

Institut für Physiologische Chemie
an der Martin - Luther - Universität Halle - Wittenberg
kommissarischer Direktor: Hr. Prof. Dr. Hollemann

Einfluss von G-Protein vermittelten Signalkaskaden auf die Wanderung von Muskelvorläuferzellen

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin - Luther - Universität Halle - Wittenberg

Von: Lutz, Martina
Geboren am: 06.09.1981 in Erlenbach am Main
Gutachter 1: Prof. Dr. Thomas Braun - Bad Nauheim
Gutachter 2: Prof. Dr. Stefan Offermanns - Frankfurt
Gutachter 3: Prof. Dr. Peter Presek
11.05.2010
12.10.2011

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 GASTRULATION UND SOMITOGENESE	4
1.2 ENTSTEHUNG UND MUSTERBILDUNG DER SOMITEN DURCH EINFLUSS VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN	6
1.3 WICHTIGE SIGNALKASKADEN DER MYOGENESE.....	9
1.4 ZELLWANDERUNG.....	10
1.5 FUNKTIONSWEISE DER RHO GTPASEN	12
1.5.1 <i>Rho GTPasen in der Zellmigration</i>	13
1.5.2 <i>Cdc42 das Zentrum der Polarität</i>	15
1.5.3 <i>Hemmende und stimulierende Regulation von Rac</i>	17
1.5.4 <i>Interaktion Rho - Rac</i>	18
1.5.5 <i>Der Einfluss von Ras und Ral auf die chemotaktische Wanderung von Skelettmuskelvorläuferzellen</i>	19
1.5.6 <i>Der Einfluss der Rho-Kinase auf fokale Adhäsion</i>	20
1.6 ZIELSTELLUNG	21
2. MATERIAL UND LÖSUNGEN	23
2.1. MATERIAL.....	23
2.1.1 <i>Gebrauchswaren</i>	23
2.1.2 <i>Chemikalien</i>	23
2.1.3 <i>Enzyme</i>	23
2.1.4 <i>Antikörper</i>	24
2.1.5 <i>Befruchtete Hühnereier</i>	24
2.1.6 <i>Verwendete Oligonukleotide</i>	24
2.1.7 <i>Verwendete Sonden für whole mount in situ Hybridisierung</i>	24
2.1.8 <i>Materialien für die EZ-DetectTM Rho Activation Kit</i>	25
2.2. LÖSUNGEN UND PUFFER.....	25
2.2.1 <i>Lösungen und Medien für molekularbiologische Methoden</i>	25
2.2.2 <i>Lösungen für whole mount in situ Hybridisierungen</i>	26
2.2.3 <i>Sonstige Lösungen für Embryopräparationen und Histologie</i>	29
3. METHODEN	30
3.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	30
3.1.1 <i>Herstellung von Agarosegelen</i>	30
3.1.2 <i>Ethanol-fällung von Nukleinsäure</i>	30
3.1.3 <i>Reinigung von Nukleinsäurelösungen</i>	31
3.1.4 <i>Restriktionsverdau</i>	31
3.2. MIKROMANIPULATION DER HÜHNEREMBRYONEN	31
3.2.1 <i>Vorbereitung der Injektion</i>	32
3.2.2 <i>Injektion der Viren in die Somiten</i>	33

Inhaltsverzeichnis

3.3. WHOLE MOUNT IN SITU HYBRIDISIERUNG	33
3.3.1 <i>Synthese der Sonde</i>	34
3.3.2 <i>Fixierung, Vorbehandlung und Hybridisierung der Embryonen</i>	35
3.3.3 <i>Waschschritte</i>	37
3.3.4 <i>Färbung</i>	38
3.4. HISTOLOGISCHE TECHNIKEN.....	38
3.4.1 <i>Einbetten der Embryonen</i>	38
3.4.2 <i>Schneiden der Embryonen am Vibratom</i>	39
3.4.3 <i>Eosin-Färbung</i>	39
3.5.1 <i>Verfahren für die EZ-Detect TM Rho Aktivierung Kit</i>	41
3.5.2 <i>In vitro GTPyS oder GDP Behandlung</i>	42
3.5.3 <i>Bindung von aktivem Rho</i>	43
3.6. STERILISATION VON LÖSUNGEN UND GERÄTEN	45
4. ERGEBNISSE.....	46
4.1. <i>IN VIVO</i> INJEKTION VON SIGNALKASKADEN - RETROVIREN	46
4.1.1 <i>Ral 91</i>	47
4.1.2 <i>Ral 400</i>	49
4.1.3 <i>Rho</i>	52
4.1.4 <i>Rac</i>	53
4.1.5 <i>Cdc42</i>	53
4.1.6 <i>Ras</i>	54
4.2. EINFLUSS DER RHO- GTPASEN AUF DIE WANDERUNG DER MUSKELVORLÄUFERZELLE <i>IN VITRO</i>	55
5. DISKUSSION	57
5.1 INJEKTION VON DOMINANT NEGATIVEN VIRUS RAL 400 FÜHRT ZUR VERKÜRZUNG DER EXTREMITÄT.....	59
5.1.1 <i>Mögliche Wechselwirkung von Ral mit den Faktoren der Entwicklung der Extremitätenknospe</i>	59
5.2 INJEKTION VON RAC-, RAS-, CDC42- UND RHO - DOMINANT NEGATIVEN UND KONSTITUTIV AKTIVEN RETROVIREN	62
5.3 RHO-AKTIVITÄT IN MIGRATIONSGESTÖRTEN MUSKELVORLÄUFERZELLEN <i>IN VITRO</i>	64
5.4 AUSSICHTEN	65
6. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNG	66
7. ANHANG.....	67
7.1. LITERATURVERZEICHNIS.....	67
7.2 ABKÜRZUNGEN	72
7.3 THESEN.....	75

Kurzreferat

Die Migration von Zellen ist ein essentieller Vorgang während der embryonalen Entwicklung. Aber auch in adulten Organismen spielt die Migration von einzelnen Zellen z. B. in der Wundheilung oder auch in der Immunantwort eine wesentliche Rolle. Veränderungen in der temporär und räumlich streng regulierten Migration von Zellen können zu Fehlentwicklungen einzelner Organe oder Tumorerkrankungen führen. In dieser Arbeit wurde die Migration von Muskelvorläuferzellen (muscle precursor cells MPCs) untersucht, die im Rahmen der Embryonalentwicklung sowie bei der Wundheilung über z.T. große Strecken an ihren Zielort wandern müssen. Auf zellulärer Ebene sind die wichtigsten Voraussetzungen, um eine Zelle gerichtet wandern zu lassen, die Polarisation der Zelle über die Bildung von Stressfasern und Fokalkomplexe, der gerichtete Vesikeltransport sowie ein angepasstes Adhäsions- und Retraktionsverhalten von unterschiedlichen Regionen der Zelle. Diese Schritte werden unter anderem über Rho - GTPasen und Mitglieder der Ras – Familie, wie Rho A, Rac1, Cdc42, Ral sowie Ras selbst, reguliert. Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, welchen Einfluss diese Signalkaskaden auf die Migration von MPCs *in vivo* und *in vitro* haben. Dazu wurden Hühnerembryonen verwendet, die auf Grund ihrer guten Zugängigkeit ein geeignetes *in vivo* Modell für diese Versuchsreihe darstellten. Es wurden die oben genannten GTPasen in Form von konstitutiv aktiven und dominant negativen Retroviren mikrochirurgisch in die Somiten 16-19, den Ausgangspunkt der Muskelvorläuferzellen für die hypaxiale Muskulatur der Vorderextremität, injiziert. Die makroskopisch beobachteten Ergebnisse wurden durch Whole mount *in situ* Hybridisierung, bei der die Expressionsmuster von Lbx1 und Pax3 in der Extremitätenmuskulatur markiert und anschliessend verglichen wurden, genauer analysiert. Lbx1 und Pax3 sind Transkriptionsfaktoren, die für die Wanderung der MPCs aus dem Dermamyotom essentiell sind und somit als Marker der MPCs verwendet werden können. Durch die Untersuchung des Expressionsmusters konnte so die Wanderung der MPCs beobachtet und der Einfluss der Injektion der Retroviren auf die Migration der Muskelvorläuferzellen untersucht werden. Zusätzlich wurde in einem *in vitro* Versuch untersucht, inwieweit in genetisch manipulierten Muskelvorläuferzellen, die eine gestörte Zellmigration vorwiesen, eine veränderte Aktivität der Rho-GTPasen nachzuweisen war.

Name: Martina Lutz

Titel: Einfluss von G-Protein vermittelten Signalkaskaden auf die Wanderung von Muskelvorläuferzellen

Institut: Institut für physiologische Chemie an der Martin – Luther – Universität – Halle - Wittenberg,

Dissertation: 74 Seiten 2010

1. Einleitung

Zellwanderung ist ein hoch regulierter vielseitiger Prozess, der unter anderem zur embryonalen Morphogenese führt. Es ist ein stark gerichteter Vorgang und wird gesteuert über komplex regulierte Signalwege. Während der Gastrulation wandert eine große Gruppe von Zellen als Platte aus, woraus sich die embryonalen Schichten bilden. So wandern die Zellen von verschiedenen epithelialen Zonen an ihren Zielort, an dem sie sich aufgrund regionaler Einflüsse zu den jeweiligen Geweben und Organen differenzieren (Gilbert S.F. et al., 2000).

Die Zellwanderung ist auch im adulten Organismus an wichtigen Prozessen beteiligt und spielt aus medizinischer Sicht eine entscheidende Rolle in verschiedenen Krankheitsprozessen: beispielsweise bei der Erneuerung der Haut oder in der Gewebsneubildung im Gastrointestinaltrakt, bei dem die frischen epithelialen Zellen von der Basalzellschicht in die Krypten wandern. Eine weitere wichtige Rolle spielt die Zellwanderung bei der Geweberegeneration und auch im Immunewebe, in dem Leukozyten von der Zirkulation in das umgebene Gewebe wandern, um invasive Mikroorganismen und Infektzellen zu zerstören. Die Zellwanderung steuert verschiedene pathologische Prozesse, wie z. B. vaskuläre Krankheiten, Osteoporose, chronisch inflammatorische Krankheiten, rheumatische Arthritis und Multiple Sklerose, Krebserkrankungen oder mentale Retardierung, wobei hier auch immer noch andere Komponenten zum Tragen kommen.

Das Verständnis über die Mechanismen der Zellwanderung ermöglicht die Entwicklung und die Anwendung vieler effektiver therapeutischer Methoden, wie zum Beispiel die zelluläre Transplantation. In den letzten Jahren wurden immense Fortschritte im Verstehen der Zellwanderung sowie im Nachweis von polaren Strukturen, der Regulation von dynamischen Prozessen der Aktin- und Mikrotubulpolarisierung und der Regulation von räumlicher und zeitlicher Signaltransduktion gemacht (Ridley J., et al, 2000).

Ein weiterer Prozess an dem Zellmigration essentiell beteiligt ist, ist die Entwicklung und Regeneration der Skelettmuskulatur. Während der Embryogenese wandern Muskelvorläuferzellen aus ihren primären Entstehungsorten (z. B. den Somiten) an ihre Zielorte, wie zum Beispiel die Extremitäten. Im Rahmen der Regeneration von Muskelverletzungen wandern Muskelstammzellen, so genannte Satellitenzellen an den Ort der Verletzung und differenzieren dort zu neuen Muskelzellen. Ist dieser Prozess gestört, kann es zu verschiedenen Fehlbildungen oder Krankheitsbildern kommen.

Bei der Muskeldystrophie vom Typ Duchenne (Duchenne Type muscular dystrophy, DMD) und bei der Muskeldystrophie Typ Becker (Becker type muscular dystrophy, BMD) liegt eine Mutation des Dystrophingens auf dem kurzen Arm des X-Chromosomes vor. Sie werden X-chromosomal rezessiv vererbt (Spuler S. und A. v. Moers, 2004).

Dystrophin ist das Protein der Zellmembran und dient wahrscheinlich der Halterung kontraktiler Proteine der extrazellulären Matrix. Bei der DMD kann Dystrophin völlig fehlen, wobei bei der milderen Form Typ Becker häufig ein funktioneller Defekt die Ursache der Symptomatik ist. Durch die fehlende Verankerung des Zytoskeletts werden die Muskelzellen verletzt und es kommt zu permanenter Regeneration zur Aufrechterhaltung der Muskelfunktion. Hierdurch werden die nur in einer begrenzten Masse vorhandenen Satellitenzellen vermutlich im Laufe der Zeit aufgebraucht und es kommt zur progredienten, fibrotischen Degeneration.

Klinisch auffällig ist die Pseudohypertrophie der Wade (Wadenumfangvergrößerung), die durch den Ersatz von Muskulatur durch Bindegewebe zustande kommt. In 25% der Fälle kann es zur progredienten, mentalen Beeinträchtigung kommen. Das Schwerwiegende dieser Erkrankung ist die einhergehende Kardiomyopathie mit schwerer Linksherzinsuffizienz und folgendem Herzversagen. Die Muskeldystrophie, Typ Duchenne (DMD), stellt die häufigste Muskelerkrankung im Kindesalter dar (Jerusalem F. und Zierz S., 1991).

Die Patienten können der körperlichen Progredienz meist nur zusehen, denn eine erfolgsversprechende Therapie gibt es noch nicht. So können nur die Symptome und nicht die Ursache der Erkrankung behandelt werden.

In Experimenten von Gussoni et al. (1999) wurde versucht durch die Übertragung verschiedener Stammzellen die Dystrophin Expression wiederherzustellen. Dazu wurden Skelettmuskeln von drei bis fünf Wochen alten Mäusen isoliert und in die Schwanzvene von letal bestrahlten mdx Mäusen injiziert (Gussoni et al., 1999). Es zeigten sich Kerne der transplantierten Zellen neben den Dystrophin positiven Zellen. Daraus könnte man schließen, dass aus den übertragenen Zellen Satellitenzellen hervorgehen. Satellitenzellen gelten als die alleinigen Träger des postnatalen Muskelaufbaus und zählen zu den Stamm-/ Vorläuferzellen. Sie befinden sich im Organismus in einer Ruhephase. Erst auf bestimmte Stimuli wie Verletzung, Muskelfaseruntergang, Verlust der nervalen Versorgung oder bei Überbelastung der Muskulatur verlassen sie ihr Ruhestadium und kehren in den Zellzyklus zurück (Schultz E. et al, 1985). Diese Ergebnisse geben Hoffnung für eine effiziente Therapie verschiedener Muskelerkrankungen im Menschen. Denn hier konnte gezeigt werden, dass es möglich ist,

Muskelstammzellen zu isolieren, über die Vene in den Körper zu injizieren, damit sich diese im ganzen Körper ansiedeln. Nach der Transplantation über den Blutkreislauf müssen die Stammzellen wandern, proliferieren und differenzieren. Ein essentieller molekularer Schalter bei diesem Mechanismus sind die Rho- GTPasen, die Adhäsion und Migration von Stamm- und Vorläuferzellen regulieren. Die Expression der Rho- GTPasen wird von Wachstumsfaktoren und Faktoren im Serum beeinflusst. So ist die spezifische Regulation der Rho- GTPasen in transplantierten Stamm- / Vorläuferzellen ein wichtiges Mittel zur Verbesserung der Transplantationseffizienz und damit der Stammzelltherapie insgesamt.

Um weitere Erkenntnisse im Bereich der Regeneration / Heilung von Muskelerkrankungen zu erzielen, wird auf Grund der ähnlich ablaufenden Prozesse während der Embryogenese gerne auf Tiermodelle wie Mäuseembryonen und Hühnerembryonen zurückgegriffen. Hühnerembryonen eignen sich für dieses Experiment am besten, da sie eine rasante Entwicklung aufweisen, schnelle chirurgische Eingriffe ermöglichen und zelluläre Wechselwirkungen gut zu beobachten sind. Das Arbeiten an Hühnerembryonen ist auch sehr hilfreich bei der Untersuchung von intrazellulären Signalen. So kann man schon drei Tage nach der Eiablage die ersten Entwicklungsschritte der Extremitäten beobachten, am zehnten Tag sind dann die wichtigsten Merkmale der Gliedmaßen zu erkennen (Gilbert S. F.,2000).

Eine zentrale Fragestellung der experimentellen Arbeit war es, festzustellen, welche Rolle Mitglieder der Familie des Ras- GTPasen bei der Migration von Muskelvorläuferzellen im Rahmen der Entwicklung der Extremitätenmuskulatur *in vivo* spielen und ob diese auch für Fehler in der Entwicklung und für potenzielle spätere Regenerationsprozesse verantwortlich sein könnten.

Dazu wurden den Hühnerembryonen in einem festgelegten Entwicklungsstadium GTPasen, für die eine generelle Rolle in der Zellmigration beschrieben ist (Ridley J. et al, 2003), in Form von konstitutiv aktiven und dominant negativen Retroviren mikrochirurgisch in die Somiten 16- 19, den Ausgangspunkt der Zellmigration der MPCs, die die hypaxiale Muskulatur der Vorderextremität formen werden, injiziert und beobachtet, ob sich während der Zellwanderung oder Extremitätenentwicklung Veränderungen zeigten.

Zum besseren Verständnis werden im Folgenden die einzelnen Entwicklungsstadien eines Hühnerembryos sowie die eingesetzten Viren mit den jeweiligen Eigenschaften vorgestellt.

1.1 Gastrulation und Somitogenese

Nachdem die Henne das Ei gelegt hat, beginnt die Furchung des Blastoderms und die Keimscheibe bildet sich. Die Zellen der Keimscheibe teilen sich in verschiedene Gebiete auf und bilden die innen gelegene Area pellucida und die außen gelegene Area opaca. Der Übergang zwischen diesen zwei Ringen nennt man posteriore Marginalzone. Teile der posterioren Marginalzone und Zellen der Keimscheibe bilden den Hypoblast, aus dem sich später die extraembryonalen Strukturen entwickeln. Die restlichen Keimzellen, sowie der größte Teil der posterioren Marginalzone formen den Epiblast, der den eigentlichen Teil des Embryos darstellt.

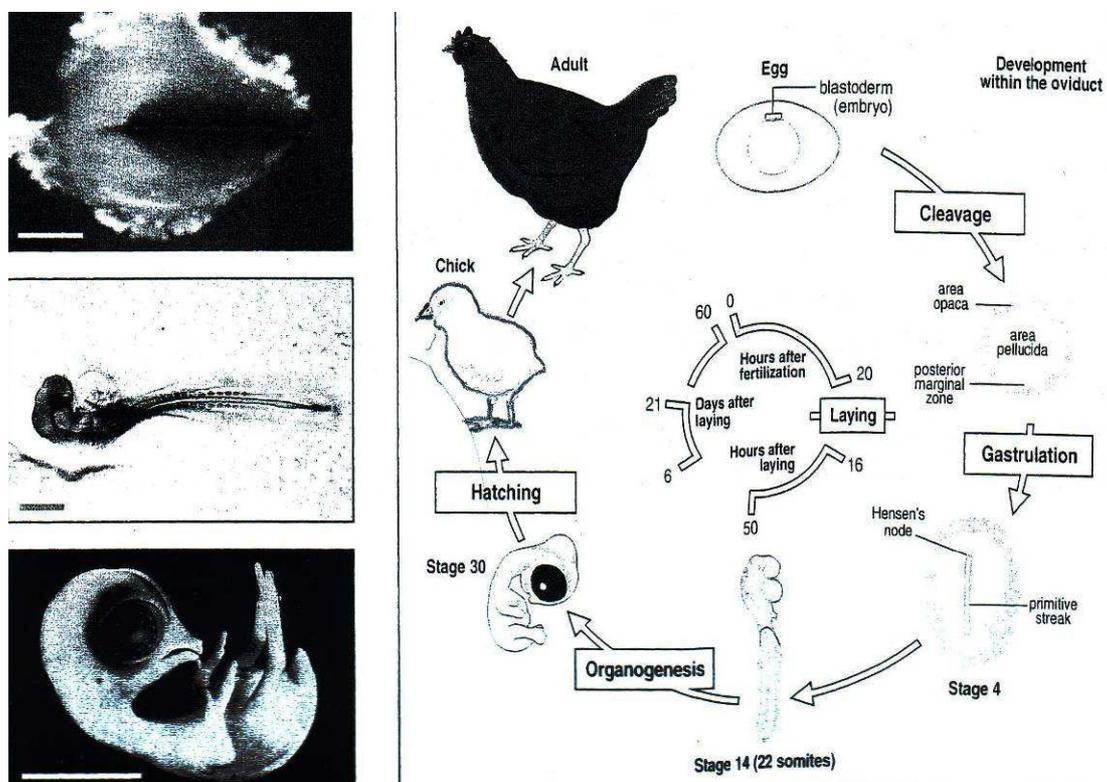


Abb. 1.1.: Links erkennt man drei Schritte der Hühnerembryonenentwicklung in vivo. Oben: Primitivstreifen mit der area pellucida; Mitte: Somitenbildung; HH 14; 50-53 Stunden mit 22 Somiten; unten: 8.5-9 Tage alter Embryo zeigt den Zyklus eines Huhns. Reche Seite: Lebenskreis des Huhns (Wolpert L., 1999)

Die Gastrulation beginnt mit der Bildung des Primitivstreifens, welcher die Längsachse des Embryos andeutet. Der Primitivstreifen erstreckt sich von der posterioren Marginalzone bis hin zur Area pellucida (s. Abb.1.1). Im Bereich des Primitivstreifens proliferieren die Zellen des Epiblast und wandern in die Tiefe. Es bildet sich eine neue Schicht direkt unter dem

Epiblast, das Mesoderm. Durch die fortschreitende Proliferation der Zellen wird der Hypoblast verdrängt und es entsteht das Entoderm. Aus der obersten Schicht, dem Epiblast wird nun das Ektoderm.

Damit sind die drei Keimblätter der Embryonalentwicklung gebildet und der Embryo kann eingeteilt werden in das oben liegende Ektoderm, das mittlere Mesoderm und die unterste Schicht, das Entoderm (Wolpert L., 1999).

Im weiteren Verlauf der Embryogenese findet die Organogenese statt. Der ventrale Teil des Primitivstreifens verdickt sich zu einem Knoten, dem Hensenschen Knoten (Primitivknoten). Dieser ist eine Ausstülpung des Blastoderms und besteht aus Ekto- und Entoderm. Der Hensensche Knoten wandert von rostral nach kaudal und bildet während dessen vor sich die Chorda, aus der später die Wirbelsäule hervorgeht. Der Kopfbereich des Embryos ist durch eine Kopffalte, bestehend aus Entoderm und Ektoderm, vom Primitivknoten abgetrennt. Nach der Bildung der Chorda setzt die Neurulation ein und es entsteht das Neuralrohr. Das Ektoderm faltet sich an beiden Seiten der Mittellinie zu Wülsten und wächst von ventral nach dorsal zusammen. Es kommt zur Faltung des neuralen Gewebes und zur Bildung des Darms. Die Herzrudimente wachsen auf diese Weise zusammen und es entsteht das Herz ventral des Darms (Gilbert S.F., 2000).

Im extraembryonalen Gewebe beginnt die Hämatopoese und verbindet sich mit den Gefäßen und dem Herzen des Embryos. Der Embryo wird nun über den Amnionsack ernährt und von einem Chorion umhüllt, das dem Allantois Stoffwechselprodukte liefert. Der Embryo krümmt sich und bildet Augen- und Ohrbläschen. 21 Tage nach der Eiablage schlüpft der Embryo.

Die Bildung der Skelettmuskulatur läuft in einem mehrstufigen Prozess ab, der räumlich und zeitlich genau koordiniert ist. Die ersten Schritte bei der Bildung der quergestreiften hypaxialen und epaxialen Muskulatur finden im Rahmen der Somitogenese statt:

Beidseits der Chorda entwickeln sich aus dem präsomitischen Mesoderm (direkt anterior zum Hensenschen Knoten) durch Veränderungen der Zellform und der interzellulären Kontakte in anterior- posteriorer -Orientierung ballförmige epitheliale Gebilde, die Somiten. Da sich etwa ein Somitenpaar pro Stunde entwickelt, sind im Embryo Somiten mit unterschiedlichem Reifegrad gleichzeitig zu sehen. Im Verlauf der Differenzierung der Somiten, aus denen später die Wirbelkörper, verschiedene Muskelgruppen und Teile der Dermis hervorgehen, spezialisieren sich die anfänglich identischen Epithelzellen immer weiter. Zu welcher körperlichen Struktur sich die Somiten entwickeln, ist abhängig von ihrer Position entlang der Längsachse zu speziellen Achsenstrukturen (Beddington R., et al., 1999).

