eine andauernde Aktivierung von RAC1 resultiert hierbei in einer Destabilisierung von AChR-Clustern. Es konnte gezeigt werden, dass es zur vermehrten Bildung von kleinen AChR-Mikroclustern bzw. zur Störungen in der Ausbildung von größeren AChR-Makroclustern kommt<sup>120, 122, 123</sup>. Diese Befunde konnten innerhalb dieser Arbeit bestätigt werden.

Weiter konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine Überexpression von CRK ebenfalls zur Ausbildung von vermehrt kleinen AChR-Mikroclustern und weniger großen AChR-Makrocluster führt. Auch *in vivo* konnte nach *miR-1/206/133* Verlust, welcher in einer gesteigerten CRK-Expression resultiert, vermehrt kleinere AChR-Cluster auf der Muskelfaseroberfläche detektiert werden. Um zu Untersuchen ob sich eine gesteigerte CRK Expression ebenfalls auf den Aktivierungsstatus von RAC1 auswirkt, wurde ein RAC-GTP *Pull-down* Assay durchgeführt. In Zellkultur-Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine CRK Überexpression in einer gesteigerten Aktivierung von RAC1 in Skelettmuskelzellen resultiert. Des Weiteren gibt eine Proteom-basierte Hauptkomponentenanalyse (PCA) Hinweise darauf, dass auch im tKO Mausmodell eine ebenfalls gesteigerte Aktivität kleiner GTPase vorliegt. Somit könnten diese CRK vermittelte RAC1 Aktivierung auch eine Relevanz für die Prozesse der NMJ-Formation und Homöostase *in vivo* haben. Jedoch müssten weiterführende Analysen zur Bestätigung durchgeführt werden.

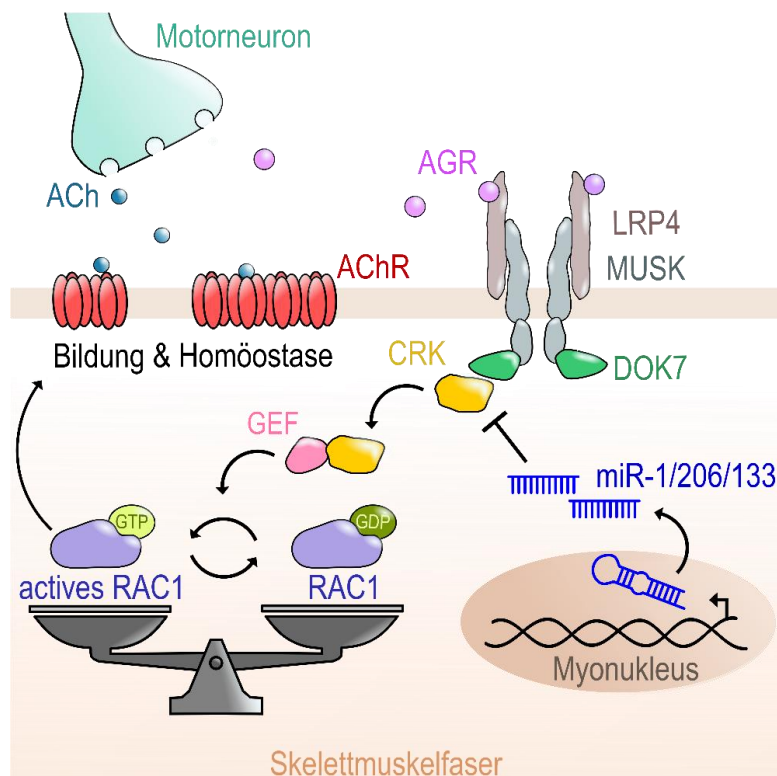
In der vorliegenden Arbeit wird auf Basis dieser Befunde die folgende Kausalkette postuliert: der Verlust von *miR-1/206/133* führt zu einer Expressionserhöhung von CRK, CRK interagiert vermehrt mit RAC1-GEF FARP1, eine gesteigerte CRK Expression resultiert in einer irregulären RAC1-Aktivierung, was wiederum zu Defekten in der postsynaptischen AChR-Cluster Ausbildung und Homöostase führt (siehe auch Abb. 4.8.). Hieraus könnte der beobachtete neuromuskuläre *miR-1/206/133* Knock-out Phänotyp resultieren.

#### 4.8. Fazit und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Funktion der microRNA Familie *miR-1/206/133* im neonatalen und adulten murinen Skelettmuskel. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen microRNAs um kritische Faktoren für die Ausbildung und Homöostase der neuromuskulären Synapse handelt. *miR-1/206/133* regulieren auf posttranskriptioneller Ebene synergistisch das Level des neu identifizierten primären microRNA Targets CRK im neonatalen und adulten Skelettmuskel. Die entsprechenden miR-Bindestellen in der *Crk* mRNA sind evolutionär konserviert. Es konnte weiter aufgedeckt werden, dass CRK *downstream* des LRP4-MUSK-DOK7 Komplexes mit dem postsynaptischen RAC1-GEF FARP1 zu interagieren scheint. Eine gesteigerte CRK Expression resultiert in einer irregulären RAC1 GTPase Aktivität und manifestiert sich in einer gestörter AChR-Cluster Bildung. Auf diesen Erkenntnissen basierend wurde ein Arbeitsmodell des molekularen Mechanismus der *miR-1/206/133* vermittelten Regulation des CRK Levels erstellt (Abb. 4.8.).

Die Mitglieder der *miR-1/206/133* Familie schaffen somit gemeinsam eine zusätzliche Ebene der posttranskriptionellen Inhibition. Dies erlaubt die Regulation von verschiedenen physiologischen Prozessen in Abhängigkeit der Konzentration der microRNAs, der Konzentration ihres Targets und dessen Auswirkungen in verschiedenen Entwicklungsstadien. Im Falle von CRK handelt es sich um ein ubiquitär exprimiertes Adapterprotein<sup>103</sup>, das je nach Entwicklungsstadium und zellulärem Kontext an den unterschiedlichsten Prozessen beteiligt ist<sup>103, 183</sup>. *miR-1/206/133* agieren durch ihre spezifische Expression zusätzlich als eine Art gewebespezifischer Repressor. Somit leisten diese microRNAs einen sehr wichtigen Beitrag in der Justierung und Modulation von Signalprozessen und können dadurch dramatisch die Komplexität von regulatorischen Interaktionsprozessen in einem Organismus erhöhen.

**Abbildung 4.8.: Arbeitsmodell der *miR-1/206/133* vermittelten Regulation von CRK und der nachfolgenden molekularen *downstream* Effekte an der neuromuskulären Synapse.** ACh= Acetylcholin; AChR= Acetylcholinrezeptoren; AGR= Agrin; DOK7= *Docking Protein 7*; GDP= Guanosindiphosphat GEF= GTP-Austauschfaktoren; GTP= Guanosintriphosphat; LRP4= *Low-density lipoprotein receptor-related protein 4*; MUSK= muskelspezifische Rezeptor-Tyrosinkinase. Abbildung 4.8. befindet sich auf der nachfolgenden Seite.



Die für die neuromuskuläre Koordination essentielle NMJ-Region macht lediglich weniger als 0,1 % der Muskelfaseroberfläche aus. Jedoch weist der postsynaptische Bereich über 95 % der AChRs auf <sup>209</sup>. In diesem Zusammenhang konnte in rezenten Studien mittels Einzelzell-RNA Sequenzierung gezeigt werden, dass Myonuklei der synzytial aufgebauten Muskelfasern ein heterogenes Expressionsprofil aufweisen und einzelne Subpopulationen bilden <sup>210, 211</sup>. Es ist bekannt, dass sich in vielen Vertebraten unter der NMJ kleine Myonuklei-Cluster formieren <sup>212</sup>. Im Kontext der vorliegenden Arbeit ist es nun interessant ob diese NMJ-assoziierten Myonuklei sich auch in der Expression der microRNAs *miR-1/206/133* oder von CRK von anderen Nuklei unterscheiden. Weiterführende Studien könnten aufdecken, ob die *miR-1/206/133* vermittelte Regulation des CRK Levels nicht nur gewebespezifisch ist, sondern auch an eine bestimmte subzelluläre Lokalisation geknüpft ist.

Vorrangegangene Arbeiten lieferten bisher keinerlei Erkenntnisse über die *miR-1/206/133* Familie als eine funktionelle Einheit <sup>2-4, 32-35, 46, 147, 195, 196</sup>. Trotz mancher offengebliebender Fragen, konnte in diesem Projekt mittels mehrerer *in vivo*-Modellen und einer Vielzahl an unterschiedlichen Methoden erstmalig, eine synergistische Funktion dieser in der gestreiften Muskulatur spezifisch exprimierten microRNA Familie aufgedeckt werden. Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit gewähren damit tiefe Einblicke in Wirkmechanismen und das kompensatorische Potential der abundantesten microRNA Familie der Skelettmuskulatur, sowohl während der Ontogenese, als auch im adulten Skelettmuskel. Diese Studie trägt damit entscheidend dazu bei, regulatorische Prozesse des Skelettmuskels im Ganzen besser zu begreifen.

