

Analyse von fusionsdefizienten Myoblasten in der Maus

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Claudia Raßek

aus Meerane

2015

Diese Arbeit wurde im Zeitraum Mai 2010–August 2013 am Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Gruppe Entwicklungsbiologie/Signaltransduktion in Nerven und Muskelzellen, unter der Leitung von Prof. Dr. Carmen Birchmeier angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Carmen Birchmeier
2. Gutachter: Prof. Dr. Fritz Rathjen

Disputation am 01.06.2015

Danksagung

Ich möchte mich an erster Stelle bei Prof. Dr. Carmen Birchmeier für das in mich gesetzte Vertrauen bedanken. Ihrer tatkräftigen Unterstützung, ihrem unermüdlichen Einsatz und ihrer Hilfsbereitschaft habe ich es zu verdanken, dass diese Arbeit entstehen konnte.

Prof. Dr. Fritz Rathjen danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein ganz besonderer Dank gilt Ivonne Schiffner, Dr. Maciej Czajkowski und Dr. Dominique Bröhl für die tolle Zusammenarbeit und ihre Freundschaft.

Dr. Michael Strehle danke ich für die Korrektur dieser Arbeit und die Gummibärchen.

Des Weiteren möchte ich Claudia Päseler und Petra Stallerow für die hervorragende Betreuung „meiner“ Mäuse danken.

Bettina Brandt, Karin Gottschling, Sven Buchert, Mandy Terne und Maria Braunschweig danke ich für die kleinen und großen Hilfestellungen, die mir den Laboralltag leichter machten.

Meiner Familie möchte ich für die stetige Unterstützung danken.

Zum Schluss möchte ich mich bei den zwei wichtigsten Menschen in meinem Leben bedanken: Kenny und Karl.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
129/Sv	Inzucht-Mauslinie
A	Adenin
<i>Arf6</i>	<i>ADP-ribosylation factor 6</i>
<i>Arp2/3</i>	<i>Actin related protein 2/3</i>
bp	Basenpaare
C57Bl/6J	Inzucht-Mauslinie
C	Cystein
C2	Subfamilie der Immunglobulin-Domäne
Ca ²⁺	Kalzium
CD1	Auszucht-Mauslinie
<i>Cdc42</i>	<i>cell-division-cycle protein 42</i>
cDNA	komplementäre DNA
<i>Cre</i>	Cre-Rekombinase aus dem P1-Bakteriophagen
DA	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<i>dELMO</i>	<i>Drosophila engulfment and cell motility protein</i>
DH	<i>catalytic Dbl homology (DH) domain</i>
DHR	<i>DOCK-homology region</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribolukleinsäure
<i>Dock1</i>	<i>Dedicator of cytokinesis 1 (auch DOCK180)</i>
E	Embryonalstadium
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDL	<i>Musculus extensor digitorum longus</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>eGFP</i>	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
F-Aktin	Filamentäres Aktin
FBS	Fetales Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FCM	Fusionskompetenter Myoblast (<i>fusion competent myoblast</i>)
FRT	Erkennungssequenz der Flipase
g	Gramm
G	Guanin
G12V	Austausch der Aminosäure Glycin zu Valin an Position 12
GAP	GTPase-aktivierende Proteine
GDI	GDP-Dissoziationsinhibitoren
GEF	GTP-Austauschfaktoren (<i>GTP exchange factor</i>)
h	Stunde
HBSS	<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Ig	Immunglobulin

<i>ILK</i>	<i>Integrin-linked-kinase</i>
<i>ItgB1</i>	<i>Integrin β1</i>
<i>Jam</i>	<i>Junctional adhesion molecule</i>
l	Liter
<i>Lbx1</i>	<i>Ladybird 1</i>
loxP	Erkennungssequenz der Cre-Rakombinase
μ	Mikro
m	Milli
M	Molar
M.	Muskel
<i>Mbc</i>	<i>Myoblast city</i>
MCAM	<i>Melanoma metastasis-associated surface molecule</i> , CD146
Mg	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
NaCl	Natriumchlorid
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
<i>Nap1</i>	<i>Nck associated protein</i>
Na ₃ PO ₄	Natriumphosphat
<i>Neo</i>	Neomycin Resistenzgen
NPF	Nukleationsfördernder Faktor (<i>nucleation promoting factor</i>)
<i>Par</i>	<i>Abnormal embryonic PARTioning of cytoplasm</i>
<i>Pax3</i>	<i>paired box family protein 3</i>
<i>Pax7</i>	<i>paired box family protein 7</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBX	PBS mit 0.1% Triton X-100
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
PH	<i>pleckstrin homology domain</i>
<i>Rac1</i>	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
<i>Ras</i>	<i>Rat sarcoma</i>
<i>RFP</i>	<i>Red fluorescent protein</i>
<i>Rho</i>	<i>Ras homologue</i>
RNA	Ribonukleinsäure
<i>Rols</i>	<i>Rolling Pebbles</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
<i>Sns</i>	<i>Sticks-and-Stones</i>
T	Thymin
TA	<i>M. tibialis anterior</i>
TK	Thymidinkinase
TSA	Tyramide Signal Amplification
üN	über Nacht
V	Subfamilie der Immunglobulin-Domänen
<i>VCAM-1</i>	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i> , CD106

<i>VLA-4</i>	<i>Very late antigen-4, Integrin $\alpha4\beta1$</i>
<i>WASP</i>	<i>Wiskott-Aldrich-syndrome protein</i>
<i>WIP</i>	<i>WASP interacting protein</i>

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1. Wie entstehen Muskelfasern?	1
1.2. Myoblastenfusion	2
1.2.1. Molekulare Kontrolle der Myoblastenfusion in <i>Drosophila</i>	2
1.2.2. Myogenese in der Maus	4
1.2.2.1. Konservierte Mechanismen kontrollieren die Fusion von Myoblasten in der Maus	5
1.2.2.2. Funktion von RAC1 und CDC42 während der Myoblastenfusion	6
1.3. Rho-GTPasen	6
1.3.1. Regulation der Rho-GTPasen	8
1.4. Adhäsionsmoleküle	9
1.4.1. Integrine	10
1.4.1.1. Struktur und Funktion von Integrinen	10
1.4.1.2. Funktion der Integrine während der Myoblastenfusion	10
1.4.2. <i>Vascular cell adhesion molecule-1</i> (VCAM-1, CD106)	11
1.4.3. <i>Junctional adhesion molecules</i> (JAMs)	12
1.4.4. <i>Melanoma cell adhesion molecule</i> (MCAM, CD146)	12
2. Zielsetzung dieser Arbeit	14
3. Material und Methoden	15
3.1. Material	15
3.1.1. Chemikalien und Enzyme	15
3.1.2. DNA-Oligonukleotide	15
3.1.3. Antikörper	16
3.1.4. Mausstämme und transgene Mauslinien	16
3.2. Methoden	19
3.2.1. Molekularbiologische Methoden	19
3.2.1.1. Isolierung von Desoxyribonukleinsäuren aus embryonalem Gewebe und Biopsien	19
3.2.1.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)	19

3.2.2.	Präparation von Myoblasten und Muskelfasern	22
3.2.2.1.	Myoblasten-Fusions-Assay	22
3.2.2.2.	Isolation einzelner Muskelfasern	22
3.2.2.3.	Isolation von Muskelfasern bei E15.5 Embryonen	23
3.2.3.	Histologische Methoden	24
3.2.3.1.	Herstellung von Gefrierschnitten	24
3.2.3.2.	Immunfärbungen auf Gefrierschnitten und primären Muskelzellkulturen	24
3.2.4.	Dokumentation und Analyse histologischer Daten	25
4.	Ergebnisse	26
4.1.	Aktivierung von <i>Rac1</i> in Myoblasten	26
4.1.1.	Expression von aktiviertem <i>Rac1</i> bewirkt Hyperfusion	26
4.1.2.	Rettung des Fusionsdefizits von <i>Cdc42</i> -mutanten Myoblasten <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	30
4.1.3.	Expression von aktiviertem <i>Rac1</i> führt zur Verbesserung des Fusionsdefizits <i>Integrin β1</i> - und <i>ILK</i> -mutanter Myoblasten	33
4.2.	Adhäsionsmoleküle	36
4.2.1.	<i>Vascular cell adhesion protein-1</i> (VCAM-1) ist nicht essentiell für die Fusion von Myoblasten	37
4.2.2.	<i>Junctional adhesion molecule B</i> (JAM-2) spielt keine wesentliche Rolle bei der Fusion von Myoblasten und bei der Besiedlung der Satellitenzellnische	39
4.2.3.	<i>Melanoma cell adhesion molecule</i> (MCAM) ist für die Myogenese nicht essentiell	40
5.	Diskussion	43
5.1.	RAC1 überträgt Integrin-Signale während der Myoblastenfusion	44
5.1.1.	Die Expression von aktiviertem RAC1 führt zur Hyperfusion	44
5.1.2.	RAC1 wird während der Myoblastenfusion CDC42-abhängig aktiviert	45
5.1.3.	Signalweiterleitung während der Myoblastenfusion	46
5.1.4.	Die Integrin-vermittelte Signalübertragung führt zur Aktivierung von RAC1 während der Myoblastenfusion	48
5.1.5.	Funktion von Aktin während der Myoblastenfusion	49
5.2.	Adhäsionsmoleküle während der Myoblastenfusion	50
5.2.1.	VCAM-1	51

5.2.2. JAM-2	51
5.2.3. MCAM	52
5.2.4. Die Rolle von Adhäsionsmolekülen während der Myoblastenfusion	52
6. Zusammenfassung	54
7. Summary	55
8. Literatur	X
Erklärung	XIX

1. Einleitung

1.1. Wie entstehen Muskelfasern?

Muskelfasern sind multinukleäre, post-mitotische Zellen. Schon seit Anfang des 20. Jahrhunderts wird das Phänomen ihrer Entstehung erforscht, und die normale Muskelentwicklung *in vivo* in verschiedenen Spezies untersucht. So erkannte man die Transition von mononukleären Myoblasten zu multinukleären Myotuben auf histologischen Schnitten. Die einzelnen Phasen dieser Entwicklung konnten allerdings nur unzureichend untersucht werden. Über mehrere Jahrzehnte stand die folgende Frage im Raum: Wie entstehen Muskelfasern?

Im Jahre 1917 erforschten W.H. und M.R. Lewis erstmals die Entwicklung von Muskeln *in vitro*. Sie schlussfolgerten aus ihren Beobachtungen, dass Myotuben durch Abschnürung aus existierenden Myotuben entstehen. Darüber hinaus gab es zwei weitere Hypothesen zur Bildung von Myotuben: (1) der Mechanismus der Amitose¹, bei der es nur zur Kernteilung und nicht zur Zellteilung kommt und (2) der Mechanismus der Mitose, ohne anschließende Zytokinese (Capers, 1960). Der Mangel an geeigneten Untersuchungsmöglichkeiten und unterschiedliche Interpretationen führten zu kontroversen Diskussionen über die Entstehung von multinukleären Myotuben.

Im Jahre 1958 zeigten H. Holtzer und seine Kollegen auf einer Tagung der *American Society of Zoologists* eine weitere Möglichkeit: Fusion mononukleärer Myoblasten zu multinukleären Myotuben. Ihnen gelang es primäre Hühner-Myoblasten *in vitro* zu kultivieren und auch zu fusionieren. Leider fehlten Holtzer und seinen Kollegen die entscheidenden Beweise für ihre Beobachtungen. C. Capers gelang es 1960 mit Zeitraffer-Aufnahmen die Fusion von Myotuben aus primären Kulturen von Hühnerembryonen zu visualisieren (Capers, 1960).

1967 brachten B. Mintz und W. Baker den endgültigen biochemischen Beweis, dass Muskelfasern durch Fusion entstehen (Mintz und Baker, 1967). In einer eleganten Studie verwendeten sie die von Mintz entwickelte Technik der chimären, sogenannten

¹ Direkte Zellteilung. Sie erfolgt unter hantelförmiger Durchschnürung des Zellkerns in der Äquatorialebene und, im Gegensatz zur Mitose, ohne Ausbildung einer Teilungsspindel (Flemming, 1882)

allophenischen Tiere. Während des Furchungsstadiums des Maus-Embryos wurden Blastomere zweier verschiedener Genotypen miteinander aggregiert und in eine Ammenmutter eingesetzt. Die sich daraus entwickelnden Tiere enthielten variierende Anteile an Zellen beider Genotypen. Mintz und ihre Kollegen verwendeten allophenische Tiere, die verschiedene Isozyme der NADP-abhängigen-Isocitrat-Dehydrogenase exprimierten, ein Enzym welches in der Zelle als Dimer vorliegt. Entständen Myotuben durch Teilung, dann besäßen Muskelfasern nur Dimere aus einem der Isozyme. Entständen Muskeln aber durch Fusion, würden beide Isozyme in einer Zelle exprimiert und Dimere, die nur ein Isozym enthalten, aber auch Hybrid-Enzyme aus den zwei verschiedenen Isozymen gebildet. Anhand ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilität könnte man diese unterschiedlichen Dimere auftrennen. Hybride Enzyme besäßen eine mittlere elektrophoretische Mobilität und wären als eigenständige, dritte Fraktion identifizierbar. Mintz und Kollegen konnten Hybridenzyme der Isocitrat-Dehydrogenase in Muskelfasern der chimären Mäuse nachweisen. Sie konnten so biochemisch zeigen, dass Muskelfasern durch Fusion und nicht durch andere Mechanismen, wie z.B. Kernteilung ohne anschließende Zellteilung, entstehen.

1.2. Myoblastenfusion

1.2.1. Molekulare Kontrolle der Myoblastenfusion in *Drosophila*

Zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der Myoblastenfusion haben drei Tiermodelle erheblich beigetragen: *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege), *Mus musculus* (Maus) und *Danio rerio* (Zebrafisch). Die genetische Analyse der Fusion während der Embryonalentwicklung von *Drosophila* brachte dabei besonders detailreiche Erkenntnisse und erlaubte die Identifizierung einer Vielzahl an der Fusion beteiligter Moleküle.

Es existieren während des Lebenszyklus von *Drosophila* zwei Phasen, in denen sich larvale und adulte Muskeln entwickeln: (1) im Embryonalstadium und (2) während der Metamorphose zum holometabolen Insekt. Die Muskeln der *Drosophila*-Larve entwickeln sich innerhalb von 10-12 Stunden. Die 30 Muskeln eines jeden abdominalen Hemisegments unterscheiden sich in ihrer Größe, Form, Lokalisation, Innervierung und dem Befestigungspunkt an der Epidermis (Bate, 1990). In *Drosophila* bestehen Muskeln, im Gegensatz zur Maus, nur aus einer Muskelfaser mit 4-30 Nuclei (Baylies *et al.*, 1998).