1.2 Entstehung und Musterbildung der Somiten durch Einfluss von Transkriptionsfaktoren

Die frühe Extremitätenknospe besteht aus zwei Zelltypen: einmal aus den inneren mesenchymalen Mesodermzellen, zum anderen aus den äußeren epithelialen Ektodermzellen (Gilbert, S. 2000). Aus den mesenchymalen Zellen entsteht fast die ganze Extremität, während die Muskelvorläuferzellen der Extremitäten aus den Somiten in die Knospe einwandern. Die Somiten bestehen aus 2 Hauptgruppen von Zellen (Abbildung 1.2); einmal dem Sklerotom und zum anderen aus dem Dermamyotom, welches sich weiter in Myotom und Dermatome aufteilt (Dietrich S. et al, 1999).

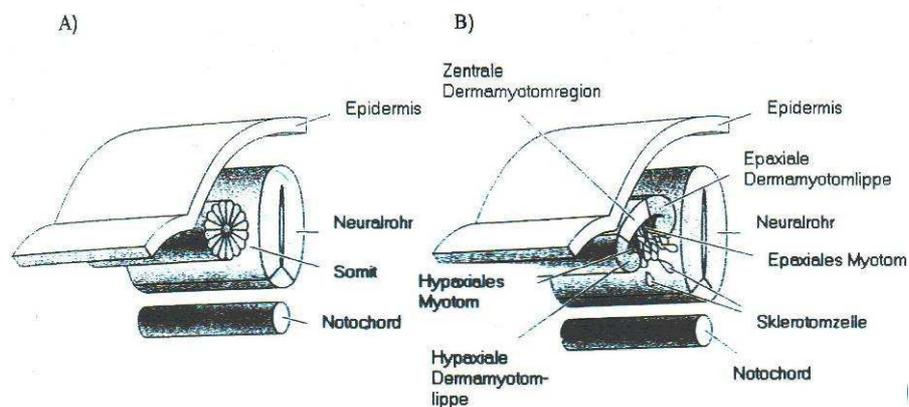


Abb. 1.2: Somitenformation eines Hühnerembryos. (A) Embryo 48 Stunden alt. (B) Embryo 65 Tage alt; schematische Darstellung aus Gilbert S.F., 2000.

Das Sklerotom baut die Wirbelkörper auf, indem es die Chorda umschließt und Zellen des posterioren Anteils mit Zellen des anterioren Teils des folgenden Sklerotompaars fusionieren. Das Dermatome bildet die Dermis und entsteht aus dem dorsalen Teil der Somiten (Dietrich S., et al., 1999). Die quergestreifte Muskulatur wird vom Myotom gebildet und lässt sich wiederum in epaxiales und hypaxiales Myotom unterteilen. Aus dem hypaxialen Myotom entstehen das Diaphragma und die Zungenmuskulatur, sowie die Schulter- und Extremitätenmuskulatur.

Während der Myogenese befinden sich die Muskelvorläuferzellen zuerst in einem undifferenzierten Stadium, an ihrem Ursprungsort in der lateralen Dermamyotomspitze. Im nächsten Schritt findet die Delamination, also das Ablösen der Zellen aus dem Zellverband, und die

regulierte Migration statt. Wenn die Muskelvorläuferzellen ihren Bestimmungsort, die Extremitätenknospe erreicht haben, differenzieren die Myoblasten zu Myozyten und proliferieren (Birchmeier C., et al, 2000).

Damit die Muskelvorläuferzellen sich weiter differenzieren können, ist die Expression von bestimmten Transkriptionsfaktoren wichtig. Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die an DNA-Erkennungssequenzen binden können und so die Expression bestimmter Gene und Genkaskaden hervorrufen und regulieren (Gilbert S.F, 2000). Die Proteine können aktivieren oder hemmen. Wichtige Mitglieder dieser Gruppe sind Pax3, Lbx1 und c-met. Sie gehen von den hypaxialen Muskelvorläuferzellen aus und stellen einen Marker für die Migrationsfähigkeit und des Differenzierungsstadiums der Muskelvorläuferzellen dar (Schäfer K. und Braun T, 1999; Dietrich S., Abou- Rebyeh et al, 1999).

In unseren in vivo Versuchen wurden die Expressionsmarker Pax3 und Lbx1 verwendet.

Pax3, ein paired box Transkriptionsfaktor, wird aus dem paraxialen Mesoderm exprimiert und bleibt später auf das Dermamyotom, genauer auf den medialen Teil und auf die laterale Spitze, beschränkt. Die Zellen, die Pax3 exprimieren und aus der lateralen Dermamyotomlippe auswandern, werden zu Zungen-, Zwerchfell- und Extremitätenmuskulatur (Bober E. und Franz T., et al. 1994). Forschungen an Splotchmäusen, in denen Pax3 nicht exprimiert wird, entwickelten keine Extremitätenmuskulatur und Zwerchfellmuskulatur (Birchmeier C., et al., 2000). Die vorzeitige Apoptose führt zur verminderten Zahl von Muskelvorläuferzellen und der verbliebene Teil schafft es nicht zu delaminieren. Dies zeigt, wie wichtig Pax3 für die Migration von Muskelvorläuferzellen ist. Außerdem ist bekannt, dass Pax3 Einfluss auf die Expression von c-met hat (Epstein, J. A. et al, 1996). Das Gen c-met, kodiert für Tyrosinkinase – Rezeptor und wird im gesamten Dermamyotom gebildet. Zusammen mit seinem Liganden SF/HGF, Scatterfactor- Hepatozyte Growth Factor (Wachstumsfaktor), bewirkt es die gerichtete Delamination der hypaxialen Muskelvorläuferzellen von der lateralen Dermamyotomlippe (Birchmeier C., et al., 2000). Zusätzlich kann HGF die Zellen in einem undifferenzierten Zustand „einfrieren“ und später, bei Bedarf die Migration, Proliferation und Differenzierung der Zelle aktivieren (Sonnenberg E. et al, 1993).

In c -met und in SF/HGF mutanten Mäusen kommt es auf Grund der fehlenden Delamination nicht zum Ausbilden der Extremitätenmuskulatur und Zwerchfellmuskulatur (Birchmeier C., et al., 2000). In Splotchmutanten mit funktionsuntüchtigem Pax3 Protein konnte die Expression von Lbx1 aus den Somiten verhindert werden, jedoch fand die Lbx1 Expression im Neuralrohr uneingeschränkt statt. Auch zeigten sich c-met Zellpopulationen in den Vorderextre-

mitäten von Pax3 mutanten Mäusen. Dies weist darauf hin, dass die Migration der Muskelvorläuferzellen nicht allein von Pax3 abhängig sein kann (Mennerich D. et al., 1998). Weiter zeigte sich in Experimenten von Mennerich D. et al., dass Pax3-positive Zellen, die durch SF/HGF induziert wurden, nur zu einer ungerichteten Zerstreuung der Zellen fähig waren und sich kein Expressionmuster von Lbx1 zeigte. Andererseits konnten durch FGF2 induzierte Pax3-positive Zellen die Ausbildung einer ektopen Extremitätenknospe hervorrufen und ein Lbx1 Expressionmuster war zu erkennen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Pax3 und c-met für die Delemination der Zellen aus dem Epithel des Dermamyotoms der Somiten verantwortlich sind und die zielgerichtete Migration dieser Zellen von Lbx1 abhängig ist (Mennerich D. et al., 1998).

Lbx1 ist ein homöoboxbeinhaltender Transkriptionsfaktor, der von den hypaxialen Muskelvorläuferzellen exprimiert wird. Anders als bei Pax3 und c-met, die im gesamten Bereich der Somiten exprimiert werden, wird Lbx1 nur in der lateralen Dermamyotomspitze exprimiert. Man ging davon aus, dass die Zelle zum Zeitpunkt der Migration aus den Somiten eine noch homogene Zellmasse darstellen und erst im Mesenchym der Extremitäten zu verschiedenen Muskelzelltypen determinieren. Später wurde erklärt, dass Lbx1 zu einem sehr frühen Zeitpunkt die Muskelvorläuferzellen, noch bevor diese aus dem Dermamyotom der Somiten in das Mesenchym der Extremitätenknospen einwandern, spezifiziert. Diese Ergebnisse gaben Anlass zur Forschung an Lbx1 Knock out Mäusen. So konnten Experimente von Schäfer und Braun zeigen, dass der Verlust des Lbx1-Gens zu einem Muskeldefekt der Vorder- und Hinterextremität führten (Schäfer K. und Braun T., 1999).

Es kam zum völligen Fehlen der hinteren Gliedmaßenmuskulatur. Den vorderen Gliedmaßen fehlte nur die distale Extensorengruppe und die restliche Muskelgruppe der Vorderextremität, also der ventrale, proximale Teil, entwickelte sich normal. Die Ergebnisse der Lbx1-Mutation zeigten einen deutlichen Migrationsdefekt der jeweiligen Muskelvorläuferzellen. Der Muskeldefekt scheint in den migratorischen Zellen selbst zu liegen, da nur in diesen Lbx1 normalerweise exprimiert wird. Jedoch ein Teil der Muskelvorläuferzellen der Lbx1-Knock out Mäuse konnte sich ohne Muskeldefekt entwickeln (Vorderextremität, ventrale, proximale Muskelgruppe). Speziell die Muskelvorläuferzellen dieser Muskelgruppen wandern über den ventralen Weg. Daraus lässt sich schließen, dass der ventrale Migrationsweg nicht auf den Expressionmarker Lbx1 angewiesen ist (Schäfer K. und Braun T., 1999; Brohmann, Jagla et al 2000; Gross, Moran-Rivard et al. 2000). Hier könnte man davon ausgehen, dass diese Zellpopulation bereits vor dem Auswandern aus dem Dermamyotom der Somiten andere regulie-

rende Signale und Mechanismen erhält und es sich vermutlich um keinen homogenen Zelltyp handelt (Schäfer K. und Braun T., 1999). Dies zeigt, dass die Migration nicht auf der Funktion eines einzelnen Faktors beruht, sondern vielmehr das Zusammenspiel vieler verschiedener Faktoren zu einer vollständigen und gerichteten Migration von Muskelvorläuferzellen führt. Die einzelnen Regulationsmechanismen während der Migration, in die Lbx1 involviert ist, sind noch nicht bekannt.

Weitere Wachstumsfaktoren, die synergistisch mit HGF wirken, sind die FGFs (Fibroblasten Wachstumsfaktoren) und die IGFs (Insulin ähnliche Wachstumsfaktoren). Die FGFs begünstigen die Proliferation, die Differenzierung und die chemotaktische Anziehung von Muskelvorläuferzellen und können im Falle von ektopischer Expression in Hühnerembryonen die Ausbildung einer zusätzlichen Extremitätenknospe auslösen (Cohn, Izvisua-Bermonte et al. 1995). HGF und FGF induzieren die Wanderung der myogenetischen Vorläuferzellen noch vor der Musterung der Gliedmaßen skelettmuskulatur. Die IGFs haben zusätzlich zur Proliferation und Differenzierung der Myoblasten die Funktion der Koordination der Muskelregeneration (Barton-Davis et al. 1998; Wilson E.M. et al. 1996).

Des Weiteren können IGFs die Expression von Myogenin fördern und haben Einfluss auf die Differenzierung der Myoblasten zu Myotuben. Es wurde gezeigt, dass HGF, FGF und IGF synergistisch an der Bildung der Skelettmuskulatur beteiligt sind. Auch haben alle drei Faktoren einen Einfluss auf die Regeneration der Skelettmuskelzellen, wozu jedoch zusätzlich die Muskelsatellitenzellen benötigt werden (Suzuki J., et al., 2000).

1.3 Wichtige Signalkaskaden der Myogenese

Für eine gut regulierte Muskelentwicklung sind nicht nur Signalwege über Wachstumsfaktoren oder Hormone wichtig. Es gibt auch intrinsische Signalwege, die eine bedeutende Rolle bei der Zellwanderung spielen, wie zum Beispiel die Familie der Rho-GTPasen. In dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Mitglieder dieser Familie auf die Wanderung der Muskelvorläuferzellen untersucht. Dabei wurden konstitutiv aktive sowie dominant-negative GTPasen, wie Rho A, Ras, Ral, Rac und Cdc42, in Form von Retroviren mikrochirurgisch in Hühnerembryonen injiziert und deren Einfluss auf die Zellmigration untersucht.

1.4 Zellwanderung

Die Zellwanderung ist ein komplexes Geschehen, in dem viele verschiedene Einheiten zusammenwirken. Hier soll zunächst ein Überblick über einzelne Schritte der Zellwanderung mit ihren Signalkomponenten gegeben werden.

Damit es zur Migration einer Zelle kommt, ist das kontrollierte Zusammenspiel von Adhäsion, Retraktion, Protrusion und Polarisation einer Zelle erforderlich. Die initiale Antwort einer Zelle auf ein migrationsförderndes Signal ist es, die Protrusion, also die Vorwölbung der Zelle in Richtung der Zellwanderung zu polarisieren (Ridley J. et al., 2003). Diese Protrusion kann ausgedehnt werden durch breite Lamellopodien und dorn-ähnliche Filopodien, die normalerweise für die Aktinpolymerisation erforderlich sind. Durch Anheftung der Lamellopodien oder Filopodien an die extrazelluläre Matrix (ECM) oder an angrenzende Zellen über einen Transmembranrezeptor kann das Aktinzytoskelett stabilisiert werden. Diese Adhäsion dient als Zugkraft für die Wanderung der Zelle. An der Zellrückseite findet eine Retraktion statt. Die Kontraktilität der Zelle ist erforderlich, damit die ganze Zelle der ausdehnenden Front folgen kann. Dadurch, dass das Aktinzytoskelett die Protrusion und die Kontraktilität der Zelle fördert, stellt es die richtungsweisende Kraft der Zellwanderung dar (Abb.1.3 u Abb.1.4).

Die Polarisation einer Zelle ist der Schlüssel zur Migration. Damit eine Zelle wandern kann, muss sie polarisiert sein, was bedeutet, dass der molekulare Prozess an der Zellvorderseite und an der Rückseite einer wandernden Zelle unterschiedlich sein muss. Festlegen und Aufrechterhalten der Zellpolarität durch extrazelluläre Stimuli scheint durch eine Reihe von positiven Rückkopplungsschleifen stattzufinden, die z. B. über GTPasen der Rho Familie, Phosphoinositol 3-Kinasen (PI3Ks), Integrine oder Mikrotubuli vermittelt werden. Abbildung 1.3 und Abb.1.4 geben einen Überblick über die Schritte der Migration und der daran beteiligten Faktoren, die im folgenden Teil besprochen werden.

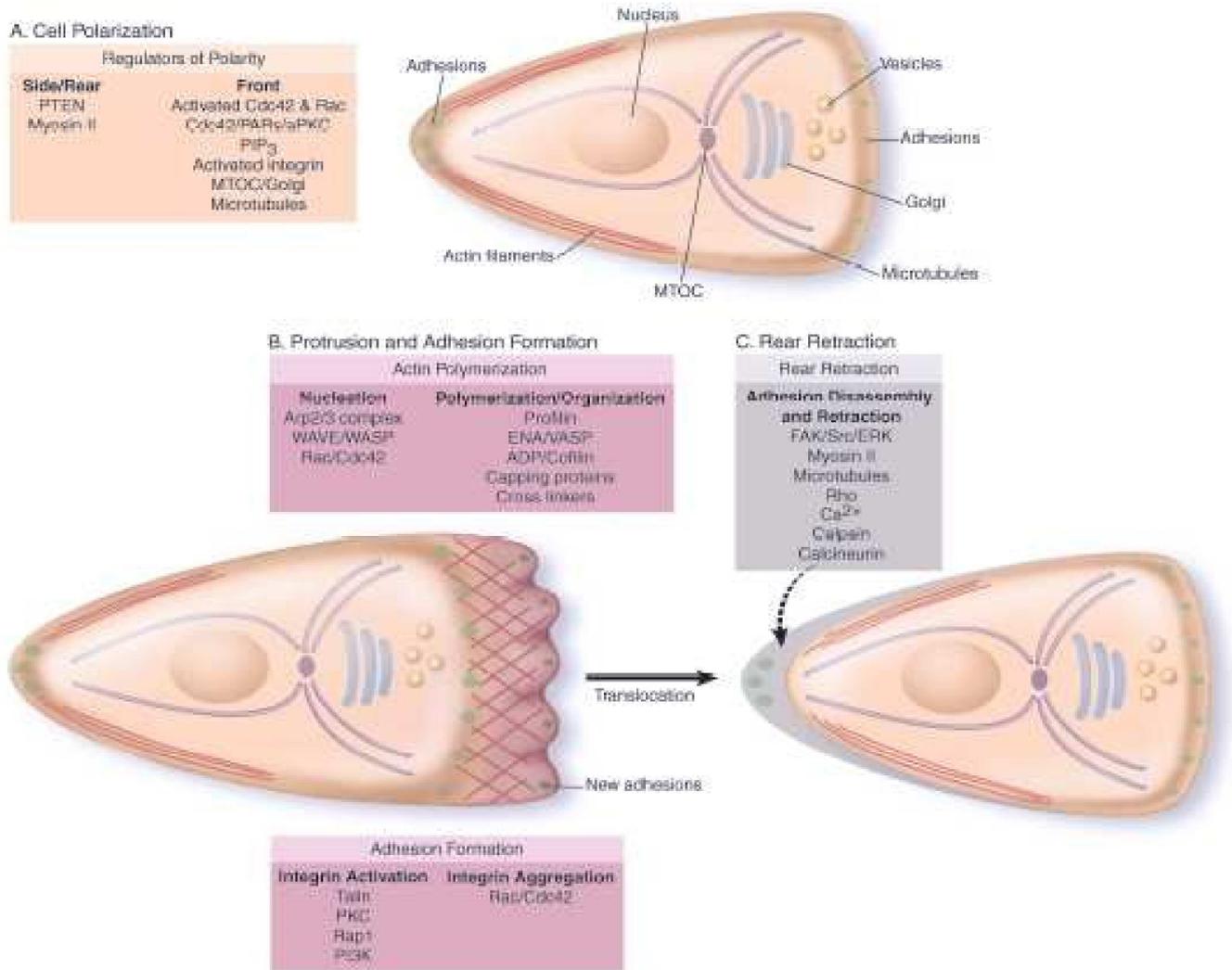


Abb. 1.3.: Zellwanderung. (A) Polarität ist der innere Antrieb der Zellwanderung. Diese wird erzeugt durch gerichteten Vesikeltransport in Richtung Zellfront, durch die Organisation der Mikrotubuli und durch die Positionierung des MTOC und des Golgiapparates vor den Zellkern. (B) Am Anfang des Migrationszyklus steht die Ausstülpung (Protrusion) der Zelle, die durch die Induktion der Aktinpolymerisation und die Bildung eines Aktinnetzes zustande kommt. Die Protrusion wird durch die Erzeugung neuer fokaler Adhäsion stabilisiert. Dazu werden wiederum Integrine und andere Adhäsionsmoleküle aktiviert und verschiedene Signalkomponenten am entstehenden Fokalkomplex rekrutiert. (C) Am hinteren Teil der Zelle löst sich die Adhäsion und es findet die Retraktion der Zelle statt (Ridley J.A. et al, 2003).

Die Abbildung 1.4 zeigt eine unabhängige Zellbewegung. Die Zellen wandern durch die polarisierte und dynamische Reorganisation des Aktinzytoskeletts, durch eine nach außen ziehende Kraft (blau), kombiniert mit einer kontraktile Kraft im Zellkörper. Die kontraktile Kraft führt zur Retraktion der Rückseite der Zelle.

Rho GTPasen agieren zeitlich und räumlich, um all diese Aspekte zu kontrollieren, wie im Folgenden gezeigt wird (Abb. Etienne Manneville, S. und Hall ,A.,2002).

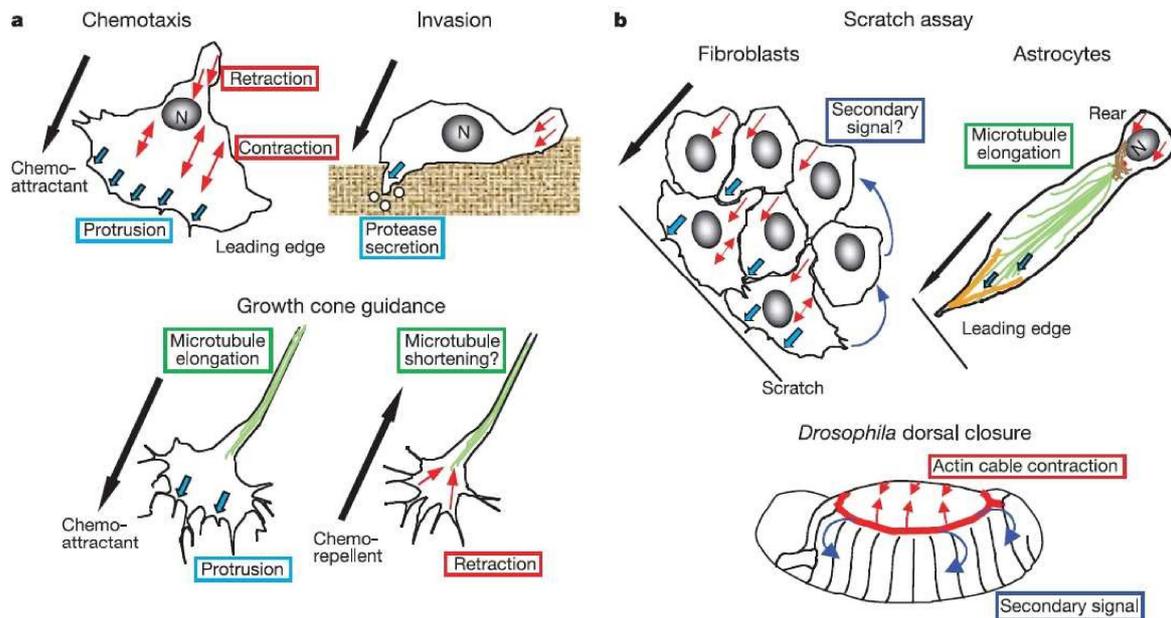


Abb. 1.4: (a) unabhängige Zellwanderung. (b) koordinierte Zellbewegung in vitro; Rac ist wichtig für die gerichtete Bewegung von Fibroblasten und Astrozyten. Die Aspekte der Zellpolarität werden durch Cdc42 (blaue Pfeile) kontrolliert. Cdc42 und Rac sind positive Regulatoren des Neuritenwachstums (grüne Markierung), wobei Rho die Neuritenausdehnung wiederum hemmt. In Fibroblasten versetzen Cdc42 und Rac die Membran in Protrusion. Rho (rote Pfeile) wiederum versetzt die Membran in Retraction, durch kontraktile Aktin und Myosinfilamente (Etienne-Manneville, S., und Hall A., 2002).

1.5 Funktionsweise der Rho GTPasen

GTPasen sind molekulare Schalter, die einen großen Bereich von Signaltransduktionswegen in allen eukaryontischen Zellen kontrollieren. Sie regulieren z. B. die Aktinzytoskelettbildung, sind an der Entstehung der Zellpolarität, der Mikrotubeldynamik, an den Membran-transportwegen und an der Transkriptionsfaktoraktivität einer Zelle beteiligt (Etienne Manneville, S., und Hall, A., 2002). Sie haben zwei Zustandsformen: Zum einen gebunden an GTP (aktive Form), zum anderen gebunden an GDP (inaktive Form). Die Bindung von zellulärem GTP an die GTPase und somit die Aktivierung erfolgt mit Hilfe von spezifischen Aktivatoren (guanine nucleotide exchange factors, GEFs), während die Inaktivierung

durch GTPase activating proteins (GAPs), die zur Hydrolyse der GTPs führen, ermöglicht wird.

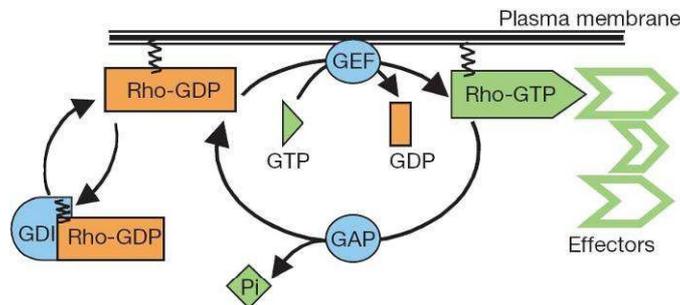


Abb. 1.5.: Rho GTPase - Zyklus. Es wurden 20 verschiedene Rho GTPasen beschrieben, die sich in einem Kreis zwischen aktivem (GTP-gebunden) und inaktivem (GDP-gebunden) Zustand befinden. Dieser Kreis wird reguliert von drei Klassen von Proteinen: den GEFs, die die Aktivierung vermitteln; den GAPs, die die GTP-Hydrolyse stimulieren und von den GDIs (guanine nucleotide exchange inhibitors), die die inaktive GTPase von der Membran entfernt (Abb. Etienne Manneville S., und Hall A., 2002).