## Referenzen

1. Boettger, T. & Braun, T. A new level of complexity: the role of microRNAs in cardiovascular development. *Circ Res* **110**, 1000-1013 (2012).
2. Boettger, T., Wüst, S., Nolte, H., Braun, T., The miR-206/133b cluster is dispensable for development, survival and regeneration of skeletal muscle. *Skeletal muscle* **4(1)**, 23 (2014).
3. Wystub, K., Besser, J., Bachmann, A., Boettger, T. & Braun, T. miR-1/133a Clusters Cooperatively Specify the Cardiomyogenic Lineage by Adjustment of Myocardin Levels during Embryonic Heart Development. *PLoS Genetics* **9** (2013).
4. Wust, S. *et al.* Metabolic Maturation during Muscle Stem Cell Differentiation Is Achieved by miR-1/133a-Mediated Inhibition of the Dlk1-Dio3 Mega Gene Cluster. *Cell Metab* **27**, 1026-1039 e1026 (2018).
5. Wightman, B., Ha, I., Ruvkun, G. Posttranscriptional Regulation of the Heterochronic Gene *lin-14* by *W-4* Mediates Temporal Pattern Formation in *C. elegans*. *Cell* **Vol. 75**, 855-862 (1993).
6. Lee, R.C., Feinbaum, L. R., Ambros, V. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell* **Vol. 75**, 843-854 (1993).
7. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T. Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science* **Vol 294**, 853-858 (2001).
8. Lau, N.C., Lim, L. P., Weinstein, E. G., Bartel, D. P. An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis elegans*. **Vol. 294(5543)**, 858-862 (2001).
9. Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S. & Bartel, D.P. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* **466**, 835-840 (2010).
10. Treiber, T., Treiber, N. & Meister, G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**, 5-20 (2019).
11. Bartel, D.P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215-233 (2009).
12. Olena, A.F. & Patton, J.G. Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol* **222**, 540-545 (2010).
13. O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y. & Peng, C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* **9**, 402 (2018).
14. Hayder H, O.B.J., Nadeem U, Peng C. MicroRNAs: crucial regulators of placental development. *Reproduction* **155**, R259-R271 (2018).
15. Ha, M. & Kim, V.N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 509-524 (2014).
16. Kehl T, B.C., Kern F, Fehlmann T, Ludwig N, Meese E, Lenhof HP, Keller A. About miRNAs, miRNA seeds, target genes and target pathways. *Oncotarget* **63**, 107167 (2017).
17. Lytle, J.R., Yario, T.A., Steitz, J.A. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **5**, 9667-9672 (2007).
18. Fang, Z. & Rajewsky, N. The impact of miRNA target sites in coding sequences and in 3'UTRs. *PLoS One* **6**, e18067 (2011).
19. Jha, A., Panzade, G., Pandey, R. & Shankar, R. A legion of potential regulatory sRNAs exists beyond the typical microRNAs microcosm. *Nucleic Acids Res* **43**, 8713-8724 (2015).
20. Londin, E. *et al.* Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E1106-1115 (2015).
21. Quillet, A. *et al.* Improving Bioinformatics Prediction of microRNA Targets by Ranks Aggregation. *Front Genet* **10**, 1330 (2019).



22. Xie, X., Lu, J., Kulbokas, E.J., Golub, T.R., Mootha, V., Lindblad-Toh, K., Lander, E.S. and Kellis, M., Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature* **434(7031)**, 338-345 (2005).
23. Lewis, B.P., Burge, C.B. & Bartel, D.P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**, 15-20 (2005).
24. Lee, C.T., Risom, T. & Strauss, W.M. Evolutionary conservation of microRNA regulatory circuits: an examination of microRNA gene complexity and conserved microRNA-target interactions through metazoan phylogeny. *DNA Cell Biol* **26**, 209-218 (2007).
25. Moran, Y., Agron, M., Praher, D. & Technau, U. The evolutionary origin of plant and animal microRNAs. *Nat Ecol Evol* **1**, 27 (2017).
26. Grimson, A. *et al.* Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature* **455**, 1193-1197 (2008).
27. Peterson, K.J., Dietrich, M.R. & McPeck, M.A. MicroRNAs and metazoan macroevolution: insights into canalization, complexity, and the Cambrian explosion. *Bioessays* **31**, 736-747 (2009).
28. Sonawane, A.R. *et al.* Understanding Tissue-Specific Gene Regulation. *Cell Rep* **21**, 1077-1088 (2017).
29. Niehrs, C., Pollet, N. Synexpression groups in eukaryotes. *Nature* **402(6761)**, 483-487 (1999).
30. Horak, M., Novak, J. & Bienertova-Vasku, J. Muscle-specific microRNAs in skeletal muscle development. *Dev Biol* **410**, 1-13 (2016).
31. Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nature* **431(7006)**, 350-355 (2004).
32. McCarthy, J.J. MicroRNA-206: the skeletal muscle-specific myomiR. *Biochim Biophys Acta* **1779**, 682-691 (2008).
33. Chen, J.F. *et al.* The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* **38**, 228-233 (2006).
34. Zhao, Y. & Srivastava, D. A developmental view of microRNA function. *Trends Biochem Sci* **32**, 189-197 (2007).
35. Townley-Tilson, W.H., Callis, T.E. & Wang, D. MicroRNAs 1, 133, and 206: critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function, and disease. *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 1252-1255 (2010).
36. van Rooij, E. Cardiac MicroRNAs, in *Muscle* 341-351 (2012).
37. Liu, N. *et al.* microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes & Development* **22**, 3242-3254 (2008).
38. Lee, R.C., Ambros, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **294(5543)**, 862-864 (2001).
39. Liu, N., Williams, A.H., Kim, Y., McAnally, J., Bezprozvannaya, S., Sutherland, L.B., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., Olson, E.N. An intragenic MEF2-dependent enhancer directs muscle-specific expression of microRNAs 1 and 133. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104(52)**, 20844-20849 (2007).
40. Niu, Z., Li, A., Zhang, S.X. & Schwartz, R.J. Serum response factor micromanaging cardiogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 618-627 (2007).
41. Sweetman, D. *et al.* Specific requirements of MRFs for the expression of muscle specific microRNAs, miR-1, miR-206 and miR-133. *Developmental Biology* **321**, 491-499 (2008).
42. Lu, J., McKinsey, T.A., Zhang, C.L., Olson, E.N., Regulation of skeletal myogenesis by association of the MEF2 transcription factor with class II histone deacetylases. *Molecular cell* **6(2)**, 233-244 (2000).
43. Ikeda, S. *et al.* MicroRNA-1 negatively regulates expression of the hypertrophy-associated calmodulin and Mef2a genes. *Mol Cell Biol* **29**, 2193-2204 (2009).

44. Zhao, Y., Samal, E. & Srivastava, D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* **436**, 214-220 (2005).
45. Heidersbach, A. *et al.* microRNA-1 regulates sarcomere formation and suppresses smooth muscle gene expression in the mammalian heart. *eLife* **2** (2013).
46. Besser, J. *et al.* MiRNA-1/133a clusters regulate adrenergic control of cardiac repolarization. *PLoS One* **9**, e113449 (2014).
47. Williams, A.H., Valdez, G., Moresi, V., Qi, X., McAnally, J., Elliott, J.L., Bassel-Duby, R., Sanes, J.R., Olson, E.N., MicroRNA-206 delays ALS progression and promotes regeneration of neuromuscular synapses in mice. *Science* **326(5959)**, 1549-1554 (2009).
48. Schmidt, R.F., Schaible, H.G., Schmidt, R.F. Neuro-und sinnesphysiologie. (2006).
49. Huxley, A.F.a.N., R. Structural changes in muscle during contraction: interference microscopy of living muscle fibres. *Nature* **173(4412)**, 971-973 (1954).
50. Cooper, G.M. The cell: a molecular approach. **2nd Edition** (2000).
51. Buckingham, M., Bajard, L., Chang, T., Daubas, P., Hadchouel, J., Meilhac, S., Montarras, D., Rocancourt, D., Relaix, F. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *Journal of anatomy* **202(1)**, 59-68 (2003).
52. Tajbakhsh, S., & Spörle, R. Somite development: constructing the vertebrate body. *Cell* **92(1)**, 9-16 (1998).
53. Hubaud, A. & Pourquié, O. Signalling dynamics in vertebrate segmentation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15**, 709-721 (2014).
54. Chal, J. & Pourquie, O. Making muscle: skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *Development* **144**, 2104-2122 (2017).
55. Kajimura, S., Seale, P. & Spiegelman, B.M. Transcriptional control of brown fat development. *Cell Metab* **11**, 257-262 (2010).
56. Stockdale, F.E. Myogenic cell lineages. *Developmental biology* **154(2)**, 284-298 (1992).
57. Biressi, S., Molinaro, M. & Cossu, G. Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development. *Dev Biol* **308**, 281-293 (2007).
58. Hernandez-Hernandez, J.M., Garcia-Gonzalez, E.G., Brun, C.E. & Rudnicki, M.A. The myogenic regulatory factors, determinants of muscle development, cell identity and regeneration. *Semin Cell Dev Biol* **72**, 10-18 (2017).
59. Hinterberger, T.J., Sassoon, D.A., Rhodes, S.J., Konieczny, S.F. Expression of the muscle regulatory factor MRF4 during somite and skeletal myofiber development. *Developmental biology* **147(1)**, 144-156 (1991).
60. Sassoon, D., Lyons, G., Wright, W.E., Lin, V., Lassar, A., Weintraub, H., Buckingham, M. Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and MyoD during mouse embryogenesis. *Nature* **341(6240)**, 303-307 (1989).
61. Kablar, B., Krastel, K., Ying, C., Tapscott, S.J., Goldhamer, D.J., Rudnicki, M.A. Myogenic determination occurs independently in somites and limb buds. *Developmental biology* **206(2)**, 219-231 (1999).
62. Shi, X. & Garry, D.J. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes & Development* **20**, 1692-1708 (2006).
63. White, R.B., Biérinx, A.S., Gnocchi, V.F. and Zammit, P.S. Dynamics of muscle fibre growth during postnatal mouse development. *BMC developmental biology* **10(1)**, p.21 (2010).
64. Oustanina, S., Hause, G. & Braun, T. Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. *EMBO J* **23**, 3430-3439 (2004).
65. Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A. & Buckingham, M. A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* **435**, 948-953 (2005).
66. Schutt, C. *et al.* Linc-MYH configures INO80 to regulate muscle stem cell numbers and skeletal muscle hypertrophy. *EMBO J*, e105098 (2020).
67. Yamakawa, H., Kusumoto, D., Hashimoto, H. & Yuasa, S. Stem Cell Aging in Skeletal Muscle Regeneration and Disease. *Int J Mol Sci* **21** (2020).