Dabei werden die Muskelfasern durch die Fusion zweier unterschiedlicher Zelltypen gebildet, den Founderzellen und den fusionskompetenten Myoblasten (*fusion competent myoblasts*; FCMs). In einem initialen Schritt fusioniert ein fusionskompetenter Myoblast mit einer Founderzelle, gefolgt von mehreren Fusionen weiterer FCMs mit dem resultierenden Synzytium. Die Identität der einzelnen Muskeln wird durch die Founderzelle determiniert und wird zellautonom, durch die Expression bestimmter Identitätsgene, beeinflusst. Im Gegensatz dazu sind fusionskompetente Myoblasten eine homogene Population und exprimieren den Transkriptionsfaktor *Lameduck*, der ihre Spezifizierung und/oder Differenzierung kontrolliert.

Die Erkennung und Adhäsion der beiden fusionierenden Zellen wird durch Moleküle der Immunglobulin-Superfamilie kontrolliert. Founderzellen exprimieren die Ig-Adhäsionsmoleküle *Kirre* und *Roughest*, während FCMs das Ig-Adhäsionsmolekül *Sticks-and-Stones* exprimieren (Bour *et al.*, 2000; Ruiz-Gomez *et al.*, 2000; Strunkelberg *et al.*, 2001). *Rolling Pebbles* fungiert als intrazellulärer Adapter und stabilisiert einerseits die Adhäsion der beiden Myoblasten, andererseits rekrutiert es *Myoblast City* zur Kontaktstelle. *Myoblast City* bildet, zusammen mit dELMO (*engulfment and cell motility protein*), den dimeren GTP-Austauschfaktor (GEF) von Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*). Rac1 selbst wird durch die GTPase Arf6 (*ADP-ribosylation factor 6*) und dem dazugehörigen GEF *Schizo* zur Membran rekrutiert und dort aktiviert (Geisbrecht *et al.*, 2008).

Rac1 kontrolliert in diesem System die Polymerisierung von Aktin. Während der Myoblastenfusion werden dynamische Aktin-Filament-reiche Foci gebildet und wieder aufgelöst (Haralalka *et al.*, 2011; Sens *et al.*, 2010). Rac1 aktiviert den *nucleation promoting factor* (NPF) WAVE, der wiederum den Arp2/3-Komplex aktiviert, welcher für die Polymerisierung von Aktin verantwortlich ist. Ein weiterer, bei der Myoblastenfusion essentieller NPF ist WASp (Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein). Der rasante Umbau des Aktin-Zytoskeletts führt zur Bildung von Fusionsporen, zum Zusammenbruch der Membran und letztendlich zur Fusion der beiden Myoblasten. Genetische Untersuchungen zeigen, dass die kontrollierte Aktin-Polymerisierung während der Fusion essentiell ist. Welche Funktion die Aktin-Polymerisierung übernimmt, blieb aber unklar. Es wurde diskutiert, dass F-Aktin den Transport von Vesikeln kontrolliert, die

Fusogene zur zytoplasmatischen Membran befördern. Eine andere Hypothese besagt, dass F-Aktin die Fusionsporen vergrößert und dadurch Fusion ermöglicht.

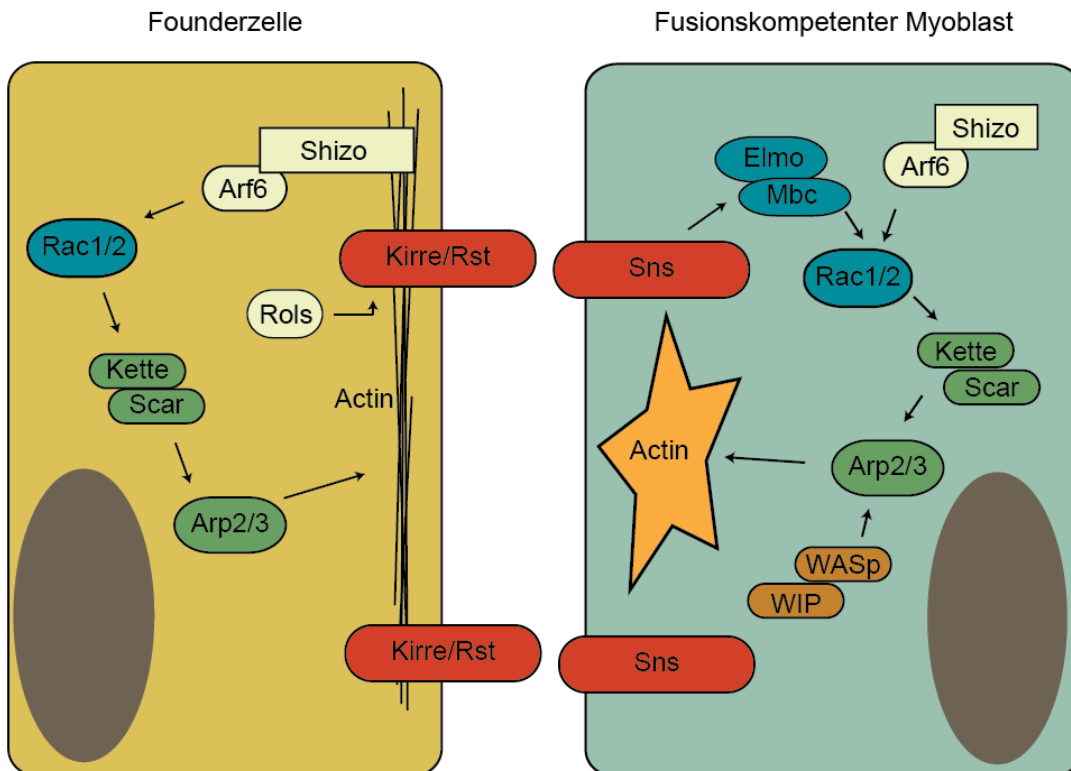


Abbildung 1.1: Proteine und Signalwege bei der Myoblastenfusion in *Drosophila*. Die Adhäsion der Founderzelle und des fusionskompetenten Myoblasten wird über Proteine der Ig-Superfamilie, *Kirre*, *Roughbest* (Rst) und *Sticks-and-Stones* (Sns), realisiert. Der Adapter *Rolling Pebbles* (Rols) verstärkt die Adhäsion und rekrutiert den dimeren GEF *Myoblast City* (Mbc)/ELMO zur Membran. Die GTPase Arf6 und der GEF Shizo bewirken die Lokalisation von Rac1 an der Membran. Dadurch kommt es zur Aktivierung von Rac1, das den NPF-Komplex aus Kette und WAVE bindet und somit aktiviert. Dieser Komplex und ein weiterer NPF, WASp, aktivieren wiederum den Arp2/3-Komplex. Die Wirkung von WASp wird durch das WASp-bindende Protein (WIP) reguliert. Der Arp2/3-Komplex polymerisiert Aktin und es kommt zur Ausbildung von lokalen F-Aktin-reichen Foci. Modifiziert nach Abmayr und Pavlath, 2012.

1.2.2. Myogenese in der Maus

Nach der Analyse der grundlegenden Struktur der Fusion in *Drosophila*, untersuchte man, ob in Vertebraten ähnliche oder sogar gleiche Mechanismen zur Bildung der Muskelfasern führen.

Während der Embryogenese gibt es zwei distinkte Populationen von Myoblasten: embryonale und fetale. Sie unterscheiden sich in Morphologie, der zellulären Antwort auf extrinsische Signale, oder der Expression verschiedener Gene, z.B. *Myosin heavy chain* (Biressi *et al.*, 2007). Außerdem entwickeln sie sich aus verschiedenen, aber verwandten

Vorläuferzellen (Hutcheson *et al.*, 2009). Ab Tag 11 der Embryonalentwicklung (E11) fusionieren embryonale Myoblasten zu primären Myotuben. Sie bestimmen die basale Muskelstruktur. Die sekundäre Myogenese findet zwischen E14.5 und E17.5 statt und wird durch Wachstum und Reifung der Muskelanlagen und Innervierung bestimmt. Fetale Myoblasten fusionieren miteinander oder mit primären Myotuben zu sekundären Myotuben (Duxson *et al.*, 1989). Während in *Drosophila* distinkte Founderzellen und FCMs existieren, wurden in Vertebraten bisher keine analogen Typen von Myoblasten identifiziert (Powell und Wright, 2012).

Alle Muskelvorläuferzellen im Körper von Vertebraten exprimieren den Transkriptionsfaktor *Pax3* (*paired box gene 3*) und entstehen aus dem Dermomyotom. Der mediale Aspekt des Dermomyotoms generiert die epaxiale Muskulatur, während aus dem lateralen Dermomyotom migrierende Muskelvorläuferzellen entstehen (Chevallier *et al.*, 1977; Christ *et al.*, 1977). Sie bilden die Muskulatur der Extremitäten, und exprimieren den Transkriptionsfaktor *Lbx1* (*ladybird homeobox homolog 1*) (Dietrich *et al.*, 1999; Dietrich *et al.*, 1998; Jagla *et al.*, 1995).

1.2.2.1. Konservierte Mechanismen kontrollieren die Fusion von Myoblasten in der Maus

Eine Reihe von Molekülen, die Myoblastenfusion in *Drosophila* kontrollieren, sind auch in Vertebraten essentiell. Ihre Funktion wurde in der Evolution also stark konserviert. So ist *Nephrin*, ein Ortholog von *Sticks-and-Stones*, essentiell für die sekundäre Fusion von Myoblasten und Myotuben (Sohn *et al.*, 2009b). Des Weiteren spielen die GTPase RAC1 und der GTP-Austauschfaktor DOCK1 in beiden Stämmen eine Rolle (Laurin *et al.*, 2008; Vasyutina *et al.*, 2009). Zwei Moleküle, die Aktinpolymerisierung regulieren, N-WASP und ARP2/3, sind ebenfalls essentiell in *Drosophila* und in Vertebraten (Gruenbaum-Cohen *et al.*, 2012; Lahmann, 2012). Der Umbau des Aktin-Zytoskeletts ist demnach ein elementarer und evolutionär konservierter Bestandteil der Myoblastenfusion.

1.2.2.2 Funktion von RAC1 und CDC42 während der Myoblastenfusion

Die Funktion der kleinen GTPase Rac1 bei der Fusion der Myoblasten ist evolutionär konserviert. Auch in Zebrafischen ist Rac1 essentiell für die Fusion von schnellkontrahierenden Muskelfasern (Srinivas *et al.*, 2007). Im Labor von C. Birchmeier konnte gezeigt werden, dass RAC1 während der Fusion von Myoblasten auch in Säugetieren essentiell ist (Vasyutina *et al.*, 2009). Ebenso spielt CDC42, eine weitere kleine GTPase, eine essentielle Rolle bei der Fusion von Myoblasten der Maus. Dies ist eine nicht konservierte Funktion, da Myoblastenfusion unverändert abläuft, wenn dominant-negatives dCdc42 in *Drosophila* exprimiert wird (Luo *et al.*, 1994).

Die Untersuchung aktivierter Mutationen von *Rac1* und *Cdc42* führte zu unterschiedlichen Ergebnissen. So ist die Fusion in aktivierten *Rac1*-Mutanten in *Drosophila* massiv gestört (Luo *et al.*, 1994), während im Zebrafisch die aktivierte Form von Rac1 zur Hyperfusion führt (Srinivas *et al.*, 2007). Die Expression von aktiviertem *dCdc42* in *Drosophila* hat keine Auswirkungen auf die Fusion der Myoblasten und verändert nur die Form der Muskelfasern und ihre Lage innerhalb der Segmente (Luo *et al.*, 1994). In Zebrafisch wurde die Rolle von Cdc42 noch nicht analysiert. Ebenso ist die Auswirkung von aktiviertem RAC1 oder CDC42 auf die Fusion der Myoblasten in der Maus unbekannt.

1.3. Rho-GTPasen

Rho-Proteine sind Mitglieder der Ras-Superfamilie der kleinen GTPasen und den Ras-Proteinen in Größe und Sequenz ähnlich. Die Familie der Rho-GTPasen besteht aus 22 Mitgliedern, die auf Grund ihrer primären Aminosäuresequenz, struktureller Motive und ihrer biologischen Funktion in sechs Gruppen untergliedert werden: Rac1, Cdc42, RhoA, Rnd, RhoBTB und Miro. Rho-GTPasen transduzieren Signale von Zelloberflächen-Rezeptoren zu intrazellulären Signalwegen. Sie regulieren eine Vielzahl zellulärer Vorgänge, wie die Organisation und den Umbau des Aktin-Zytoskeletts, Zelladhäsion, Migration, Zellpolarität, Zellteilung, Membrantransport und Vesikeltransport (Jaffe und Hall, 2005).

Rho-GTPasen funktionieren als molekulare Schalter, die zwischen einer inaktiven, GDP-gebundenen Form und einer aktiven, GTP-gebundenen Form wechseln (Abb. 1.2). Letztere ist üblicherweise mit der Membran verbunden, wo auch Effektoren lokalisiert sind, während die GDP-gebundene Form meist zytoplasmatisch lokalisiert ist.

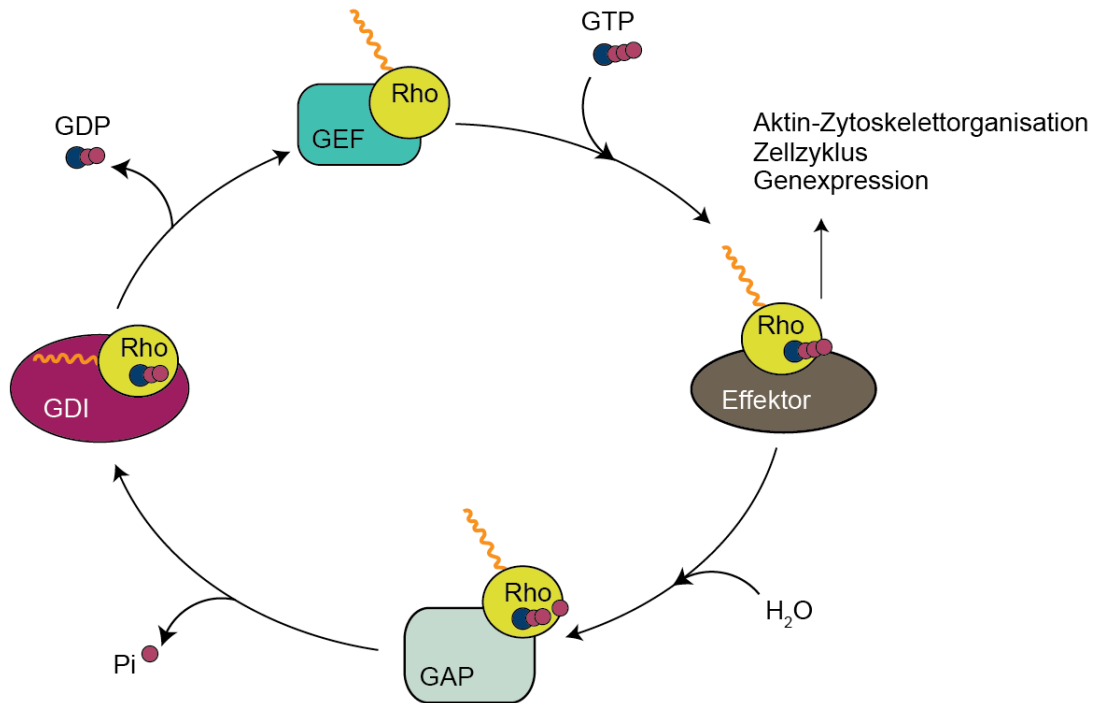


Abbildung 1.2: Rho-GTPase Zyklus. Rho-GTPasen wechseln zwischen einer inaktiven, GDP-gebundenen Form und einer aktiven, GTP-gebundenen Form. GTP-Austauschfaktoren (GEFs) stimulieren den Austausch von GDP zu GTP und erzeugen die aktive Form, die durch Effektoren erkannt wird. Dies führt zu einer Vielzahl zellulärer Antworten, u. a. der Organisation des Aktin-Zytoskeletts, der Veränderung der Genexpression oder der Fortführung des Zellzyklus. GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) stimulieren die intrinsische, hydrolytische Kapazität und beenden somit das Signal. GDP-Dissoziationsinhibitoren (GDIs) inhibieren die Dissoziation des GDP, stabilisieren so den GDP-gebundenen Zustand. GDIs binden die *Switch*-Region und den prenylierten C-Terminus (orange Wellenlinie) und kontrollieren so auch den Wechsel der Rho-GTPasen zwischen Membran und Zytoplasma.