Wie bereits bei der Zellmigration beschrieben, sind für die Mitglieder der Familie der Rho-GTPasen einige wichtige Bedeutungen in Bezug auf die Zellmigration beschrieben worden. Einige dieser Aufgaben werde ich im Folgenden beschreiben.

1.5.1 Rho GTPasen in der Zellmigration

Zellwanderung erfolgt in der Regel gerichtet, als Antwort auf eine Vielfalt von möglichen Signalen, wie zum Beispiel einem Chemotaxisgradienten (Faktoren der zielgerichteten Zellbeweglichkeit, wie Wachstumsfaktoren) oder entlang von verschiedenen Molekülen der Extrazellulären Matrix (ECM). Externe Faktoren greifen an oberflächlichen Zellrezeptoren an und induzieren verschiedene Kaskaden, wie z. B. die Aktivierung von G-Proteinen, Tyrosinkinasen oder Lipidkinasen. Die lokale Aktivierung von Rac oder Cdc 42 und anderen Regulatoren wie WASP/WAVE Proteinen (Wiskott-Aldrich Syndrom Protein) und dem Arp2/3 Komplex stimulieren die Bildung eines verzweigten Aktinfilamentnetzwerkes am führenden Rand der Zelle, was die Protrusion in die Richtung der Wanderung induziert (Abb.1.3; B).

Das Rho-Gen wurde 1985 identifiziert, seine Funktion als GTPase wurde jedoch erst 1992 beschrieben. Weitere Mitglieder (GTPasen) der Rho-Familie sind das Cdc42 und das Rac

(Etienne - Manneville, S. und Hall, A., 2002).

Im Rahmen der funktionellen Untersuchungen der Rho-Familie der GTPasen wurden verschiedene Mechanismen aufgeklärt, mit denen die verschiedenen Faktoren das Adhäsions- und Wanderungsverhalten einer Zelle beeinflussen können. Es wurden aktive Mutanten von Rho und Rac gefunden, die die Ansammlung der kontraktile Aktin- und Myosinfilamente (Stressfasern) induzieren und eine aktinreiche Oberfläche bereitstellen (Etienne-Manneville, S. et al., 2004). Später wurde entdeckt, dass Cdc42 die Bildung der Aktinfasern fördert (Allen, W.E et al 1998; Nobes C.D. und Hall A.1995, Ridley J. et al 1995). Rho, Rac und Cdc42 regulieren drei verschiedene separate Signaltransduktionswege über Plasmamembranrezeptoren, die für die Bildung und Adhäsion von verschiedenen Filament- und Aktinstrukturen verantwortlich sind (Nobes, C.D. and Hall, A., 1995).

Rho ist an der Regulierung der Zellpolarität, der Gentransduktion, sowie der Regulierung des G1 Zellzyklusverlaufs beteiligt. Zusätzlich kontrolliert Rho die Mikrotubulobeweglichkeit, die vesikulären Transportwege und ist an einer Vielfalt von enzymatischen Aktivitäten (z.B. NADPH- Oxydase in Phagozyten) beteiligt. Es ist verantwortlich für die Kontraktion und Retraktion des Zellkörpers (Abb.1.3 und Abb. 1.4). In verschiedenen Zelltypen führt die Hemmung von Rho zur Bildung eines ausgedehnten hinteren Teils der Zelle, da die Aktin-Myosin- basierte Kontraktibilität im Zellkörper vermindert ist, was darauf hinweist, dass Rho an der Rückseite der Zelle aktiv ist. Rho kann zur Stabilisierung der Mikrotubuli und der fokalen Adhäsionskomplexe an der Zellrückseite beitragen.

Im Gegensatz zu Rho sind Rac und Cdc42 an der Zellfront (leading edge) aktiv. Cdc42 ist der Hauptregulator der Zellpolarität in allen eukaryontischen Zellen (Abb.1.3, A). Die Zellpolarität ist fundamental für die Proliferation, die Differenzierung und die Morphogenese (Etienne-Manneville, S. and Hall, A. 2002). Sowohl durch Hemmung als auch durch Aktivierung von Cdc42 kann die Richtung der Zellwanderung unterbrochen werden.

Rac induziert die Aktinpolymerisation und die Bildung des Integrinadhäsionskomplexes in der Zellperipherie, was zur Membranprotrusion (Vorwölbung) führt. FRET- (Fluoreszenz-Resonanz- Energie-Transfer) Mikroskopie hat gezeigt, dass der Rac GTP-Spiegel am Vorder- rand der Zelle (leading edge) während der Zellwanderung am höchsten ist.

Rho, Rac und Cdc42 agieren auch synergistisch, um eine gezielte Zellwanderung zu ermöglichen. So vermindert z. B. eine Aktivierung von Cdc42 und Rac die Rho Aktivität und erhöht dadurch die Phosphoinositol 3-Kinase (PI3K) - Aktivität sowie die Produktion von den

phosphoinositiden Schlüssel molekülen PI (3,4) P2/PIP3 am führenden Rand. Integrine und andere Adhäsionsmoleküle werden aktiviert und stabilisieren die Protrusion durch strukturelle Beziehungen zu den Aktinfilamenten. Sie stimulieren Rac, was die Anziehung von zusätzlichen Integrinen und die Bildung der Adhäsion fördert. Eine neue Adhäsion am führenden Rand verstärkt die Rac-, Cdc42- und die PI3K-Aktivität, wohingegen die Bildung eines Gradienten für die Rho-Aktivität, am führenden Rand niedriger und an der Zellhinterseite höher ist. Die Polarisation ist auch abhängig von der Sensibilität der Rezeptoren am führenden Rand. Die Adhäsion wird kontrolliert über Signalwege wie FAK, ERK, Src und die Protease Calpin. Die Retraktion an der Zellhinterseite benötigt die Rhokinase und ist abhängig von Myosin. Spezifische Aufgaben der einzelnen Mitglieder der Familie der Rho-GTPasen werden im Folgenden dargestellt.

1.5.2 Cdc42 das Zentrum der Polarität

Im Folgenden werden die wichtigsten Funktionen von Cdc42 zusammengefasst und durch die Abbildung 1.6 veranschaulicht.

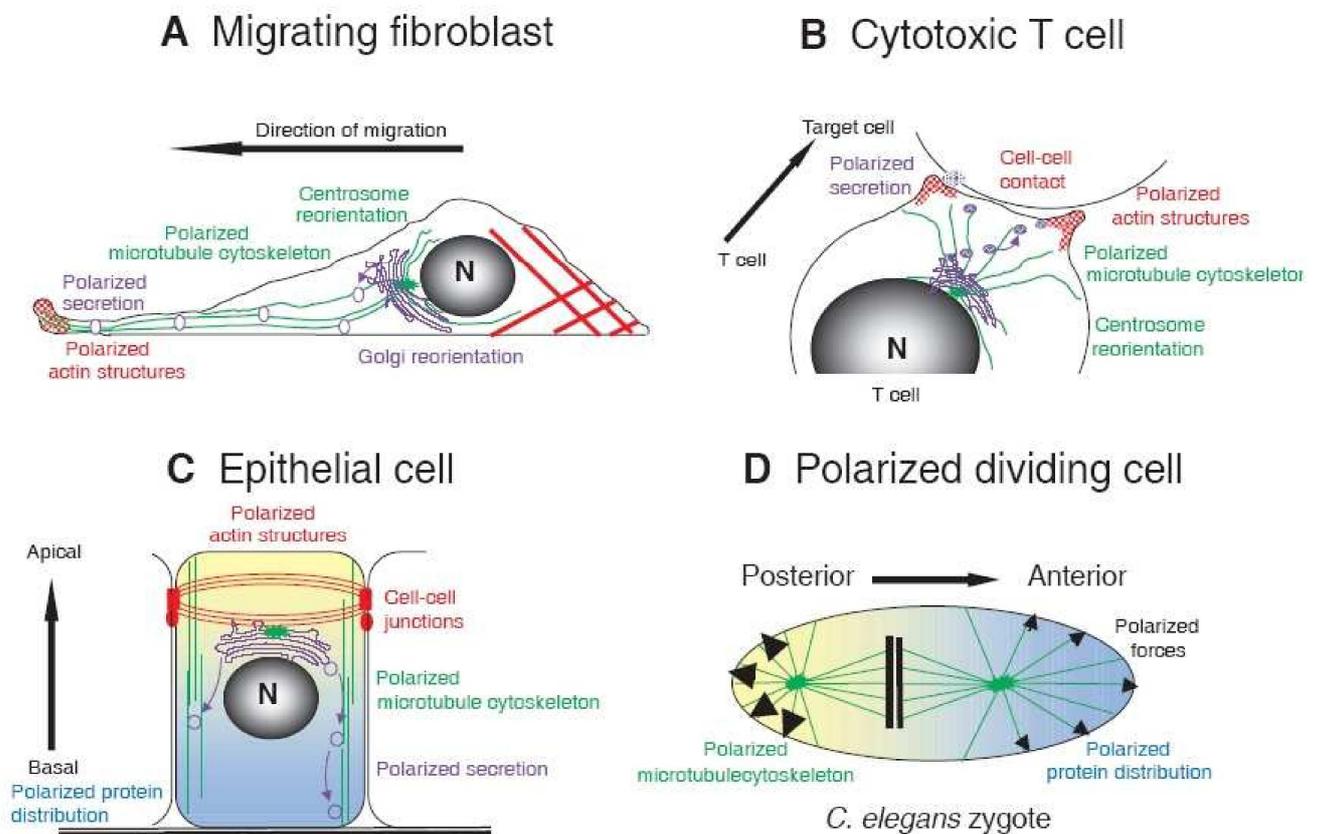


Abb. 1.6.: Funktionen von Cdc42 in Bezug auf das Zytoskelett. (A) – eines wandernden Fibroblasten. (B) – einer zytotoxischen Zelle. (C) – einer epithelialen Zelle und (D) – einer polarisierten, sich teilenden Zelle.

In Abb.1.6 A ist die Zellwanderung eines Fibroblasten dargestellt. In wandernden Fibroblasten fördert das Aktinzytoskelett die Ausdehnung des führenden Randes (Protrusion) und das Zusammenziehen (Kontraktion) der Rückseite der Zelle.

Cdc42 ruft eine Zellpolarisation hervor, indem es das Mikrotubenorganisationszentrum (MTOC) und den Golgiapparat vor den Zellkern positioniert und so alles Richtung führenden Rand, also Richtung wandernde Zellfront orientiert ist (Abb.1.6 A). Diese Cdc42 induzierte Zellorganisation kann die gerichtete Zellwanderung steuern, indem es das Mikrotubenwachstum in den Lamellopodien fördert und die von den Mikrotuben vermittelte Zustellung der vom Golgiapparat abstammenden Vesikel zum führenden Rand erleichtert und somit die Membran mit Proteinen beliefert, die für das Voranschreiten der Protrusion gebraucht werden. Die Positionierung des MTOC vor den Zellkern scheint nur in der Zellwanderung von langsam wandernden (slow-moving) Zellen von Bedeutung zu sein, da in schnell wandernden (fast moving) Zellen, wie z. B. Neutrophilen- oder T-Zellen, das MTOC hinter dem Zellkern lokalisiert ist. Diese Effekte der Positionierung von MTOC durch Cdc42 werden hauptsächlich durch einen Signalweg gesteuert, der durch den Cdc42 Effektor PAR 6 reguliert wird, der wiederum in einem Komplex mit PAR3 und einer atypischen Proteinkinase (aPKC) existiert. Der genaue molekulare Mechanismus ist jedoch noch nicht ganz verstanden.

Die Polarisation wird induziert durch Zell – Zellkontakte; durch Kontaktrezeptoren und Adhäsionsproteine, wie z. B. Integrine und E-Cadherin. Durch Nectin sowie andere Chemokine können individuelle Zellen Kontakt mit der Umgebung aufnehmen und dadurch deren Polarität beeinflussen. Das wiederum wird kontrolliert über Cdc42 (Takai und Nakanichi, 2003).

Ein Beispiel hierfür ist die Bildung der epithelialen Schicht, wobei Zellen polarisiert sein müssen, um verschiedene apikale und basolaterale Schichten durch Zell-Zellkontakte erzeugen zu können (Abb.1.6; C) (Arthur et al., 2002; Honda et al, 2003). Dieses erlaubt wiederum die Sekretion von apikalen und basolateralen Proteinen. Die intrazelluläre Organisation ist charakterisiert durch polarisierte Zytoskelettstrukturen und polarisierten Membrantransport. Cdc42 gesteuerte Zell-Zellkontakte erzeugen auch polarisierende Funktionen in anderen Zellen: Zum Beispiel bei der Interaktion zwischen T-Zellen und den Antigenpräsentierenden Zellen (Abb.1.6; B). Während eines Kontaktes mit einer Zielzelle zeigt eine zytotoxische T-Zelle eine polarisierende Organisation, die die Bildung von stabilen Zell-Zellkontakten erlaubt. Hierbei erhalten die Zentrosome und Golgiapparate intrazellulär eine Orientierung in Rich-

tung dieser Zell-Zellkontakte. Dies ist notwendig, um die Zustellung von sekretorischen Vesikeln zu ermöglichen.

Auch bei der asymmetrischen Zellteilung spielt Cdc42 induzierte Polarität eine wichtige Rolle, so ist z. B. in der Zygote (Abb.1.6; D) die erste Teilung asymmetrisch. Das Mikrotubulensystem ist an beiden Enden der Zygote polarisiert, so dass es zu einer asymmetrischen Positionierung der Mitosespindeln und der Proteinverteilung im Zytoplasma kommt und sich so zwei nicht äquivalente Tochterzellen entwickeln.

Verschiedene Signalwege kontrollieren die Cdc42 Aktivierung. In multizellulären Organismen antworten die Zellen auf einen weiten Bereich von externen Signalen (wie chemotaktische Signale, physikalische Signale und Zell-Zellkontakte), die die Zellpolarisierung fördern. Diese Signale werden durch verschiedene Rezeptorfamilien übermittelt und werden hier kurz beschrieben. Es sind verschiedene Signalwege bekannt, die zu der Aktivierung und Anordnung von Cdc42 führen: einmal der Phosphoinositol 3 - Kinase (PI3-K) Signalweg, der für die Zellpolarisation während der Chemotaxis benötigt wird und der Rac sowie Cdc42 GTPasen an der wandernden Zellfront aktiviert (Benard et al, 1999, Wang et al., 2002). Die Phosphoinositol-3-Kinase wird durch die Phosphatase PTEN gehemmt, die so einen negativen Einfluss auf die Cdc42 Aktivität hat. Zum anderen existiert ein zweiter Signalweg über die PAK1-Kinase: Ein heterotrimeres – G-Proteinsignal, das den Chemoattakanten C5 α stimuliert und über einen Serpentinrezeptor vermittelt wird.

Andere Faktoren, wie der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) induzieren auch die Polarisierung, indem sie an einen Tyrosin-kinase-Rezeptor binden und Cdc42 aktivieren (Chou et al., 2003; Lui and Burridge 2000). Eine Hemmung von Cdc42 in EGF stimulierten Fibroblasten führt zur keiner effektiven Zellwanderung.

1.5.3 Hemmende und stimulierende Regulation von Rac

Die Aktivierung der Aktinpolarisation wird unter anderem durch die Zustellung von Rac Austauschfaktoren (Rac GEF), die durch die PI3 Kinase aktiviert werden, erreicht. Während Rac aktiv ist, können verschiedene Rückkopplungsschleifen identifiziert werden, die helfen, die gerichtete Protrusion aufrecht zu erhalten. Zum einen kann Rac selbst die Aktivierung von PI3Ks an der Plasmamembran stimulieren. Zum anderen findet eine Interaktion zwischen Rac und den Mikrotubuli statt, indem die Mikrotubulopolymerisation Rac aktiviert und dieses wie-

derum die Mikrotubenstabilität fördert. Zusätzlich führt die Integrinbindung, die ebenfalls mittels Integrinaktivierung über PIP3 ausgelöst werden kann, zur Rac -Aktivierung und damit zur gezielten Membranprotrusion. Die neu geformte Adhäsion am führenden Rand wiederum fördert die Rac- Aktivität (Abb.1.3, A u B).

S1P2 wurde als erstes Beispiel für einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) erwähnt, der die negative Regulation von Rac vermittelt, welches ein hemmendes Signal für die Zellwanderung und Zellanziehung darstellt (Sugimoto N.,et al 2002). S1P ist ein bioaktives Lysophospholipid, das Einfluss auf eine Vielfalt von biologischen Aktivitäten ausübt. Die meisten S1P Moleküle sind aus der Edg - Familie, welche G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) darstellen und sich, gekoppelt an S1P-Moleküle, in S1P1/Edg1, S1P2/Edg5/AGR16/H218 und S1P3/Edg3 unterteilen lassen. S1P ist ein extrazellulärer Modulator für die Stimulierung und Hemmung der Zellbewegung. Diese bimoduläre Funktion ist scheinbar zelltypspezifisch. So stimuliert S1P z. B. die Chemotaxis in vaskulären endothelialen Zellen und in embryonalen Fibroblasten; es hemmt jedoch die Zellwanderung in vaskulären glatten Muskelzellen und in Melanomzellen. Diese bimoduläre Regulierung basiert auf der Vielfalt der S1P Rezeptor - Isotypen, die sowohl einen aktivierenden wie auch einen hemmenden Einfluss auf die Zellwanderung haben können.

Die G-Protein gekoppelten Rezeptoren S1P2 und S1P3 sind beide Sphingosin-1-Phosphat vermittelte Stimulatoren von Rho. Jedoch vermittelt S1P2 die Hemmung der Rac-Aktivierung, der Membranfaltung und der Zellwanderung durch das GTPase - Aktivierungsprotein (GAP), wohingegen S1P1 und S1P3 Rezeptoren die Aktivierung von Rac über Gi vermitteln. Die Eliminierung von S1P Rezeptorgenen in Mäusen und die Entwicklung eines S1P ähnlichen Stoffes in verschiedenen Experimenten haben gezeigt, dass S1P an der Regulierung der Zellwanderung *in vivo*, an der Zellmorphogenese und an der Regulierung der Lymphocyten- adressierung beteiligt ist und, dass diese Effekte möglicherweise über die Familie der Rho-GTPasen vermittelt werden.

1.5.4 Interaktion Rho - Rac

Ein Modell, wie wandernde Zellen die Polarität aufrechterhalten können, basiert auf der Tatsache, dass Rho und Rac gegenseitige Antagonisten sind; jedes unterdrückt die Aktivität des anderen. Aktives Rac am führenden Rand der Zelle unterdrückt dort die Rho Aktivität, wo-

hingegen Rho an der Seite und im hinteren Teil der Zelle stärker aktiv ist und hier die Rac Aktivität hemmt, wodurch die Rac- vermittelte Protrusion an nicht wandernden Seiten verhindert wird. Die Hemmung von Rac durch GPCR wird vermittelt durch G12/13 und Rho. Gi hat wiederum einen stimulierenden Einfluss auf Rac (Sugimoto N. et al ,2002).

Rho vermittelt die Hemmung der zellulären Rac - Aktivität über einen Signalweg, der nicht durch die Rho – Kinase - Aktivität beeinflusst wird. Bei einem Experiment wurden die S1P2-exprimierenden Zellen (also Rac hemmende Zellen) mit Botulinum C3 Toxin vorbehandelt, das Rho inaktiviert. Durch die Rho - Inaktivierung konnte Rac nicht mehr durch S1P2 gehemmt werden, was zur indirekten IGF -gesteuerten Zellwanderung führte. Dies zeigt, dass Rho die Hemmung der Rac-Aktivität über einen S1P2-Signalweg bewirken kann.

1.5.5 Der Einfluss von Ras und Ral auf die chemotaktische Wanderung von Skelettmuskelvorläuferzellen.

Wie in der anfänglichen Abbildung 1.2 (S.6) dargestellt, müssen hypaxiale Muskelvorläuferzellen zielgerichtet über lange Distanzen wandern. Die Wachstumsfaktoren FGF und HGF haben den stärksten Einfluss auf die Wanderung der Skelettmuskelvorläuferzellen vom Dermamyotom zu den Endgliedern der Extremität. IGF wiederum induziert die distale Wanderung von Muskelzellen in die Endglieder während der Skelettmuskelentwicklung und ist wahrscheinlich auch bei der postläsionalen Regeneration der Skelettmuskeln beteiligt, indem es Satellitenzellen in die Regenerationszone anzieht. Dieser Prozess wird unter anderem durch die Faktoren Ras, Ral, Rac und Cdc42 reguliert. Ras und Ral sollen hier genauer dargestellt werden. Die Mitglieder der Ras GTPase Familie stellen eine der wichtigsten Regulatoren der Zelle dar. Man kann sie in fünf Hauptgruppen einteilen: Ras, Rho, Rab, Arf und Ran. Die Expression eines dominant - negativen Mutanten von Ras und Ral hemmen die Chemotaxis in C2C12 Myoblasten, indem der Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF), der Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF) und der Insulin-like-growth-Faktor 1 (IGF 1) inhibiert werden, welche Schlüsselregulatoren der Gliedmaßenentwicklung und der Skelettmuskelregeneration darstellen. Im Gegensatz dazu zeigten Inhibitoren der Phosphatidylinositol 3-Kinase und der mitogen - aktivierten Protein Kinase (MEK) keinen Effekt in Bezug auf die chemotaktische Wanderung der C2C12-Zellen (Suzuki J., et al., 2000). Die Aktivierung des Ral - Rac -Signalweges und die Expression eines aktivierten Mutanten von Ras ergibt eine

Zunahme der Motilität der Myoblasten. In einem Versuch konnte durch eine Mutation im Ral - Gen die Bindung von Ral an die Phospholipase D verhindert werden, was zu einer abgeschwächten Myoblastenmotilität führte. Weiterhin fand man heraus, dass Ras und Ral in C2C12 Zellen auch durch FGF, HGF und IGF über Tyrosinkinaserzeptoren aktiviert werden. Ras ist ein kleines GTP - bindendes Protein, das die Umwandlung von inaktivem GDP in aktives GTP und umgekehrt ermöglicht. Ras aktiviert verschiedene Signaltransduktionsstoffe, wie Raf, Ral, GEF und Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) und spielt eine bedeutende Rolle bei der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung. Untersuchungen ergaben, dass die Ras-Aktivität Einfluss auf die FGF- stimulierte Bewegung der endothelialen Zellen, sowie die Zellanziehung und die HGF- induzierte Zerstreung von epithelialen Zellen hat. Es sind drei verschiedene Arten von Ral bekannt: Ral BP1, PLD und Filamin, die auf die Zellbewegung Einfluss nehmen. Ral BP1 hat die GAP Domäne für Rac 1 und für CDC42 Regulatoren des Aktin - Zytooskelett. Die PLD - Aktivität ist für die Aktinstressfaser-Bildung zuständig und ist am Vesikeltransport beteiligt. Filamin ist an der Ral - abhängigen Zellbewegung und Zellwanderung beteiligt, aber genaueres ist noch nicht bekannt. Es wurde bewiesen, dass die Wachstumsfaktoren IGF1, HGF und FGF den Ras- und den Ca^{2+} - Signalweg benutzen, um die Ral - Aktivität zu regulieren. Der Ca^{2+} - Signalweg ist wiederum abhängig von dem Ras-Signalweg (Suzuki J., et al., 2000).