68. von Maltzahn, J., Jones, A.E., Parks, R.J. & Rudnicki, M.A. Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 16474-16479 (2013).
69. Rayagiri, S.S. *et al.* Basal lamina remodeling at the skeletal muscle stem cell niche mediates stem cell self-renewal. *Nat Commun* **9**, 1075 (2018).
70. Abmayr, S.M. & Pavlath, G.K. Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Development* **139**, 641-656 (2012).
71. Martineau, E., Di Polo, A., Vande Velde, C. & Robitaille, R. Dynamic neuromuscular remodeling precedes motor-unit loss in a mouse model of ALS. *Elife* **7** (2018).
72. Hamuro, J. *et al.* Mutations causing DOK7 congenital myasthenia ablate functional motifs in Dok-7. *J Biol Chem* **283**, 5518-5524 (2008).
73. Arimura, S. *et al.* Neuromuscular disease. DOK7 gene therapy benefits mouse models of diseases characterized by defects in the neuromuscular junction. *Science* **345**, 1505-1508 (2014).
74. Gonzalez-Freire, M., de Cabo, R., Studenski, S.A. & Ferrucci, L. The Neuromuscular Junction: Aging at the Crossroad between Nerves and Muscle. *Front Aging Neurosci* **6**, 208 (2014).
75. Kuo, I.Y. & Ehrlich, B.E. Signaling in muscle contraction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, a006023 (2015).
76. Liu, W. & Chakkalakal, J.V. The Composition, Development, and Regeneration of Neuromuscular Junctions. *Curr Top Dev Biol* **126**, 99-124 (2018).
77. Wu, H., Xiong, W.C. & Mei, L. To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly. *Development* **137**, 1017-1033 (2010).
78. Li, L., Xiong, W.C. & Mei, L. Neuromuscular Junction Formation, Aging, and Disorders. *Annu Rev Physiol* **80**, 159-188 (2018).
79. Kim, N. *et al.* Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK. *Cell* **135**, 334-342 (2008).
80. Zhang, B. *et al.* LRP4 serves as a coreceptor of agrin. *Neuron* **60**, 285-297 (2008).
81. Okada, K., Inoue, A., Okada, M., Murata, Y., Kakuta, S., Jigami, T., Kubo, S., Shiraishi, H., Eguchi, K., Motomura, M., Akiyama, T. The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis. *Science* **312(5781)**, 1802-1805 (2006).
82. Inoue, A., Setoguchi, K., Matsubara, Y., Okada, K., Sato, N., Iwakura, Y., Higuchi, O., Yamanashi, Y. Dok-7 activates the muscle receptor kinase MuSK and shapes synapse formation. *Science signaling* **2(59)**, ra7-ra7 (2009).
83. Burden, S.J., Yumoto, N. & Zhang, W. The role of MuSK in synapse formation and neuromuscular disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a009167 (2013).
84. Weatherbee, S.D., Anderson, K.V. & Niswander, L.A. LDL-receptor-related protein 4 is crucial for formation of the neuromuscular junction. *Development* **133**, 4993-5000 (2006).
85. DeChiara, T.M., Bowen, D.C., Valenzuela, D.M., Simmons, M.V., Poueymirou, W.T., Thomas, S., Kinetz, E., Compton, D.L., Rojas, E., Park, J.S., Smith, C. The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell* **85(4)**, 501-512 (1996).
86. Gautam, M., Noakes, P.G., Mudd, J., Nichol, M., Chu, G.C., Sanes, J.R., Merlie, J.P. Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature* **377(6546)**, 232-236 (1995).
87. Messeant, J. *et al.* MuSK frizzled-like domain is critical for mammalian neuromuscular junction formation and maintenance. *J Neurosci* **35**, 4926-4941 (2015).
88. Remédio, L., Gribble, K.D., Lee, J.K., Kim, N., Hallock, P.T., Delestrée, N., Mentis, G.Z., Froemke, R.C., Granato, M., Burden, S.J., Diverging roles for Lrp4 and Wnt signaling in neuromuscular synapse development during evolution. *Genes & development* **30(9)**, 1058-1069 (2016).

89. Burden, S.J., Huijbers, M.G. & Remedio, L. Fundamental Molecules and Mechanisms for Forming and Maintaining Neuromuscular Synapses. *Int J Mol Sci* **19** (2018).
90. Hesser, B.A., Henschel, O. & Witzemann, V. Synapse disassembly and formation of new synapses in postnatal muscle upon conditional inactivation of MuSK. *Molecular and Cellular Neuroscience* **31**, 470-480 (2006).
91. Hallock, P.T. *et al.* Dok-7 regulates neuromuscular synapse formation by recruiting Crk and Crk-L. *Genes Dev* **24**, 2451-2461 (2010).
92. Sobel, A., Heidmann, T., Hofler, J., Changeux, J.P., Distinct protein components from *Torpedo marmorata* membranes carry the acetylcholine receptor site and the binding site for local anesthetics and histrionicotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **75(1)**, 510-514 (1978).
93. Apel, E.D., Roberds, S.L., Campbell, K.P., Merlie, J.P. Rapsyn may function as a link between the acetylcholine receptor and the agrin-binding dystrophin-associated glycoprotein complex. *Neuron* **15(1)**, 115-126 (1995).
94. Luo, S. *et al.* HSP90 beta regulates rapsyn turnover and subsequent AChR cluster formation and maintenance. *Neuron* **60**, 97-110 (2008).
95. Lin, W., Burgess, R.W., Dominguez, B., Pfaff, S.L., Sanes, J.R., Lee, K.F. Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nature* **410(6832)**, 1057-1064 (2001).
96. Gaudon, K. *et al.* Multiexon deletions account for 15% of congenital myasthenic syndromes with RAPSN mutations after negative DNA sequencing. *J Med Genet* **47**, 795-796 (2010).
97. Maselli, R.A. *et al.* Mutations in MUSK causing congenital myasthenic syndrome impair MuSK-Dok-7 interaction. *Hum Mol Genet* **19**, 2370-2379 (2010).
98. Rodriguez Cruz, P.M. *et al.* Congenital myasthenic syndrome due to mutations in MUSK suggests that the level of MuSK phosphorylation is crucial for governing synaptic structure. *Hum Mutat* **41**, 619-631 (2020).
99. Engel, A.G., Shen, X.M., Selcen, D. & Sine, S.M. What have we learned from the congenital myasthenic syndromes. *J Mol Neurosci* **40**, 143-153 (2010).
100. Shi, L., Fu, A.K. & Ip, N.Y. Molecular mechanisms underlying maturation and maintenance of the vertebrate neuromuscular junction. *Trends Neurosci* **35**, 441-453 (2012).
101. Hallock, P.T., Chin, S., Blais, S., Neubert, T.A. & Glass, D.J. Sorbs1 and -2 Interact with CrkL and Are Required for Acetylcholine Receptor Cluster Formation. *Mol Cell Biol* **36**, 262-270 (2016).
102. Mayer, B.J., Hamaguchi, M., Hanafusa, H., A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* **53**, 907-914 (1988).
103. Birge, R.B., Kalodimos, C., Inagaki, F. & Tanaka, S. Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling. *Cell Commun Signal* **7**, 13 (2009).
104. Reichman, C.T., Mayer, B.J., Keshav, S. and Hanafusa, H. The product of the cellular crk gene consists primarily of SH2 and SH3 regions. *Cell Growth Differ.* **3(7)**, 451-460 (1992).
105. Li, S.S. Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochem J* **390**, 641-653 (2005).
106. Liu, B.A. & Nash, P.D. Evolution of SH2 domains and phosphotyrosine signalling networks. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **367**, 2556-2573 (2012).
107. Matsuda, M., Tanaka, S., Nagata, S., Kojima, A., Kurata, T., Shibuya, M. Two species of human CRK cDNA encode proteins with distinct biological activities. *Molecular and cellular biology* **12(8)**, 3482-3489 (1992).
108. Flynn, D.C. Adaptor proteins. *Oncogen.* **20(44)**, 6270-6272 (2001).
109. Feller, S.M. Crk family adaptors—signalling complex formation and biological roles. *Oncogene* **20(44)**, 6348-6371 (2001).

110. Moore, C.A., Parkin, C.A., Bidet, Y. & Ingham, P.W. A role for the Myoblast city homologues Dock1 and Dock5 and the adaptor proteins Crk and Crk-like in zebrafish myoblast fusion. *Development* **134**, 3145-3153 (2007).
111. Fagerberg, L. *et al.* Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics* **13**, 397-406 (2014).
112. Valenzuela, D.M., Stitt, T.N., DiStefano, P.S., Rojas, E., Mattsson, K., Compton, D.L., Nunez, L., Park, J.S., Stark, J.L., Gies, D.R., Thomas, S. Receptor tyrosine kinase specific for the skeletal muscle lineage: expression in embryonic muscle, at the neuromuscular junction, and after injury. *Neuron* **15(3)**, 573-584 (1995).
113. Bai, Y., Xiang, X., Liang, C. & Shi, L. Regulating Rac in the nervous system: molecular function and disease implication of Rac GEFs and GAPs. *Biomed Res Int* **2015**, 632450 (2015).
114. Symons, M., Settleman, J. Rho family GTPases: more than simple switches. *Trends in cell biology* **10(10)**, 415-419 (2000).
115. Ponimaskin, E., Voyno-Yasenetskaya, T., Richter, D.W., Schachner, M. & Dityatev, A. Morphogenic signaling in neurons via neurotransmitter receptors and small GTPases. *Mol Neurobiol* **35**, 278-287 (2007).
116. Jaffe, A.B. & Hall, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 247-269 (2005).
117. Etienne-Manneville, S., Hall, A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420(6916)**, 629-635 (2002).
118. Nizhynska, V., Neumueller, R. & Herbst, R. Phosphoinositide 3-kinase acts through RAC and Cdc42 during agrin-induced acetylcholine receptor clustering. *Dev Neurobiol* **67**, 1047-1058 (2007).
119. Shi, L. *et al.* Ephexin1 is required for structural maturation and neurotransmission at the neuromuscular junction. *Neuron* **65**, 204-216 (2010).
120. Weston, C. *et al.* Cooperative regulation by Rac and Rho of agrin-induced acetylcholine receptor clustering in muscle cells. *J Biol Chem* **278**, 6450-6455 (2003).
121. Kumari, S. *et al.* Nicotinic acetylcholine receptor is internalized via a Rac-dependent, dynamin-independent endocytic pathway. *J Cell Biol* **181**, 1179-1193 (2008).
122. Weston, C., Yee, B., Hod, E., Prives, J., Agrin-induced Acetylcholine Receptor Clustering Is Mediated by the Small Guanosine Triphosphatases Rac and Cdc42. *The Journal of cell biology* **150(1)**, 205-212 (2000).
123. Bai, Y. *et al.* Balanced Rac1 activity controls formation and maintenance of neuromuscular acetylcholine receptor clusters. *J Cell Sci* **131** (2018).
124. Betel, D., Wilson, M., Gabow, A., Marks, D.S. & Sander, C. The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res* **36**, D149-153 (2008).
125. Keller, C., Hansen, M.S., Coffin, C.M. & Capecchi, M.R. Pax3:Fkhr interferes with embryonic Pax3 and Pax7 function: implications for alveolar rhabdomyosarcoma cell of origin. *Genes Dev* **18**, 2608-2613 (2004).
126. Murphy, M.M., Lawson, J.A., Mathew, S.J., Hutcheson, D.A. & Kardon, G. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development* **138**, 3625-3637 (2011).
127. McCarthy, J.J., Srikuea, R., Kirby, T.J., Peterson, C.A. & Esser, K.A. Inducible Cre transgenic mouse strain for skeletal muscle-specific gene targeting. *Skelet Muscle* **2**, 8 (2012).
128. Rao, P. & Monks, D.A. A tetracycline-inducible and skeletal muscle-specific Cre recombinase transgenic mouse. *Dev Neurobiol* **69**, 401-406 (2009).
129. Schuler, M., Ali, F., Metzger, E., Chambon, P. & Metzger, D. Temporally controlled targeted somatic mutagenesis in skeletal muscles of the mouse. *Genesis* **41**, 165-170 (2005).