Rho-GTPasen besitzen, wie alle GTP-bindenden Proteine (G-Proteine), die sogenannte G-Domäne (Vetter und Wittinghofer, 2001). Sie ist etwa 20 kD groß und für die Bindung der Nukleotide und deren Hydrolyse verantwortlich. Die Bindung des Nukleotids erfolgt über das hochkonservierte N/TKxD Motiv (Abb. 1.3). Der sogenannte *P-loop* mit der charakteristischen GxxxxGKS/T Sequenz ist für die Bindung des β -Phosphats und Mg^{2+} verantwortlich. Strukturänderungen zwischen der aktiven und inaktiven Form finden sich in den beiden *Switch*-Regionen (Milburn *et al.*, 1990). Die Freisetzung des γ -Phosphats nach der GTP-Hydrolyse führt zur Auflösung einer gespannten Konformation ähnlich der Relaxation einer gespannten Feder (*loaded-spring*

Mechanismus). Neben dem Wechsel zwischen der inaktiven und aktiven Form gibt es einen weiteren Mechanismus, der die Funktion der Rho-Proteine kontrolliert. Am C-terminalen Ende der Rho-GTPasen befindet sich eine hochkonservierte Aminosäuresequenz, die CAAx-Box. Die posttranslationale Prenylierung führt zu einer membranständigen Lokalisation der eigentlich im Zytoplasma vorkommenden Rho-GTPasen (Casey, 1994).

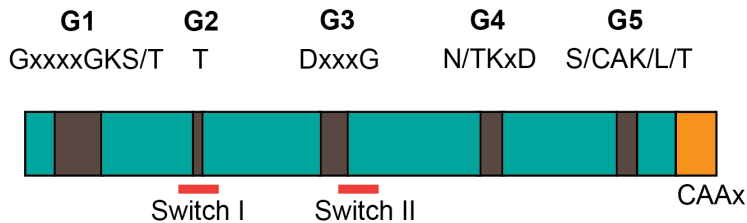


Abbildung 1.3: Funktionelle Domänen der Ras-GTPasen. Schematische Darstellung der Primärstruktur und der 5 Konsensussequenzen (G1-G5; grau) innerhalb der G-Domäne (blau). Außerdem sind die beiden *Switch*-Regionen dargestellt (rot). Am C-terminalen Ende befindet sich das CAAx-Motiv (orange), welches posttranslational modifiziert wird. Durch Prenylierung werden GTPasen zur Membran lokalisiert. Dies stellt einen zweiten Kontrollmechanismus neben dem Wechsel zwischen aktiver und inaktiver Form dar.

Bestimmte Mutationen in den Konsensussequenzen konvertieren Ras-Gene in Onkogene (Bos, 1989). Man nutzte die strukturelle Ähnlichkeit der Ras-Gene und *Rac1* bei der Einführung ähnlicher Mutationen in *Rac1*. Beispielsweise führt die Substitution der Aminosäure Glycin an Position 12, im *P-loop*, zur sterischen Behinderung während der Hydrolyse des GTP (Malumbres und Barbacid, 2003). Dies resultiert in einer aktivierten, GTP-gebundenen Form von RAC1.

1.3.1. Regulation der Rho-GTPasen

Die Aktivierung der Rho-GTPasen erfolgt durch Oberflächenrezeptoren, wie Adhäsionsrezeptoren (Integrine), Cytokine, Tyrosinkinasen oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Kjoller und Hall, 1999; Sah *et al.*, 2000). Die Interkonversion und die Verfügbarkeit der aktiven und inaktiven Form wird durch verschiedene Regulatoren realisiert. GTP-Austauschfaktoren (GEFs) beschleunigen den Austausch von GDP zu GTP und damit die Aktivierung der Rho-GTPasen drastisch (Vetter und Wittinghofer, 2001). Sie setzen die Affinität der GTPase für GDP herab und stabilisieren den sehr instabilen nukleotidfreien Zustand. Rho-GTPasen werden durch zwei nicht miteinander verwandte Familien von GEFs aktiviert, die entweder eine *dibble-homology* (DH)-, gefolgt

von einer *pleckstrin homology* (PH)-Domäne besitzen, oder aber eine *DOCK-homology* Region (DHR) aufweisen (Aghazadeh *et al.*, 1998). GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) beschleunigen die intrinsische hydrolytische Aktivität der GTPasen und inaktivieren diese. Eine dritte Klasse von Regulatoren, die GDP-Dissoziationsinhibitoren (GDIs), wirken ebenfalls inaktivierend auf Rho-GTPasen (DerMardirossian und Bokoch, 2005). Sie inhibieren Rho-GTPasen, indem sie die Dissoziation des GDP verhindern. Eine zweite Möglichkeit ist die Blockade der Hydrolyse des GTP und damit der intrinsischen und GAP-katalysierten GTPase-Aktivität. Dadurch können Effektoren nicht binden. Des Weiteren binden GDIs den prenylierten Rest und behindern dadurch die Insertion der GTPase in die Membran.

1.4. Adhäsionsmoleküle

Die Fusion von Myoblasten erfolgt in mehreren distinkten Teilabschnitten. Nach der Migration der Muskelvorläuferzellen zum Ort ihrer Bestimmung, u. a. in die Extremitäten, adhären sie an andere Myoblasten. Migration und Adhäsion werden in *Drosophila* durch Transmembranproteine der Immunglobulin-Superfamilie vermittelt. Analysen in der Maus, vor allem *in vitro*, offenbarten, dass wesentlich mehr Moleküle bei der Adhäsion von Myoblasten beteiligt sind, als bei der Fusion in *Drosophila*. Die genaue Funktion vieler Adhäsionsmoleküle während der Muskelentwicklung ist bisher unbekannt.

Im perinatalen Stadium spielen Adhäsionsmoleküle eine weitere wichtige Rolle. Ein Teil der Muskelvorläuferzellen wird zu Stammzellen, den sogenannten Satellitenzellen. Diese Zellen exprimieren *Pax7* und *Pax3*, können sich selbst erneuern oder entwickeln sich zu differenzierenden Myoblasten. Sie stellen damit eine Quelle regenerativer Zellen dar. In der späten fetalen Entwicklung bildet sich eine Basallamina um die Muskelfasern (Rosen *et al.*, 1992) und Muskelvorläuferzellen nehmen ihre Satellitenzellposition ein, d. h. sie sind zwischen der Basallamina und der Plasmamembran der Muskelfaser lokalisiert. Adhäsionsmoleküle, die an der Fusion von Myoblasten beteiligt sind, spielen möglicherweise auch bei der Adhäsion zwischen Satellitenzellen und Muskelfaser eine Rolle. Beide Adhäsionsstellen sind durch die Akkumulation von M-Cadherin, Integrinen und PAR3 charakterisiert (Brohl *et al.*, 2012).

1.4.1. Integrine

1.4.1.1. Struktur und Funktion von Integrinen

Integrine sind Adhäsionsmoleküle, die die äußere Umgebung einer Zelle mit dem Zytoskelett verbinden (Legate *et al.*, 2009). Sie binden Liganden der extrazellulären Matrix (ECM) oder Rezeptoren auf benachbarten Zellen, die auch als Counterrezeptoren bezeichnet werden. Integrine geben Signale an das Zellinnere weiter und aktivieren eine Vielzahl an Signaltransduktionswegen.

Integrine sind Transmembranproteine, und besitzen eine große extrazelluläre Domäne und relativ kleine zytoplasmatische Domänen. Integrine agieren als Heterodimere, sie bestehen aus je einer α - und β -Untereinheit, die nicht kovalent miteinander verbunden sind. 18 α - und 8 β -Untereinheiten können zu 24 verschiedenen Varianten kombiniert werden (Humphries *et al.*, 2006; Hynes, 2002). Diese werden Zelltyp-spezifisch exprimiert und haben überlappende Substratspezifitäten. Integrine wechseln zwischen einer geschlossenen Form, die eine geringe Affinität für Liganden besitzt und einer offenen, aktiven Konformation, bei der die Ligandenbindestelle exponiert ist und Liganden mit hoher Affinität gebunden werden (Bridgewater *et al.*, 2012).

Die Bindung von Adapter-Proteinen und somit die Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionswege wird vornehmlich über die β -Untereinheiten realisiert (Legate und Fassler, 2009). Es gibt drei Gruppen von Adapter-Proteinen: (1) Adapter mit vorwiegend strukturellen Funktionen, (2) gerüstbildende Adapter, die Bindungsstellen für weitere Proteine bereitstellen, und (3) katalytische Adapter, wie *focal adhesion kinase* (FAK) oder *Integrin-linked-kinase* (ILK). Die Bindung der Adapter an Integrine ist einer starken Kontrolle unterworfen, z.B. durch Phosphorylierung, Lipidisierung oder der Bindung von Co-Adaptoren.

1.4.1.2. Funktion der Integrine während der Myoblastenfusion

Während der Entwicklung der Muskulatur werden verschiedene Untereinheiten der Integrine innerhalb der Skelettmuskeln exprimiert (Gullberg *et al.*, 1998). Dazu gehören $\beta 1$ und die dazugehörigen α -Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$ und αv . Allerdings

sind die Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$ und αv nicht essentiell für die Muskelentwicklung in der Maus (Bader *et al.*, 1998; Gardner *et al.*, 1996; Georges-Labouesse *et al.*, 1998; Kreidberg *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996). Hingegen bewirkt ein Fehlen der Untereinheiten $\alpha 5$ und $\alpha 7$ Muskeldystrophien bei Mäusen (Mayer *et al.*, 1997; Taverna *et al.*, 1998). Außerdem entwickeln Integrin $\beta 1$ -mutante Mäuse schwere Defizite in der Myoblastenfusion, im Zusammenbau des Zytoskeletts der Muskelfasern und in der Erhaltung der myotendinösen Verbindungen (Czajkowski, 2014; Schwander *et al.*, 2003).

Des Weiteren sind die Integrin-Adapter Talin1 und Talin2 essentiell für die Fusion von Myoblasten in der Maus (Conti *et al.*, 2009). Die beiden Adapter bewirken die direkte Interaktion von Integrinen und Zytoskelett und sind für die korrekte Ausbildung der Sarkomere und der myotendinösen Verbindungen verantwortlich. Allerdings ist die Aktivierung von Integrinen in diesen Doppelmутanten nicht gestört. Zusätzlich ist das Adapter-Protein ILK essentiell für die Myoblastenfusion (Czajkowski, 2014). Es bleibt allerdings weiterhin offen, ob die Adhäsionsfunktion und/oder die signalübertragende Wirkung der Integrine bei der Myoblastenfusion eine Rolle spielt.

1.4.2. *Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1, CD106)*

VCAM-1 ist ein Zell-Zell-Adhäsionsmolekül der Immunglobulin-Superfamilie, das als Counterrezeptor von Integrin $\alpha 4\beta 1$ (*very late antigen-4*, VLA-4) auf Endothelzellen identifiziert wurde (Osborn *et al.*, 1994). Die Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen ist ein essentieller Schritt während der Reifung und Funktion der Immunzellen.

VLA-4 und sein Counterrezeptor VCAM-1 werden aber auch in Skelettmuskeln von sich entwickelnden und adulten Mäusen exprimiert (Rosen *et al.*, 1992). Während der fetalen Entwicklung ist VCAM-1 ab E16.5 in sekundären Myoblasten an den Zell-Zell-Kontakten zu primären Myotuben lokalisiert. Perinatal wird die Expression von VCAM-1 herunterreguliert. In adulten Tieren ist VCAM-1 nur in Satellitenzellen nachweisbar. Antikörper gegen VLA-4 oder VCAM-1 inhibieren die Bildung von Myotuben *in vitro*.

1.4.3. *Junctional adhesion molecules (JAMs)*

Junctional adhesion molecules sind Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie, die vor allem an *Tight Junctions* von Epithel- und Endothelzellen lokalisiert sind (Bazzoni, 2003). Zur Familie der JAM-Proteine gehören fünf Mitglieder, neben JAM-1, JAM-2 und JAM-3, die hohe Sequenzhomologien von 32-38% zeigen, auch die weiter entfernten Proteine JAM4 und JAM-L. JAM-Proteine besitzen zwei extrazelluläre, Ig-ähnliche Domänen, die zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen tragen. Die Funktion dieser Glykosylierung ist noch unbekannt. Daneben können JAM-1, JAM-2 und JAM-3 über die N-terminale Ig-ähnliche Domäne homo- und heterophile Interaktionen eingehen. Die kurze intrazelluläre Domäne enthält PDZ-Bindungsmotive und Phosphorylierungsstellen. Der genaue Mechanismus zur Regulation der JAM-Proteine ist allerdings unbekannt.

Die heterophile Interaktion von JAM-2 und JAM-3 ist bei der Fusion von Muskelzellen in Zebrafisch essentiell (Powell und Wright, 2011). Auch in der Maus ist JAM-3 an der Adhäsionsstelle zwischen Satellitenzellen und Muskelfaser lokalisiert (D. Bröhl, unveröffentlichte Beobachtung).

1.4.4. *Melanoma cell adhesion molecule (MCAM, CD146)*

Das Zell-Adhäsionsmolekül MCAM wurde ursprünglich als Marker für maligne Melanome und Metastasenbildung identifiziert (Lehmann *et al.*, 1989). In gesundem adultem Gewebe wird es primär in vaskulären Endothelzellen und glatter Muskulatur exprimiert (Ouhitit *et al.*, 2009). Es findet sich aber auch in aktivierten T-Zellen, im Knochenmark und in verschiedenen neuronalen Zelltypen.

MCAM ist ein Transmembranmolekül und gehört zur Immunglobulin-Superfamilie (Ouhitit *et al.*, 2009). Es besteht aus fünf charakteristischen Ig-ähnlichen Domänen (V-V-C2-C2-C2). Die Glykosylierung von MCAM führt zu spezifischen Kohlenhydratresten auf verschiedenen Zelltypen. MCAM-Moleküle können miteinander dimerisieren, aber auch heterophil mit anderen Liganden, z.B. Laminin interagieren. Die zytoplasmatische Domäne von MCAM enthält potentielle Erkennungsstellen für Proteinkinasen und vermittelt Signale an das Zellinnere.