1.5.6 Der Einfluss der Rho-Kinase auf fokale Adhäsion

Neben dem Umbau der extrazellulären Matrix und der Etablierung der Zellpolarität wirken Mitglieder der Rho-GTPase-Familie auch an der Aktivierung von verschiedenen Zellrezeptoren, wie z. B. den Integrinen mit. Integrine sind heterotrimere Rezeptoren, bestehend aus einer α - und einer β - Kette mit langen Ligand-bindenden, extrazellulären Domänen und kurzen im Zytoplasma liegenden Domänen. Die Integrine sind eine Hauptfamilie der migrationsfördernden Rezeptoren, zum Beispiel, indem sie zur Verstärkung der Adhäsion zwischen der wandernden Zelle und der extrazellulären Matrix führen. Darüber hinaus aktivieren sie migrationsgebundene Signalproteine und sind Empfänger von intrazellulären und extrazellulären Signalen, die möglicherweise eine Zellwanderung induzieren können. Eine Ansammlung von Integrinen an der Zelloberfläche wird als Fokalkomplex bezeichnet und bildet sich in der Regel am führenden Rand, wo während der Zellmigration eine neue Adhäsion geformt wird. Die

Bildung dieses Fokalkomplexes ist abhängig von Rac, Cdc42 und Rho (Nobes C. D. et al., 1995) Der Fokalkomplex stabilisiert die Lamellopodien durch Bindung an die extrazelluläre Matrix, wodurch die effiziente Wanderung gesteuert wird. Dadurch, dass sich Integrin mit der extrazellulären Matrix und dem intrazellulären Zytoskelett verbindet, hat Integrin zwei Funktionen, einmal dient es als Zugseite, über die die Zellen wandern und ein anderes mal als mechanischer Sensor, der Informationen über den physikalischen Zustand der extrazellulären Matrix und über die veränderte Zytoskelettdynamik sendet. Die Kraft, die von der Adhäsionsstelle ausgeht, leitet sich von der Interaktion von Myosin II mit den Aktinfilamenten ab, die mit dieser Stelle verbunden sind. Die Myosin II Aktivität wird durch die Phosphorylierung der Myosin leichten Kette (MLC) reguliert, was direkt positiv über die MLC-Kinase (MLCK) und die Rho-Kinase (ROCK) oder auch negativ über die MLC Phosphatase vermittelt wird. Die MLC Phosphatase wird wiederum über ROCK inhibiert und phosphoryliert. Die Regulation der Rho – Kinase erfolgt durch die Bindung von Rho - GTP. Die MLC Phosphorylierung aktiviert Myosin, wodurch es zur Zunahme der Kontraktilität und der Übertragung der Spannung auf die Adhäsionsstelle kommt (Amano M., et al 2002). Dictyostelium Zellen, die einen Mangel an Myosin II oder den Regulatoren PAKa aufweisen, zeigen eine beeinträchtigte Retraktion der Zelle. Ähnliches zeigt sich in Monozyten und Neutrophilen. Hier wird die Myosin II Ansammlung durch die Hemmung von Rho oder Rhokinase geblockt.

1.6 Zielstellung

Bis jetzt gibt es sehr viele *in vitro* Daten und Experimente über die genaue Regulation der Zellwanderung in Skelettmuskelvorläuferzellen. Wie beispielsweise die *in vitro* Experimente von Suzuki et al. zeigten, könnten die Faktoren Ras und Ral einen wichtigen Einfluss auf die Wanderung der hypaxialen Muskelvorläuferzellen in die differenzierten Endglieder haben. Eine *in vivo* Untersuchung wurde bisher nicht durchgeführt.

Im Rahmen meiner Arbeit wurden Hühnerembryonen mit konstitutiv aktiven sowie dominant-negativen GTPasen in Form von Retroviren injiziert, um die *in vitro* Ergebnisse der wesentlichen Faktoren der Zellwanderung *in vivo* zu testen. Hierzu gehören, wie oben schon dargestellt, die GTPasen Rac, Ral, Ras, CdC42 und Rho.

Ergänzend zu den *in vivo* –Versuchen mit Hühnerembryonen wurden Experimente an genetisch modifizierten Muskelvorläuferzellen *in vitro* durchgeführt, um den Wirkmechanismus der Rho-GTPasen bei der Wanderung von Muskelvorläuferzellen besser verstehen zu können.

2. Material und Lösungen

2.1. Material

2.1.1 Gebrauchswaren

Filmmaterial Polaroid

Glaspipetten.....Hirschmann Laborgeräte

Reaktionsgefäße, Plastikwaren.....Greiner Labortechnik GmbH
Nunc, Sarstedt

Zellkulturschalen (Nunc Surface□)Nunc, Sarstedt

Objektträger, Deckgläser, GlaskapillarenScience Products GmbH

2.1.2 Chemikalien

Soweit nicht anders erwähnt, wurden die Chemikalien und Biochemikalien von den Firmen Sigma, Merck, BD Biosciences, Applichem, Invitrogen, Roth und Biomol in Analysequalität bezogen.

2.1.3 Enzyme

Alkalische PhosphataseBoehringer (Mannheim)

Proteinase KBoehringer (Mannheim)

Restriktionsendonukleasen.....Boehringer (Mannheim)

RNase ABoehringer (Mannheim)

RNase HPromega (Heidelberg)

RNasin (RNase Inhibitor).....Promega (Heidelberg)

T3 - RNS – Polymerase.....Promega (Heidelberg)

T7 - RNS – Polymerase.....Promega (Heidelberg)

Taq DNS PolymeraseEppendorf

Trypsin / EDTA.....Gibco BRL

2.1.4 Antikörper

Primäre Antikörper

Dig - Antikörper konjugiert mit alkalischer

PhosphataseBoehringer (Mannheim)

2.1.5 Befruchtete Hühnereier

Die befruchteten und virusfreien SPF - Hühnereier wurden von der Firma Charles River (Extertal) bezogen.

2.1.6 Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 2.1.: Synthetische Oligonukleotide (von Roth / Karlsruhe)

Name	Sequenz 5`-3`Richtung	Tm in °C
T3	GCT CGA AAT TAA CCC TCA CTA AAG	52 °C
T7	GAA TGG TAA TAC GAC TCA CTA TAG	52 °C

2.1.7 Verwendete Sonden für whole mount *in situ* Hybridisierung

Um einzelsträngige RNS-Proben für die *in situ*-Hybridisierung zu erhalten, musste man sie mit Hilfe einer RNS- Polymerase synthetisieren. Dazu wurde die DNS der Probe in einen Plasmidvektor kloniert. Damit keine Plasmidsequenzen mit einem hohen Hintergrund transkribiert wurden, wurde der Plasmid mit den jeweiligen Restriktionsenzymen linearisiert. Mit Hilfe der angegebenen RNS-Polymerasen wurde eine *in vitro*-Transkription durchgeführt und ein Sense-Strang als Kontrolle sowie ein Antisense-Strang als Probe erzeugt.

Folgende Plasmide dienen als Matritze zur Herstellung von Antisense - RNS-Proben mit Hilfe von *in vitro* Transkription:

- § Hühnchen Lbx1 (cLbx1) -
800 bp in pBluescript KS II +

Antisense - Probe: Linearisierung mit SalI, Transkription mit T7 RNS-Polymerase

§ Hühnchen Pax 3

600 bp in pBluescript KS II +

Antisense-Probe: Linearisierung mit Bam H I, Transkription mit T3 RNS-Polymerase

2.1.8 Materialien für die EZ-Detect™ Rho Activation Kit

- § Proteaseinhibitor (z. B. Halt™ Proteaseinhibitor Cocktail Kit-EDTA Free, Product No 78415)
- § β-Mercaptoethanol (Product No.35602)
- § Polyacrylamidgel, 12% oder 4-20% (Prescis™ Chemikalie)
- § Nitrozellulosemembran (Produkt No.88014)
- § Trispuffer Saline (TBS; 25 mM Tris; HCL; pH 7,5; 150 mM NaCl; Product No 28379) Molbiol-Lösungen
- § Goat Anti-Mouse IgG-Horseradish Peroxidkonjugat (Anti-Rho AK)
- § Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrat
- § Röntgen-Film (Kodak)
- § 0,5 M EDTA, pH 8,0
- 1 M MgCl₂
- § Natriumazid (NaN₃)

2.2. Lösungen und Puffer

2.2.1 Lösungen und Medien für molekularbiologische Methoden

Alle verwendeten Lösungen und Puffer wurden mit bidestiliertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Milli-Q; Millipore) angesetzt. Wenn nicht anders erwähnt, wurde der pH-Wert mit NaOH oder HCl eingestellt.

Tabelle 2.2.: Lösungen für die DNS Präparation

Lösung A:	50 mM Glucose 25 mM Tris pH 8,0 10 mM EDTA
Lösung B:	0,2 N NaOH 1% SDS
Lösung C:	3 M Kalium Acetat 1,8 M Essigsäure

Tabelle 2.3.: Lösungen für Gelelektrophorese

TAE - Puffer 50x:	2 M Tris – Base 1 M CH ₃ COOH 0,1 M EDTA, mit Essigsäure auf pH 8,3 eingestellt
TAE - Puffer 10x:	10 mM Tris – HCl 0,1 mM EDTA
DNS - Ladepuffer:	12% Ficoll 4000 60 mM Na ₂ EDTA, pH 8,0 0,6% SDS 0,15% Bromphenolblau 0,15% Xylencyanol
PBS 10x:	1,5 M NaCl 0,03 M KCl 0,08 M Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 0,01 M KH ₂ PO ₄ pH 7,5
Ethidium-Bromid Lösung	1% (10 mg / ml) Stammlösung; Arbeitslösung 0,01% in H ₂ O

2.2.2 Lösungen für whole mount *in situ* Hybridisierungen

Für die Transkription und Hybridisierung verwendete Lösungen während der Whole mount *in situ* Hybridisierung mussten RNase frei sein. Dazu wurden die verwendeten Lösungen mit 0,01% Diehtylpyrocarbonat (DEPC) behandelt und danach zweimal autoklaviert. DEPC ist

ein Radikalstarter und zerstört dadurch in den Lösungen enthaltene Proteine, wie z.B. RNasen. Um eine vollständig Auflösung des PFA- Pulvers zu erzielen, wurde die Lösung auf 55 °C erwärmt. Später wurden einige Tropfen NaOH hinzu gegeben und der pH-Wert mit HCL auf 6-7 eingestellt und das PFA aliquotiert bei -20°C gelagert.

Table 2.4.: *Verwendete Lösungen der Whole mount in situ Hybrdisierung*

Dig – Mix	10 mM ATP 6,5 mM UTP 10 mM GTP 10 mM CTP 3,5 mM Dig - II - UTP in TE pH 7,5
PBT:	1x PBS mit 0,1% Tween 20 versetzt
Hefe – RNS:	10 mg/ml in DEPC - H ₂ O
PBT / Glycin	PBT + 2 mg/ml Glycin
Proteinase - K Puffer:	10 ml Tris pH 7,0 1 ml 0,5 M EDTA ad 500 ml H ₂ O
Proteinase K:	20 □g/ml in Proteinase K Puffer
SSC / Formamid / Tween	5 ml 20x SSC 25 ml Formamid 50 □l Tween 20 ad 500 ml DEPC - H ₂ O
Hybridisierungspuffer:	25 ml Formamid 12,5 ml 20x SSC (pH 4,5) 25 □l Heparin 50 □l Tween 20 12,5 ml DEPC - H ₂ O
RIPA:	250 □l 20% SDS 3 ml 5 M NaCl 1 ml NP40 5 ml 10% Deoxycholol 200 µl 0,5 M EDTA

Material und Lösungen

	5 ml 1 M Tris, pH 8,0 ad 100 ml DEPC - H ₂ O
20x SSC:	175,3 g NaCl 88,2 g Na - Citrat ad 1 l DEPC - H ₂ O, pH 7,0
10x TBST	80 g NaCl 2 g KCl 250 ml Tris (1 M, pH 7,5) 100 ml Tween 20 ad 1 l H ₂ O
RNase Puffer:	1 ml NaCl 100 µl 1 M Tris, pH 7,5 10 µl Tween 20 8,89 ml H ₂ O
RNase A:	Sigma R – 4875 Konzentration 10 mg/ml, in Natriumacetat lösen (pH 5,2), 15 Minuten auf 100°C erhitzen
MABT:	11,6 g Maleinsäure 8,8 g NaCl 1 ml Tween 20 ad 1000 ml H ₂ O pH 7,5
Blockierungs Stammlsg.:	10% (w/v) Blocking Reagenz (Boehringer, Ingelheim) in MABT
TBST / Levamisol:	2 mM Levamisol in TBST
Alkalischer Phosphatase Puffer:	1 ml 5 M NaCl 2,5 ml 1 M MgCl ₂ 50 µl Tween 20 5 ml 1 M Tris, pH 9,5 2 mM Levamisol ad 50 ml H ₂ O

Färbelösung:	Boehringer BM purple AP Substrat 2 mM Levamisol 0,1% Tween 20 zentrifugieren und Pellet verwerfen
Heparin	100 mg/ml in 4x DEPC SSC
4% PFA:	40 g Paraformaldehyd ad 1 l 1 x PBS
PBS:	30 ml NaCl (5M) 15 ml Na - Ph Puffer (1 M; pH 7,3) ad auf 1 l mit DEPC - Wasser

2.2.3 Sonstige Lösungen für Embryopräparationen und Histologie

Tabelle 2.5.: Sonstige Lösungen

Ringerlösung:	7,2 g NaCl 0,36 g KCl 0,23 g CaCl ₂ ad 1000 ml H ₂ O, pH 7,2
Xylol / Ethanol	50% Ethanol 50% Xylol
Eosin – Arbeitslösung	5 ml Eosin 250 ml H ₂ O zwei Tropfen Essigsäure
Entellan	Firma Merck

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

Alle die hier aufgeführten Standardtechniken wurden nach „Molekular Cloning“ (Sambrook et al. 1998) oder „Current Protocols in Molecular Biology“ (Asubel et al. 1992) durchgeführt.

3.1.1 Herstellung von Agarosegelen

Zur Größenanalyse und Integrität von DNS- Fragmenten wird die Agarosegelelektrophorese eingesetzt. Je nach der Größe der untersuchten Fragmente und der gewünschten Auftrennung werden die Gele von 0,6% (große Fragmente) und 2% (kleine Fragmente) Agarose in 1x TAE hergestellt. Damit die Größe einer DNS festgestellt werden kann, muss man ein 1% iges Agarosegel herstellen. Hierfür wurde 1 g Agarose in 100 ml 1x TAE aufgekocht und nach dem Abkühlen mit 1 µl/100 ml Ethidiumbromid versetzt. Der Nukleinsäure wurde ein Ladepuffer hinzugegeben. Danach wurde das Gemisch auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer verwendete man 1x TAE. Die angelegte Spannung betrug, je nach Größe des Gels, 80 bis 150 V.

3.1.2 Ethanolfällung von Nukleinsäure

Zu der DNS - Lösung wird 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und das 2,5 fache Volumen 100% Ethanol hinzugegeben. Nach 20 min bei -80°C wurde die präzipitierte Nukleinsäure in der Zentrifuge bei 13000 rpm pelliert. Danach wurde die DNS mit 70% Ethanol gewaschen, um Salze zu entfernen, und bei RT getrocknet.

Anschließend wurde die DNS in einem geeigneten Volumen Wasser gelöst.

3.1.3 Reinigung von Nukleinsäurelösungen

DNS-Präparationen, die zur Gewinnung von Plasmid- oder genomischer DNS aus Bakterienkulturen oder Gewebestücken gewonnen wurden, mussten für die weiteren Untersuchungen von anhaftenden Proteinen befreit werden. Hierzu wurde dem DNS-Gemisch eine Phenol-Chloroformlösung von gleichem Volumen zugegeben und das Gemisch bei 13000 rpm zehn Minuten lang zentrifugiert. Während die Proteine sich in der organischen Phase lösen, bleibt die DNS in der oberen wässrigen Phase. Diese Phase wird danach abgenommen und eine Präzipitation der DNS mit einer Ethanol-fällung durchgeführt.

3.1.4 Restriktionsverdau

Will man einen bestimmten Bereich einer DNS erhalten oder die DNS genauer analysieren, kann man mit Restriktionsendonukleasen die DNS an einer bestimmten Stelle trennen. Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die auch zur Linearisierung von Vektoren vor dem Klonieren verwendet werden. An einem Beispiel wird der Reaktionsansatz eines Restriktionsverdaus gezeigt. Die DNS-Menge betrug 10 µg und das gesamte Ansatzvolumen 50 µl.

Tabelle 3.1: Lösungen für den Restriktionsverdau

x µl (10 µg)	DNS
1 µl	Enzym (10 U/µl)
2 µl	10x Puffer
2 µl	BSA (10 mg/ml)
ad 20 µl	Aqua bidest

3.2. Mikromanipulation der Hühnerembryonen

Wie schon erwähnt, ist der Hühnerembryo bestens zu experimentellen Untersuchungen geeignet. Durch die kurze Inkubationszeit, die extrauterine Entwicklung (und damit leicht

zugängliches Experimenttier) und durch die unproblematischen chirurgischen Eingriffe stellen Hühnerembryonen ein geeignetes System für embryonale Manipulationen dar.

Die befruchteten Hühnereier (Virusfreie SPF-Eier) wurden von der Firma Charls River geliefert. Bis zur Inkubation mussten die Eier bei 14°C gelagert werden, da sich so die Embryonen nicht weiterentwickeln konnten. Zur weiteren Entwicklung wurden die Eier dann in einem Brutschrank bei 38°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50-55% inkubiert. Nach 48-52 Stunden war das erwünschte Entwicklungsstadium erreicht und es konnte mit der Mikromanipulation des befruchteten Eies begonnen werden. Dazu waren folgende Vorbereitungen notwendig.

3.2.1 Vorbereitung der Injektion

- § Es wurde eine 1x Ringerlösung mit Penizillin und Streptomycin hergestellt. Pelikantusche (Zeichentusche A) wurde mit 1x Ringerlösung im Verhältnis 1:10 verdünnt.
- § Die Eier wurden aus dem Bismarkbrüter genommen und mit dem Stempel nach oben aufgestellt.
- § Um das Ei zu belüften, wurde ein kleines Loch am hinteren Ende gestochen und mit einer Spritze 3-5 ml Eiweiß vorsichtig abgezogen. Dadurch senkte sich der Embryo ein Stück vom Eischalendach.
- § Die mit dem Stempel gekennzeichnete Oberfläche wurde mit einem Klebestreifen abgeklebt und ein kleines ovales ca. 2 cm großes Loch mit einer kleinen Schere aufgeschnitten.
- § Anschließend wurde der Embryo mit dem Ringer/ Penizillin/ Streptomycin-Gemisch benetzt, um einen bakteriellen Infektionsschutz während der Injektion zu gewährleisten.
- § Nun wurde der Embryo mit Hilfe der Tusche sichtbar gemacht, indem man vorsichtig die Tusche mit einer feinen Nadel unter das Blastoderm spritzte.
- § Mit einem dünnen Wolframdraht konnte die Vitellinenmembran im Bereich der Somiten aufgetrennt werden und die Somiten gezählt und die Embryonen nach der Hamburger- Hamiltoneinteilung einem Stadium zugeordnet werden.

3.2.2 Injektion der Viren in die Somiten

- § Die Injektion erfolgte mit dem Injektionsgerät Transjector 5246 von Eppendorf. Dieses Gerät wurde auf folgende Größen eingestellt: Druck 3500 pi; Injektionszeit 2 Sekunden.
- § Die zu injizierende Substanz wurde mit einer 10 µl großen Mikroladerpipette in eine Kapillare pipettiert und in den Mikromanipulator gespannt.
- § Durch das Abschneiden der Mikroladerpipettenspitze mit einer Mikroschere konnte die Tropfengröße der zu injizierenden Substanz bestimmt werden und annähernd konstant gehalten werden.
- § Es wurde in den Versuchen immer in die linke Somitenreihe injiziert, wobei die unbehandelte rechte Seite zur Negativkontrolle diente.
Dabei wurden immer Somiten 16-19 mit dem Virus infiziert, da aus diesen Somiten die hypaxialen Muskelvorläuferzellen der Vorderextremitäten auswandern.
- § Nach beendeter Injektion wurde der Embryo nochmals mit antibiotikahaltiger Ringerlösung überschichtet und mit Klebestreifen an der offenen Schale beklebt, um das Austrocknen des Embryos zu vermeiden. Anschließend wurde das Ei zur weiteren Entwicklung noch 5 Tage im Inkubator gelagert.
- § Nach vollständiger Inkubation wurde der Embryo präpariert und für die whole mount in situ Hybridisierung vorbereitet.

3.3. Whole mount in situ Hybridisierung

Mit dieser Methode kann man RNS vor Ort, also *in situ*, nachweisen, indem man eine bestimmte RNS - Sequenz mittels Hybridisierung mit einem markierten Antisense-Strang sichtbar macht. Dadurch kann man zelltypspezifische Expression sowie den zeitlichen Verlauf der Expression beobachten und so mehr über die Funktion und Regulation eines Genes herausfinden. Dafür braucht man eine markierte Sonde, die meist aus Oligonukleotiden oder aus, von uns verwendeten, *in vitro* synthetisierten RNS-Fragmenten besteht. Diese können radioaktiv oder nicht-radioaktiv markiert sein und mittels spezifischer Antikörper, die an Enzyme gekoppelt sind, durch ein Farbsubstrat detektiert werden. Die folgenden Schritte sehen zusam-

mengefasst so aus: Es wird hybridisiert, dann gewaschen und die Sonde entsprechend der Markierung nachgewiesen (Protokoll Günther et al., 1997).

3.3.1 Synthese der Sonde

Um eine Matritze für die RNS-Polymerase herzustellen, wird der DNS-Vektor mit einem spezifischen Enzym an einer bestimmten Stelle linearisiert. Verunreinigte Proteine können entfernt werden, indem die DNS mit einem Chloroform/Phenol-Gemisch versetzt wird. Die Gelelektrophoreseprobe zeigt nun die Linearisierung und die Konzentration der DNS-Matritze an.

Tabelle 3.2: Transkriptionsansatz

X μ l	Matrizen DNS
4 μ l	5x Transkriptionspuffer
2 μ l	Nukleotid- Mix (enthält Digoxigenin markiertes UTP)
2 μ l	X μ l
1 μ l	RNasin (40 U/ μ l)
1 μ l	RNS- Polymerase (20 U/ μ l)
Ad 20 μ l	Aqua bidest

Der Transkriptionsansatz wird bei 37°C zwei Stunden lang inkubiert und eine Kontrollprobe von 1 μ l für die Gelelektrophorese entnommen. Danach wurde die DNS- Matritze 15 Minuten lang bei 37°C mit 2 μ l DNase verdaut. Die RNS wurde über Nacht gefällt. Dazu benötigte man folgenden Ansatz:

- § 1 μ l t-RNS (10 mg/ml)
- § 20 μ l Reaktionsansatz
- § 300 μ l abs. Ethanol
- § 100 μ l H₂O DEPC
- § 33 μ l 7,5 M Ammoniumacetat

Der Ansatz wurde gevortext und bei -80°C gefällt. Anschließend wurde die Suspension bei 4°C und 13000 Upm 10 min lang zentrifugiert. Danach wurde das Pellet mit 70% -igem Ethanol gewaschen und 5 min getrocknet. Die RNS wurde in 100 μl Aqua bidest gelöst und 0,5 μl RNasin (RNase-Inhibitor) hinzu gegeben. Um die Integrität und die Konzentration zu bestimmen, wurde 1 μl der Probe entnommen und mittels Gelelektrophorese untersucht.

3.3.2 Fixierung, Vorbehandlung und Hybridisierung der Embryonen

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Waschschritte fünf Minuten bei RT durchgeführt.

Fixierung:

Durch die Paraformaldehydfixierung (4%) kann eine Retention zellulärer RNS erreicht werden und man kann sie im Detail gut darstellen.

Vorbehandlung:

- § Nach sechs Tagen wurden die Eier aus dem Inkubator genommen und mit der Freipräparation der Embryonen begonnen.
- § Nach Entfernung der umhüllenden Membran wurden die Embryonen mehrmals in einer Petrischale mit 1x PBS gewaschen.
- § Anschließend wurden sie über Nacht bei 4°C in einem Kühlraum auf einem horizontalen Laborschüttler in 4% PFA/PBS fixiert.
- § Durch zweimaliges Waschen mit 1x PBS 30 Minuten lang bei 4°C wurde das Paraformaldehyd vollständig entfernt.
- § Zehn Minuten 25% iges Methanol/PBS- Gemisch
Zehn Minuten 50% iges Methanol/PBS- Gemisch
Zehn Minuten 75% iges Methanol/PBS-Gemisch
Zweimal jeweils zehn Minuten 100% iges Methanol
- § Die Embryonen wurden durch eine aufsteigende Methanolreihe dehydriert und anschließend bei -20°C gelagert.

Hybridisierung:

- § Zuerst werden die Embryonen auf Eis rehydriert:
 - Zweimal je zehn Minuten 100% iges Methanol/PBS- Gemisch
 - Zehn Minuten 75% iges Methanol/PBS- Gemisch
 - Zehn Minuten 50% iges Methanol/PBS- Gemisch
 - Zehn Minuten 25% iges Methanol/PBS- Gemisch
 - Zweimal je zehn Minuten PBT auf Eis.

Damit eine unspezifische Färbung durch die Inaktivierung endogener Phosphatasen unterdrückt wird, werden die Embryonen mit Wasserstoffperoxid behandelt.

Auch konnten so pigmentierte Strukturen gebleicht und verschiedene Signale dargestellt werden. Folgendes ist dazu notwendig:

- § Mit 6% igem Wasserstoffperoxid in PBT eine Stunde auf Eis waschen
- § Mit PBT drei mal zehn Minuten waschen.