130. Lobe, C.G., Koop, K.E., Kreppner, W., Lomeli, H., Gertsenstein, M., Nagy, A. Z/AP, a double reporter for cre-mediated recombination. *Developmental biology* **208(2)**, 281-292 (1999).
131. T Das, A., Tenenbaum, L., Berkhout, B. Tet-on systems for doxycycline-inducible gene expression. *Current gene therapy* **16(3)**, 156-167 (2016).
132. Zhou, H. *et al.* In vivo simultaneous transcriptional activation of multiple genes in the brain using CRISPR-dCas9-activator transgenic mice. *Nat Neurosci* **21**, 440-446 (2018).
133. Balboa, D. *et al.* Conditionally Stabilized dCas9 Activator for Controlling Gene Expression in Human Cell Reprogramming and Differentiation. *Stem Cell Reports* **5**, 448-459 (2015).
134. Horlbeck, M.A. *et al.* Compact and highly active next-generation libraries for CRISPR-mediated gene repression and activation. *Elife* **5** (2016).
135. Brooks, S.P. & Dunnett, S.B. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat Rev Neurosci* **10**, 519-529 (2009).
136. Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J.V. & Mann, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* **1**, 2856-2860 (2006).
137. Kiweler, M., Looso, M. & Graumann, J. MARMoSET - Extracting Publication-ready Mass Spectrometry Metadata from RAW Files. *Mol Cell Proteomics* **18**, 1700-1702 (2019).
138. Cox, J. *et al.* Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics* **13**, 2513-2526 (2014).
139. Cox, J. & Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* **26**, 1367-1372 (2008).
140. Cox, J. *et al.* Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J Proteome Res* **10**, 1794-1805 (2011).
141. Ritchie, M.E. *et al.* limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* **43**, e47 (2015).
142. Weston, C., Yee, B., Hod, E. & Prives, J. Agrin-induced acetylcholine receptor clustering is mediated by the small guanosine triphosphatases Rac and Cdc42. *Journal of Cell Biology* **150**, 205-212 (2000).
143. Wilkinson, D.G. *In Situ Hybridization: A Practical Approach*. (Oxford University Press, Oxford; 1992).
144. Koutsoulidou, A., Mastrogiannopoulos, N.P., Furling, D., Uney, J.B. & A., P.L. Expression of miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-206 increases during development of human skeletal muscle. *BMC Developmental Biology* **11:34** (2011).
145. Mitchelson, K.R. & Qin, W.Y. Roles of the canonical myomiRs miR-1, -133 and -206 in cell development and disease. *World J Biol Chem* **6**, 162-208 (2015).
146. Liu, W. & Wang, X. Prediction of functional microRNA targets by integrative modeling of microRNA binding and target expression data. *Genome Biol* **20**, 18 (2019).
147. Kim, H.K., Lee, Y.S., Sivaprasad, U., Malhotra, A. & Dutta, A. Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. *J Cell Biol* **174**, 677-687 (2006).
148. Khodabukus, A., Prabhu, N., Wang, J. & Bursac, N. In Vitro Tissue-Engineered Skeletal Muscle Models for Studying Muscle Physiology and Disease. *Adv Healthc Mater* **7**, e1701498 (2018).
149. Meyer-Dilhet, G. & Courchet, J. In Utero Cortical Electroporation of Plasmids in the Mouse Embryo. *STAR Protocols* **1** (2020).
150. Trajkovski, M., Ahmed, K., Esau, C.C. & Stoffel, M. MyomiR-133 regulates brown fat differentiation through Prdm16. *Nat Cell Biol* **14**, 1330-1335 (2012).
151. Yin, H. *et al.* MicroRNA-133 controls brown adipose determination in skeletal muscle satellite cells by targeting Prdm16. *Cell Metab* **17**, 210-224 (2013).
152. Liu, W. *et al.* miR-133a regulates adipocyte browning in vivo. *PLoS Genet* **9**, e1003626 (2013).

153. Gill, J.A. & La Merrill, M.A. An emerging role for epigenetic regulation of Pgc-1alpha expression in environmentally stimulated brown adipose thermogenesis. *Environ Epigenet* **3**, dvx009 (2017).
154. Turgeon, B. & Meloche, S. Interpreting neonatal lethal phenotypes in mouse mutants: insights into gene function and human diseases. *Physiol Rev* **89**, 1-26 (2009).
155. Boase, N.A. *et al.* Respiratory distress and perinatal lethality in Nedd4-2-deficient mice. *Nat Commun* **2**, 287 (2011).
156. Genabai, N.K. *et al.* Deregulation of ZPR1 causes respiratory failure in spinal muscular atrophy. *Sci Rep* **7**, 8295 (2017).
157. Betel, D., Koppal, A., Agius, P., Sander, C. & Leslie, C. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol* **11**, R90 (2010).
158. Rao, P.K., Kumar, R.M., Farkhondeh, M., Baskerville, S., Lodish, H.F. Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103(23)**, 8721-8726 (2006).
159. Chavez, A. *et al.* Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat Methods* **12**, 326-328 (2015).
160. Guy, J., Hendrich, B., Holmes, M., Martin, J.E. & Bird, A. A mouse Mecp2-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *nature genetics* **27** (2001).
161. Hayward, L.J. *et al.* Targeted mutation of mouse skeletal muscle sodium channel produces myotonia and potassium-sensitive weakness. *J Clin Invest* **118**, 1437-1449 (2008).
162. Eguchi, T., Tezuka, T., Miyoshi, S. & Yamanashi, Y. Postnatal knockdown of dok-7 gene expression in mice causes structural defects in neuromuscular synapses and myasthenic pathology. *Genes Cells* **21**, 670-676 (2016).
163. Han, H. Nonnegative principal component analysis for mass spectral serum profiles and biomarker discovery. *BMC Bioinformatics* **11 Suppl 1**, S1 (2010).
164. Cheadle, L. & Biederer, T. The novel synaptogenic protein Farp1 links postsynaptic cytoskeletal dynamics and transsynaptic organization. *J Cell Biol* **199**, 985-1001 (2012).
165. Hall, A.B. *et al.* Requirements for Vav guanine nucleotide exchange factors and Rho GTPases in FcgammaR- and complement-mediated phagocytosis. *Immunity* **24**, 305-316 (2006).
166. Mourelatos, Z. *et al.* miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev* **16**, 720-728 (2002).
167. Kusakabe, R. *et al.* Characterization of the compact bicistronic microRNA precursor, miR-1/miR-133, expressed specifically in Ciona muscle tissues. *Gene Expr Patterns* **13**, 43-50 (2013).
168. Bartel, P.D. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* **Vol. 116**, 281-297 (2004).
169. Sieber, P., Wellmer, F., Gheyselinck, J., Riechmann, J.L. & Meyerowitz, E.M. Redundancy and specialization among plant microRNAs: role of the MIR164 family in developmental robustness. *Development* **134**, 1051-1060 (2007).
170. Wu, J. *et al.* Two miRNA clusters, miR-34b/c and miR-449, are essential for normal brain development, motile ciliogenesis, and spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E2851-2857 (2014).
171. Gu, K.L. *et al.* Pluripotency-associated miR-290/302 family of microRNAs promote the dismantling of naive pluripotency. *Cell Res* **26**, 350-366 (2016).
172. Rosenberg, M.I., Georges, S.A., Asawachaicharn, A., Analau, E. & Tapscott, S.J. MyoD inhibits Fstl1 and Utrn expression by inducing transcription of miR-206. *J Cell Biol* **175**, 77-85 (2006).
173. Jingting, S. *et al.* Oxidative and glycolytic skeletal muscles show marked differences in gene expression profile in Chinese Qingyuan partridge chickens. *PLoS One* **12**, e0183118 (2017).