Während der frühen Embryonalentwicklung im Huhn wurden MCAM⁺ Myoblasten im dorsalen Bereich der Somiten, dem Myotom nachgewiesen (Pujades *et al.*, 2002). In der Maus wird MCAM von proliferierenden Myoblasten und Endothelzellen exprimiert (Cerletti *et al.*, 2006). Die Inhibition der MCAM-Expression durch RNA-Interferenz in C2C12-Zellen verstärkt die Myoblastenfusion.

Außerdem wird MCAM an der Adhäsionsstelle zwischen Satellitenzellen und Muskelfaser exprimiert und ist bei der korrekten Lokalisation der Satellitenzellen in ihrer Stammzellnische, innerhalb der Basallamina, beteiligt (Brohl *et al.*, 2012).

2. Zielsetzung dieser Arbeit

Integrin-Rezeptoren, RAC1 und CDC42 können in einer Signalkaskade wirken, d. h. aktivierte Integrin-Rezeptoren aktivieren CDC42, und die Aktivierung von CDC42 wird durch RAC1 moduliert. Da Mutationen von *Integrin β 1*, *Rac1* und *Cdc42* zu ähnlichen Fusionsdefiziten führen, liegt die Hypothese nahe, dass diese Moleküle in einer Signalkaskade agieren. So sollten aktivierte Varianten von RAC1 die Fusionsdefizite in *Integrin*- bzw. *Cdc42*-mutanten Myoblasten retten. In meiner Arbeit nutzte ich Methoden der Mausgenetik um diese Hypothese zu testen. Meine Ergebnisse zeigen, dass aktiviertes RAC1 Fusionsdefizite von *Integrin β 1*-, *ILK*- und *Cdc42*-mutanten Myoblasten mildert, und liefern somit genetische Evidenz für die Hypothese, dass die Integrin β 1-abhängige Aktivierung von RAC1 die Fusion von Myoblasten kontrolliert. Zusätzlich versuchte ich, Counterrezeptoren, die Integrine aktivieren, durch genetische Analysen zu identifizieren. Meine Analyse von Mausmodellen zeigt, dass die möglichen Counterrezeptoren JAM-2, MCAM und VCAM-1 keine essentielle Funktionen während der Myoblastenfusion ausüben.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien und Enzyme

Alle Chemikalien, Enzyme, Oligonukleotide oder Antikörper stammten, sofern nicht speziell vermerkt, von folgenden Unternehmen: Ambion (Austin, USA), GE Healthcare (Freiburg), BioTeZ (Berlin), Biozym (Hess. Oldendorf), Dianova (Hamburg), Stratec (Berlin), Invitrogen (Karlsruhe), Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), Eurofins MWG Operon (Ebersberg), New England Biolabs (Frankfurt), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (München), Thermo Scientific (Waltham, USA).

3.1.2. DNA-Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten und in Tabelle 1 aufgeführten DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg bezogen.

Tabelle 1: verwendete DNA-Oligonukleotide

Name	Sequenz 5' - 3'	Zweck
MG1	GTC [*] TTGAGTTACATCTCTGG	Genotypisierung <i>Rac1</i> ^{flux/flux}
MG2	CTGACGCCAACAAC [*] TATGC	
MR6	TCTGCCATCTACACATACAC	Genotypisierung <i>Cdc42</i> ^{flux/flux}
MR7	ATGTAGTGTCTGTCCAT [*] TGG	
ItgB1_fw	GGGTTGCCCTTCCCTCTAG	Genotypisierung <i>ItgB1</i> ^{flux/flux}
ItgB1_rv	GTGAAGTAGGTGAAAGGTAAC	
ILK_Ex1	GTC [*] TTGCAAACCCGTCTCTGCG	Genotypisierung <i>ILK</i> ^{flux/flux}
ILK_INT1	CCCT [*] TCACATCCCATACCAACTC	
Pax3Cre_wt_F	AGCACCTTTGCCAGTAGCC	Genotypisierung <i>Pax3</i> ^{Cre}
Pax3Cre_mut_R	AATCGCGAACATCTTCAGGT	

RacDAfl mt rv	TCG CCT TCT TGA CGA GTT CT	Genotypisierung <i>Rac1^{D.A/D.A}</i>
RacDAfl wt fw	AAG GGA GCT GCA GTG GAG TA	
RacDAfl wt rv	CCG AAA ATC TGT GGG AAG TC	
LbxCre_type_5'up	CGCCTTCCTCTCGCACCGTC	Genotypisierung <i>Lbx1^{Cre}</i>
LbxCre_type_5'low	GGCAGCCCGGACCGAC	
VCAM fl fw	GGG ACG GAT TTT CTT TCC AC	Genotypisierung <i>VCAM-1^{flax/flax}</i>
VCAM fl rv	GAC TTT GAA GCC CAT TGC AC	
Jam2KO_fw	AGACCGTGCTGAGATGATAGA	Genotypisierung <i>Jam2^{-/-}</i>
Jam2KO_rev	CCGAAGGAAGTGTCTAGTAAT	
TF0440-1	CGGGATGCACGGGTGG	Genotypisierung <i>MCAM^{+/+}</i>
TF0440-2	GGGAGTTGGGGATGTCTTCG	
TF0440-3'	CCTTGCGTCTGCCACATACCACC	Genotypisierung <i>MCAM^{-/-}</i>
Neo3a	GCAGCGCATCGCCTTCTATC	

3.1.3 Antikörper

Die nachfolgenden Antikörper wurden von der ausgewiesenen Quelle bezogen und in der Immunhistologie angewandt: Kaninchen-anti-MyoD von Santa Cruz Biotechnology (1:200) und Ziege-anti-Desmin von R&D Systems (1:500).

Die verwendeten sekundären Antikörper waren Alexa-Fluor 555 Esel-anti-Kaninchen (1:500) und Alexa-Fluor 647 Esel-anti-Ziege (1:500) von Invitrogen. Zur Markierung der DNA wurde DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) von Sigma verwendet.

3.1.4. Mausstämme und transgene Mauslinien

Wildtyp-Mäuse

C57Bl/6J-Inzucht und CD1-Auszucht Mauslinien stammten aus eigener Zucht bzw. wurden von Charles River (Sulzfeld) bezogen.

***Rac1*^{flox/flox}-Mäuse**

von Cord Brakebusch, Universität Kopenhagen, Dänemark

Durch homologe Rekombination in R1-embryonalen Stammzellen (129/Sv) wurde Exon 3 deletiert. Dieses kodiert die Aminosäuren 37 bis 75, die einen Teil der Effektor-Domäne und die komplette Switch II-Domäne der Rho-GTPase bilden (Chrostek *et al.*, 2006).

***Cdc42*^{flox/flox}-Mäuse**

von Cord Brakebusch, Universität Kopenhagen, Dänemark

Der Zielvektor für die homologe Rekombination in ES-Zellen enthielt das Startcodon-enthaltende Exon 2 und als doppelten Selektionsmarker eine Neomycin-Thymidin-Kinase (Neo-TK)-Kassette flankiert von loxP Sequenzen. Durch Cre-vermittelte Rekombination kommt es zur Deletion von Exon 2 (Wu *et al.*, 2006).

***ItgB1*^{flox/flox}-Mäuse**

von Reinhard Fässler, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried

Durch Cre-vermittelte Rekombination wird in diesen Mäusen ein Großteil des *ItgB1*-Gens deletiert und stattdessen das Reporterallel *lacZ* exprimiert (Potocnik *et al.*, 2000).

***ILK*^{flox/flox}-Mäuse**

von Reinhard Fässler, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried

In diesen Mäusen wurde das zweite Exon von den Erkennungsstellen der Cre-Rekombinase (loxP-Stellen) flankiert. Durch Cre-vermittelte Rekombination wird Exon 2, welches das Startcodon ATG enthält, deletiert (Grashoff *et al.*, 2003).

***Rac1*^{DA/DA}-Mäuse**

von Klaus Rajewsky, MDC, Berlin

Durch homologe Rekombination in ES-Zellen wurde eine gefloxt Stoppkassette in den *Gt(ROSA)26Sor*-Locus (Soriano, 1999) eingebracht, gefolgt von einem aktivierten *Rac1G12V* Allel, einer FRT-flankierten IRES-eGFP-Kassette und einer bovinen Polyadenylierungs-Sequenz. Durch Cre-vermittelte Rekombination wird die Stoppkassette deletiert und *Rac1G12V* und *eGFP* ubiquitär exprimiert (Srinivasan *et al.*, 2009).

***Lbx1^{Cre}*-Mäuse**

von Carmen Birchmeier, MDC, Berlin

Durch homologe Rekombination in ES-Zellen wurde die kodierende Sequenz von *Lbx1* durch eine Cre cDNA ersetzt (Sieber *et al.*, 2007).

***Pax3^{Cre}*-Mäuse**

von Jonathan A. Epstein, Universität von Pennsylvania, Philadelphia

In dieser Knockin-Mauslinie ersetzte die kodierende Sequenz der Cre-Rekombinase das erste Exon, einschließlich des Startcodons ATG von *Pax3* (Engleka *et al.*, 2005).

***VCAM-1^{flox/flox}*-Mäuse**

von Richard A Flavell, Yale School of Medicine, New Haven, Connecticut

Durch Cre-vermittelte Rekombination wird in diesen Mäusen die Promotorregion und das erste Exon von *VCAM-1* deletiert (Koni *et al.*, 2001).

***MCAM^{-/-}*-Mäuse**

von Taconic, Hudson, New York

In diesen Knockout-Mäusen wird die Expression von *MCAM* durch die Deletion der ersten drei Exone verhindert (Taconic, TF0440).

***Jam2^{-/-}*-Mäuse**

von Ralf H. Adams, Max-Planck-Institut für molekulare Biomedizin, Münster

Durch homologe Rekombination in ES-Zellen wurde das fünfte Exon durch loxP-Stellen flankiert und eine Polyadenylierungssequenz p(A) sowie eine von FRT-Stellen umgebene Neomycin Kassetten eingefügt. Bei der Cre-vermittelten Rekombination kommt es zur Deletion des fünften Exons (Arcangeli *et al.*, 2011).

3.2. Methoden

3.2.1. Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1. Isolierung von Desoxyribonukleinsäuren aus embryonalem Gewebe und Biopsien

Die Isolierung genomischer DNA aus embryonalem Gewebe und Biopsien für PCR-Analysen erfolgte aus Gewebestücken frisch präparierter Embryonen und Ohrloch- oder Schwanzbiopsien von Mäusen. Die Gewebestücke wurden für 2 Stunden in 30 µl Ohr-/Schwanz-Lyse-Puffer (100 mM Tris pH 8,5, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,2 % SDS, 100 µg/ml Proteinase K) bei 55°C verdaut. Darauf erfolgte die Inaktivierung der Proteinase K für 10 min bei 95°C. Nach Zugabe von 300 µl H₂O wurde je 1 µl dieser verdünnten Lösung für die Genotypisierung in einer PCR-Reaktion eingesetzt.

3.2.1.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wurde zur Genotypisierung von präparierten Mausembryonen bzw. Jungtieren eingesetzt. Die Etablierung der verwendeten PCR-Programme erfolgte dabei in Anlehnung an Standard-PCR-Methoden (Innis, 1989). Verwendet wurde die Taq-Polymerase von Invitrogen und die GoTaq®-Polymerase von Promega mit den entsprechenden Puffern gemäß Herstellerangaben. Nachfolgend sind die verwendeten Genotypisierungs-PCR-Programme inklusive der MgCl₂-Konzentrationen und, bei Verwendung, die Konzentration von DMSO und β-Mercaptoethanol angegeben. Die DNA-Primer können Tabelle 1 entnommen werden. Sie wurden in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt.

PCR für die Stämme *Rac1^{flox/flox}*, *Cdc42^{flox/flox}*, *Lbx1^{Cre}*, *Pax3^{Cre}*, *Jam2^{-/-}*

- a) MgCl₂-Konzentration: 1,5 mM
- b) DMSO: 3,5%
- c) β-Mercaptoethanol: 0,09%

- d) Programm: 94°C 4 min
 94°C 30 s
 55°C 30 s
 72°C 1 min
 72°C 4 min
 12°C
- } 40x

e) Produktlängen:

	Mutantes Allel	Wildtyp-Allel
<i>Cdc42^{lox/lox}</i>	400 bp	320 bp
<i>Lbx1^{Cre}</i>	432 bp	-
<i>Pax3^{Cre}</i>	433 bp	-
<i>Jam2^{-/-}</i>	345 bp	450 bp

PCR für den Stamm *ItgB1^{lox/lox}*

- a) MgCl₂-Konzentration: 1,5 mM
 b) DMSO: 3,5%
 c) β-Mercaptoethanol: 0,09%
 d) Programm: 94°C 4 min
 94°C 30 s
 60°C 30 s
 72°C 1 min
 72°C 4 min
 12°C
- } 35x
- e) Produktlänge: Mutantes Allel: 340 bp
 Wildtyp-Allel: 290 bp

PCR für den Stamm *ILK^{lox/lox}*

- a) MgCl₂-Konzentration: 1,5 mM
 b) Programm: 95°C 5 min
 95°C 30 s
 68°C 30 s
 72°C 30 s
 95°C 30 s
 60°C 30 s
 72°C 30 s
 12°C
- } 8x
- } 40x

PCR für den Stamm *Rac1*^{DA/DA}

- a) MgCl₂-Konzentration: 1,5 mM
- b) Programm: 94°C 3 min
 94°C 30 s } 35x
 63°C 30 s
 72°C 30 min
 72°C 2 min
 12°C
- c) Produktlänge: Mutantes Allel: 421 bp
 Wildtyp-Allel: 297 bp

PCR für den Stamm *VCAM-1*^{flox/flox}

- a) MgCl₂-Konzentration: 1,5 mM
- b) Programm: 94°C 3 min
 94°C 30 s } 35x
 60°C 1 min
 72°C 1 min
 72°C 2 min
 12°C
- c) Produktlänge: Mutantes Allel: 226 bp
 Wildtyp-Allel: 162 bp

PCR für die Stämme *MCAM*^{-/-} und *MCAM*^{+/+}

- a) MgCl₂-Konzentration: 1,5 mM
- b) Programm: 94°C 4 min
 94°C 15 s } 10x, -1°C/Zyklus
 65°C 30 s
 72°C 30 s
 94°C 15 s } 30x
 55°C 30 s
 72°C 30 s
 12°C
- c) Produktlänge: Mutantes Allel: 398 bp
 Wildtyp-Allel: 365 bp

3.2.2. Präparation von Myoblasten und Muskelfasern

3.2.2.1. Myoblasten-Fusions-Assay

Präparierte E14.5 Embryonen wurden in 1x PBS gespült. Die vorderen und hinteren Extremitäten wurden mit einer Pinzette vom Torso getrennt und mit einem Skalpell grob zerkleinert. Die Extremitäten wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in 200 µl HBSS (+Mg²⁺ und Ca²⁺) mit 1:40 NB4G Kollagenase (6mg/ml; Serva) für zweimal 20 Minuten bei 37°C kräftig geschüttelt. Dazwischen wurden das Gewebe 3-4x pipettiert und so weiter zerkleinert. Danach wurden zum Stoppen der Kollagenase-Reaktion 500 µl Medium (DMEM 4,5g/l Glucose, 10% FBS, 1% Gentamycin) hinzugefügt und die Lösung durch einen 20 µm-Filter (Partec) gegeben. Nachdem die Zellsuspension zentrifugiert (2000 rpm, 5 Minuten) wurde, wurde das Pellet in 200 µl Medium resuspendiert und in zwei Vertiefungen einer 12-well-Mikrotiterplatte gegeben, die mit 40 µg/ml Poly-L-Lysin oder 10% Matrigel™ (BD Biosciences) behandelten Deckgläsern ausgelegt waren. Die isolierten Zellen wurden über Nacht in Wachstumsmedium kultiviert. Dann wurden sie für 72 h in Differenzierungsmedium (DMEM 4,5g/l Glucose, 5% FBS, 1% Gentamycin) differenziert und danach für 10 Minuten in 4% PFA fixiert und dreimal für 10 Minuten in 1x PBS gewaschen. Die so fixierten Kulturen konnten für zwei Wochen bei 4°C gelagert werden.