Nun folgt ein kritischer Schritt, da die Embryonen mit Proteinase K behandelt und inkubiert werden müssen. Dabei ist auf die Inkubationszeit zu achten, da sie an die Größe der Embryonen angepasst werden muss. Durch die Behandlung mit Proteinase K im Inkubator kann die Erreichbarkeit der Ziel - RNS durch die Probe erhöht werden. Damit die Embryonen nach der Behandlung mit Proteinase K nicht zerfallen, ist eine Nachfixierung notwendig:

- § Für den Proteinase K- Verdau benötigt man: 10 µl/ml Proteinase K in Proteinase K Puffer bei RT (fünf Minuten Inkubationszeit bei dem hier vorliegenden Embryonalstadium E 12.5)
- § Mit 2 mg/ml Glycin in PBT zwei mal fünf Minuten lang waschen, um die Reaktion zu stoppen
- § Embryonen mit 1x PBT zwei mal fünf Minuten waschen
- § Mit RIPA Puffer drei mal fünf Minuten waschen
- § Mit 1x PBT drei mal fünf Minuten waschen.
- § Mit 4% PFA/0,2% igem Glutaraldehyd in PBT bei RT einmal 20 Minuten fixieren
- § Mit 1x PBT dreimal fünf Minuten waschen

Um eine unspezifische Bindung zu verhindern und damit besser auswertbare Ergebnisse zu erzielen, muss die Hybridisierung bei einer Temperatur von 65°C stattfinden. Folgende Hybridisierungsschritte sind dazu notwendig:

- § Zehn Minuten 1:1 Hybridisierungspuffer/PBT- Gemisch bei Raumtemperatur
- § Zehn Minuten Hybridisierungspuffer bei RT
- § Embryonen wurden zur Prähybridisierung in einer feuchten Kammer bei 65°C eine bis drei Stunden inkubiert.
- § Zugabe der Sonde und Hybridisierung über Nacht bei 65°C.

3.3.3 Waschschritte

Mit Hybridisierungspuffer bei 65°C zweimal 30 Minuten waschen.

Die Embryonen werden nach der Hybridisierung gewaschen. Die Proben, die nicht mit der Ziel RNS hybridisiert haben, werden durch eine Ribonuklease entfernt.

- § Mit Hybridisierungspuffer/RNase Lösung bei RT einmal fünf Minuten waschen.
- § In RNase Lösung mit 100 µg/ml RNase A bei 37°C zwei mal 30 Minuten waschen.
- § In 1: 1 RNase Lösung/SSC/FA/Tween 20 bei RT einmal fünf Minuten waschen.
- § Danach die Embryonen in SSC/FA/Tween 20 von RT auf 65 °C erhitzen.
- § Mit SSC/FA/Tween 20 bei 65°C zweimal fünf Minuten waschen.
- § Mit SSC/FA/Tween 20 bei 65°C drei mal zehn Minuten waschen.
- § Mit SSC/FA/Tween 20 bei 65°C einmal 30 Minuten waschen.
- § Mit SSC/FA/Tween 20 bei 65°C fünf mal eine Stunde waschen.
- § Anschließend die Embryonen auf die RT abkühlen lassen.
- § Mit 1: 1 SSC/FA/Tween 20/1x TBST einmal fünf Minuten waschen.
- § Mit 1x TBST bei RT zweimal zehn Minuten waschen.
- § Mit MABT bei RT zweimal zehn Minuten waschen.
- § Mit 10% Blockierungslösung in MABT bei RT eine Stunde lang waschen.

Während die Embryonen geblockt wurden, konnten die Anti – Digoxigenin - Antikörper in einer Verdünnung von 1: 5000 in 1% Blockierungslösung/MABT bei 4°C präinkubiert werden. Eine alkalische Phosphatase ist an diesen Anti – Dig - Antikörper konjugiert. Sie führt zur späteren Farbreaktion. Anschließend wurden die Embryonen über Nacht in dieser Lösung auf einem Schüttler mit niedriger Drehzahl inkubiert.

Danach konnten die Anti – Dig - Antikörper durch häufiges Waschen mit einem 1x TBST/2 mM Levamisol Gemisch entfernt werden. Das Levamisol ist zur Hemmung der endogenen alkalischen Phosphatasen notwendig.

3.3.4 Färbung

Die Embryonen wurden in alkalischem Phosphatase Puffer dreimal 20 Minuten gewaschen. Danach wurden sie mehrere Stunden bis hin zu drei Tagen, je nach Farbannahme, bei RT oder 4°C in der Färbelösung im Dunkeln gefärbt. Während des Färbeprozesses war eine ständige Kontrolle der Farbannahme der Embryonen unter dem Mikroskop notwendig. Ohne die ständige Kontrolle könnte es durch die hohe spezifische Bindung zu einem sehr starken Hintergrund kommen. Durch mehrmaliges Waschen mit PBT konnte nach Erhalt des richtigen Farbkontrastes die Reaktion gestoppt werden. Danach wurden die Embryonen fotografiert und für die spätere Verwendung bei 4°C gelagert.

3.4. Histologische Techniken

3.4.1 Einbetten der Embryonen

Damit die Embryonen aufbewahrt und am Kryostat geschnitten werden konnten; mussten sie eingebettet werden:

- § Die Einbettform wurde zuerst mit dem Datum, der Probe und der Position des später eingebetteten Embryos beschriftet, um später die richtigen Schnitte zu erhalten.
- § Die Einbettformen wurden mit Polyfreeze™ gefüllt und der Embryo in der gewünschten Position eingelegt.

- § Anschließend wurde das Einfriermedium auf Trockeneis (-80°C) polymerisiert. Die Positionierung des Embryos musste schnell vonstatten gehen, da die Polymerisation des Polyfreeze™- Gel schnell einsetzte.
- § Danach wurden die Blöcke bei -20°C gelagert.

3.4.2 Schneiden der Embryonen am Vibratom

- § Die Blöcke wurden in einem Kryostat (Firma: Leica) bei ca. -22°C mit einer Schichtdicke von 10-20 µm geschnitten.
- § Die Schnitte wurden auf einen beschichteten Objektträger gelegt und in einem Objektträgerkasten bei -20°C gelagert.

3.4.3 Eosin-Färbung

- § In nacheinander aufgereihten Glasgondeln konnten die Objektträger durch eine Halterung folgende Färbeschritte durchlaufen:
 - § In 1x PBS zweimal drei Minuten
 - § In H₂O einmal drei Minuten
 - § In Eosin- Arbeitslösung einmal eine Minute
 - § In 70% igem Ethanol zweimal drei Minuten
 - § In 100% igem Ethanol zweimal drei Minuten
 - § In 100% igem Ethanol/Xylol einmal drei Minuten
 - § In Xylol zweimal drei Minuten in eine jeweils frische Xylollösung

Anschließend wurden die Objektträger aus dem Xylol genommen und mit Entellan Eindeckmedium beschichtet und mit einem in Xylol getunkten Deckgläschen bedeckt. Danach musste man sie nur noch trocknen lassen.

3.5. EZ - Detect TM Rho Activation Kit

Um die *in vivo* Ergebnisse *in vitro* zu vergleichen, wurde ein EZ - DetectTM Rho Activation Kit genutzt. Der Rho Aktivation Kit liefert eine einfache und schnelle Methode, die Rho - Aktivität in den hier verwendeten C2C12 - Zellen zu beobachten.

Kleine GTP-bindende Proteine (GTPasen) dienen als molekularer Schalter in verschiedenen Transduktionssignalwegen. Zusammengefasst ist Rho (24kDa) eine kleine GTPase, die die Stressfaserbildung, die Fokalkontakte und die Zellwanderung reguliert. Außerdem ist gezeigt worden, dass Rho die Gentranskription stimuliert und an der Ras - induzierten Zelltransformation beteiligt ist (Protokoll der Firma PIERCE, Rockford, IL 66105). Wie andere kleine GTPasen ist Rho aktiv, wenn es GTP gebunden hat und inaktiv, wenn es GDP gebunden hat. Wenn Rho GTP gebunden hat, interagiert es mit Effektoren wie z. B. Rhotekin. So bindet aktiviertes Rho an die Rho - bindende Domäne (RBD) von Rhotekin und bewirkt dadurch eine intrinsische Hemmung von GAPs und erhöht dadurch wiederum die GTPase-Aktivität von Rho. Dadurch kann RBD- Rhotekin als Probe für die spezifische Isolierung von aktivem GTP-Rho benutzt werden (Abb.3.1;Protokoll der Firma PIERCE, Rockford, IL 66105).

Der EZ-DetectTM Rho Aktivation Kit nutzt ein Maus Rhotekin RBD - GST Fusionsprotein für einen spezifischen Pull-Down-Assay zur Isolierung von aktivem Rho. Rhotekin bindet an aktives Rho und dieser Komplex bindet über die GST-Fusion an Glutathion-Agarose-Beads. Anschliessend wird das gebundene Rho von der Agarose gelöst und mit Hilfe eines spezifischen anti-Rho-Antikörpers in einem Westernblot nachgewiesen. Da Rho - GTP die aktive Form darstellt, kann man die Bestimmung von Rho-GTP als Messung der Rho - Aktivität in der Probe betrachten.

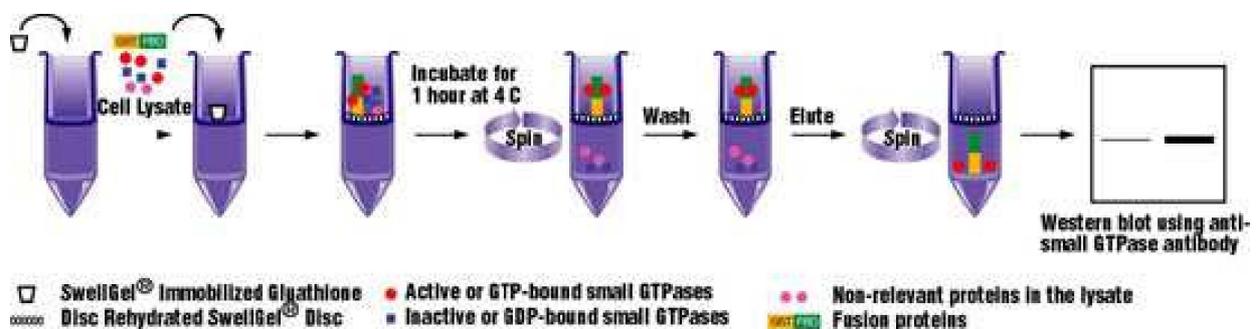


Abb. 3.1.: Nachweis von aktivem Rho in C2C12 Zellen anhand des EZ-DetectTM Rho Activation Kit

Western Blot Analyse:

Beim Western Blotting werden in einer SDS-Page (Sodium dodecylsulfate-Polyacrylamidgelelektrophorese) aufgetrennte Proteingemische aus der Polyacrylamidmatrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und dabei auf eine Membran aus Nitrozellulose transferiert. Bei der elektrophoretischen Übertragung wird ein Abklatsch des Gels erzeugt, und somit bleibt das Auftrennmuster erhalten. Das SDS (Natriumlaurylsulfat) wird bei diesem Vorgang ausgewaschen. Deshalb können die Proteine renaturieren und zum Teil ihre Sekundär- und ihre Tertiärstruktur wieder einnehmen, nicht jedoch ihre Quartärstruktur. Dadurch können die Proteine von Antikörpern erkannt werden. Da die Renaturierung nicht vollständig ist, können bei Verwendung von monoklonalen Antikörpern Probleme auftreten, da sie nur ein Epitop erkennen. Die polyklonalen Antikörper haben den Nachteil der unzureichenden Spezifität. Gegebenfalls müssen verschiedene Antikörper getestet werden. Auf Grund der hydrophoben Wechselwirkungen können die Proteine an die Nitrozellulosemembran binden. Für den elektrophoretischen Transfer gibt es 2 Verfahren; einmal das Semidry-Blot-System und das Tank-Blot-System. Damit sich die Antikörper nicht mit den freien Bindungsstellen der Membran verbinden und so den spezifischen Antigen-nachweis unmöglich machen, müssen diese freien Bindungsstellen der Membran erst blockiert werden. Diese Aufgabe übernimmt ein Protein, das für die Antikörper nicht erkennbar ist. In dem hier durchgeführten Experiment wurde dafür Milchpuffer verwendet. Es kann aber auch BSA (bovin serum albumin), Hämoglobin oder Myoglobin verwendet werden. Damit die spezifische Bindung der Antikörper an die Epitope des Antigens nachweisbar ist, wird ein Spezies-spezifischer-sekundärer Antikörper verwendet, der mit HRP (horseradish Peroxidase) gekoppelt ist. Die Produkte bilden dann ein sichtbares Präzipat um den Antigen-Antikörper-Komplex.

3.5.1 Verfahren für die EZ-Detect TM Rho Aktivations Kit

Herstellung von Zelllysat für adhärenente Zellen:

- § Bei adhärenenten Zellen wurde das Medium vorsichtig entfernt und die Zellen mit eiskaltem TBS gespült.

- § Dann wurden 0,5-1,0 ml Lysis/Binding/Wash Buffer für 75 cm² Fläche (1-2x 10⁷ Zellen) oder 0,3-0,5 ml Lysis/Binding/ Wash Buffer für 100 mm Platten mit Zellen in 80-90% iger Flüssigkeit hinzugefügt.
- § Die Zellen wurden ausgeschabt und in eine Mikrozentrifugen-Tube gegeben. Die Tube wurde gevortext und 5 Minuten auf Eis gekühlt.
- § Anschließend mussten die Zellen bei 4°C und 16 000 rpt für 15 Minuten zentrifugiert werden.
- § Das Lysat wurde in ein neues Tube gegeben.
- § mit Hilfe eines Aliquots wurde die Proteinkonzentration im Lysat bestimmt.

Für das Proteingel benötigte man folgendes:

- § Trenngel:

Das Gel wurde mit Acrylamid/Bis und 4x Trenn-Puffer und Wasser verbunden.

APS und TEMED wurden hinzugegeben und langsam vermischt. Die Lösung wurde vorsichtig in eine Tasche eingefüllt bis ca. 1,5 cm vom Rand der Platte. Anschließend erfolgte die Polymerisation bei 30-60°C.

3.5.2 *In vitro* GTP γ S oder GDP Behandlung

Das Zelllysate konnte mit GTP γ S (ein Stimulator von Rho – Positivkontrolle) oder mit GDP, (Inhibitor von Rho – Negativkontrolle), vermischt werden. Es wurden Kontrollbehandlungen durchgeführt, um sicher zu gehen, dass das Pull-down Verfahren auch gut funktioniert. GTP-Rho kann schnell zu GDP-Rho hydrolysieren. Daher musste das Zelllysate vor jedem Assay frisch hergestellt oder bei -70° C gelagert werden.

Es wurden 500 μ g des Zelllysates für jede Behandlung verwendet:

- § Für 500 μ l benötigte man 10 μ l 0,5 M EDTA, pH 8,0 und vortexte die Probe
- § Es wurden 5 μ l 10 mM GTP γ S oder 5 μ l 100 mM GDP hinzugefügt und dann gevortext.
- § Man inkubierte die Mischung bei 30°C für 30 Minuten auf einem horizontalen Schüttler.

- § Anschließend beendete man die Reaktion, indem man sie auf Eis stellte und 32 μ l 1 M $MgCl_2$ hinzufügte und vortexte.

3.5.3 Bindung von aktivem Rho

Im folgenden Teil wurde RBD, Rho-bindendes Protein hinzugegeben, damit GTP γ S oder GDP an Rho binden konnte. Außerdem verstärkt es die GTPase Aktivität und kann zur Isolierung von Rho-GTP benutzt werden. Anschließend wurde ein Anti-Rho-Antikörper hinzugefügt, um die Reaktion zu markieren. Das Proteingemisch konnte mit Hilfe der Gelelektrophorese entsprechend ihrer Größe, Ladung und anderer Eigenschaften aufgetrennt werden.

- § Ein Swellgel wurde auf eine unbewegliche Glutathion Disc in eine Schale mit einer Sammeltube plaziert. (Das maximale Volumen der Schale ist 850 μ l).
- § Danach wurden 400 μ g von GST – Rhotekin - RBD hinzugefügt.
- § Es wurden mehr als 700 μ l von dem Lysat in die Schale gegeben, der Deckel geschlossen und die Probe gevortext.
- § Die Reaktion wurde bei 4° C für eine Stunde unter leichtem Schütteln inkubiert.
- § Die Schale mit Sammeltube wurde bei 7,200 x rpt für 10-30 Sekunden zentrifugiert.
- § Schale in ein neues Sammeltube gegeben.
- § Das Granulat wurde dreimal mit Lysis/Binding/Wash Puffer gewaschen. (Hinzufügen von 400 μ l des Lysis/Binding/Wash Puffer und zentrifugieren bei 7,200x rpt für 10–30 Sekunden). Anschließend wurde der Puffer abgegossen und das Waschen zweimal wiederholt.
- § Dann wurde die Schale erneut in ein neues Sammeltube gestellt.
- § Es wurden 50 μ l vom Probenpuffer für jede pull down Reaktion vorbereitet, indem β -Mercaptoethanol mit 2x SDS-Probenpuffer in einem Verhältnis von 1: 20 gemischt wurden.
- § Durch Hinzufügen von 50 μ l des 2X SDS Probepuffers wurde das β -Mercaptoethanol im Granulat zurückgehalten. Anschließend wurde die Probe auf 95-100°C für 5 Minuten erhitzt.

- § Das Tube wurde bei 7,200 rpt 2 Minuten zentrifugiert. Die Probe wurde auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und bei -20°C aufbewahrt.
- § Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und anschließend eine Nitrozellulose Membran geblottet.
- § Die Membran wurde in TBS und 3% BSA zwei Stunden bei Raumtemperatur geblockt.
- § Die Membran wurde mit TBST gespült.
- § Es wurde eine Lösung mit enthaltenen Anti-Rho Antikörper in 3% BSA und 0,1% NaN₃ in TBS hergestellt.
- § Die Membran wurde in der Anti-Rho Antikörperlösung bei 4°C über Nacht inkubiert.
- § Die Membran wurde fünfmal fünf Minuten mit TBST gewaschen.
Anschließend wurde der sekundäre Antikörper (Anti-Maus IgG – HRP - Konjugat) mit TBST/5% fettfreiem Trockenmilchpulver verdünnt:
50 ml Milchgemisch mit 1 µl Antikörperlösung und gevortext.
- § Die Membran wurde eine Stunde in dem verdünnten Anti-Maus-IgG-HRP-Konjugat bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran fünfmal fünf Minuten mit TBST gewaschen und mit einem Chemiluminescent- Substrat bei RT inkubiert. Dieses Chemiluminescent- Substrat ist für die spätere Belichtung des Röntgenfilms notwendig.
- § Zum Schluss wurde die Membran mit einem X-ray Film oder einer CCD Kamera belichtet.
Vermerk: Das Rho - Signal ist lokalisiert bei ~ 24 k Da

- Sammel-Gel:

- § Das Trenngel wurde mit Akrylamid/bis verbunden.
- § Man fügte APS und TEMED hinzu und schüttelte es leicht
- § Anschließend schüttete man die Sammelgel-Lösung auf das Trenn-Gel, bis die Lösung den Rand der Platte erreicht.
- § Dann wurde die Lösung vorsichtig in eine Kammer gefüllt und polymerisiert (~30°).
- § Danach wurde die Kammer entfernt und das Gel in eine Elektrophoresekammer gegeben.

- § Der Elektrophorese - Puffer wurde hinzugegeben und die Elektrophorese bei 200V und 45 Umdrehungen durchgeführt.
- § Für den Western Blot musste das Gel in einen Gleichgewichtspuffer gegeben werden.

- Blotting:

Tabelle 3.3: Transferpuffer und Laufform

	Puffer	Memebran	Transferpower Condition
SDS-Protein	25 mM Tris 192 mM Glycin 20% Mehtanol pH ~ 8,3	Nitrozellulose	a) über Nacht 30 V/40mA 30 V/ 90mA b) für 1 Stunde 100 V/250mA 100V/350 mA

Die Gelelektrophorese wurde in einer Bio Rad Mini - Gel-Protean Gelkammer gemäß den Herstellerdaten durchgeführt.

3.6. Sterilisation von Lösungen und Geräten

Um mit RNS, DNS und Zellkulturen zu arbeiten, muss auf eine sorgfältige Sterilisation geachtet werden, um eine Kontaminierung mit Mikroorganismen zu verhindern. Dazu mussten die Glaswaren bei trockener Hitze von 180°C, Lösungen und Materialien, sowie Plastikwaren bei 121°C und einem Druck von 2,2 bar 30 Minuten autoklaviert werden. Wenn Lösungen nicht hitzestabil waren, mussten sie durch einen Zelluloseacetatfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm-0,45 µm gefiltert werden.

4. Ergebnisse

4.1. *In vivo* Injektion von Signalkaskaden - Retroviren

Wie in der Einleitung schon erwähnt, spielen die Rho - GTPasen eine bedeutende Rolle bei der Regulierung der chemotaktischen Zellwanderung in Skelettmuskelvorläuferzellen. Das Ziel dieser Arbeit war es die schon erforschten *in vitro* Ergebnisse bezüglich der Rho-GTPasen vermittelten Zellwanderung auch *in vivo* zu untersuchen. Dazu haben wir Hühnerembryonen verwendet, die sich gut für mikrochirurgische Experimente eignen. Den Hühnerembryonen wurden verschiedene konstitutiv aktive sowie dominant-negative GTPasen in Form von Retroviren injiziert. Um die Ergebnisse zu analysieren, wurde die Whole mount in situ Hybridisierung durchgeführt. Durch die Marker Lbx1 und Pax3, die bei der Zellwanderung aus den Somiten in die Extremitätenknospen von den jeweiligen Zellen exprimiert werden, konnte festgestellt werden, ob sich durch die Injektion eine Veränderung der hypaxialen Muskulatur im Entwicklungsmuster ergeben hat.

Dazu mussten die Hühnerembryonen bei der Injektion ein gewisses Reifestadium aufweisen. Die Reifestadien der Hühnerembryonen werden nach Hamburger und Hamilton eingeteilt. Die Hamburger/Hamilton Skale beruht auf der Einteilung in Stadien nach der Anzahl der Somiten des Embryos. Da diese sich im Laufe der Entwicklung von kranial nach kaudal entwickeln, können sie als Maß für die Reife des Embryos genutzt werden.

Tabelle 4.1: Embryonale Entwicklungsstadien nach Hamburger u. Hamilton

HH	Anzahl der Somiten	Stunden Inkubation
12	16	45 -49
13	19	48 – 52
14	22	50 – 53
15	24 – 27	50 – 55
16	26 – 28	51 – 56
17	29 – 32	52 – 56
18	30 – 36	65 – 69
19	37 – 40	68 – 72
20	40 – 43	70 -72

Wir wählten das Stadium HH 13, in dem die Embryonen meist eine Anzahl von 19 Somiten beidseits aufwiesen und 48- 52 Stunden im Inkubator inkubiert wurden. Es wurde stets in die Somiten 16-19 der linken Seite injiziert, da die Muskelvorläuferzellen, die in die Vorderextremität einwandern, aus der lateralen Dermomyotomlippe der Somiten 16-19 stammen. Da sich die Somiten rechts und links symmetrisch entwickeln, diente die rechte, nicht manipulierte Somitenreihe als interne Negativkontrolle. Nach erfolgter Injektion wurden der Herzschlag und die Keimscheibe des Embryos überprüft, um ein Absterben des Embryos während der Manipulation auszuschließen. Nach der Injektion wurden die Embryonen weitere sechs Tage im Inkubator inkubiert, damit sie sich weiterentwickeln konnten. Nach der Präparation der Embryonen wurde die Entwicklung der Extremitätenmuskulatur mittels WISH untersucht. Nach der Whole mount in situ Hybridisierung konnten Fotos angefertigt werden. Nun war eine makroskopische Beurteilung der Muskelzellwanderung in den manipulierten Embryonen möglich.

4.1.1 Ral 91

Ral ist eine kleine GTPase der Rac-Familie und stimuliert die Myoblastenmotilität. (Jotaro Suzuki et al.,2000). Der Ras - Ral - Signalweg ist für die Wanderung der Myoblasten unerlässlich. Wie in einem *in vitro* Versuch von Jotaro Suzuki bestätigt wurde, ist der Ral - GEF - Signalweg entscheidend für die Wanderung von C2C12 Myoblasten und Muskel - Satellitenzellen. In unserem Versuch wurde nun die Ral Aktivität auf die Zellwanderung *in vivo* untersucht, indem den Hühnerembryonen ein konstitutiv aktiver (k/a) und ein dominant negativer (d/n) Virus mikroskopisch injiziert wurde (Kapitel 1.5.5). Es wurden 58 Eier an unterschiedlichen Versuchstagen für die Injektion von Ral 91, eine konstitutiv aktive (k/a) Variante, präpariert. Davon konnten 30 Eier inkubiert werden und 28 Eier mussten verworfen werden. Nach sechs Tagen im Inkubator überlebten 10 Embryonen. Ein so hoher Ausschuss von Eiern (28 Eier) war auf einen fehlenden Herzschlag der Embryonen, zu wenig entwickelte Somiten, selten auch auf Anomalien, wie zum Beispiel zweiköpfige Embryonen oder durch Verletzung der Keimscheibe bei der Entfernung der Vitellinenmembran zurück zu führen. Oft kam es auch vor, dass nach Öffnen der Eier kein Embryo vorhanden war, also das Ei nicht befruchtet war oder der Embryo sich nicht weiter entwickelt hatte. Durch Absaugen des Eiweißes am Anfang der Versuchsreihe zur Senkung des Embryos von der Schalendecke kam es manchmal zur Verletzung der Keimscheibe oder des Embryos.