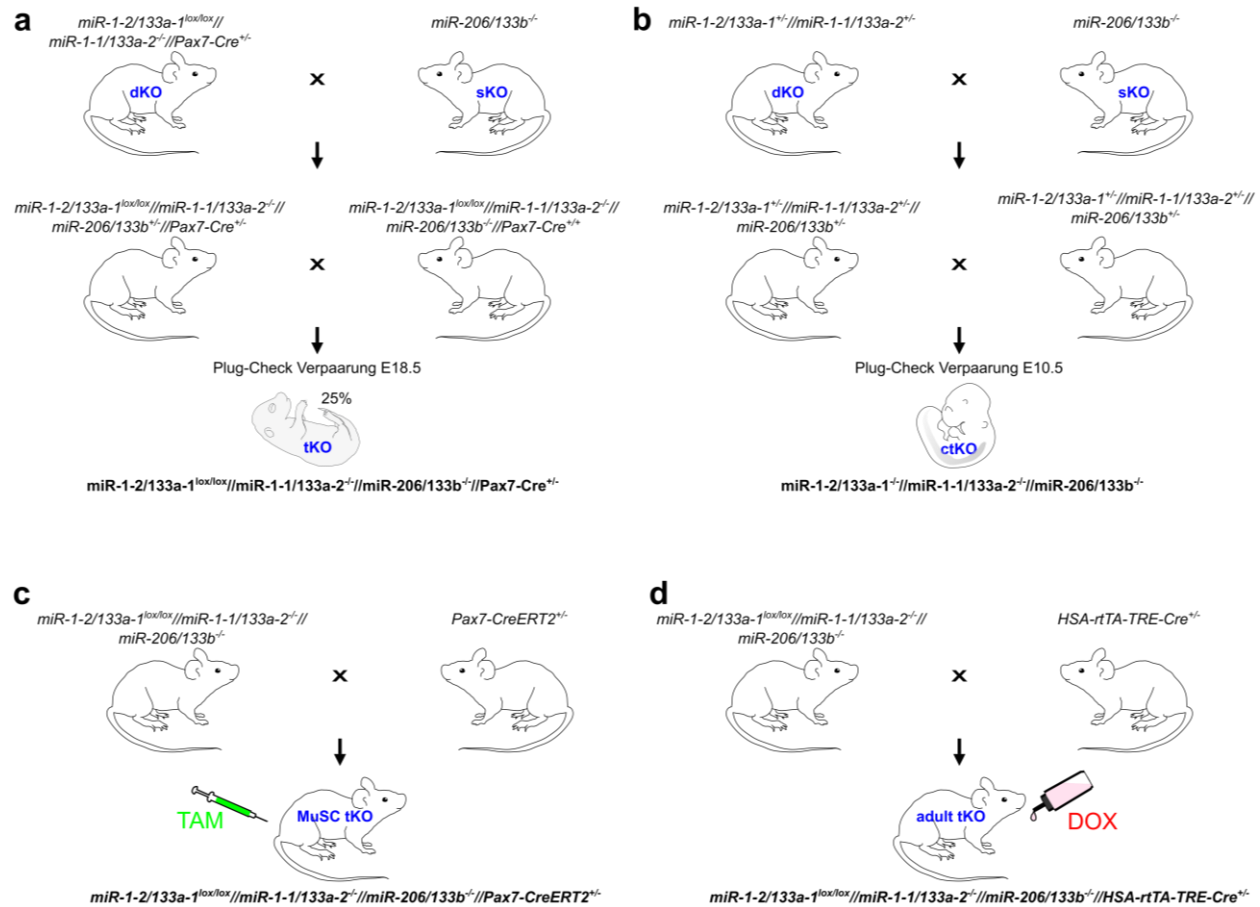
174. Soyol, S.M. *et al.* The PPARGC1A locus and CNS-specific PGC-1alpha isoforms are associated with Parkinson's Disease. *Neurobiol Dis* **121**, 34-46 (2019).
175. Prince, V.L., A. Hoxa-2 expression in normal and transposed rhombomeres: independent regulation in the neural tube and neural crest. *Development* **120(4)**, 911-923 (1994).
176. Yoshida, T. *et al.* Evaluation of off-target effects of gapmer antisense oligonucleotides using human cells. *Genes Cells* **24**, 827-835 (2019).
177. Baumann, V. & Winkler, J. miRNA-based therapies: strategies and delivery platforms for oligonucleotide and non-oligonucleotide agents. *Future Med Chem* **6**, 1967-1984 (2014).
178. Stenvang, J., Petri, A., Lindow, M., Obad, S. & Kauppinen, S. Inhibition of microRNA function by antimiR oligonucleotides. *Silence* **3**, 1 (2012).
179. Zhang, X. *et al.* Syne-1 and Syne-2 play crucial roles in myonuclear anchorage and motor neuron innervation. *Development* **134**, 901-908 (2007).
180. Li, M.O., Sarkisian, M.R., Mehal, W.Z., Rakic, P., Flavell, R.A. Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells. *Science* **302(5650)**, 1560-1563 (2003).
181. Ferguson, S.M., Bazalakova, M., Savchenko, V., Tapia, J.C., Wright, J., Blakely, R.D. Lethal impairment of cholinergic neurotransmission in hemicholinium-3-sensitive choline transporter knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101(23)**, 8762-8767 (2004).
182. Kuchen, S. *et al.* Regulation of microRNA expression and abundance during lymphopoiesis. *Immunity* **32**, 828-839 (2010).
183. Bell, E.S. & Park, M. Models of crk adaptor proteins in cancer. *Genes Cancer* **3**, 341-352 (2012).
184. Collins, T.N. *et al.* Crk proteins transduce FGF signaling to promote lens fiber cell elongation. *Elife* **7** (2018).
185. Feller, S.M. Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles. *Oncogene* **20**, 6348-6371 (2001).
186. Pawson, T., Nash, P. Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* **300(5618)**, 445-452 (2003).
187. Ren, R., Mayer, B.J., Cicchetti, P., Baltimore, D. Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* **259(5098)**, 1157-1161 (1993).
188. Muller, J.S. *et al.* Phenotypical spectrum of DOK7 mutations in congenital myasthenic syndromes. *Brain* **130**, 1497-1506 (2007).
189. Beeson, D., Higuchi, O., Palace, J., Cossins, J., Spearman, H., Maxwell, S., Newsom-Davis, J., Burke, G., Fawcett, P., Motomura, M., Müller, J.S. Dok-7 mutations underlie a neuromuscular junction synaptopathy. *Science* **313(5795)**, 1975-1978 (2006).
190. Bruno, D.L. *et al.* Further molecular and clinical delineation of co-locating 17p13.3 microdeletions and microduplications that show distinctive phenotypes. *J Med Genet* **47**, 299-311 (2010).
191. Simon, D.J. *et al.* The microRNA miR-1 regulates a MEF-2-dependent retrograde signal at neuromuscular junctions. *Cell* **133**, 903-915 (2008).
192. Fleming, J.T., Squire, M.D., Barnes, T.M., Tornoe, C., Matsuda, K., Ahnn, J., Fire, A., Sulston, J.E., Barnard, E.A., Sattelle, D.B., Lewis, J.A. Caenorhabditis elegans Levamisole Resistance Geneslev-1, unc-29, and unc-38 Encode Functional Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits. *Journal of Neuroscience* **17(15)**, 5843-5857 (1997).
193. Nguyen, H.T. & Frasch, M. MicroRNAs in muscle differentiation: lessons from Drosophila and beyond. *Curr Opin Genet Dev* **16**, 533-539 (2006).
194. Simon, D.J., Madison, J.M., Conery, A.L., Thompson-Peer, K.L., Soskis, M., Ruvkun, G.B., Kaplan, J.M., Kim, J.K. The microRNA miR-1 regulates a MEF-2-dependent retrograde signal at neuromuscular junctions. *Cell* **133(5)**, 903-915 (2008).
195. Williams, A.H. *et al.* MicroRNA-206 delays ALS progression and promotes regeneration of neuromuscular synapses in mice. *Science* **326**, 1549-1554 (2009).



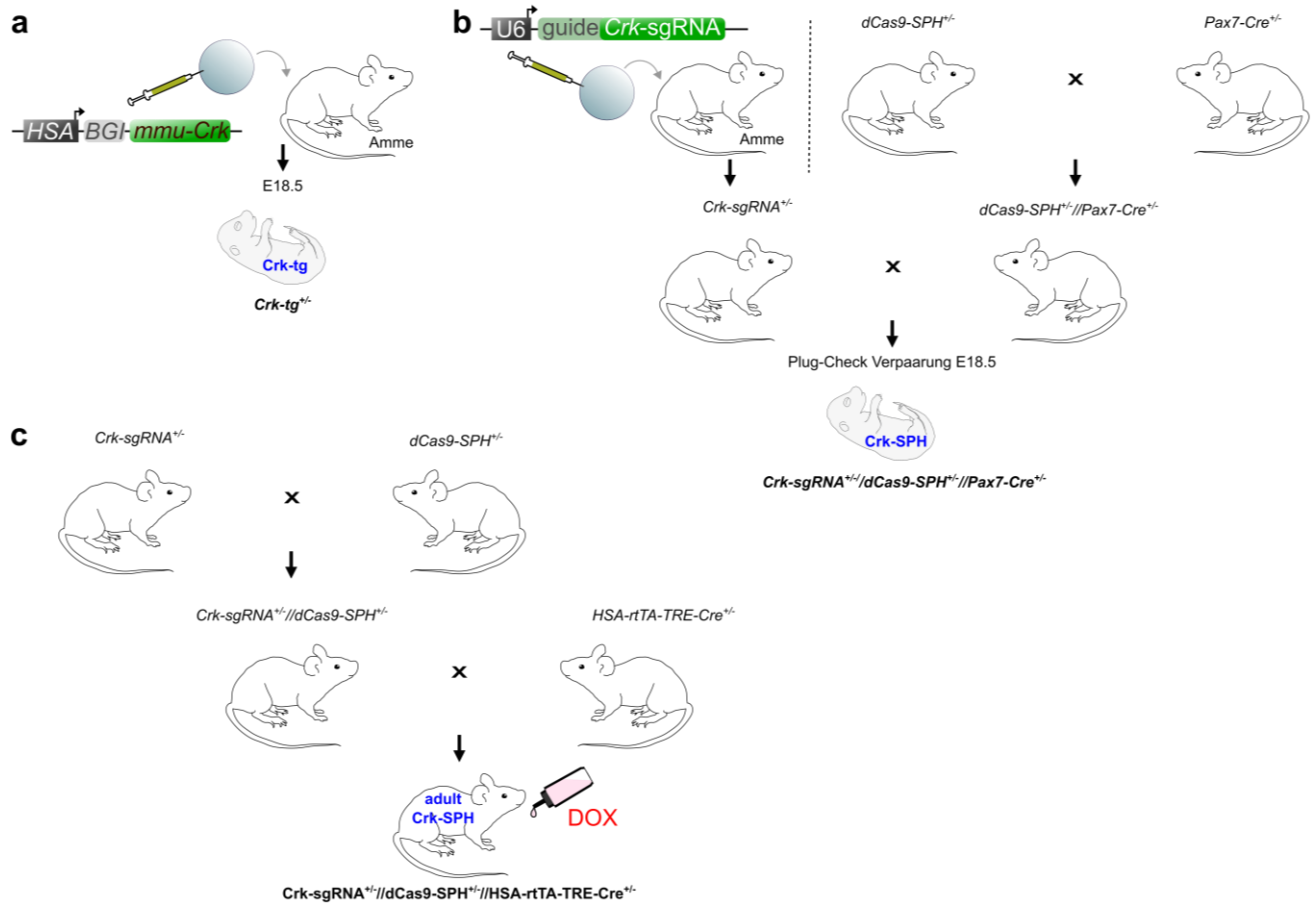
196. Dai, Y. *et al.* The role of microRNA-1 and microRNA-206 in the proliferation and differentiation of bovine skeletal muscle satellite cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **52**, 27-34 (2016).
197. Stark, A., Brennecke, J., Bushati, N., Russell, R.B. & Cohen, S.M. Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell* **123**, 1133-1146 (2005).
198. Simkin, A., Geissler, R., McIntyre, A.B.R. & Grimson, A. Evolutionary dynamics of microRNA target sites across vertebrate evolution. *PLoS Genet* **16**, e1008285 (2020).
199. Chen, K., Rajewsky, N. Deep conservation of microRNA-target relationships and 3'UTR motifs in vertebrates, flies, and nematodes. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **71**, 149-156 (2006).
200. Xu, J. *et al.* The evolution of evolvability in microRNA target sites in vertebrates. *Genome Res* **23**, 1810-1816 (2013).
201. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* **294(5543)**, 853-858 (2001).
202. Park, T.J. & Curran, T. Crk and Crk-like play essential overlapping roles downstream of disabled-1 in the Reelin pathway. *J Neurosci* **28**, 13551-13562 (2008).
203. Park, T.J., Boyd, K. & Curran, T. Cardiovascular and craniofacial defects in Crk-null mice. *Mol Cell Biol* **26**, 6272-6282 (2006).
204. DeVeale, B., Swindlehurst-Chan, J. & Billeloch, R. The roles of microRNAs in mouse development. *Nat Rev Genet* **22**, 307-323 (2021).
205. Varghese, J. & Cohen, S.M. microRNA miR-14 acts to modulate a positive autoregulatory loop controlling steroid hormone signaling in *Drosophila*. *Genes Dev* **21**, 2277-2282 (2007).
206. Bail, S. *et al.* Differential regulation of microRNA stability. *RNA* **16**, 1032-1039 (2010).
207. Bhatt, V.S., Zeng, D., Krieger, I., Sacchettini, J.C. & Cho, J.H. Binding Mechanism of the N-Terminal SH3 Domain of CrkII and Proline-Rich Motifs in cAbl. *Biophys J* **110**, 2630-2641 (2016).
208. Tanaka, S., Ouchi, T. & Hanafusa, H. Downstream of Crk adaptor signaling pathway: activation of Jun kinase by v-Crk through the guanine nucleotide exchange protein C3G. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2356-2361 (1997).
209. Nazarian, J., Bouri, K. & Hoffman, E.P. Intracellular expression profiling by laser capture microdissection: three novel components of the neuromuscular junction. *Physiol Genomics* **21**, 70-80 (2005).
210. Dos Santos, M. *et al.* Single-nucleus RNA-seq and FISH identify coordinated transcriptional activity in mammalian myofibers. *Nat Commun* **11**, 5102 (2020).
211. Petrany, M.J. *et al.* Single-nucleus RNA-seq identifies transcriptional heterogeneity in multinucleated skeletal myofibers. *Nat Commun* **11**, 6374 (2020).
212. Perillo, M. & Folker, E.S. Specialized Positioning of Myonuclei Near Cell-Cell Junctions. *Front Physiol* **9**, 1531 (2018).