3.2.2.2. Isolation einzelner Muskelfasern

Die Isolation einzelner Muskelfasern erfolgte bei Embryonen (E15.5 – E18.5) aus dem *M. brachioradialis* und *M. extensor carpi radialis*. Nach Entfernung der Haut wurden die Vorderextremitäten vom Rumpf getrennt und mit Präparationsnadeln (Fine Science Tools) auf einer Silikonplatte (Petrischale ausgekleidet mit Sylgard 184, Dow Corning) fixiert. Durch Entfernen der restlichen Muskeln wurden der *M. brachioradialis* und *M. extensor carpi radialis* freigelegt. Die zur Hand hinreichenden Sehnen wurden durchtrennt, wobei die zwei Muskeln weiterhin am Humerus verankert waren. Der Humerus wurde links und rechts des Muskels durchtrennt und die Muskeln in Isolationsmedium (DMEM GlutaMAX-I, 2% GlutaMAX-I, 1% Penicillin/Streptomycin) mit 1:20 NB4G Kollagenase (6 mg/ml; Serva) 2-3 Stunden bei 37°C inkubiert. Dabei wurde das 2 ml Reaktionsgefäß alle 20 Minuten invertiert. Danach wurden die Muskeln in mit 5% BSA

beschichteten 35 mm-Petrischalen vereinzelt, indem sie mit Glaspipetten mit unterschiedlich großer Lochöffnung (ebenfalls mit 5% BSA beschichtet) pipettiert wurden bis einzelne Muskelfasern austraten. Diese einzelnen Muskelfasern wurden mit einer 200 µl Pipette in eine mit Medium gefüllte 35 mm-Petrischale überführt, mit 4% PFA für 10 Minuten fixiert und danach dreimal mit PBT (1x PBS, 0,025% Tween20) gewaschen. Danach wurden die Kerne mit DAPI (1 µg/ml in 1x PBX (1x PBS, 0,5% Triton-X100)) markiert und mit 1x PBX dreimal 10 Minuten bei RT gewaschen. Die Überführung der einzelnen Fasern auf Adhäsions-Objektträger (Histobond, Marienfeld) erfolgte mit einer 20 µl Pipette. Nach Entfernen des überschüssigen 1x PBX wurden die Muskelfasern mit 20-30 µl Eindeckmedium (Vectashield, H-1000, Vector Laboratories) eingedeckelt und das Deckgläschen an den Ecken mit Nagellack fixiert.

Bei postnatalen Tieren konnten einzelne Muskelfasern aus dem *M. extensor digitorum longus* (EDL) isoliert werden. Dies ermöglichte eine sauberere Präparation. Zuerst wurden Haut und Epimysium der hinteren Extremitäten entfernt. Danach wurden die Sehnen des *M. tibialis anterior* (TA) und des EDL an Fuß und Knie durchtrennt und die beiden Muskeln vorsichtig getrennt. Der EDL-Muskel wurde in Isolationsmedium mit 0,2% Kollagenase (von *Clostridium histolyticum*, Typ I, Sigma) verdaut. Die nachfolgende Vereinzelnung, Fixierung und Färbung der Muskelfasern entsprach dem Protokoll für pränatale Tiere.

3.2.2.3. Isolation von Muskelfasern bei E15.5 Embryonen

Für die Isolation pränataler Muskelfasern fusionsdefizienter Mutanten wurde eine andere Isolationsmethode angewandt. Sie waren für die in 3.2.2.2. beschriebene Isolation zu kurz und instabil.

Für die Präparation wurden die oberen Extremitäten von E15.5 Embryonen verwendet. Nach Entfernung der Haut wurden die Extremitäten auf einer Silikonplatte in 1x PBS fixiert und das Epimysium um die Muskeln beseitigt. Außerdem wurde vorsichtig überschüssiges Fett- und Bindegewebe entfernt. Die Muskeln wurden in 1 ml Isolationsmedium (DMEM 4,5g/l Glucose, 25 mM HEPES, 1% Gentamycin) mit 1:20 NB4G Kollagenase eine Stunde bei 37°C bei 100 rpm vorsichtig geschüttelt. Danach wurde das Medium mit den gelösten Zellen und Muskelfasern in eine Vertiefung einer 12-well-Mikrotiterplatte, die mit 40 µg/ml Poly-L-Lysin oder 10% Matrigel (BD Biosciences) behandelten Deckgläschen ausgelegt war, überführt und mit Medium

aufgefüllt. Die Zellen adhärten über Nacht an das Deckgläschen und wurden mit 4% PFA 20 Minuten bei 4°C fixiert. Danach wurden sie dreimal für je 10 Minuten mit 1x PBS gewaschen. Die so behandelten Kulturen konnten zwei Wochen bei 4°C gelagert werden.

3.2.3. Histologische Methoden

3.2.3.1. Herstellung von Gefrierschnitten

Zur Durchführung von immunhistologischen Färbungen wurden Gefrierschnitte angefertigt. Präparierte Embryonen wurden in PBS gespült und anschließend für 2,5 Stunden in Zamboni-Lösung (2% PFA und 15% Pikrinsäure in 100 mM Na₃PO₄) fixiert. Das Gewebe der juvenilen Tiere (P23) wurde ohne Fixierung weiterverarbeitet. Das Einfrieren erfolgte in *Tissue-Tek* (OCT-Compound, Sakura) in einer Einbettform (*Peel-A-Way*, Thermo Scientific) auf einer Alkohol/Trockeneis-Mischung. Abhängig von Gewebeart und Embryonalstadium wurden Schnitte im Kryostaten (Microm HM560, Walldorf) bei einer Blocktemperatur zwischen -10°C und -20°C angefertigt. Die Schnittstärke lag bei 10-14 µm. Die Schnitte wurden auf Adhäsions-Objektträger (Histobond, Marienfeld) aufgezogen, bei 37°C getrocknet und dann feuchtigkeitsgeschützt eingefroren. Wie die gefrorenen Präparate konnten auch die Schnitte über mehrere Wochen bei -80°C aufbewahrt werden.

3.2.3.2. Immunfärbungen auf Gefrierschnitten und primären Muskelzellkulturen

Gefrierschnitte und Muskelzellkulturen wurden in Blockierungslösung (10% Pferdeserum, 0,5% TSA-Blockierungsreagenz (*Tyramide Signal Amplification* (TSA)-Kit, Perkin Elmer, 0,1% TritonX-100) für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) blockiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in Antikörperlösung (3% Pferdeserum, 0,3% BSA, 0,05% TritonX-100) für zwei Stunden bei RT. Hierauf wurden die Schnitte dreimal für je 10 min mit 1x PBX gewaschen und dann für eine Stunde mit dem sekundären Antikörper in Antikörperlösung bei RT inkubiert. Die Schnitte wurden mit *Immu-Mount* (Thermo Scientific) eingedeckelt.

Der immunhistologische Nachweis von Pax7 auf Muskelgewebe erforderte eine Vorbehandlung, sogenanntes *antigen retrieval*. Dazu wurden die Gefrierschnitte drei Stunden bei 37°C getrocknet um eine bessere Haftung der Schnitte zu ermöglichen. Danach wurden sie in *Antigen Unmasking-Lösung* (H-3300, Vector Laboratories) 30 Minuten bei 80°C vorbehandelt. Nach dreimaligem kurzem Waschen in 1x PBS wurde unfixiertes Gewebe in Zamboni-Lösung postfixiert und erneut in 1x PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte in Blockierungslösung für eine Stunde bei RT blockiert. Die Inkubation mit Erstantikörper erfolgte in Antikörperlösung über Nacht bei 4°C. Hierauf wurden die Schnitte dreimal für je 10 min mit 1x PBX gewaschen und dann für 1 h mit dem sekundären Antikörper in Antikörperlösung bei RT inkubiert. Danach wurden die Schnitte mit *Immu-Mount* eingedeckelt.

3.2.4. Dokumentation und Analyse histologischer Daten

Histologische Daten wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte an einem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 700 auf einem Axio Observer Z1 Mikroskop, Zeiss) mit der Zen-Software (Zeiss). Die Berechnung der Standardabweichungen und Standardfehler erfolgte mit der Software Microsoft Excel und GraphPad Prism. Unterschiede wurden als statistisch signifikant betrachtet, wenn $p < 0,05$ (*), $p < 0,005$ (**) bzw. $p < 0,0001$ (***) betrug.

4. Ergebnisse

4.1. Aktivierung von *Rac1* in Myoblasten

Rac1 übernimmt wichtige Funktionen in der Fusion von Myoblasten in der Maus (Vasyutina *et al.*, 2009). Die Mutation von *Rac1* bewirkt starke Fusionsdefizite, d. h. Muskelvorläuferzellen differenzieren zu Myoblasten, aber ihre Fähigkeit, Synzytien zu bilden, ist stark eingeschränkt. Im ersten Teil meiner Arbeit untersuchte ich mit Hilfe genetischer Experimente die Effekte konstitutiver Aktivierung von *Rac1* auf die Myoblastenfusion. Dazu verwendete ich einen Mausstamm, der in der Arbeitsgruppe von K. Rajewsky konstruiert worden war (Srinivasan *et al.*, 2009). Diese Mäuse tragen ein aktiviertes *Rac1*-Gen, *Rac1G12V*, und den Fluoreszenzmarker *eGFP* im *ROSA26*-Locus. Durch Cre-vermittelte Rekombination wird eine Stoppkassette entfernt, welche die Translation von *Rac1G12V* und *eGFP* unterbindet. Ich bezeichne diesen Mausstamm kurz als *Rac1DA*. Zur Expression des aktivierten *Rac1* und des Markers *eGFP* setzte ich *Lbx1^{Cre}* ein (Sieber *et al.*, 2007). *Lbx1^{Cre}* wird spezifisch in wandernden Muskelvorläuferzellen exprimiert. Diese Zellen wandern z.B. in die Anlage der Extremitäten ein und bilden dort Muskelfasern. In anderen Muskelvorläuferzellen, z.B. in Zellen, welche die Rückenmuskulatur bilden, wird *Lbx1* nicht exprimiert.

4.1.1. Expression von aktiviertem *Rac1* bewirkt Hyperfusion

Tiere, die aktiviertes *Rac1* exprimierten, zeigten keine offensichtlichen Phänotypen. Die Mäuse erreichten eine normale Größe und waren fertil. Ich isolierte Muskelvorläuferzellen aus diesen Mäusen und untersuchte ihre Fusion in Zellkultur. Dazu wurden Zellen aus Vorder- und Hinterextremitäten isoliert und unter Fusionsbedingungen, d. h. in 5% Serum für 72 h inkubiert. Muskelzellen wurden durch Immunfärbung identifiziert, wofür ich eine Kombination von Antikörpern gegen Desmin und MyoD einsetzte. Desmin ist ein Intermediärfilament, das in Myoblasten und in Myotuben exprimiert wird, während der Transkriptionsfaktor MyoD Myoblasten markiert. Danach quantifizierte ich den Fusionsindex, d. h. die Prozentzahl der Kerne, die in multinukleären Myotuben lokalisiert waren. Wildtyp-Zellen, wie auch Myoblasten, die aktiviertes *Rac1* exprimierten, fusionierten zu mehrkernigen Myotuben (Abb. 4.1A-

D). Demnach interferierte die Expression des aktivierten *Rac1* nicht mit der Fusion von Myoblasten, und die meisten Myotuben erreichten ihre typische Form. Sie waren schmal, elongiert und die Nuclei waren in einer Reihe angeordnet. Der Fusionsindex betrug für die Kontrolle $65,3\% \pm 1,7\%$ (Abb. 4.1E). Interessanterweise fusionierten Myoblasten, die aktiviertes *Rac1* exprimierten, effizienter, und der Fusionsindex war mit $75,9\% \pm 3,1\%$ signifikant erhöht. Die vermehrte Fusion führte zu 7% mehr Myotuben mit 3 bis 15 Nuclei (Abb. 4.1F). Die Anzahl der Myotuben mit mehr als 15 Nuclei stieg auf das Dreifache ($11,4\% \pm 6,4\%$). Myoblasten fusionierten vereinzelt sogar zu riesigen Myotuben, die bis zu 130 Kerne enthielten. Solch große Myotuben beobachtete ich in Wildtyp-Kulturen nie. Die Morphologie der Riesenmyotuben war untypisch. Sie waren sehr flach und ihre Kerne unregelmäßig verteilt (Abb. 4.1D). Demnach erhöhte die Expression von aktiviertem *Rac1* besonders die Zahl der Myotuben, die viele Kerne enthielten.

In einem nächsten *in vitro*-Experiment testete ich den Effekt von *Rac1DA* in einem *Rac1*-defizienten Hintergrund (Abb. 4.1G, H). Myoblasten aus *Rac1*-defizienten Embryonen zeigten klare Fusionsdefizite und nur 17,1% der Kerne befanden sich in multinukleären Zellen (Abb. 4.1I). Über 90% der Zellen blieben mono- beziehungsweise binukleär, und nur $5,9\% \pm 2,7\%$ der Muskelzellen enthielten drei bis sechs Nuclei (Abb. 4.1J). Durch die zusätzliche Expression von aktiviertem *Rac1* wurde das Fusionsdefizit reduziert. Der Fusionsindex stieg signifikant und erreichte einen Wert von $41,4\% \pm 1,8\%$. Vor allem der Prozentsatz von Myotuben mit 3 bis 15 Nuclei erhöhte sich, während die Anzahl der binukleären Zellen konstant blieb.