Auch bei der Injektion des Virus konnten Probleme auftreten. Stach man versehentlich in das Neuralrohr oder injizierte eine zu große Menge an Virus, so dass die Somiten zerrissen wurden, konnte damit gerechnet werden, dass der Embryo die sechs Tage im Inkubator nicht überlebte. Bei der Injektion der Tusche zur besseren Darstellung des Embryos konnten Gefäße der Keimscheibe verletzt werden, was zu Einblutungen führte. Um die Injektionstechnik richtig zu lernen und um sicher zu gehen, dass man auch richtig injiziert hatte, wurde an mehreren Tagen der gleiche Virus injiziert. Auch konnten so Zufallsergebnisse ausgeschlossen werden.

Nach anschließender Whole-mount in situ Hybridisierung mit dem Zellmarker Lbx1 konnten folgende Fotos von den mit Ral 91 (k/a) behandelten Embryonen gemacht werden.

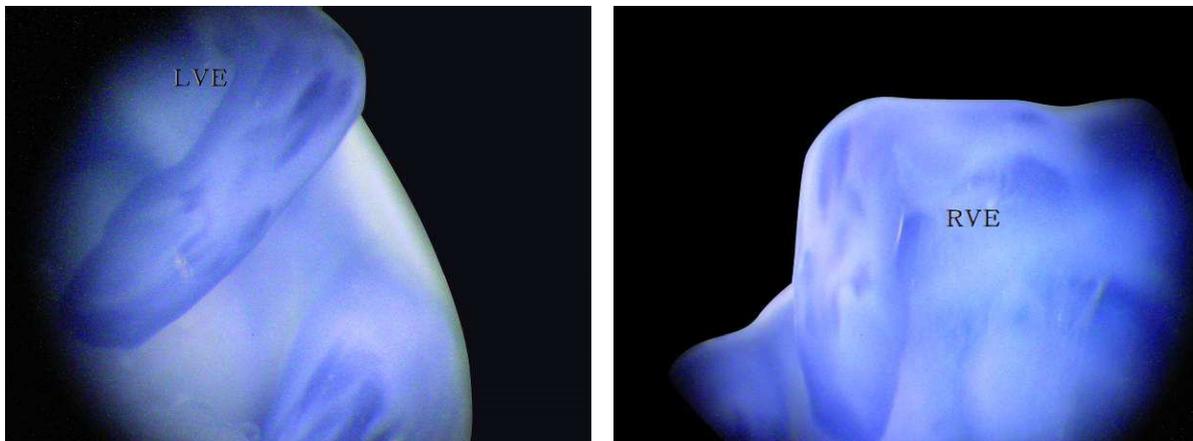


Abb. 4.1. zeigt zum Vergleich eine Nahaufnahme der linken, vorderen Extremität (LVE) sowie rechts im Bild der rechten, vorderen Extremität (RVE) nach Injektion des konstitutiv aktiven Ral 91 - Virus. Es zeigt sich kein wesentlicher Unterschied des Expressionsmusters von Lbx1 zwischen den beiden Extremitäten.

Wie auf der Abbildung 4.1 zu sehen ist, sind rechte wie linke Extremität in gleicher Länge und Form ausgebildet. Ferner hat die Injektion des konstitutiv aktiven Virus Ral 91 nicht zu einer Veränderung des Expressionsmusters von Lbx1 geführt, wenn man die rechte und die linke Vorderextremität miteinander vergleicht. Das Expressionsmuster ist identisch. Da Lbx1 und Pax3 Marker für die Migration der Muskelvorläuferzellen sind und sich keine Änderung des Expressionsmuster ergeben hat, kann man sagen, dass die Injektion des konstitutiv aktiven Ral 91-Virus in dieser Versuchsreihe keinen Einfluss auf die Wanderung der Muskelvorläuferzellen *in vivo* hatte. Um den makroskopischen Eindruck noch mikroskopisch zu bestätigen, wurden mit dem Kryostat 12 µm dicke Schnitte von den Embryonen angefertigt und anschließend mit Eosin gefärbt. Auch mikroskopisch zeigte sich keine Veränderung des Expres-

sionsmusters von Lbx1 und somit auch kein Nachweis der Aktivität von Ral in unserem *in vivo* Versuch.

4.1.2 Ral 400

Vom dominant negativen (d/n) Virus Ral 400 konnten im ersten Durchgang von 60 vorbereiteten Eiern nur 25 Embryonen injiziert werden. Davon hatten 13 Embryonen nach sechs Tagen überlebt. Von den 13 Embryonen waren zwei mit verstümmelter vorderer linker Extremität zu erkennen, die Extremität, in die der Virus injiziert wurde. Da es nur zwei Embryonen mit verstümmelter Extremität waren, wurden weitere Embryonen mikrochirurgisch manipuliert. Nach nochmaligem Injizieren konnten von 60 Embryonen 32 verwendet werden. Diesmal überlebten nur 10 Embryonen die sechs Tage im Inkubator und nur einer zeigte eine veränderte Extremität. Nach der Whole-mounts in situ Hybridisierung zeigten sich folgenden Bilder der mit Virus Ral 400 (d/n) behandelten Embryonen.

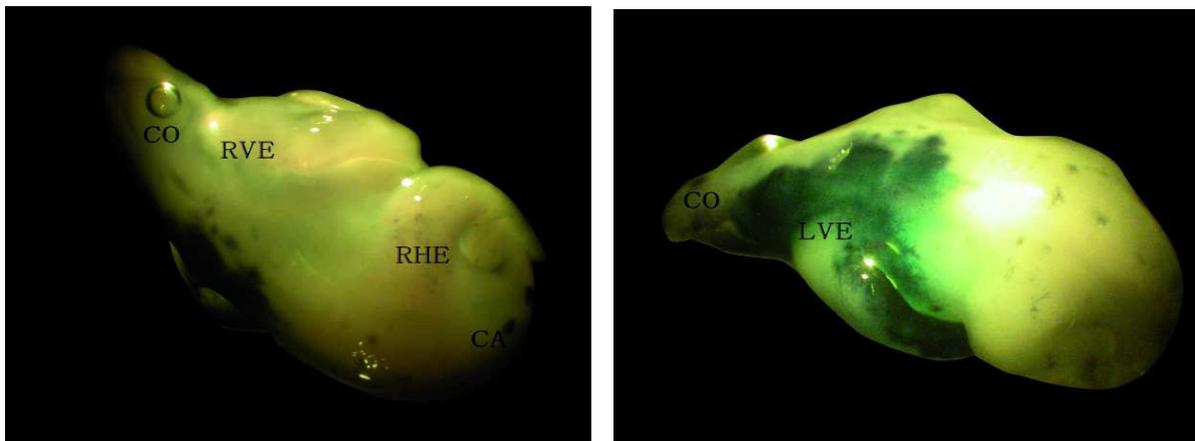


Abb. 4.2.: (a) Übersichtsaufnahme Ansicht von dorsal nach Injektion des dominant negativen (d/n)Virus Ral 400. Hier bietet sich ein guter Vergleich der linken Vorderextremität (LVE) zur rechten Vorderextremität (RVE). Es ist eine deutliche Einfärbung der linken, vorderen Extremität sichtbar; Außerdem gekennzeichnet ist der Hals (CO = Collum) und der Schwanz (CA = Cauda), sowie die rechte hintere Extremität (RHE). (b) Ansicht von lateral; links

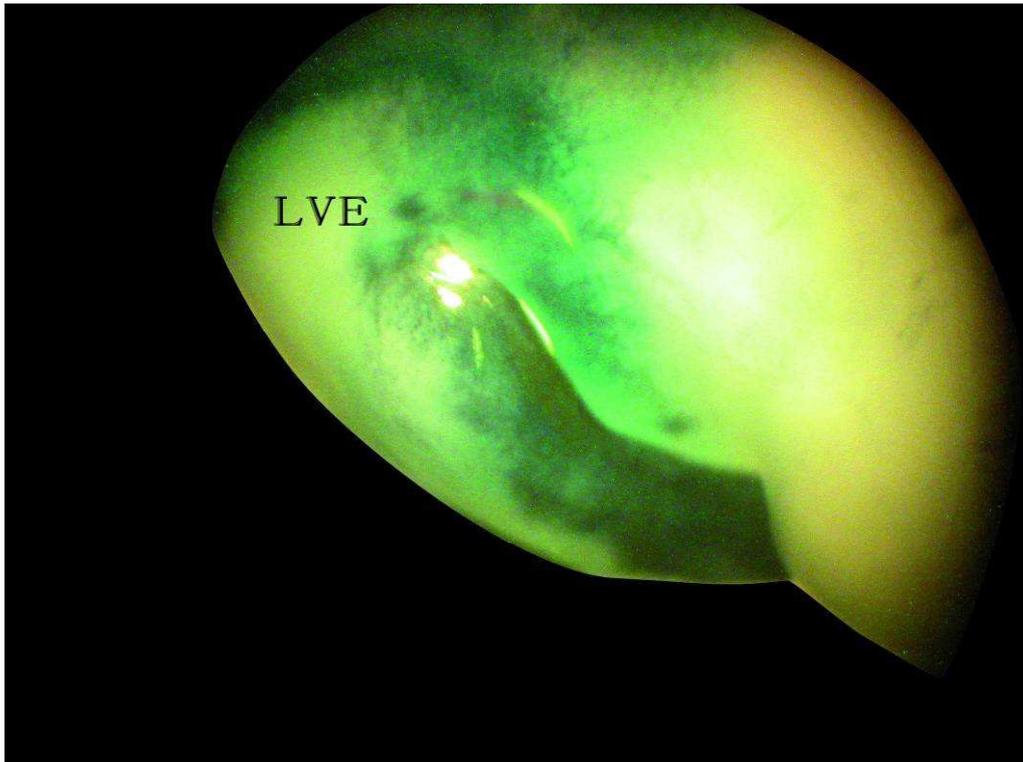


Abb.4.2 c) Detailaufnahme der linken, vorderen Extremität (LVE) des mit Ral 400 dominant negativen Virus infizierten und ral markierten Embryos.

Es wurden weitere Aufnahmen der Embryonen gemacht, in deren Somiten Ral 400(d/n) injiziert wurde. Diese wurden mit Lbx1 markiert. Das Expressionsmuster zeigte keine Veränderung im Vergleich rechter zur linken Vorderextremität.

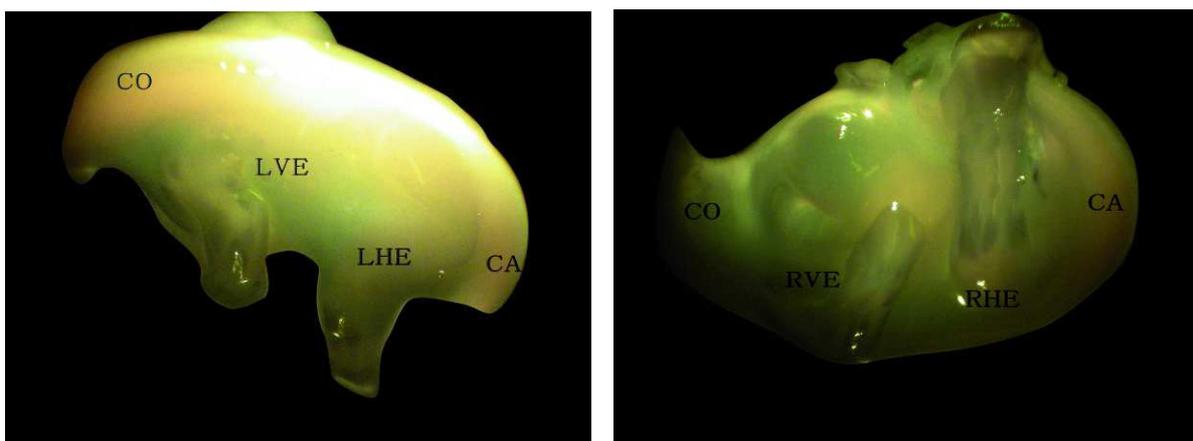


Abb.4.2 d) Übersichtsaufnahme des mit dominant negativen Ral 400 injizierten und mit Lbx1 markierten Embryos.

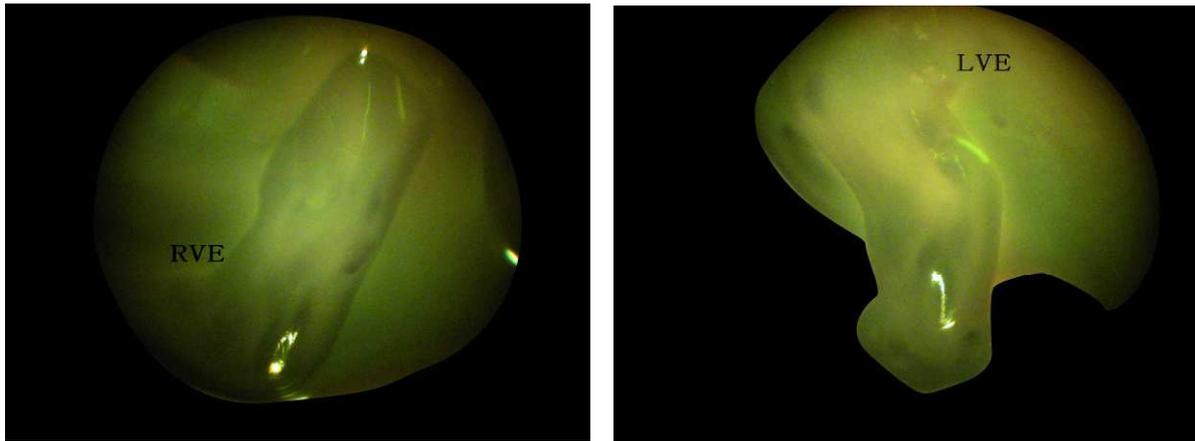


Abb. 4.2 e) Detailaufnahmen zum Vergleich der LVE zur RVE. Das Expressionsmuster von *Lbx1* zeigt keine Veränderung auf.

Abbildung 4.2 f) und g) veranschaulicht einen Embryo der 2. Versuchsreihe, der mit Pax3 markiert wurde. Hier zeigt sich, dass die linke vordere Extremität (LVE), in die der dominant negative Ral 400 Virus injiziert wurde, deutlich verkürzt bzw. nicht vollständig ausgebildet ist, während die rechte vordere Extremität (RVE), die Negativkontrolle, regelrecht entwickelt ist. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Manipulation des Embryos mit dem Virus Ral 400 (d/n) die Fehlentwicklung der Extremität verursacht hat.

Hier ist das Expressionsmuster von Pax3 schwer zu beurteilen, da die Muskelvorläuferzellen (MPCs) kaum in die verkürzte Extremität einwandern konnten. Das Expressionsmuster konnte zwar in der rechten vorderen Extremität, sowie in den beiden hinteren Extremitäten beobachtet werden, jedoch ist dies in Bezug auf die Migration der Muskelvorläuferzellen in die linke vordere Extremität nicht aussagekräftig.

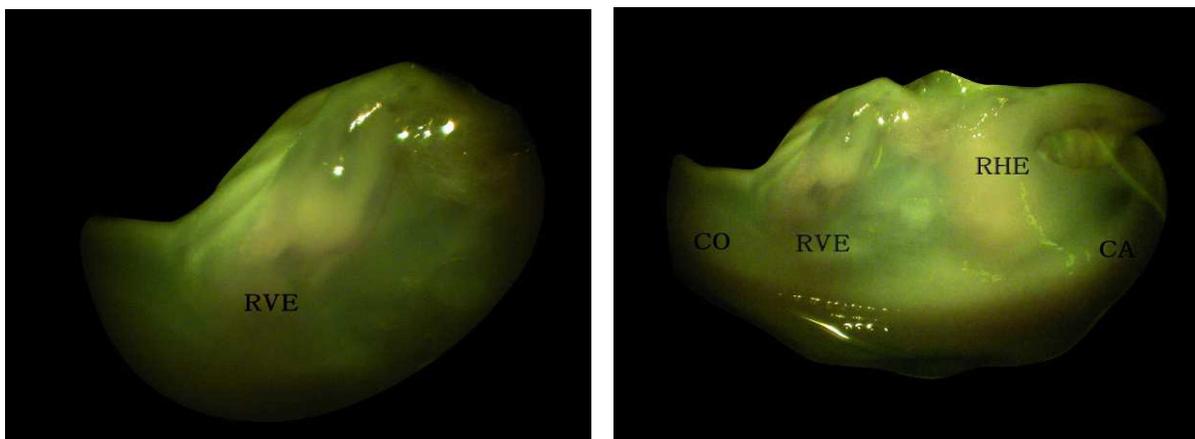


Abb. 4.2 f) Übersicht rechte Seite. Rechte Aufnahme zeigt die RVE eines Ral 400 (d/n) infizierten Embryos mit Pax 3 markiert.

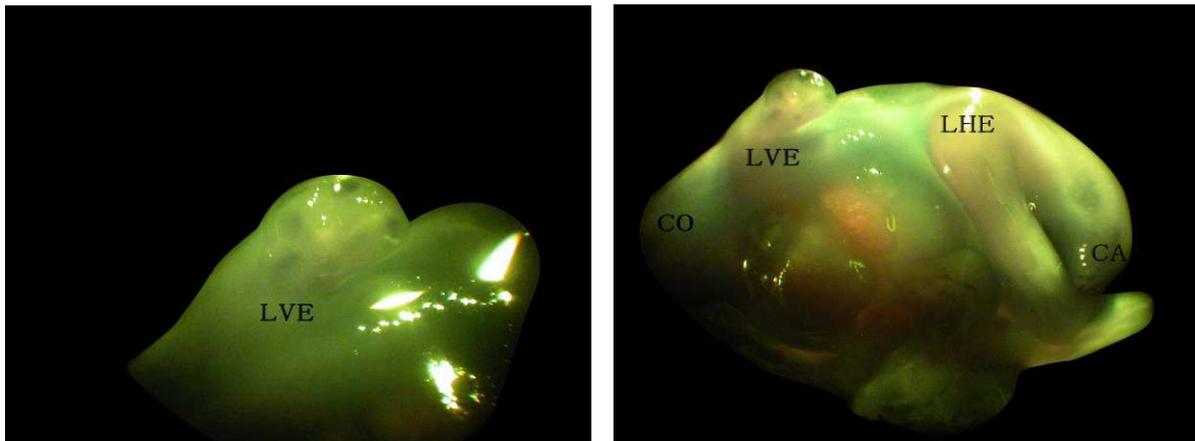


Abb. 4.2 g) Übersicht linke Seite des (d/n)Virus Ral 400. Hier ist eine deutliche Verkürzung der linken Vorderextremität (LVE) erkennbar; LHE = linke Hintere Extremität.

4.1.3 Rho

In einer Studie von Manneville und Hall wurden die Aktivitäten von Rho beschrieben. Es steuert die Zellpolarität, die Membran-Transportwege, die Mikrotubulen Dynamik und nimmt Einfluss auf die Transkriptionsfaktoraktivität. Eine wichtige Rolle spielt Rho in der Stressfaserbildung und in der Fokal Adhäsion der Zellen, indem es die Ansammlung und Stabilisierung der Aktinfilamente fördert. Rho ist hauptsächlich an der Zellhinterseite aktiv und sorgt dort durch die Kontraktion der Aktinfilamente für eine Retraktion der Zellhinterseite, die für die gerichtete Zellwanderung von wichtiger Bedeutung ist (Etienne MannevilleS., und Hall A., 2002).

Nun galt es festzustellen, wie aktivierende und hemmende Rho-Viren sich *in vivo* auf die Muskelzellwanderung auswirken. Hierzu wurden die Viren Rho A 135 (dominant negativ-d/n) und Rho A 136 (konstitutiv aktiv- k/a) verwendet. Es wurden in mehreren Sitzungen erst der konstitutiv aktive Virus Rho A 136 injiziert. Von den insgesamt 120 zur Injektion präparierten Eiern waren nur 50 Embryonen geeignet und nach weiteren sechs Tagen der Inkubation und anschließender Freipräparation konnten 17 lebende Embryonen gezählt werden. Makroskopisch ergaben sich keine Veränderungen der Extremitäten im rechts/links Vergleich und auch nach der Whole mount in situ Hybridisierung wurde keine Veränderung des Expressionsmusters von Lbx1 und Pax3 beobachtet.

Von dem dominant negativen Virus Rho 135 A konnten nach 120 präparierten Eiern 51 Embryonen inkubiert werden, wovon wiederum 22 Embryonen überlebten. Nach dem makroskopischen wie mikroskopischen Vergleich nach der Whole mount in situ Hybridisierung konnte auch hier keine Veränderung in Länge, Form und Expressionsmuster festgestellt werden. Zusammenfassend kann man sagen, dass bei (d/n) Rho A 135 und (k/a) Rho A 136 kein Einfluss auf die *in vivo* Zellwanderung bei Hühnerembryonen zu beobachten war.

4.1.4 Rac

Rac ist für die Aktinpolymerisation, die Protrusion an der Zellfront durch die Bildung eines Integrinadhensionskomplexes, sowie für die Mikrotubenstabilität verantwortlich (J.Ridley, 2003). Zusammen mit Cdc 42 und Rho bildet Rac adhaerente Zellkontakte und ist am basolateralen Vesikeltransport beteiligt. Des Weiteren ist Rac *in vitro* essentiell für die Vorwärtsbewegung von Fibroblasten und Astrozyten. Durch die FRET konnte festgestellt werden, dass der Rac - GTP-Spiegel während der Protrusion an der führenden Zellfront die höchste Konzentration aufwies. Rac und Rho regulieren sich gegenseitig. Ist die Konzentration an der Zellfront von Rac erhöht, vermindert das gleichzeitig die Konzentration von Rho an der Zellhinterseite. Von den 90 präparierten Embryonen konnten 45 erfolgreich injiziert, doch nur 12 Embryonen mit dem konstitutiv aktiven (k/a) Virus Rac 138 eingefroren und geschnitten werden. Von den 44 mit dem dominant negativen (d/n) Virus Rac 137 behandelten Embryonen von insgesamt 90 präparierten konnten 15 geschnitten werden.

In dem *in vivo* Versuchsaufbau zeigte sich auch hier nach Abgleich makroskopischer und mikroskopischer Untersuchung keine Wirkung auf die Zellwanderung von Hühnerembryonen.

4.1.5 Cdc42

Wie in der Einleitung schon aufgeführt, übernimmt Cdc42 verschiedenste Funktionen der Zellwanderung. So ist es zum einen für die Polarisation der Zelle verantwortlich, indem Cdc42 einzelne Zellbestandteile organisiert und neue Zell-Zellkontakte bildet. Zum anderen regelt Cdc42 die Proteinbelieferung der Zellmembran, die für die Protrusion der Zelle nötig ist (Arthur et al., 2002; Honda et al, 2003).

In unserem Versuchsaufbau wurden die Viren Cdc42 139 (konstitutiv aktiv-k/a) und Cdc42 140 (dominant negativ- d/n) in die Hühnerembryonen injiziert. Dazu wurden für Virus Cdc42 139 (k/a) 90 Eier präpariert, in 34 Embryonen injiziert, wobei 12 Embryonen überlebten. Von den mit dominant negativen (d/n) Virus CdC42 140 injizierten Embryonen überlebten von insgesamt 38 injizierten Embryonen 16 Embryonen. Als mögliches Ergebnis hätte man erwartet, dass es durch Hemmung der Chemotaxis, der Aktinpolarisation und der Zellpolarität zur Hemmung der Zellwanderung kommt und sich fehl- bzw. unterentwickelte Extremitäten der Hühnerembryonen ausbilden. Jedoch entwickelten sich die Extremitäten unserer Embryonen normal und zeigten keine Veränderungen.