## Anhang

## Ergänzende Abbildungen



**Abbildung 5.1.: Generierung verwendeter *miR-1/206/133* Mauslinien. a** Verpaarungsstrategie zur Gewinnung von tKO Tieren im Alter E18.5. **b** Gewinnung von konstitutiven tKO (ctKO) Embryonen (E10.5). **c** Verpaarungsstrategie und anschließende Tamoxifen-basierte (TAM) Induktion zur Gewinnung MuSC tKO Tieren. **d** Verpaarungsstrategie und anschließende Doxycyclin-basierte (DOX) Induktion zur Gewinnung adulten tKO Tieren.



**Abbildung 5.2.: Herstellung der verwendeten CRK Überexpressionslinien. a** Pronucleusinjektion des *Crk*-Transgens zur Gewinnung von *Crk-tg* Tieren im Alter E18.5. **b** Skelettmuskelspezifische Aktivierung des *Crk*-Lokus durch Verpaarung von *Crk-sgRNA* Transgen-positive Mäuse mit *Pax7-Cre<sup>+/-</sup>//dCas9-SPH<sup>+/-</sup>* Mäusen. Die resultieren *Crk-sgRNA<sup>+/-</sup>//Pax7-Cre<sup>+/-</sup>//dCas9-SPH<sup>+/-</sup>* Tiere (*Crk-SPH*) wurden im Alter von E18.5 analysiert. **c** Skelettmuskelspezifische Doxycyclin (DOX) induzierbare Aktivierung des endogenen *Crk*-Lokus in adulten Mäusen (adult *Crk-SPH*) via *dCas9-SPH* System.

**a**

FC	p-Wert	Gen
1,39	<b>0,001</b>	<i>Crk</i>
1,17	0,095	<i>Crk-L</i>
0,08	<b>0,000</b>	<i>miR-133a-1</i>
0,20	<b>0,000</b>	<i>miR-133a-2</i>
0,03	<b>0,000</b>	<i>miR-1a-1</i>
0,12	<b>0,000</b>	<i>miR-1a-2</i>
0,03	<b>0,000</b>	<i>miR-206</i>

1,5  
0,5

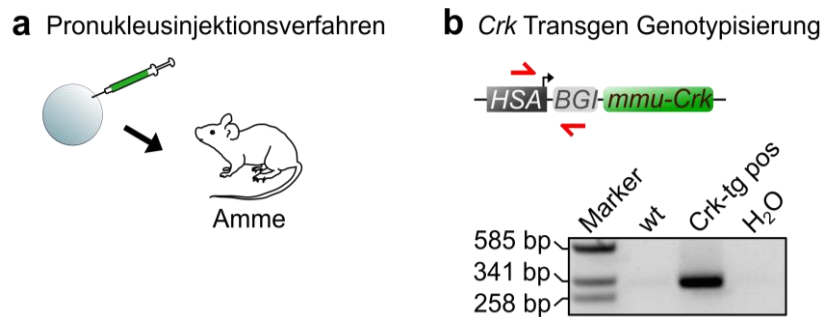
**Abbildung 5.3.: Expression von *Crk-L* nach *miR-1/206/133* Knock-out.** a Transkriptomanalysen von tKO gegen ctrl (Affymetrix Micro Array Analyse mit Quadriceps-Muskeln, n = 4/4, FC= *Fold Change* log<sub>2</sub>, Students t-Test, zweiseitig, rot= p-Wert <0,05 ctrl = *miR-1-1/133a-2<sup>+/+</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-206/133b<sup>+/+</sup>// Pax7-Cre<sup>+/+</sup>*[E18.5]).

**a**

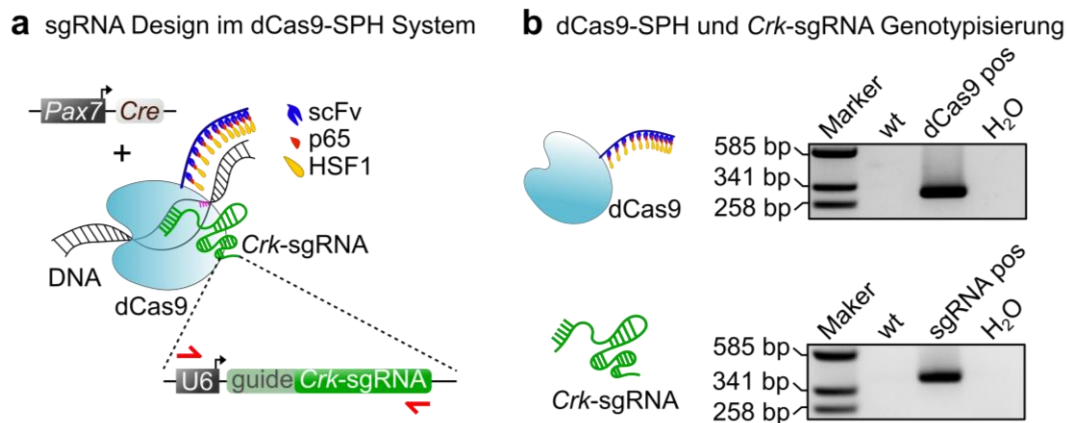
p-Wert	FDR	Protein
0,00	0,00	CRK Adapter molecule CRK
0,65	0,74	HDAC4 Histondeacetylase 4

**Abbildung 5.4.: Keine Änderung des HDAC4 Levels nach Verlust von *miR-1/206/133*.** a Proteom-Daten von wt vs. tKO (n=3/3, Diaphragma-Muskel, rot= p-Wert <0,05 [E18.5]) FDR= *False Discovery Rate*.

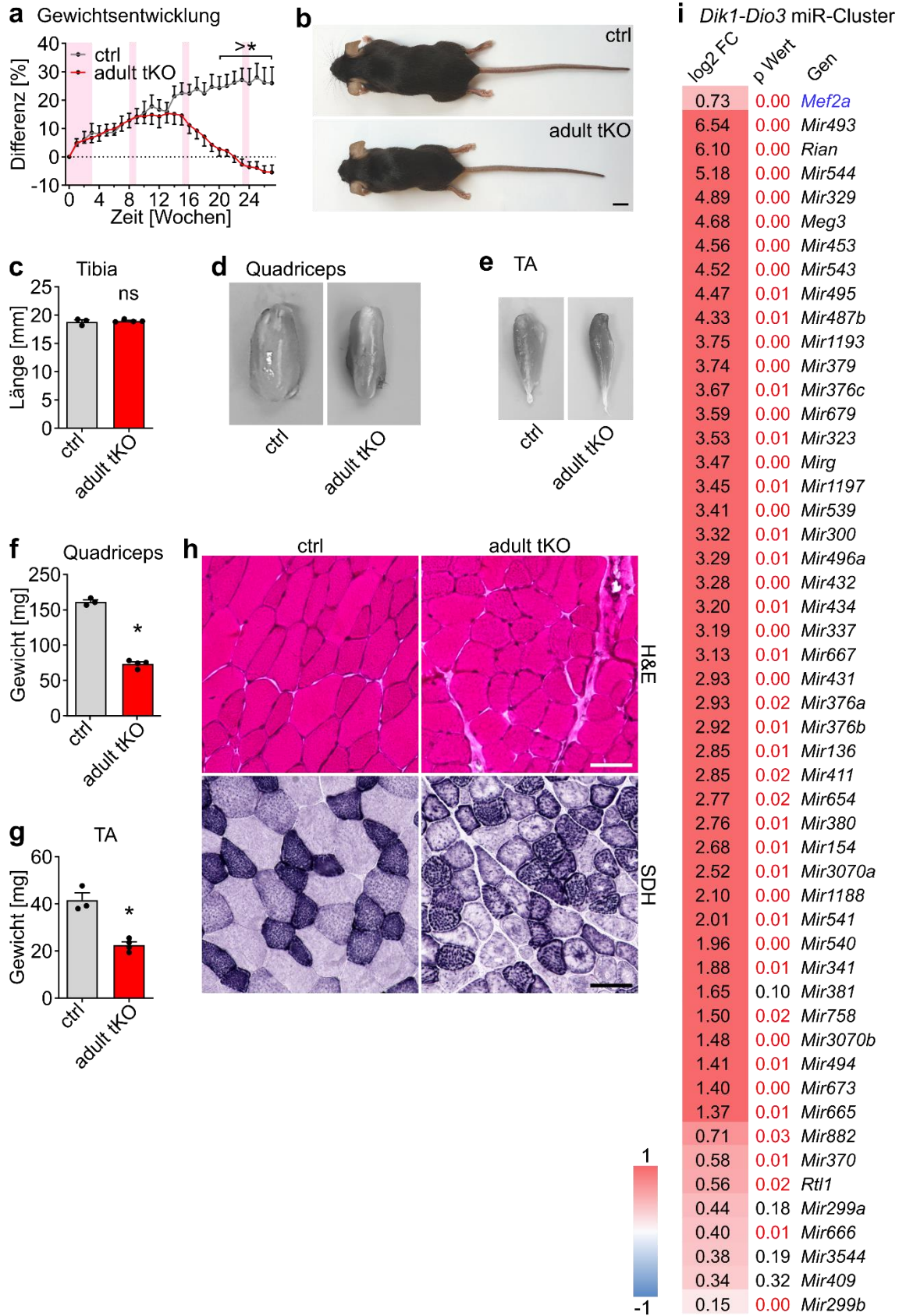




**Abbildung 5.6.: Genotypisierung von *Crk*-tg Mäusen.** **a, b** Schematische Darstellung der vorgenommenen Pronukleusinjektion des *Crk*-Transgens zur Erzeugung der skelettmuskelspezifischen CRK-Überexpressionsmauslinie *Crk*-tg. Die Genotypisierung erfolgte mit Transgen-spezifischen Primern (rot). Das PCR-amplifizierte, gelelektrophoretisch aufgetrennte Produkt von *Crk*-tg ist 314 Basenpaare (bp) lang. BGI= Betaglobin-Intron, HSA-Promoter= *Human  $\alpha$ -skeletal actin*, wt = Wildtyp.