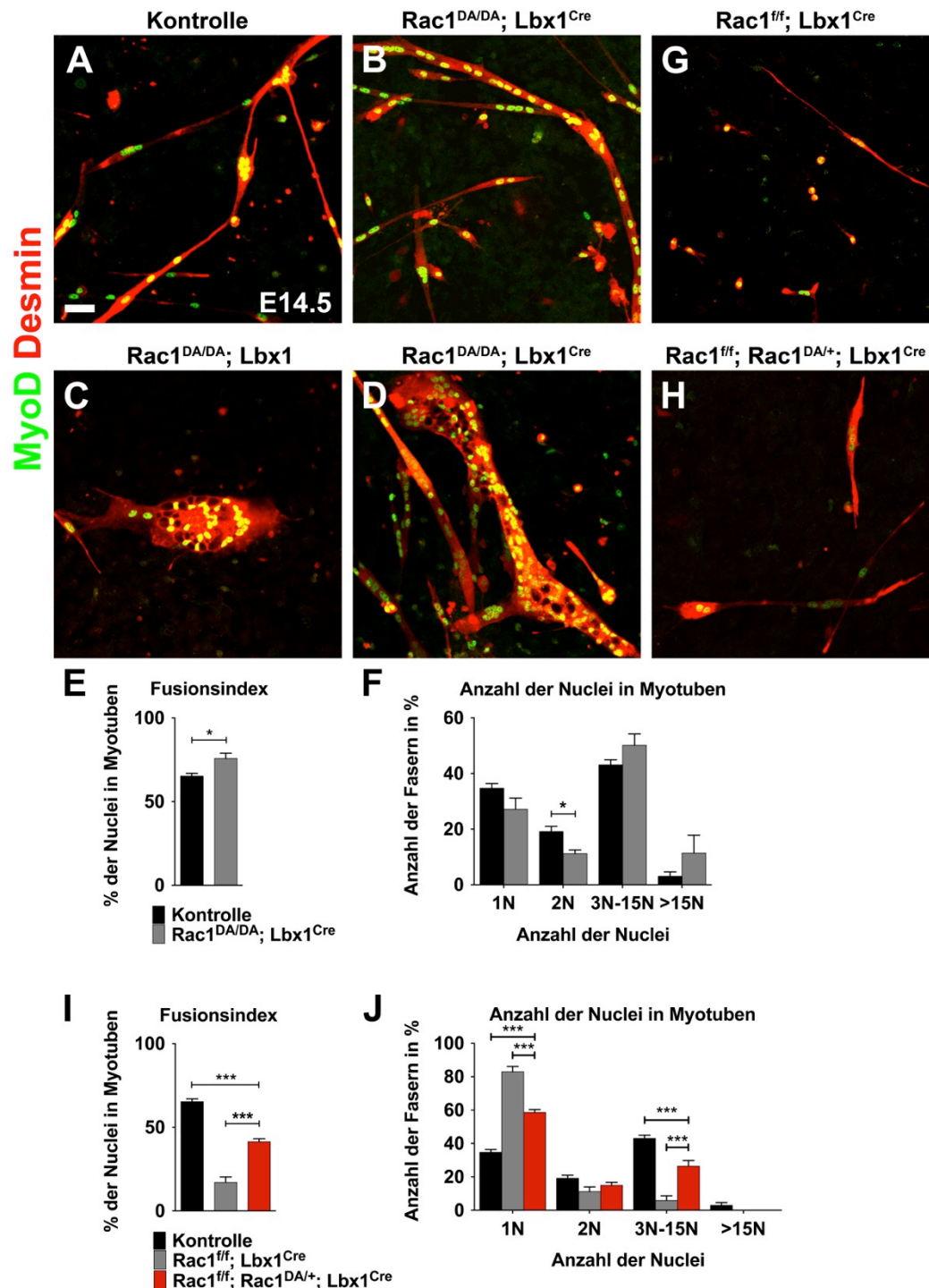


Abbildung 4.1: Expression von aktiviertem *Rac1* führte zur Hyperfusion und zur Reduzierung des Fusionsdefizits *Rac1*-defizienter Myoblasten *in vitro*. Immunhistologische Analyse des Fusionsexperimentes zeigt die Expression von MyoD (grün) und Desmin (rot). Myoblasten der Kontrolle (A) und der *Rac1^{DA/DA}*-Embryonen (B-D) fusionierten zu multinukleären Myotuben. *Rac1*-defiziente Myoblasten (G) blieben größtenteils mononukleär. Durch Expression von aktiviertem *Rac1* fusionierten *Rac1*-defiziente Myoblasten wieder zu längeren Myotuben (H). Quantifizierung der Fusionsindizes (E, I) und der Anzahl der Nuclei in mono- und multinukleären Zellen (F, J). Maßstab (A-D, G, H): 100 μ m.

Im nächsten Experiment untersuchte ich die Konsequenzen der Aktivierung von *Rac1* auf die Fusion von Myoblasten *in vivo*. Histologische Untersuchungen zeigten keine offensichtlichen Veränderungen der Muskulatur nach Expression von aktiviertem *Rac1*, z.B. in Embryonen am Tag E15.5 (Abb. 4.2). Im Vergleich zur Kontrolle waren die Muskelgruppen der *Rac1DA*-Embryonen unverändert in Größe, Form und Lage (Abb. 4.2A, A', B, B'). Ich bestimmte die Anzahl der Kerne in Muskelfasern, die ich aus dem *M. extensor digitorum longus* (EDL) von Kontroll- und *Rac1DA*-Mäusen am 21. postnatalen Tag (P21) isolierte. Muskelfasern von Kontrolltieren enthielten durchschnittlich 184 ± 9 Nuclei, während die Muskelfasern aus *Rac1DA*-Tieren 232 ± 6 Nuclei enthielten (Abb. 4.2C). Muskelfasern der Tiere, die aktiviertes *Rac1* exprimierten, enthielten auch *in vivo* signifikant mehr Kerne.

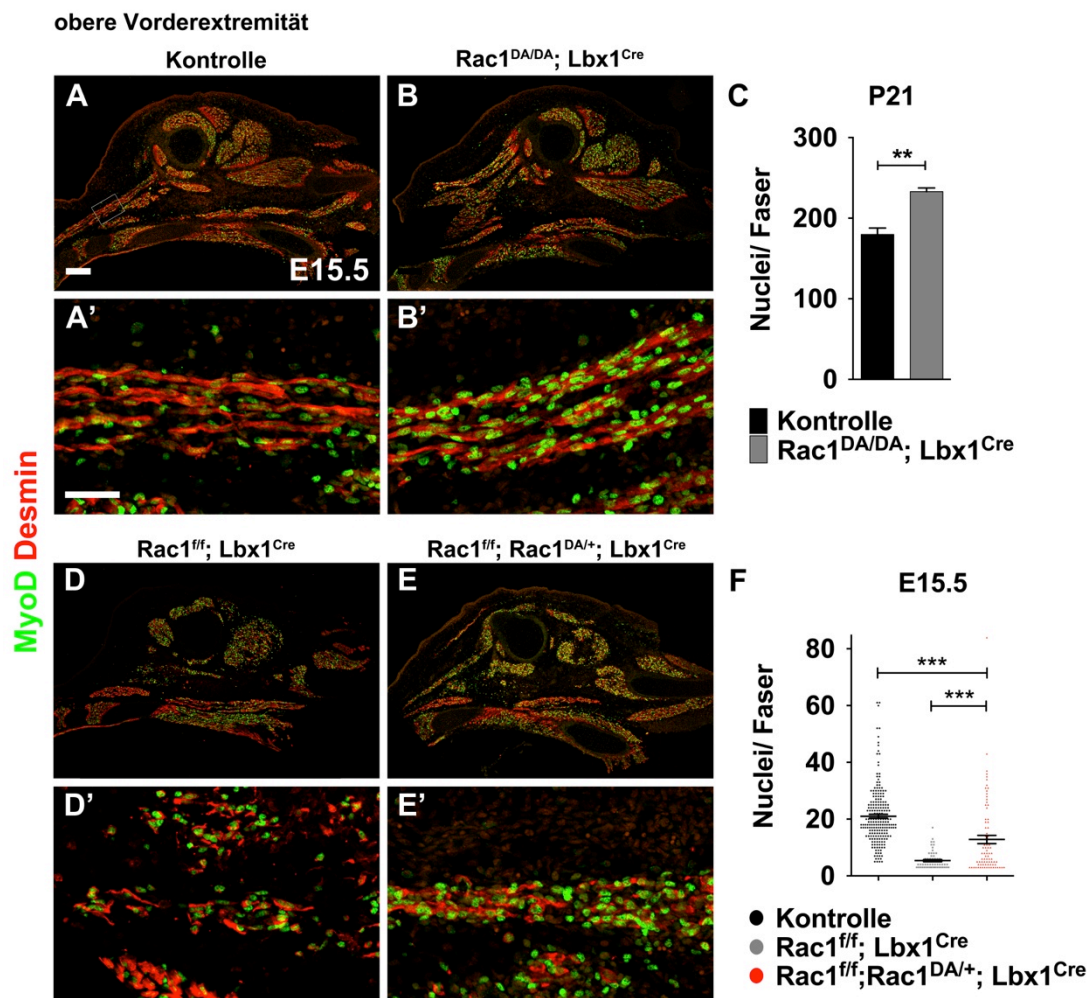


Abbildung 4.2: Expression von aktiviertem *Rac1* bewirkt erhöhte Fusion und Reduktion des Fusionsdefizits *Rac1*-defizienter Myoblasten *in vivo*. Immunhistologie von Transversalschnitten der oberen Vorderextremität von E15.5 Kontroll- (A, A'), *Rac1DA*- (B, B'), *Rac1*-defizienten- (D, D') und *Rac1^{-/-}; Rac1^{DA/+}; Lbx1^{Cre}* Tieren (E, E'). Die Muskeln wurden mit Antikörpern gegen MyoD (grün) und Desmin (rot) gefärbt. Quantifizierung der Muskelfaserlänge in Nuclei pro Faser für *Rac1DA* im Vergleich

zur Kontrolle bei P21 (C) und der *Rac1^{flf}; Rac1^{DA/+}; Lbx1^{Cre}* Tiere im Vergleich zur *Rac1*-defizienten Mutante und der Kontrolle bei E15.5 (F). Maßstab (A, B, D, E): 400 μm , (A', B', D', E'): 50 μm .

Weiterhin untersuchte ich, ob ich *in vivo* die Fusionsdefizite der *Rac1*-Mutanten durch Expression eines aktivierten *Rac1*-Allels verbessern könnte. Ein immunhistologischer Vergleich von *Rac1^{flf}; Rac1^{DA/+}; Lbx1^{Cre}* und *Rac1^{flf}; Lbx1^{Cre}* Tieren zeigte keine offensichtliche Veränderung des Fusionsdefizits (Abb. 4.2D, E, D', E'). Die einzelnen Muskelgruppen waren als solche in Tieren beider Genotypen zu erkennen. Die Muskelfasern waren allerdings sehr ungeordnet und kurz.

In einem weiteren Experiment isolierte ich einzelnen Muskelfasern aus Vorderextremitäten von E15.5 Mäusen. Die Muskelfasern der *Rac1^{flf}; Rac1^{DA/+}; Lbx1^{Cre}*-Tiere enthielten durchschnittlich $12,8 \pm 1,4$ Nuclei und damit eine signifikant höhere Anzahl von Kernen als die Muskelfasern der *Rac1* Mutante mit $5,4 \pm 0,4$ Nuclei (Abb. 4.2F). Die Größe der Fasern aus Kontrolltieren, die durchschnittlich $21 \pm 0,7$ Nuclei enthielten, wurde allerdings nicht erreicht.

4.1.2. Rettung des Fusionsdefizits von *Cdc42*-mutanten Myoblasten *in vitro* und *in vivo*

Rho-GTPasen können sich gegenseitig aktivieren. Zum Beispiel aktiviert CDC42 in Fibroblasten RAC1 und dies bewirkt die Ausbildung von Stressfasern und Lamellipodien (Nobes und Hall, 1995). Da ein Verlust der beiden GTPasen, CDC42 und RAC1, zu ähnlichen Fusionsdefiziten führt, untersuchte ich eine mögliche epistatische Interaktion von RAC1 und CDC42. Falls CDC42 auch in Myoblasten RAC1 aktiviert, sollte aktiviertes *Rac1* das Fusionsdefizit von *Cdc42*-Mutanten retten. Im nächsten Experiment untersuchte ich deshalb die Auswirkung der Expression von aktiviertem *Rac1* in einem *Cdc42*-defizienten Hintergrund.

Zuerst analysierte ich die Fusionsindices *in vitro* (Abb. 4.3D). Myoblasten der *Cdc42*-defizienten Tiere fusionierten zu $32,6\% \pm 1,4\%$ zu multinukleären Myotuben, während der Fusionsindex der Wildtyp-Myoblasten mit $65,3\% \pm 1,7\%$ doppelt so hoch war. Diese *Cdc42*-defizienten Myoblasten wiesen demnach, wie beschrieben, ein Fusionsdefizit auf (Vasyutina *et al.*, 2009). Durch die Expression von aktiviertem *Rac1* im *Cdc42*-defizienten Hintergrund stieg der Fusionsindex an und betrug $62,5\% \pm 1,7\%$. Auch in der

Faserlänge spiegelte sich dieser Effekt wider. Im Vergleich zu Wildtyp-Myoblasten blieben 20% mehr *Cdc42*-defiziente Myoblasten mononukleär (Abb. 4.3E). Die Zahl der binukleären Myotuben war ähnlich in beiden Genotypen, aber die Zahl der Myotuben mit 3-15 Kernen war in *Cdc42*-mutanten Kulturen kleiner. Durch die Expression von aktiviertem *Rac1* im *Cdc42*-defizienten Hintergrund fusionierten wieder mehr mononukleäre Myoblasten zu 3-15-kernigen Myotuben. Hingegen traten Myotuben mit mehr als 15 Kernen nur selten auf. Myotuben, die aktiviertes *Rac1* im *Cdc42*-defizienten Hintergrund exprimierten, waren morphologisch nicht von Wildtyp-Myotuben zu unterscheiden (Abb. 4.3A-C).