4.1.6 Ras

In einem Versuch von Suzuki J. et al. konnte durch die Expression von einem dominant-negativen Mutanten von Ras die Chemotaxis in C2C12 Myoblasten gehemmt werden, wohingegen es durch die Expression eines aktivierten Mutanten von Ras zu einer Zunahme der Motilität in Myoblasten kam. Ferner konnte festgestellt werden, dass Ral und Ras in Wechselbeziehung zueinander stehen und sich durch ihre Konzentration regulieren. Aber auch die Wachstumsfaktoren HGF, FGF und IGF, die in der frühen Entwicklung der Skelettmuskulatur eine bedeutende Rolle spielen, aktivieren Ras und auch im geringeren Maße Ral (Suzuki J., et al., 2000).

In unserem *in vivo* Versuch wurden jeweils von 60 Hühnerembryonen einmal 26 mit konstitutiv aktiven (k/a) hRas 398 Virus behandelte Embryonen und 27 mit dominant negativen (d/n) hRas 399 Virus behandelten Embryonen mikrochirurgisch manipuliert. Von den (k/a) h Ras 398 Embryonen haben acht überlebt und von den (d/n) h Ras 399 Embryonen haben zehn überlebt. Auch hier zeigte sich keine Wirkung auf die Entwicklung der Skelettmuskulatur und führte zu keiner veränderten Entwicklung der Extremität.

Zur Ergänzung ist in Tabelle 1 eine Übersicht über die gesamte experimentelle Reihe, injizierter Virus, Anzahl der inkubierten Embryonen sowie die Ergebnisse dargestellt.

Tabelle 4.2: Übersicht der Anzahl experimentell bearbeiteter Embryonen

Injizierter Virus	Anzahl verwendeter Embryonen			Effekt	Wish			d/n oder k/n
	Eingelegt	erfolgreich injiziert	überlebt/ analysiert		Virus	Pax3	Lbx1	
1. Durchgang	60	25	13	3 Embryonen mit verstümmelter Extremität	Ral	+	+	d/n
Ral 400								
2. Durchgang	60	32	10	1 Embryo mit verstümmelter Extremität	Ral	+	+	d/n
Ral 400								
Ral 91	58	30	10	Keine Veränderungen	Ral	+	+	k/a
Rho A 135	120	51	22	Keine Veränderungen	Rho	+	+	d/n
Rho A 136	120	50	17	Keine Veränderungen	Rho	+	+	k/a
Rac 1 137	90	44	15	Keine Veränderungen	Rac	+		d/n
Rac 1 138	90	45	12	Keine Veränderungen	Rac	+	+	k/a
Cdc 42 139	90	34	12	Keine Veränderungen	Cdc42	+	+	k/a
Cdc 42 140	90	38	16	Keine Veränderungen	Cdc42	+	+	d/n
h Ras 398	60	26	8	Keine Veränderungen	Ras	+	+	k/a
h Ras 400	60	27	10	Keine Veränderungen	Ras	+	+	d/n

4.2. Einfluss der Rho- GTPasen auf die Wanderung der Muskelvorläuferzelle *in vitro*

Rho spielt eine entscheidende Rolle bei der Bildung der Stressfasern und bei der Bildung der Fokalkontakte. Wie schon erwähnt spielen Rho – GTPasen, als molekulare Schalter in Signaltransduktionswegen eine entscheidende Rolle in der Zellmigration. In der Arbeitsgruppe wurden C2C12 Zelllinien etabliert (C2C12^{mKlhdc2-H} und C2C12^{mKlhdc2-A}), die *in vitro* eine reduzierte Zellmigration und eine schwächere Antwort auf chemotaktische Signale aufwiesen (Neuhaus, P. et al., 2006). In diesen Zelllinien sollte die Aktivität von Rho bestimmt werden, um zu sehen, ob das gestörte Wanderungsverhalten vielleicht auf eine Deregulation von Rho zurückzuführen ist.

Die Rho-Aktivität wurde mit Hilfe des EZ - Detect TM Rho Activation Kit untersucht. Die verwendeten Zelllinien waren: WT C2C12, C2C12^{mKlhdc2-H} und C2C12^{mKlhdc2-A}. Die murine Zelllinie C2C12 wurde von Myoblasten embryonaler Mäuse abgeleitet.

Sie eignen sich sehr gut für Studien der Myoblastenentwicklung und Myoblastendifferenzierung (Yaffe und Saxel, 1997). In den Zelllinien C2C12^{mKlhdc2-H} und

C2C12^{mKlhdc2-A} führt eine gezielte Überexpression des Kelch domain containing Gens 2 (mKlhdc2) zu einem geänderten Migrationsverhalten der Zellen, wobei die Linie C2C12^{mKlhdc2-H} einen stärkeren Phänotyp aufweist als die Linie C2C12^{mKlhdc2-A}. Zur Kontrolle wurde Protein des Wildtyp-C2C12 Zellen mit GDP (Negativkontrolle, kein aktives Rho vorhanden) bzw. GTPγS (Positivkontrolle, viel aktives Rho vorhanden) vorbehandelt.

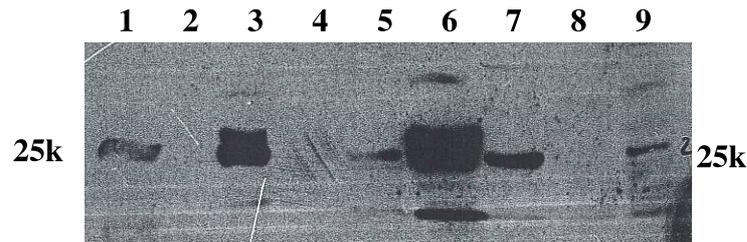


Abb.4.3: Rho-Aktivitätsassay, Western-Blot. 1- Marker, 2 – WT, GDP behandelt (Negativkontrolle), 3 – WT, GTPγS behandelt (Positivkontrolle), 4 – WT (nach Aktivitätsassay), 5 - C2C12^{mKlhdc2-A} (nach Aktivitätsassay), 6 - C2C12^{mKlhdc2-H} (nach Aktivitätsassay), 7 – WT (Gesamtprotein), 8 - C2C12^{mKlhdc2-A} (Gesamtprotein), 9 - Marker

Der Westernblot zeigt im Vergleich zur Wildtyp C2C12-Zelllinie eine starke Aktivierung des Rho-Proteins in der Zelllinie C2C12^{mKlhdc2-H} und eine schwächere Rho-Aktivierung in der Zelllinie C2C12^{mKlhdc2-A}.

5. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene Faktoren in Bezug auf Ihre Funktion bei der Skelettmuskelentwicklung zu untersuchen. Dabei wurden die Rho-GTPasen Rac, Ral, Ras, Cdc42 und Rho stärker in Augenschein genommen und in *in vivo* Experimenten untersucht.

Rho - GTPasen sind monomere Proteine von ca. 25 kD. Sie liegen in zwei Zustandsformen vor. Die GTP gebundene Form stellt die aktive Form dar und wirkt über G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die die Proliferation von Zellen, Zelldifferenzierung und die gerichtete Zellbewegung steuern. Durch Austausch des GTP kann die aktive Form durch Hydrolyse des Triphosphats durch sogenannte GTPase - aktivierende Proteine (GAPs) in die inaktive Form überführt werden. Sogenannte Guaninnukleotid - Dissoziationsinhibitoren (GDIs) stabilisieren Rho - GDP solange, bis es erneut durch Guaninnucleotid Austauschfaktoren (GEFs - Guanin nucleotid exchange factors) in aktive Rho – GTP Form überführt wird (Abb. Etienne Manneville S., 2002). In *in vitro* Versuchen konnte für einen Teil der hier beschriebenen Rho-GTPasen ein Einfluss auf die Migration von Muskelvorläuferzellen analysiert und nachgewiesen werden. Über diese Erkenntnisse liegen jedoch keine *in vivo* Experimente vor.

So wurde in dieser Arbeit versucht, durch Injektion konstitutiv aktiver oder dominant negativer Viren mit verschiedenen Signalkaskaden (Ral, Rac, Ras, Rho, Cdc42) zu interagieren bzw. interferieren und so Aussagen in Bezug auf deren Wirkung im Rahmen der Migration von Muskelvorläuferzellen *in vivo* machen zu können.

Rho-GTPasen lassen sich in verschiedene Untergruppen unterteilen, die unterschiedliche Aufgaben im Rahmen der Muskelentwicklung übernehmen. Die wichtigsten zusammenwirkenden Stationen der Zellwanderung im Rahmen der Myogenese sind die Adhäsion, die Retraction, die Protrusion und die Polarisation. All diese Schritte müssen aktiviert, gehemmt und kontrolliert werden. Dies geschieht hauptsächlich über die hier untersuchten Faktoren. So ist Cdc42 zum Beispiel für die Polarisation der Zelle verantwortlich. Dies geschieht zum Teil durch die bestimmte Positionierung und Neuorganisation verschiedener Zellbestandteile, um den Vesikeltransport der Zelle oder auch die Bildung von Zell - Zellkontakten zu erleichtern. Zusätzlich bildet es die Protrusion der Zellfront gemeinsam mit anderen Faktoren wie zum Beispiel Rac (Arthur e al; 2002; Honda et al 2003). Rho verstärkt die Zellpolarität und steuert die Migration der Zelle unter Anderem durch die Retraction an der Zellhinterseite.

Zum anderen kann es durch Stimulierung der Mikrotubeldynamik und Stressfaserbildung die fokale Adhäsion der Zelle steuern. Außerdem nimmt Rho Einfluss auf die Transkriptionsfaktoraktivität (Etienne Maneville, S. et al., 2002). Es gibt eine Wechselwirkung zwischen Rho und Rac. So können sie sich je nach Konzentration stimulieren oder hemmen. Rac wirkt im Gegensatz zu Rho an der Zellfront und führt dort zur Protrusion der Zelle, indem es die Aktinpolymerisation organisiert und für neu entstehende Zell-Zellkontakte sorgt. Es konnte gezeigt werden, dass Rac nicht nur für die Vorwärtsbewegung von Muskelvorläuferzellen sondern auch von Astrozyten und Fibroblasten verantwortlich ist (J. Ridley, 2003). Über einen gemeinsamen Signalweg können Ras und Ral die Myoblastenmotilität fördern und die Wanderung von C2C12 Zellen und Muskelsatellitenzellen regulieren. Ras nimmt zusätzlich auf die Chemotaxis in C2C12 Myoblasten Einfluss. Die Funktion von Ral und Ras kann durch die Wachstumsfaktoren HGF, FGF und IGF stimuliert werden. Um die erzielten Ergebnisse auch mikroskopisch und auf Genebene zu untersuchen, wurde die Whole mount in situ Hybridisierung durchgeführt. Hierzu waren Transkriptionsfaktoren für die Markierung des Expressionsmusters notwendig. Die Migrationsfähigkeit und auch die Fähigkeit zur Differenzierung von Muskelvorläuferzellen zeigen sich durch die Expression bestimmter Gene. Zu diesen gehören unter anderem Pax3 und Lbx1. Wie in der Einleitung schon beschrieben, wird Pax3 vom paraxialen Mesoderm und dem weiterentwickelten Dermamyotom und Lbx1 von der lateralen Dermamyotomlippe exprimiert. Zellen, die aus der lateralen Dermamyotomlippe auswandern, entwickeln sich später zu einer spezifischen Muskulatur wie Zungen- oder Zwerchfellmuskulatur oder Extremitätenmuskulatur (Bober, Franz et al. 1994). Pax3 kann den Transkriptionsfaktor Lbx1 beeinflussen. Um einen Effekt der injizierten Signalkaskaden, bzw. Retroviren beurteilen zu können, wurden die Transkriptionsfaktoren Lbx1 und Pax3 als Marker der gerichteten Wanderung von Muskelvorläuferzellen der Extremitäten verwendet. Bei der Injektion des dominant negativen Ral 400- Virus ließ sich eine deutliche Wirkung auf die Bildung der Vorderextremität nachweisen. Die linke vordere Extremität bildete sich im Vergleich zur rechten vorderen Extremität nur verkürzt und deformiert aus. Bei den anderen Rho - GTPasen Rac, Ras und Cdc42 waren weder morphologische Veränderungen zu erkennen, noch traten Veränderungen im Expressionsmuster von Lbx1 und Pax3 auf.

5.1 Injektion von dominant negativen Virus Ral 400 führt zur Verkürzung der Extremität

Bei *in vitro* Versuchen zeigte sich ein großer Einfluss von Ral auf die Wanderung von Muskelvorläuferzellen. So erwarteten wir eine Veränderung der Extremität bei Injektion des Retrovirus Ral auch in unseren *in vivo* Experimenten.

Nach Bearbeitung von insgesamt 808 Hühnereiern und zur Injektion geeigneten 402 Embryonen konnte nur bei der Injektion von dominant negativen Virus Ral 400 eine Veränderung der Entwicklung der vorderen linken Extremität am Hühnerembryo beobachtet werden. Es zeigte sich dort eine deutliche Verkürzung der mit Virus Ral 400 (d/n) injizierten Extremität.

Dies lässt darauf schließen, dass die erzeugte Verkürzung nicht durch die Injektionstechnik an sich bedingt sein kann. Das Expressionsmuster von Lbx1 und Pax3 war hier nicht aussagekräftig, da die Muskelvorläuferzellen keine Möglichkeit hatten, in die vordere linke Extremität einzuwandern. Jedoch zeigte sich nicht bei allen mit dominant negativen Virus Ral 400 behandelten Embryonen eine Fehlbildung der manipulierten Extremität. Vergleicht man hier das Expressionsmuster von Lbx1 und Pax3 der linken mit der rechten vorderen Extremität (Kontrolle), konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

Man kann hier davon ausgehen, dass die Injektion in die Somiten fehlerhaft verlaufen ist oder zuwenig vom Virus injiziert wurde und das unveränderte Expressionsmuster nicht verwertbar ist. Nun stellt sich die Frage, ob Ral einzig allein Einfluss auf die Fehlentwicklung hatte oder ob es durch Wechselwirkung mit anderen Faktoren bzw. Signalkaskaden zu dieser Verkürzung der Extremität kam.

5.1.1 Mögliche Wechselwirkung von Ral mit den Faktoren der Entwicklung der Extremitätenknospe

Die Injektion des dominant negativen Virus Ral 400 führte zu einer abnormen Gliedmaßenentwicklung. Man kann davon ausgehen, dass der Effekt nicht allein auf die Störung der Migration von Muskelvorläuferzellen zurückzuführen ist, da sich in verschiedenen Tiermodellen trotz fehlender Gliedmaßenmuskulatur noch normal ausgewachsene Extremitäten finden (Lbx-1 knock out Maus; Schäfer et al.1999).

Möglicherweise deutet dieser Fund auf eine bis jetzt nicht näher beschriebene Interaktion von Ral und FGFs als den Hauptinduktoren der Bildung der Extremitätenknospe und des Auswachsens hin.

Anhand der folgenden Ausführungen können mögliche Interaktionspunkte zwischen Ral und den Signalen der Extremitätenentwicklung aufgeführt werden.

Die Extremitätenentwicklung bei Hühnerembryonen beginnt schon ab dem dritten Tag nach der Eiablage (Wolpert et al., 1999). Zu diesem Zeitpunkt sind die Strukturen entlang der Körperhauptachse bereits im Großen und Ganzen angelegt, und somit bestehen bereits bei der Injektion der Retroviren die Anfangsstrukturen und die Wegerichtung der Extremitätenentwicklung. Die Gliedmaßen entwickeln sich aus den Extremitätenknospen. Die Extremitätenknospe besteht aus zwei Zelltypen, einmal den Mesodermzellen, aus dem sich der größte Teil der Extremität entwickelt (Muskeln, Knorpel, Knochen) und den epithelialen Ektodermzellen, die in erster Linie die Haut der entstehenden Extremität bilden. Die späteren Muskelzellen wandern aus den Somiten in die Knospe ein. An der Spitze der Knospe befindet sich die so genannte Wachstumszone, ein Bereich mit schnell teilenden undifferenzierten Zellen, die unmittelbar unter der apikalen Ektodermleiste, auch Apikalleiste genannt, liegt. Erst nach Verlassen der Wachstumszone können sich die Zellen differenzieren. Die proximal gelegenen Abschnitte der Extremität entwickeln sich zuerst. Damit sich Knorpel, Muskel und Sehnen an der richtigen Stelle in der Extremität entwickeln, sind bestimmte Faktoren in Wechselwirkung mit Organisationszentren notwendig. Ein Organisationsbereich ist die oben erwähnte apikale Ektodermleiste am Ende der Knospe. Ein zweites Organisationszentrum befindet sich am Rand des Mesenchyms, die so genannte Zone der polarisierenden Aktivität (ZPA). Entfernt man bei einem Hühnerembryo den vorderen Teil der Extremitätenknospe, entwickelt sich die Extremität normal. Wird jedoch ein Teil aus der hinteren, also der polarisierenden Region entfernt, kommt es zur abnormen Gliedmaßenentwicklung. Gleiches gilt für die Apikalleiste, bei deren Entfernen die distalen Elemente der Extremität nicht mehr ausgebildet werden (Wolpert et al. 1999). Das hängt auch damit zusammen, dass die Entwicklung der Hühnerextremität auf einer Positionsinformation beruht. Man geht davon aus, dass das Schicksal der Zellen der Extremitätenentwicklung durch deren Position relativ zu den drei Hauptachsen bestimmt wird und so festgelegt wird ob sich ein Hühnerflügel oder ein Hühnerbein entwickelt. So könnte der Positionswert der proximo- distalen Achse ein zeitabhängiger Mechanismus sein, der die Aufenthaltsdauer einer Zelle in der Wachstumszone misst und beim Verlassen der Zone ihr die nötige Positionskoordinate mitgibt.

Die Koordinaten auf der Dorsoventralachse werden durch Signale der apikalen Ektodermleiste geliefert; die Signale der anterior-posterioren Achse werden von der polarisierenden Region mitgegeben. Die apikale Ektodermleiste ist für die proximo-distale Musterbildung und das Längswachstum der Extremität notwendig. Nach mikrochirurgischer Entfernung der Apikalleiste bleibt das Wachstum der Extremität zurück und auch die Zellteilung in der Wachstumszone geht deutlich zurück. Man kann davon ausgehen, dass die Apikalleiste Signale an die Wachstumszone sendet. Zu diesen Signalen gehören auch einige Mitglieder der FGF-Familie (fibroblast growth factor, Fibroblastenwachstumsfaktor). Z. B. FGF-4 wird ausschließlich im posterioren Bereich der Apikalleiste ausgeschüttet und kann diese funktionell ersetzen. Entfernt man die Apikalleiste und ersetzt sie durch FGF-4 Depotperlen, so kann sich die Extremität, bei genügender Dosierung an FGF-4, normal entwickeln (Wolpert et al. 1999). In mehreren Publikationen wurde gezeigt, dass FGFs auch über einen Ras- und Ral-abhängigen Signalweg wirken. So zum Beispiel bei der Einleitung der Zellmigration von Muskelvorfürerzellen (Braun et al., 2005) oder der Mesodermentwicklung im Frosch (Lebreton et al., 2003). Das könnte bedeuten, dass der Effekt der Injektion des dominant negativen Ral 400-Virus auf eine gestörte FGF-Signalkaskade zurückzuführen sein könnte. In einer Forschungsgruppe von S. Lebreton et al (2003) konnte aber auch gezeigt werden, dass bei der *Xenopus*-Entwicklung eine konstitutive Aktivierung des Ral Signalweges zu einer Störung des Actin-Zytoskeletts führt. Auch diese Funktion von Ral wird bei *Xenopus* durch FGF-Aktivierung induziert. Das heisst, dass eine gestörte Entwicklung oder Funktion der extrazellulären Matrix eine andere mögliche Erklärung für die Extremitätenfehlbildung nach Injektion eines dominant-negativen Ral-Virus bieten könnte.

Ein Beispiel für ein verändertes Zellverhalten auf Grund eines gestörten Zytoskeletts wird im Rahmen dieser Arbeit auch an C2C12-Zellen gezeigt, die auf Grund der Überexpression von mKlhd2 eine verstärkte Bildung fokaler Adhäsionskomplexe und eine reduzierte Wandlungsfähigkeit aufweisen. Interessanterweise ist auch in diesem Prozess eine Involvierung von G-Proteinen der Ras-Ral-Familie zu beobachten, in dem Fall eine Aktivierung des endogenen Rho. Die genaue Ursache der Extremitätenfehlbildung in den Embryonen nach Injektion des dominant negativen Virus Ral 400 lässt sich nach dem aktuellen Kenntnisstand nicht finden, es gibt aber mehrere Erklärungsansätze, deren Richtigkeit in weiterführenden Experimenten untersucht werden kann.

5.2 Injektion von Rac-, Ras-, Cdc42- und Rho - dominant negativen und konstitutiv aktiven Retroviren

Bei der Whole mount *in situ* Hybridisierung der mit den dominant negativen und konstitutiv aktiven Retroviren Rac, Ras, Cdc42 und Rho *in vivo* behandelten Embryonen zeigten sich keine Veränderungen der Expression von Lbx1 und Pax3, obwohl in *in vitro* Versuchen Einflüsse dieser Signalkaskaden auf die Zellmigration beschrieben werden konnten.

Es stellt sich die Frage, ob die untersuchten Rho- GTPasen keinen Einfluss auf die Wanderung von Muskelvorläuferzellen *in vivo* haben oder ob es etwas mit der Durchführung der Experimente zu tun hat. Um dies herauszufinden, werden einzelne Schritte der Versuchsreihe aufgeführt und analysiert. Um die Injektionstechnik zu erlernen, ist eine gewisse Zeit an Probeinjektionen notwendig, solange bis man nach Einlagerung der Embryonen im Inkubator lebende Embryonen erhält. Nach einigen Monaten stellten wir fest, wenn wir etwas an der Injektionstechnik veränderten, waren mehr überlebende Embryonen zu verzeichnen. Dazu versuchten wir die Spitze der Injektionsnadel so dünn wie möglich zu lassen; also nur den nötigsten Teil mit der Mikroschere von der Spitze abzuschneiden. Dadurch wurde der injizierte Virustropfen kleiner und der Einstich in die Somiten mit der Injektionsnadel minimal, so dass die Somiten kaum verletzt wurden. Das Aufblähen des Virus - beinhaltenden Somiten zeigte, dass die Injektion erfolgreich war. Es war jedoch nicht möglich, stets die gleiche Virusmenge zu injizieren, da nach mehrfacher Injektion häufig die Nadel verklebte und die Spitze der Nadel erneut mit einer Mikroschere eröffnet werden musste und sich so der Durchmesser vergrößerte. So variierte häufig die Menge des injizierten Virus und somit auch dessen Wirkung. Außerdem konnte man sich nicht sicher sein, dass die injizierte Konzentration auch in Abhängigkeit von der Zeit ausreichend für eine Wirkung war. Zum einen wusste man nicht, wie lange der Virus an der Injektionsstelle verblieb und zum anderen wie hoch der Verdünnungseffekt im jeweiligen Somiten war. Da noch nie zuvor eine solche *in vivo* Injektion mit den oben genannten Viren versucht wurde, konnte kein Vergleich über injizierte Mengen bzw. Einwirkzeit angestellt und somit keine Aussage in Bezug auf den Effekt *in vivo* gemacht werden. Anfangs verwendeten wir nur Hühnerembryonen, die sich im HH Stadium 13 nach Hamburger und Hamilton befanden und maximal 19 Somiten bei einer Brutzeit von 48-52 Stunden besaßen. Oft waren weniger als 19 Somiten vorhanden, was zu wenig für die festgelegte Injektion in Somiten 16-19 (Entwicklung der Vorderextremität) war.

Also verwendeten wir Hühnerembryonen im HH Stadium 14, die 22 Somiten nach 50-53 Stunden der Inkubation aufwiesen. Auch hier überlebten mehr Embryonen die Zeit im Inkubator, wahrscheinlich aufgrund der weiterentwickelten Organfunktionen. Diese Situation könnte jedoch auch Einfluss auf die Wanderung der Muskelvorläuferzellen gehabt haben. Man könnte vermuten, die Wanderung war soweit fortgeschritten, dass die injizierte Menge des Virus weniger Einfluss auf die Entwicklung hatte.

Eine zweifelsfreie Beurteilung über die fehlerfreie Injektion ist nicht möglich, jedoch weist das Aufblasen der Somiten auf eine durchgeführte Injektion hin und auch der bei den mit Ral 400 behandelten Embryonen beobachtete Effekt spricht für eine erfolgreiche Injektionstechnik. Da es nur bei diesen Embryonen zur Fehlbildung der Extremität gekommen war, ist davon auszugehen, dass dies nicht durch die mikrochirurgische Manipulation bedingt war, sondern durch die Wirkung des dominant negativ, injizierten Retrovirus Ral 400 auf die Zellwanderung. Bei der Whole mount *in situ* Hybridisierung werden die im Gewebe enthaltenen mRNS Kopien der exprimierten Gene an komplementäre DIG - markierte RNS- Probe gebunden. Diese Proben diffundieren in den Embryo und werden nach einer bestimmten Inkubationszeit wieder ausgewaschen (Protokoll; Günther et al., 1997).