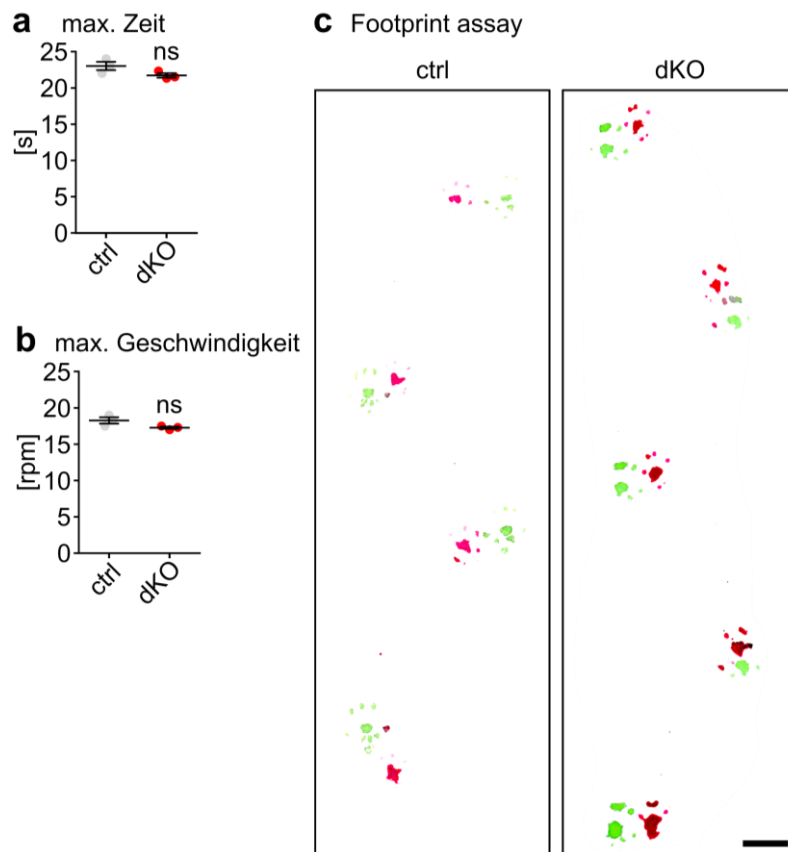


**Abbildung 5.7.: Genotypisierung von *Crk*-SPH Mäusen.** **a** Schematische Darstellung des verwendeten dCas9-SPH Systems mit CRK-spezifischer sgRNA (grün) unter der Kontrolle der skelettmuskelspezifischen Pax7-Cre-Rekombinase. Schematische Abbildung des sgRNA-Designs mit den zur Genotypisierung verwendeten Primern (rot). U6= U6 Promoter. **b** Das PCR-amplifizierte, gelelektrophoretisch aufgetrennte Produkt ist 305 (dCas9) Basenpaare (bp) und ~ 400 (sgRNA) bp lang. wt = Wildtyp.





**Abbildung 5.8.: Phänotypische Untersuchung und molekulare Analyse von adulten miR-1/206/133 Knock-out Tieren (adult tKO).** **a** Darstellung der Gewichtsentwicklung über den Versuchszeitraum von ~28 Wochen von adult tKO Tieren und Kontrollen. Zeitraum, der Doxycyclin-Behandlung dargestellt in hellrot. Gewichtsunterschiede wurden in Prozent abgebildet (n = 3/3, ctrl = *miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-206/133b<sup>-/-</sup>//HSA-rtTA-TRE-Cre<sup>+/+</sup>*, Mann-Whitney U Test, einseitig, \*p = <0,05 [Versuchsende ~44 Wochen alt]). Tiere am Tag des Versuchsendes (**b**). Analyse der Tibiallänge (**c**), der äußeren Muskelmorphologie (**d, e**) und der Muskelgewichte (**f-g**) von Quadriceps (**d, f**) und TA-Muskeln (**e, g**) von adult tKO Tieren und Kontrollen. (n = 3/4, ctrl = *miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-206/133b<sup>-/-</sup>//HSA-rtTA-TRE-Cre<sup>+/+</sup>*, Mann-Whitney U Test, einseitig, ns = nicht signifikant \*p = <0,05 [~44 Wochen alt]). **h** Hämatoxylin-Eosin- (H&E) und Succinat Dehydrogenase (SDH) Färbung. **i** Transkriptomanalysen zeigt erhöhte Expression des gesamten D *Dlk1-Dio3* Clusters und Mef2a (blau) in miR-1/206/133 defizienten adulten Quadriceps Muskeln im Vergleich zur Kontrolle (ctrl) (Affymetrix Micro Array, n = 2/3, FC log<sub>2</sub> = *Fold Change* log<sub>2</sub>, ctrl = ctrl = *miR-1-1/133a-2<sup>-/-</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-206/133b<sup>-/-</sup>//HSA-rtTA-TRE-Cre<sup>+/+</sup>*, Students t-Test, zweiseitig, signifikante Unterschiede in Rot, p = <0,05).



**Abbildung 5.9.: Analyse der koordinativen Fähigkeiten von miR-1/133 dKO Mäusen.** **a, b** Rotarod- und Food-Print Assay Analysen von adulten miR-1/133 dKO Tieren im Vergleich zur Kontrolle (n= 3/3, ctrl = *miR-1-1/133a-2<sup>+/+</sup>//miR-1-2/133a-1<sup>lox/lox</sup>//miR-206/133b<sup>+/+</sup>//Pax7-Cre<sup>+/+</sup>*, Mann-Whitney U Test, einseitig, ns = nicht signifikant [Männchen, ~44 Wochen alt]).



## Ergänzende Tabellen

**Tabelle 24: Muskelspezifische Deletion von *miR-1/206/133* resultiert in neonataler Letalität.**

Abundanz von *miR-1/206/133* (tKO, blau) Knock-out Tieren am postnatalen Tag 21 (P21) im Vergleich zu entsprechenden Wurfgeschwistern.

Line	Genotyp	N	% gesehen	% erwartet
tKO	miR-1-1/-133a-2 <sup>-/-</sup> //miR-1-2/133a-1 <sup>lox/lox</sup> //miR-206/-133b <sup>+/-</sup> //Pax7-Cre <sup>+/-</sup>	9	26	25
	miR-1-1/-133a-2 <sup>-/-</sup> //miR-1-2/133a-1 <sup>lox/lox</sup> //miR-206/-133b <sup>-/-</sup> //Pax7-Cre <sup>+/-</sup>	10	29	25
	miR-1-1/-133a-2 <sup>-/-</sup> //miR-1-2/133a-1 <sup>lox/lox</sup> //miR-206/-133b <sup>+/-</sup> //Pax7-Cre <sup>+/-</sup>	15	44	25
	miR-1-1/-133a-2 <sup>-/-</sup> //miR-1-2/133a-1 <sup>lox/lox</sup> //miR-206/-133b <sup>-/-</sup> //Pax7-Cre <sup>+/-</sup>	0	0	25
	<b>Total</b>	<b>34</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

**Tabelle 25: tKO-Tiere weisen nahezu erwartete Abundanz im Stadium E18.5 auf.**

Abundanz von *miR-206/133b* (sKO, blau), *miR-1/133a* (dKO, blau) und *miR-1/206/133* (tKO, rot) Knock-out Tieren im perinatalen Alter E18.5 im Vergleich zu entsprechenden Wurfgeschwistern.

Linie	Genotyp	N	% gesehen	% erwartet
sKO	miR-1-1/-133a-2 <sup>+/-</sup> //miR-1-2/133a-1 <sup>+/-</sup> //miR-206/-133b <sup>+/-</sup>	49	25	25
	miR-1-1/-133a-2 <sup>+/-</sup> //miR-1-2/133a-1 <sup>+/-</sup> //miR-206/-133b <sup>+/-</sup>	98	50	50
	miR-1-1/-133a-2 <sup>+/-</sup> //miR-1-2/133a-1 <sup>+/-</sup> //miR-206/-133b <sup>-/-</sup>	48	25	25
	<b>Total</b>	<b>195</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
dKO	miR-1-1/-133a-2 <sup>-/-</sup> //miR-1-2/133a-1 <sup>lox/lox</sup> //miR-206/-133b <sup>+/-</sup> //Pax7-Cre <sup>+/-</sup>	35	26	25
	miR-1-1/-133a-2 <sup>-/-</sup> //miR-1-2/133a-1 <sup>lox/lox</sup> //miR-206/-133b <sup>+/-</sup> //Pax7-Cre <sup>+/-</sup>	39	29	25
	miR-1-1/-133a-2 <sup>+/-</sup> //miR-1-2/133a-1 <sup>lox/lox</sup> //miR-206/-133b <sup>+/-</sup> //Pax7-Cre <sup>+/-</sup>	26	19	25
	miR-1-1/-133a-2 <sup>-/-</sup> //miR-1-2/133a-1 <sup>lox/lox</sup> //miR-206/-133b <sup>+/-</sup> //Pax7-Cre <sup>+/-</sup>	35	26	25
	<b>Total</b>	<b>135</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
tKO	miR-1-1/-133a-2 <sup>-/-</sup> //miR-1-2/133a-1 <sup>lox/lox</sup> //miR-206/-133b <sup>+/-</sup> //Pax7-Cre <sup>+/-</sup>	4	13	25
	miR-1-1/-133a-2 <sup>-/-</sup> //miR-1-2/133a-1 <sup>lox/lox</sup> //miR-206/-133b <sup>-/-</sup> //Pax7-Cre <sup>+/-</sup>	10	31	25
	miR-1-1/-133a-2 <sup>-/-</sup> //miR-1-2/133a-1 <sup>lox/lox</sup> //miR-206/-133b <sup>+/-</sup> //Pax7-Cre <sup>+/-</sup>	12	38	25
	miR-1-1/-133a-2 <sup>-/-</sup> //miR-1-2/133a-1 <sup>lox/lox</sup> //miR-206/-133b <sup>-/-</sup> //Pax7-Cre <sup>+/-</sup>	6	19	25
	<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