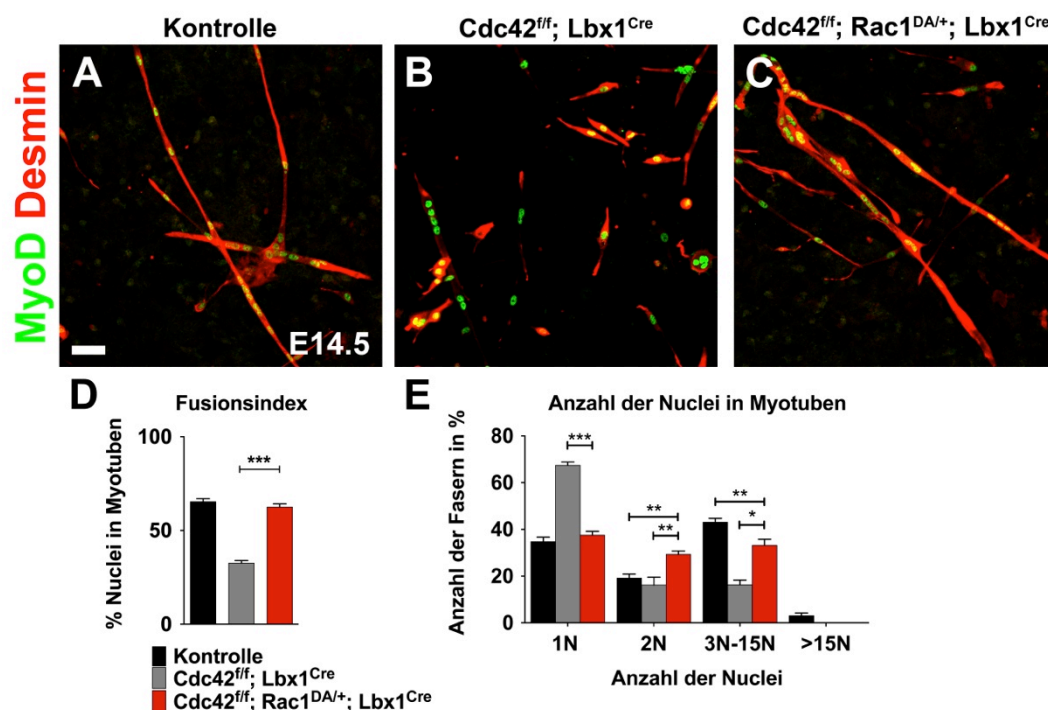


Abbildung 4.3: Expression von aktiviertem *Rac1* führt zur Minimierung des Fusionsdefizits *Cdc42*-defizienter Myoblasten *in vitro*. Immunhistologische Analyse des Fusionsexperimentes zeigt die Expression von MyoD (grün) und Desmin (rot). Myoblasten der Kontrolle (A) fusionierten zu multinukleären Myotuben. *Cdc42*-defiziente Myoblasten (B) hatten ein Fusionsdefizit. Durch die Expression von aktiviertem *Rac1* im *Cdc42*-defizienten Hintergrund (C) fusionierten mehr Myoblasten wieder zu längeren Myotuben. Quantifizierung der Fusionsindizes (D) und der Anzahl der Kerne in mono- und multinukleären Zellen (E). Maßstab (A-C): 100 µm.

Die *in vitro* beobachtete Rettung des Fusionsdefizits der *Cdc42*-defizienten Tiere durch die Expression von aktiviertem *Rac1* war *in vivo* nicht offensichtlich erkennbar. Dies wurde in den immunhistologischen Untersuchungen der oberen Vorderextremität von E15.5 Embryonen deutlich (Abb. 4.4A-C, A'-C'). Die Muskelfasern wurden mit Antikörpern gegen MyoD und Desmin identifiziert. In der *Cdc42*-Mutante waren zwar

alle Muskelgruppen vorhanden und in der richtigen Position, die Muskelfaser aber kürzer und dünner als in der Kontrolle. Die Expression von aktiviertem *Rac1* im *Cdc42*-defizienten Hintergrund führte *in vivo* nicht zu einer deutlichen Verlängerung der Muskelfasern. Um auch kleine, durch die Histologie nicht erkennbare Unterschiede in der Faserlänge zu erfassen, isolierte ich Muskelfasern der Vorderextremität aus Embryonen am Tag E15.5 (Abb. 4.4D). Die Anzahl der Nuclei in den isolierten Wildtyp-Muskelfasern betrug $21 \pm 0,7$. Aus *Cdc42*-Mutanten konnte ich Fasern mit durchschnittlich nur $3,9 \pm 0,3$ Kernen isolieren. In Embryonen, die zusätzlich aktiviertes *Rac1* exprimierten, enthielten die Fasern mit $8,4 \pm 0,6$ Nuclei signifikant mehr Kerne als die *Cdc42*-defizienten Fasern.

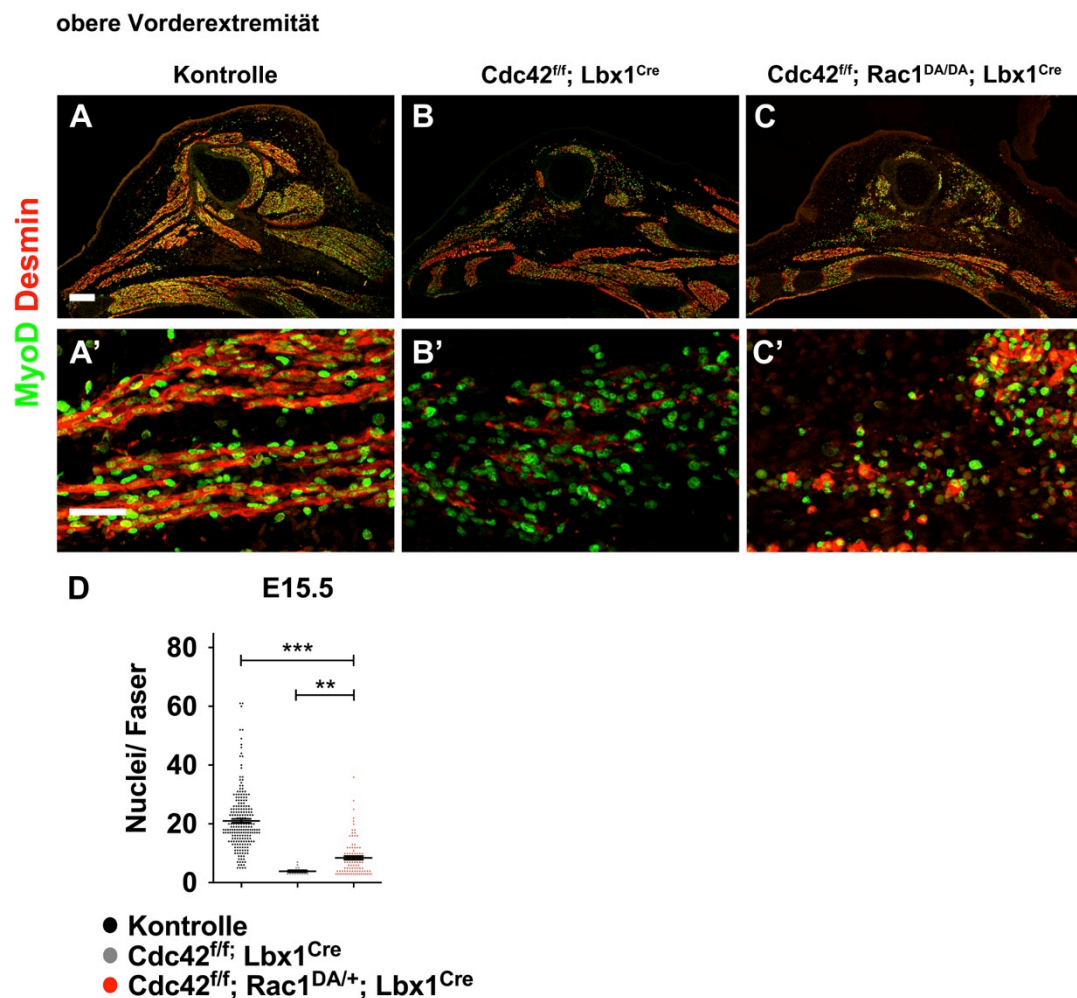


Abbildung 4.4: Expression von aktiviertem *Rac1* bewirkt Minimierung des Fusionsdefizits *Cdc42*-defizienter Myoblasten *in vivo*. Immunhistologie von Schnitten der oberen Vorderextremität von E15.5 Kontroll- (A, A'), *Cdc42*-defizienten- (B, B') und *Cdc42^{ff}; Rac1^{DA/+}; Lbx1^{Cre}*-Tieren (C, C'). Die Muskeln wurden mit Antikörpern gegen MyoD (grün) und Desmin (rot) gefärbt. (D) Quantifizierung der Muskelfaserlänge in Nuclei pro Faser *in vivo* für die *Cdc42^{ff}; Rac1^{DA/+}; Lbx1^{Cre}*-Tiere im Vergleich zur *Cdc42*-defizienten Mutante und der Kontrolle bei E15.5. Maßstab (A-C): 400 μm , (A'-C'): 50 μm .

4.1.3. Expression von aktiviertem *Rac1* führt zur Verbesserung des Fusionsdefizits *Integrin $\beta 1$* - und *ILK*-mutanter Myoblasten

Integrine sind in der Lage, allein oder in Verbindung mit anderen Rezeptoren, RHO, RAC1 und CDC42 zu aktivieren (Choma *et al.*, 2004; DeMali *et al.*, 1999; Etienne-Manneville und Hall, 2001; Kjoller und Hall, 1999; Price *et al.*, 1998; Ren *et al.*, 1999; Russell *et al.*, 2003). Außerdem zeigten die *Integrin $\beta 1$* - und *ILK*-Mutanten Fusionsdefizite, die denen der *Rac1*- und *Cdc42*-Mutanten ähneln (Czajkowski, 2014; Schwander *et al.*, 2003; Vasyutina *et al.*, 2009).

Daher untersuchte ich, ob Integrin $\beta 1$ und ILK epistatisch mit RAC1 interagieren. Ich exprimierte aktiviertes *Rac1* in einem *Integrin $\beta 1$* - beziehungsweise *ILK*-defizienten Hintergrund. Zuerst analysierte ich die Fusionskapazität von Myoblasten *in vitro*. Ich isolierte Myoblasten aus den vorderen und hinteren Extremitäten der Mäuse und kultivierte sie 72 h in Differenzierungsmedium. Die Myotuben wurden immunhistologisch mit Antikörpern gegen MyoD und Desmin markiert und die Fusionsindices bestimmt (Abb. 4.5).

Nur 6% der *Integrin $\beta 1$* -defizienten Myoblasten fusionierten zu Myotuben mit drei oder mehr Kernen (Abb. 4.5E). Hingegen fusionierten 42% der *Integrin $\beta 1$* -defizienten Myoblasten, die zusätzlich aktiviertes *Rac1* exprimierten, zu Myotuben. Sie fusionierten ähnlich effizient wie die Wildtyp-Myoblasten. Dies drückte sich auch in einem höheren Fusionsindex aus. Er stieg von $18,9\% \pm 1,7\%$ auf $53,6\% \pm 2,6\%$ (Abb. 4.5D). Demzufolge beseitigte die Expression von aktiviertem *Rac1* das Fusionsdefizit der *Integrin $\beta 1$* -Mutante *in vitro*.

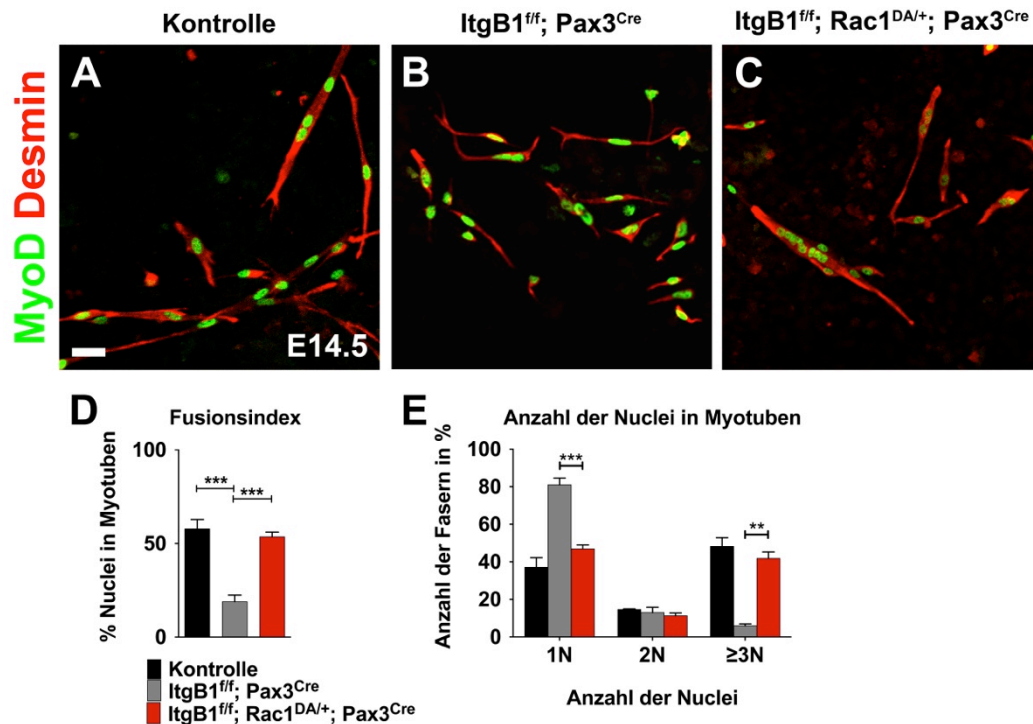


Abbildung 4.5: Expression von aktiviertem *Rac1* führte zur Reduzierung des Fusionsdefizits der *Integrin β1*-mutanten Myoblasten *in vitro*. Immunhistologische Analyse des Fusionsexperimentes zeigt die Expression von MyoD (grün) und Desmin (rot). Myoblasten der Kontrolle (A) fusionierten zu multinukleären Myotuben. *Integrin β1*-defiziente Myoblasten (B) hatten ein Fusionsdefizit. Durch die Expression von *Rac1* im *Integrin β1*-defizienten Hintergrund (C) fusionierten wieder mehr Myoblasten zu längeren Myotuben. Quantifizierung der Fusionsindices (D) und der Anzahl der Kerne in mono- und multinukleären Zellen (E). Maßstab (A-C): 100 μ m.

In der Histologie der oberen Vorderextremität von E15.5 Tieren war die *in vitro* beobachtete Verbesserung des Fusionsdefizits der *Integrin β1*-Mutanten durch die zusätzliche Expression von *Rac1DA* weniger deutlich auszumachen. Die Muskelfasern wurden mit Antikörpern gegen MyoD und Desmin gefärbt (Abb. 4.6A-C, A²-C²). Muskelfasern der geretteten Mutanten waren länger und enthielten mehr Nuclei als Muskelfasern der Mutanten. Im Vergleich zur Kontrolle war die Lage und Form der einzelnen Muskelgruppen in Tieren mit aktiviertem *Rac1* unverändert. Die Muskelfasern waren jedoch weiterhin deutlich kürzer. Zur Quantifizierung des reduzierten Fusionsdefizits *in vivo* isolierte ich Muskelfasern aus den Vorderextremitäten von E15.5 alten Embryonen. Muskelfasern wurden durch Immunfärbung mit anti-MyoD und anti-Desmin Antikörpern identifiziert und die Anzahl der Kerne pro Faser ermittelt. Wildtyp-Muskelfasern enthielten im Durchschnitt $22 \pm 0,8$ Kerne. *Integrin β1*-defiziente Myoblasten fusionierten im Durchschnitt zu Fasern mit $4,2 \pm 0,2$ Kernen (Abb. 4.6D).

Durch die Expression des aktivierten *Rac1* im *Integrin $\beta 1$* -defizienten Hintergrund stieg die Anzahl der Kerne signifikant auf $9 \pm 0,7$. Dieser Wert lag allerdings weiterhin unter dem des Wildtyps.