Anschließend wird ein Antikörper hinzugefügt, der komplementär zu Digoxigenin ist und alkalische Phosphatase gebunden hat. Schließlich werden die freien Antikörper ausgewaschen und eine Substrat hinzugefügt, so dass dieses sich nach Reaktion mit der alkalischen Phosphatase blau verfärbt. Dadurch können spezifisch die Zellen gefärbt werden, in den die Probe das passende Gen exprimiert und so sichtbar gemacht werden. Durch unterschiedliche Diffusionsgradienten ist es oft schwierig, dichtes Gewebe in tieferen Schichten deutlich anzufärben, wobei es bei oberflächlichen Schichten gut sichtbare Zellgruppen sind. Dadurch kann es zur schwachen Färbung des beobachteten Gewebes kommen und so den Vergleich des untersuchten Expressionsmusters erschweren und möglicherweise zu Fehlinterpretation führen. Deshalb wurden zusätzlich Schnitte im Kryostat angefertigt, um auch mikroskopisch das Expressionsmuster der linken mit der rechten vorderen Extremität zu vergleichen. Da es noch keine *in vivo* Versuche mit den hier verwendeten Retroviren an Hühnerembryonen gibt, ist es schwer, die Fehlerquellen aufzudecken bzw. zu erörtern, ob es überhaupt zu Fehlern kam, und so die Aussagekraft der Injektion mit den Retroviren Rac, Ras, Cdc 42 und Rho vermindert ist. Es muss auch beachtet werden, dass in *in vitro* Experimenten mit Zellkulturen ein künstlich geschaffenes Milieu herrscht und so andere Bedingungen geschaffen wurden als es *in vivo* Experimenten der Fall ist.

Wenn zum Beispiel eine Signalkaskade beschrieben werden konnte, die unabhängig von anderen Faktoren einen bestimmten Schritt in der Migration und Differenzierung von Muskelvorläuferzellen reguliert, so ist es möglich, dass in *in vivo* Versuchen mehrere Faktoren zusammenwirken und sich gegenseitig beeinflussen und so die Hemmung oder auch Stimulierung der Zellmigration allein durch Interferenz mit einer Signalkaskade potenziell kein Effekt zu beobachten ist, da mit Hilfe von anderen Signalkaskaden eine Kompensation auftreten könnte.

5.3 Rho-Aktivität in migrationsgestörten Muskelvorläuferzellen *in vitro*

In der Arbeitsgruppe wurden C2C12 Zelllinien etabliert (C2C12^{mKlhdc2-H} und C2C12^{mKlhdc2-A}), die nach stabiler Transfektion mit Klhdc2 *in vitro* eine reduzierte Zellmigration und eine schwächere Antwort auf chemotaktische Signale aufwiesen (Neuhaus et al 2006). In diesen Zelllinien sollte die Aktivität von Rho bestimmt werden, um zu sehen, ob das gestörte Wanderungsverhalten vielleicht auf eine Deregulation von Rho zurückzuführen ist. Die beiden Zelllinien verhalten sich im Vergleich zu C2C12-Wildtypzellen nicht mehr wie typische Muskelvorläuferzellen. Sie sind in ihrer Migrationsfähigkeit gehemmt und reagieren nur noch abgeschwächt auf chemotaktische Reize. Ferner weisen sie ein stärkeres Adhäsionsverhalten und eine geringere Zellteilungsrate auf. Hierbei ist ein deutlicher Unterschied zwischen den Zelllinien zu beobachten; die Zelllinie C2C12^{mKlhdc2-H} weist einen deutlich stärkeren Effekt auf als die Zelllinie C2C12^{mKlhdc2-A}, wobei dies dem Grad der Klhdc2-Überexpression entspricht (stärkere Überexpression in C2C12^{mKlhdc2-H}). In welcher Art und Weise Klhdc2 diese Veränderungen hervorruft, konnte noch nicht geklärt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in beiden Zelllinien eine deutliche Aktivitätssteigerung von Rho zu beobachten ist. Zusammen mit der beobachteten stärkeren Adhäsion der Zellen lässt sich somit vermuten, dass in den Zellen durch die Klhdc2-Überexpression (direkt oder indirekt) eine Rho-Aktivitätssteigerung induziert wird, die zu der verstärkten Bildung fokaler Adhäsionskomplexe führt. Letzteres wurde auch bereits auf histologischer Ebene gezeigt (Neuhaus et al 2006). Damit wurde jetzt mit Rho ein mögliches Bindeglied zwischen Klhdc2-Überexpression und den veränderten Eigenschaften der C2C12-Zellen gefunden.

5.4 Aussichten

In der Medizin gibt es einige Bereiche, in denen diese Experimente mit Muskelvorläuferzellen eine Rolle spielen. Es sind viele Muskelerkrankungen bekannt, das bekannteste und wohl auch häufigste Beispiel im Jugendalter wäre die Erb Duchenne Muskeldystrophie, die zwar symptomatisch therapierbar ist, jedoch nicht zu einer Heilung führt. Forschungen, die in das Migrationsverhalten, bzw. in die Muskelregeneration eingreifen, wie die Stamm-/Vorläuferzellen geben erfolgsversprechende Ansätze für die Therapie und Heilung jeglicher Muskelerkrankungen. Vorläuferzellen oder auch Stammzellen, zeigen eine Fähigkeit zur Regeneration und Differenzierung in unterschiedlichen Geweben. So können zum Beispiel hämatopoetische Stammzellen durch Transplantation und Weiterentwicklung zu ausgereiften Zellen im Empfänger zur Heilung von Leukämien eingesetzt werden. Es werden weitere Möglichkeiten erforscht, um Vorläuferzellen zur Organregeneration einzusetzen, um so körpereigenes Gewebe aufzubauen. Dadurch wäre es eventuell möglich, eine Transplantation von Fremdorganen und der damit verbunden gefährlichen Operation und der langen Wartezeit auf Organe in den Hintergrund zu drängen. Die Transplantatabstoßung könnte so möglicherweise bekämpft werden. Wie die Experimente von Gussonie et al. zeigen, ist es möglich, durch Transfer von Stammzellen über die Blutbahn, Satellitenzellen zu aktivieren und so evtl. eine erfolgsversprechende Therapie für die Muskeldystrophie vom Typ Becker und Duchenne zu etablieren (Gussonie et al, 1999).

Forschungen in der molekularen Basis der Zellwanderung wurden in den letzten Jahren oft betrieben. Die Schlüsselmoleküle der Regulation wurden identifiziert und die Mechanismen untersucht, die potentielle Signale für therapeutische Intervention von Krankheiten, die in die Zellwanderung involviert sind, bereitstellen. Jedoch gibt es noch viele ungelöste Streitpunkte, wie die Zelle *in vivo* ihre Polarität errichtet und aufrechterhält, wie die Adhäsion geformt und zerstreut wird, wie Zellen *in vivo* wandern und wie Zellen Signale erkennen.

Um weiter Fortschritte in diesem Bereich zu machen, wären weitere *in vivo* Versuche von Interesse. In Bezug auf diese Arbeit könnte man in weiterführenden Experimenten eine erhöhte Konzentration der Retroviren injizieren oder beispielsweise einen Embryo mit zwei verschiedenen Rho - GTPasen behandeln, die eine gleichgerichtete Regulierung der Migration von Muskelvorläuferzellen bewirken, um so den Effekt zu verstärken.

6. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Ziel dieser Arbeit war es, Signalkaskaden, die Einfluss auf die Wanderung von Muskelvorläuferzellen haben, zu untersuchen. Rho – GTPasen über ihren G – Protein geregelten Signalweg stellen dabei die Hauptregulatoren dar und nehmen eine wichtige Stellung auch in der Medizin ein. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass Ras mutierte Gene, einer der verwendeten Faktoren in dieser Arbeit, eine große Rolle in der Tumorentwicklung spielt.

In 15-20 % aller menschlichen Tumore werden Ras- Proteine (H- Ras, K- Ras und N- Ras) gefunden. 90 % der Pankreastumore und 50 % der Colonkarzinome beinhalten ein mutiertes K- Ras Gen. H- Ras wird in 20 % der Blasenkarzinome gefunden (Bos, J.L. ,1995).

Die GTPase Ral gehört zur Ras- Familie und stimmt mit H-Ras, N-Ras und K- Ras überein. Die Aktivierung von Ral erfolgt über Ral- GEF, die durch Ras aktiviert werden. Es gibt Hinweise, dass Ral – GTPasen einen großen Teil der Ras- induzierten Transformation von Zellen vermittelt. Es zeigte sich jedoch, dass Ral auch unabhängig vom Ras Signalweg aktiviert werden kann. So kann man davon ausgehen, dass Ral auch unabhängige Funktionen ausübt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Injektion von Ral- GTPasen in die Somiten der linken Vorderextremität zu einer Fehlentwicklung dieser führte. Bei den anderen hier verwendeten Rho- GTPasen konnte eine Aktivität *in vivo* am Hühnerembryo nicht gezeigt werden, da die Injektion nicht zu einer Fehlentwicklung der behandelten Extremität führte.

Jedoch konnten aktive Rho- GTPasen in einem *in vitro* Versuch, dem Rho Activation Kit, nachgewiesen werden und damit die Funktion der Fokaladhäsion von Rho- GTPasen bestätigt werden.

Für die Zukunft wäre von Interesse, was genau zu dieser Fehlentwicklung der mit Ral behandelten Embryonen geführt hatte; außerdem, ob mit einer zusätzlichen Injektion von Ras- GTPasen, die die Aktivität der Ral - Faktoren verstärken, es zu einer ausgeprägteren Fehlentwicklung oder gar zu einem Fehlen der Extremität führen könnte.

Mit der Injektion von größeren Mengen des Ral 400 Virus könnten evtl. weitere Fehlentwicklungen und noch deutlichere Ergebnisse erzielt werden.

7. Anhang

7.1. Literaturverzeichnis

Allen W. E., Zicha D., et al (1998). "A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis." J Cell Biol **141**: 1147-1157.

Amano, M., Fukata Y., et al (2000). "Regulation and functions of Rho-associated kinase." Exp. Cell Res. **261**:44–51.

Arthur, W. T., Noren, N.K., et al (2002). "Regulation of Rho family GTPase by cell- cell and cell matrix adhesion." Biol. Res. **35**: 239-246.

Barton - Davis, E.R., Shorturma, D.I., et al: (1998)."Viral mediated expression of insulin like growth factor I blocks the aging – relatet loss of skeletal muscle function." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A. **95**:15063-15607.

Beddington, R., Brockes J., et al (1999). Entwicklungsbiologie. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.

Benard, V., Bohl B., et al (1999). "Characterization of Rac and Cdc42 activation in the moat-tracant-stimulated human neutrophils using a novel assay for active GTPase." J. Biol. Chem. **274**:13198-13204.

Birchmeier C., Brohmann H., et al (2000). "Genes that control the development of migration muscle precursor cells." Current Opinion in Cell Biology,**12**: 725-730.

Bober, E., Franz T., et al. (1994). "Pax-3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells." Development **120**, No.3: 603-612.

Bos, J.L., (1995). "P21 Ras, an oncorstein functioning in growth factor. Induced signal transduction." Eu. J. Cancer **31 A**: 1051-1054.

Braun, T. (2005). "Differenzierung und Proliferation von Zellen während der Entwicklung und Regeneration". Entwicklungs- Evolutionsbiologie S.259-267

Brohmann, H., Jagla K., et al.(2002). "The role of Lbx1 in migration of muscle precursor cells." Development **127**; No2: 437-445.

Chou, J., Burke N.A., et al (2003). "Directional motility induced by epidermal growth factor requires Cdc42.Exp." Cell Res. **287**: 47-56.

Cohn, M. J., Izpisua-Belmonte JC., et al. (1995). "Fibroblast growth factor induce additional limb development from the flank of chick embryos." Cell **80**: 739-46.

Daston, G., Lamar, E., et al (1996). "Pax-3 is necessary for migration but not differentiation of limb muscle precursors in the mouse." Development **122**: 1017-1027.

Dietrich, S. (1999). "Regulation of hypaxial muscle development." Cell Tissue Res. **296**: 175-182.

Dietrich, S., Abou-Rebyeh F., et al. (1999). "The role of SF/ HGF and c-Met in development of skeletal muscle." Development **126**: 1621-1629.

Donovan P.J., Gearhart J., (2001). "The end of the beginning for pluripotent stem cells." Natur **1**:424-492

Epstein, J. A. et al (1996). "Pax3 modulates expression of the c-met receptor during limb muscle development." PNAS; **93**,No 9: 4213-4218.

Etienne Manneville, S. and Hall, A., (2002). "Rho GTPases in cell biology." Natures **420**: 629-635.

Etienne – Manneville, S., (2004). “Cdc42- the centre of polarity.” Journal of Cell Science **117**: 1291-1300.

Gilbert. S.F.; (2000). “Developmental Biology.” Sunderland, Sinauer V.;6. Auflage; S. 447 - 454.

Gross, M.K., Moran- Rivard, L. et al (2002).”Lbx1 is required for muscle precursor migration along a lateral pathway into the limb.” Development **127**:413-424.

Gussoni et al, (1999).“Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation.” Nature **23**: 390-401.

Hamburger, V. and Hamilton, H.L.; (1992). “A series of normal stages in the development of the chick embryo.” Dev. Dyn. **195**:231-72.

Honda, T. S., Shimizu, K., et al. (2003).” Cdc 42 and Rac small G proteins activated by trans-interaction of nectins are involved in activation of c-Jun N-terminal kinase, not in association of nectins and cadherin to form adherens junctions, in fiboblast.” Genes Cells. **8**: 481-491.

Jerusalem F. und Zierz S., (1991).” Muskelerkrankungen - Klinik, Therapie, Pathologie.“ Thieme – Verlag 2.Auflage: S.170-177.

Lebreton S. et al (2003). “Control of embryonic Xenopus morphogeneses by a Ral-GDS/Xral branch of the Ras signalling pathway.” Journal of Cell Science **116**, 4651-4662.

Mackay, D. J. G. and Hall, A. (1998). “Rho- GTPases.” J. Biol. Chem. **273**: 20685–20688.

Mennerich, D., Schäfer, K. und Braun, T., (1998). ”Pax3 is necessary but not sufficient for lbx1 expression in myogenic precursor cells of limb“. Mechanisms of Development: **73**: 147-158.

Neuhaus, P., Jaschinsky B., et al (2006). “Overexpression of Kelch domain containing-2 (mKlhdc2) inhibits differentiation and directed migration of C2C12 myoblasts”, Experimental Cell Research **16**, 3049 – 3059

Nobes, C. D., and Hall, A. (1995). “Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia and filopodia.” Cell **81**:53–62.

Pollard, T.D. and Borisy, G.G. (2003). “Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments.” Cell **112**: 453-465.

Ridley, J.A., Schwartz, M., et al. (2003), “Cell migration: integrating signals from front to back.” Science **320**: 1704-1709.

Schäfer, K. and Braun, T. (1999): “Early specification of limb muscle precursor cells by the homeobox gene Lbx1.” Nat Genet **23**, No. 2: 213-216.

Schultz, E., Jaryszak, D.L. et al. (1985).“ Response of satellite cell to focal skeletal muscle injury.” Muscle Nerve, **8**: 217-222.

Spuler, S. und A. v. Moers (2004): „ Muskelerkrankungen – Grundlagen, Diagnostik und Therapie.“ Schattauer-Verlag: 87-93.

Sonnenberg, E., Meyer, D., et al (1993). “Scatter factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchym and epithelia during mouse development.” J. Cell Biol. **123**: 223-235.

Sugimoto N., Takuwa N., et al. (2002).” Inhibitory and Stimulatory Regulation of Rac and Cell Motoloty by the G_{12/13}- Rho and G₁ Pathways Integrated Downstream of a Single G Protein- Couple Sphingosine-1-Phoshate Receptor Isoform”. Molekular and Celullar Biology **23**: 1534-1545.

Suzuki, J., Yamazaki, Y., et al. (2000). "Involvement of Ras and Ral in chemotactic migration of skeletal myoblasts." Molecular and cellular biology **20**, No. 13: 4658-4665.

Tajbakhsh, S., Buckingham M.E., et al. (1994). "Mouse limb muscle is determined in the absence of earliest myogenic factor:myf -5." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 747-752.

Takai, Y. and Nakanishe, H. (2003). "Nectin and afadin: novel organizer of intercellular junctions." J.Cell Sci. **116**:17-27.

Wang, F., Herzmark, P. et al. (2002). "Lipid products of PI(3)Ks maintain persistent cell polarity and directed motility in neutrophils." Nat. Cell Biol. **4**: 513-518.

Wilson, E.M., Hasieh, M.M., et al.(2003). "Autocrine growth factor signalling by insulin like growth factor II mediates MyoD stimulated myocyte maturation." J Biol Chem **278**: 41109-13.

Wolpert L. (1999). Principles of development Oxford, University Press, S37, S.303-319

Yaffe, D., Saxel, O. (1977). "A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation." Differentiation **7**: 159-166.

Zhang, X. , Novick, P. et al (2001). "Cdc42 interacts with the exocyst and regulates polarized secretion." J. Biol. Chem. **276**: 46745-46750.

7.2 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Antisense	engl. : entgegengesetzte Richtung
Arp 2/3	Actin related Protein
aPKC	atypische Proteinkinase
bzw.	beziehungsweise
CA	Cauda, Schwanz
Cdc42	engl: cell division cycle 42
CO	Collum, Hals
Dig.....	Digoxigenin
d/n.....	dominant negativ
DNSse.....	Desoxyribonuklease
DNS/ DNS.....	Desoxyribonukleinsäure
ECM	extracelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	engl.: epidermale growth factor, epidermaler Wachstumsfaktor
ETOH	Ethanol
et al.	Et altera
FGF.....	Fibroblasten Wachstumsfaktor
FRET	Fluoreszenz- Resonanz – Energie Transfer
g.....	Gramm
GAPs	GTPase aktivierende Proteine
GDP.....	Guanindiphosphat ;inaktive Form
GDI.....	engl.: Guanine nucleotide exchange inhibitors
GEFs.....	engl.: Guanin nucleotide exchange factors
G-Protein	Guaninnukleotide - bindendes Protein; oder GTP- Bindendes Protein
GPCRs.....	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanintriphosphat ;aktive Form
GTPase	Enzym zur Hydrolyse des GTPs
h.....	Stunde
HGF.....	engl. Hepatozyten Growth factor oder Scatterfaktor
HH	Hamburger/Hamilton Stadien, Reifestadien der Hühnerembryonen

IGF	engl.: Insulin like growth factor
k/a	konstitutiv aktiv
l.....	Liter
Lbx1	Transkriptionsfaktor; (lady bird homeobox gene)
LHE	linke hintere Extremität
LVE	linke vordere Extremität
M	Molarität
MEK	mitogen aktivierte Protein Kinase
MeOH.....	Methanol
min.....	Minuten
MLC	Myosin leichte Ketten
MLCK	Myosin leichte Ketten Kinase
MPCs.....	engl.: muscle precursor cells, embryonale Muskelvorläuferzellen
mRNS	engl.: messenger RNS; durch Transkription entstandene Boten – DNS
MTOC	Mikrotubenorganisationszentrum
PAK1 – Kinase.....	heterotrimeres G- Protein - Signal
Pax3.....	Transkriptionsfaktor (Paired box gene)
PBS.....	Phosphat gepufferte Saline
PFA.....	Paraformaldehyd
pH	Potentium Hydrogenii
PI3Ks.....	Phosphoinositol - 3 – Kinase
PIP3	Phosphoinositol- 3- Phosphat.
Primer	Oligonukleotid, wird zum Start der DNS- Synthese gebraucht
PTEN.....	Phosphatase und Gensin homologes Tumorsupressorgen
Rac 1.....	engl.: Ras related C3 botullinus toxin substrat1
Ral	Unterform von Ras
Ras.....	engl.: Rat sarcoma
RBD.....	Rho bindende Domäne von Rhotekin
RHE	rechte hintere Extremität
Rho	engl.: Ras homologous members
RNS	Ribonukleinsäure
RNasin.....	RNase Inhibitor
ROCK.....	Rho - Kinase

RT.....	Raumtemperatur
RVE.....	rechte vordere Extremität
S1P	Sphingosin - 1 - Phosphat; Lipophospholipid
SDS – Page.....	Sodium dodecylsulfate Polyacryl amidgelelektrophorese
sek.....	Sekunde
Shh.....	Sonic Hedgehog Protein
TAE.....	Tris - Acetat – EDTA - Puffer
t- RNS.....	trans - Ribonukleinsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan; Puffersubstanz
Tween 20.....	Polyoxyethylensorbitan – Monolaurylsäure
ü.N.	über Nacht
U/min.....	Umdrehungen pro Minute
WASP.....	Wiskott- Aldrich- Syndrom- Protein
WAVE.....	WASp Family Verprolin Homologous Protein
ZPA	Zone der polarisierenden Aktivität

7.3 Thesen

1. In *in vitro* Versuchen wurde bereits mehrfach die Bedeutung von kleinen G-Proteinen der Rho-Familie auf die Wanderung verschiedener Zellarten, unter anderem auch von Muskelvorläuferzellen, gezeigt. Eine Aufgabe dieser Dissertation bestand darin, dominant negative und konstitutiv aktive Ras-, Ral-, Rac-, Cdc42- und Rho A- Proteine mittels Injektion von Retroviren in den Somiten von Hühnerembryonen zu exprimieren, um den *in vivo* Einfluss dieser Faktoren auf die Zellmigration von Muskelvorläuferzellen in die Extremität zu untersuchen.

2. In unserer Arbeitsgruppe konnte festgestellt werden, dass nach stabiler Transfektion mit Klhdc2 in C2C12 Zelllinien (C2C12^{mKlhdc2-H} und C2C12^{mKlhdc2-A}) diese eine gehemmte Zellmigration und eine schwächere Antwort auf chemotaktische Signale aufwiesen. Im Rahmen der Dissertation sollte untersucht werden, in wie weit diese Migrationshemmung über kleine G-Proteine der Rho-Familie vermittelt wird und welche morphologischen Prozesse daran beteiligt sind.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Martina Lutz

Geboren: 06.09.81 in Erlenbach am Main

Familie-
Stand : ledig, zwei Schwestern, Eltern in Heilbronn als
Allgemeinärzte tätig

Schulbildung:

1988-1992.1 Grundschule
1992-2001 Hölderlingymnasium in Lauffen
1992-2002

Studium

11.2001 Studienbeginn in Halle an der Saale
04.2004 Staatsprüfung Physik
06.2008 Staatsexamen

Praktika

Augenheilkunde in Greifswald (2001)
Orthopädische Praxis in Würzburg (2001)
Chirurgische Privatklinik in Heilbronn (2002)

Famulaturen

Allgemeinarztpraxis in Heilbronn (2004)
Rehabilitationszentrum in Italien (Negrar, 2004)
Orthopädisches Zentrum Markgröningen (Feb 005)
Orthop. Krankenhaus und Praxis Würzburg (2006)
Innere Medizin in Köln (Aug 2006)

Praktisches Jahr (2007/2008)

1. Terial: Universitätsklinik für Anästhesie, Notfallmedizin und Intensivmedizin in Halle (Feb. – Juni 07)
2. Terial: Spital/ Wil/ Schweiz Kanton St. Gallen. Allgemein Chirurgie (Juni- Okt. 07)
3. Terial: Universitätsklinik für Innere Medizin und Intensivmedizin in Halle (Okt- Dez- 07)

Sprachen

Englisch, Französisch, Italienisch

Arbeit

Seit 11.2008 in der Viszeral- und Unfallchirurgie in Wil
als Assistenzärztin tätig

Auslandsaufenthalt

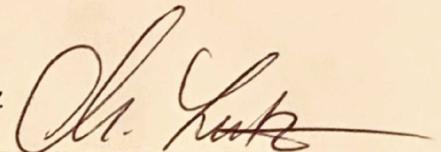
2001 Intensivkurs in Italien (2 Monate)
2004 Famulatur (2 Monate) in Negrar/ Verona
2005/2006 Auslandsstudium in Mailand
2007 Schweiz/ Wil; PJ- Terial
seit 2008/ Nov. wohnhaft Wil/Kanton St. Gallen /Schweiz

Eidesstattlich Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Nordheim, den 20.2.2010

Martina Lutz



Außerdem versichere ich, dass dies mein erster Promotionsversuch ist und ich zuvor noch keine anderen Promotionsversuche unternommen habe.

Nordheim, den 20.2.2010

Martina Lutz