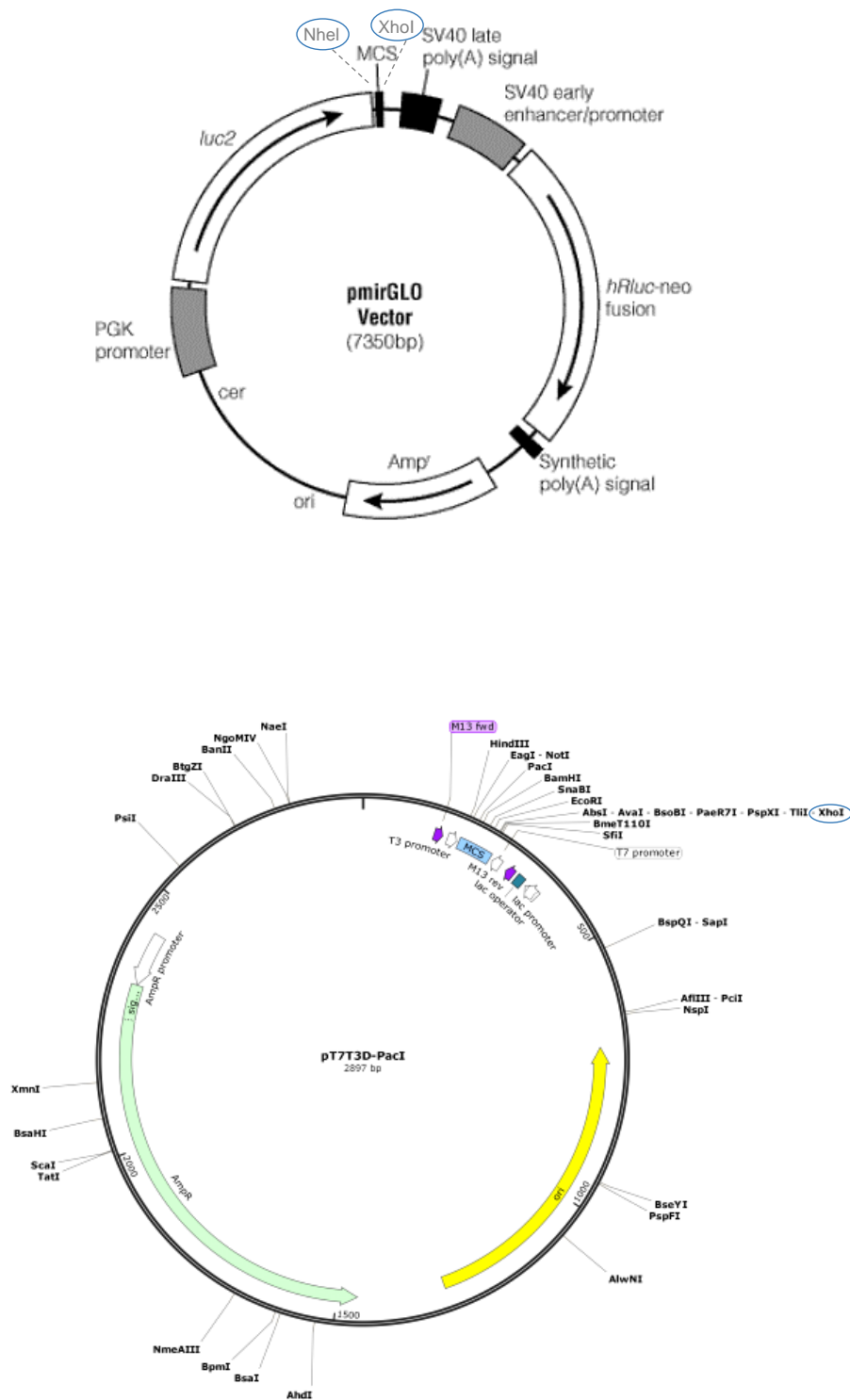
**Tabelle 26: Muskelspezifische CRK Überexpression (Crk-SPH) resultiert in neonataler Letalität.**

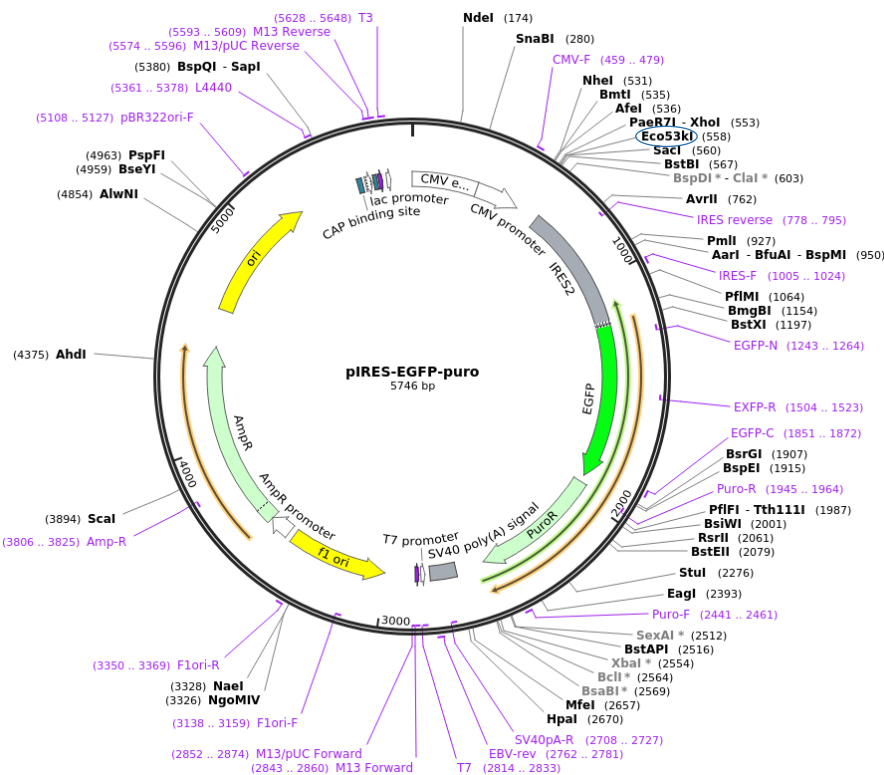
Abundanz von Crk-SPH (grün) Tieren am postnatalen Tag 21 (P21) im Vergleich zu entsprechenden Wurfgeschwistern.

Linie	Genotyp	N	% gesehen	% erwartet
Crk-SPH	sgRNA <sup>+/-</sup> //dCAS9 <sup>+/-</sup> //Pax7-Cre <sup>+/-</sup>	3	7.9	12.5
	sgRNA <sup>+/-</sup> //dCAS9 <sup>+/-</sup> //Pax7-Cre <sup>+/-</sup>	7	18.4	12.5
	sgRNA <sup>+/-</sup> //dCAS9 <sup>+/-</sup> //Pax7-Cre <sup>+/-</sup>	8	21.1	12.5
	sgRNA <sup>+/-</sup> //dCAS9 <sup>+/-</sup> //Pax7-Cre <sup>+/-</sup>	4	10.5	12.5
	sgRNA <sup>+/-</sup> //dCAS9 <sup>+/-</sup> //Pax7-Cre <sup>+/-</sup>	4	10.5	12.5
	sgRNA <sup>+/-</sup> //dCAS9 <sup>+/-</sup> //Pax7-Cre <sup>+/-</sup>	4	10.5	12.5
	sgRNA <sup>+/-</sup> //dCAS9 <sup>+/-</sup> //Pax7-Cre <sup>+/-</sup>	8	21.1	12.5
	sgRNA <sup>+/-</sup> //dCAS9 <sup>+/-</sup> //Pax7-Cre <sup>+/-</sup>	0	0	12.5
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	

## Schematische Plasmidkarten

Alle Plasmidkarten wurden von Addgene ([www.addgene.org](http://www.addgene.org)) oder Promega ([www.promega.de](http://www.promega.de)) entnommen. Die jeweilig genutzten Restriktionsenzym-Schnittstellen wurden markiert.





## Danksagung

Ich danke ganz herzlich...

meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Böttger für die hervorragende Betreuung, seine Geduld und seine Hilfsbereitschaft.

Prof. Dr. Dr. Thomas Braun für die Aufnahme in seiner Abteilung, die Finanzierung des Projektes und für die zahlreichen Denkanstöße und Diskussionen während der Seminare.

Prof. Dr. Reinhard Dammann für die Übernahme der Betreuung meiner Dissertation an der Universität Gießen.

meinen Kooperationspartner Dr. Ulrich Gärtner vom Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Gießen.

meiner lieben Arbeitsgruppe, für die immerwährende Hilfe, Diskussionen und Vorschläge. Außerdem danke ich Dennis, Dafina und Jonas für die fleißige Hilfe bei DNA Extraktion und Genotypisierung.

Auch ein besonderes Dankeschön an einige Leute die leider nicht mehr im Institut sind. Hierunter besonders Alix, Stas und Sylvia, für all die schönen Gespräche, Hilfe und auch die tatkräftige Unterstützung.

allen Mitarbeitern des Tierhauses für ihre zuverlässige Arbeit und all meinen Kollegen aus der Abteilung Entwicklung und Umbau des Herzens.

allen Mitarbeitern und Service Gruppen des MPI Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung.

meiner lieben Familie und meinen Freunden für all den Beistand und die Unterstützung!

Maik für permanenten starken Rückhalt in allen erdenklichen Lebenslagen und einfach fürs Dasein!

meinem kleinen Sohn Paul, der mir die letzte Etappe meiner Doktorarbeit anspruchsvoller gestaltet, aber auch versüßt hat ♥