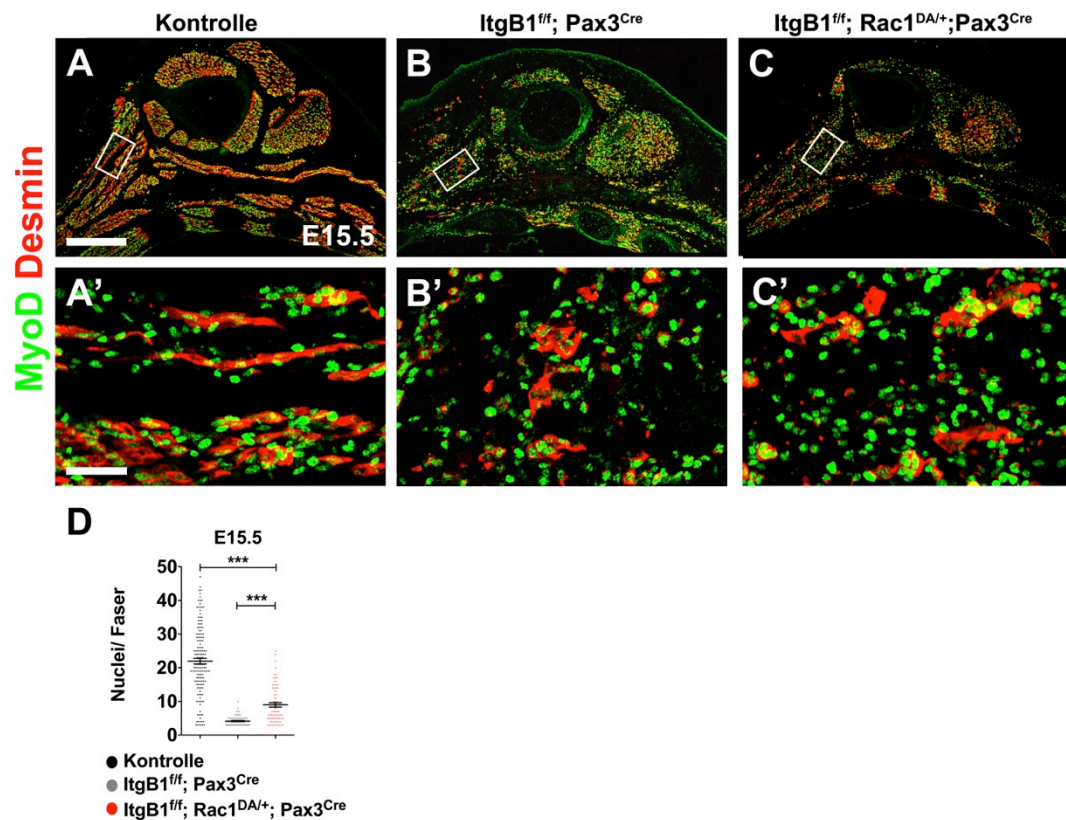


Abbildung 4.6: Expression von aktiviertem *Rac1* führt zur Reduktion des Fusionsdefizits der *Integrin $\beta 1$* -mutanten Myoblasten *in vivo*. Immunhistologie von Schnitten der oberen Vorderextremität von E15.5 Kontroll- (A, A'), *Integrin $\beta 1$* -defizienten- (B, B') und *Integrin $\beta 1^{fl/fl}$; Rac1^{DA/+}; Pax3^{Cre}* Tieren (C, C'). Die Färbung der Muskeln erfolgte mit Antikörpern gegen MyoD (grün) und Desmin (rot). (D) Quantifizierung der Muskelfaserlänge in Nuclei pro Faser *in vivo* für *Integrin $\beta 1^{fl/fl}$; Rac1^{DA/+}; Pax3^{Cre}* Tiere im Vergleich zu den *Integrin $\beta 1$* -defizienten Mutanten und den Kontrolltieren bei E15.5. Maßstab (A-C): 400 μm , (A'-C'): 50 μm .

ILK-mutante Myoblasten zeigten nur ein geringes Fusionsdefizit von 10% im Vergleich zu Kontroll-Myoblasten *in vitro* (Czajkowski, 2014). Eine mögliche Verbesserung des Fusionsdefizits *in vitro* wäre ebenfalls nur marginal, daher konzentrierte ich mich auf die Untersuchung der Fusion der Myoblasten *in vivo*.

Die Expression des aktivierten *Rac1* erhöhte ebenfalls die Anzahl der Nuclei in den Muskelfasern der *ILK* Mutanten (Abb. 4.7D). So enthielten Myotuben von *Integrin $\beta 1^{fl/fl}$* ;

$Rac1^{DA/+}; Pax3^{Cre}$ Tieren durchschnittlich $10,9 \pm 1,3$ Kerne, während die *ILK*-mutanten Myoblasten $4,1 \pm 0,2$ Nuclei aufwiesen.

Die Expression von aktiviertem *Rac1* minimiert demnach das Fusionsdefizit der *Integrin* $\beta 1$ - und *ILK*-mutanten Myoblasten *in vitro* und *in vivo*.

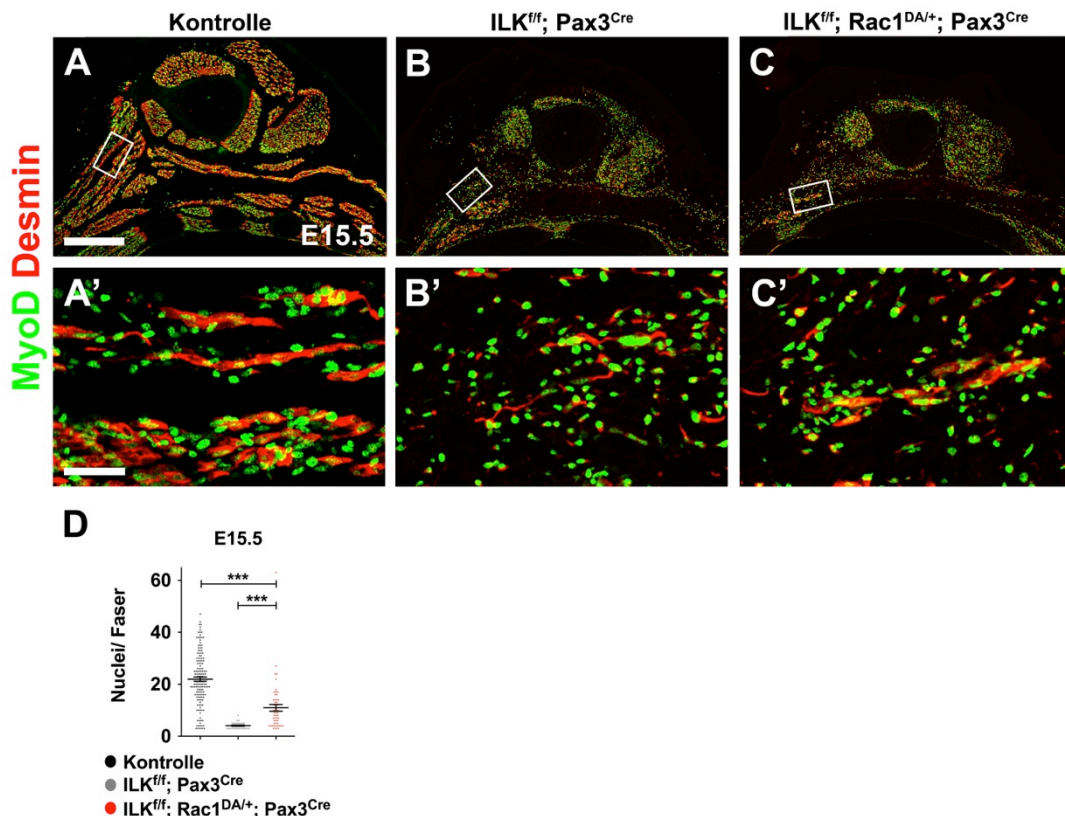


Abbildung 4.7: Expression von aktiviertem *Rac1* führt zur Reduktion des Fusionsdefizits der *ILK*-mutanten Myoblasten *in vivo*. Immunhistologie von Schnitten der oberen Vorderextremität von E15.5 Kontroll- (A, A'), *ILK*-defizienten- (B, B') und *ILK*^{ff}; *Rac1*^{DA/+}; *Pax3*^{Cre} Tieren (C, C'). Die Muskeln wurden mit Antikörpern gegen MyoD (grün) und Desmin (rot) identifiziert. Quantifizierung der Muskelfaserlänge in Nuclei pro Faser *in vivo* für die Tiere, die aktiviertes *Rac1* exprimieren im Vergleich zu den *ILK*-defizienten Mutanten und den Kontrolltieren bei E15.5. Maßstab (A-C): 400 μm , (A'-C'): 50 μm .

4.2. Adhäsionsmoleküle

Integrin-Rezeptoren werden aktiviert, indem sie an Matrixmoleküle oder an Counterrezeptoren auf anderen Zellen binden. Außerdem wird *Integrin* $\beta 1$ nur in einer der beiden fusionierenden Zellen exprimiert (Czajkowski, 2014). Daher ist anzunehmen, dass ein Counterrezeptor existiert, der während der Myoblastenfusion mit Integrin $\beta 1$

interagiert und es so zur Adhäsion der beiden Myoblasten kommt. Mögliche Counterrezeptoren, die während der Myogenese exprimiert werden, sind VCAM-1, MCAM und Mitglieder der JAM-Familie. JAM-Rezeptoren sind von besonderem Interesse für die Myogenese, da sie im Zebrafisch für Fusion essentiell sind. In meiner Arbeit analysierte ich deshalb die Rolle der Adhäsionsmoleküle *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1), *junctional adhesion molecule B* (JAM-2) und *melanoma cell adhesion molecule* (MCAM) bei der Fusion von Myoblasten.

4.2.1. *Vascular cell adhesion protein-1* (VCAM-1) ist nicht essentiell für die Fusion von Myoblasten

Mit Hilfe genetischer Experimente untersuchte ich die Funktion von VCAM-1 während der Myogenese. Dazu verwendete ich konditionelle *VCAM-1*-Tiere. Durch die Rekombination mit *Pax3^{Cre}* wurde *VCAM-1* in allen Muskelvorläuferzellen deletiert. *VCAM-1^{fl/fl}; Pax3^{Cre}*-Mäuse sind lebensfähig und unterscheiden sich in ihrer Morphologie nicht von Kontrolltieren.

Zuerst quantifizierte ich die Anzahl der Nuclei pro Muskelfaser *in vivo*. Dazu isolierte ich einzelne Muskelfasern aus dem *M. brachioradialis* und *M. extensor carpi radialis* (E17.5) beziehungsweise aus dem *M. extensor digitorum longus* (EDL) von P23-Tieren und färbte die Nuclei mit DAPI. Die Muskelfasern der Kontrolltiere enthielten in der späten fetalen Entwicklung $43,5 \pm 2,6$ Nuclei (Abb. 4.8A). Die Muskelfasern der *VCAM-1*-defizienten Tiere waren mit $41,9 \pm 2,6$ Kernen gleich lang. Auch im juvenilen Stadium (P23) enthielten die Fasern der *VCAM-1*-Mutanten die gleiche Anzahl Kerne wie Muskelfasern der Kontrolltiere (Abb. 4.8C). Folglich führte der Verlust von *VCAM-1* nicht zu einer Verminderung der Fusion der Myoblasten.

In einem zweiten Experiment untersuchte ich, ob VCAM-1 eine Rolle bei der Adhäsion zwischen Satellitenzellen und Muskelfasern spielt. Dazu analysierte ich die Anzahl Pax7⁺ Satellitenzellen und ihre Lage innerhalb der Basallamina beziehungsweise im Interstitium der Rückenmuskulatur von E17.5 und P23 alten Tieren (Abb. 4.8B, D). Die Satellitenzellen wurden mit Antikörper gegen Pax7 und die Muskelfasern mit Antikörper gegen Laminin, einem Bestandteil der extrazellulären Matrix, identifiziert. Im späten Fetalstadium (E17.5) befanden sich $18,6 \pm 1,5$ Satellitenzellen innerhalb der Basallamina,

während sich mit $8,3 \pm 0,3$ 30% aller Pax7⁺ Zellen im Interstitium befanden und damit nicht die Satellitenzellnische besiedelt hatten. Die Zahl der Pax7⁺ Zellen innerhalb der Basallamina und im interstitiellen Raum war in *VCAM-1*-defizienten Mäusen unverändert. Im juvenilen Alter nahm die Zahl der Satellitenzellen pro 100 Fasern ab. Sie halbierte sich auf 12 ± 2 Pax7⁺ Zellen/100 Muskelfasern. Die Rückenmuskeln der *VCAM-1*-Mutante enthielten eine vergleichbare Zahl Pax7⁺ Zellen/100 Muskelfasern. Somit zeigte die Deletion von *VCAM-1* keine Auswirkungen auf die Fähigkeit der Satellitenzellen an die Muskelfasern zu adhären und den Stammzellpool aufrechtzuerhalten.

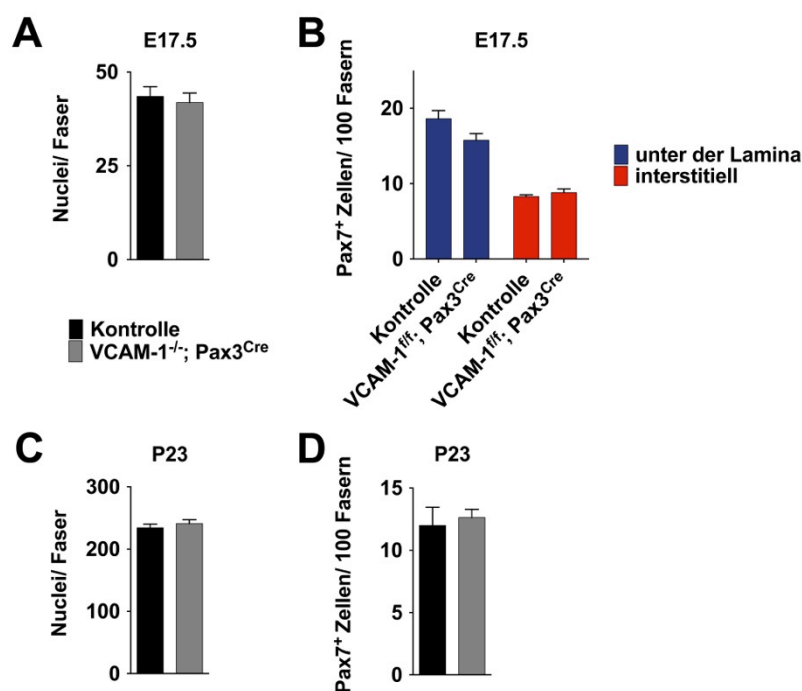


Abbildung 4.8: VCAM-1 ist weder bei der Adhäsion von fusionierenden Myoblasten, noch bei der Adhäsion von Satellitenzellen und Muskelfasern essentiell. Quantifizierung der Nuclei in einzelnen Muskelfasern des *M. brachioradialis* und *M. extensor carpi radialis* bei E17.5 (A) und des EDL bei P23 (C) in Kontrolltieren und in *VCAM-1*-defizienten Tieren. Quantifizierung der Pax7⁺ Zellen/100 Muskelfasern innerhalb der Lamina und interstitiell der Rückenmuskeln bei E17.5 (B) und gesamt bei P23 (D) in Kontrolltieren und in *VCAM-1*-defizienten Tieren.

4.2.2. *Junctional adhesion molecule B (JAM-2)* spielt keine wesentliche Rolle bei der Fusion von Myoblasten und bei der Besiedlung der Satellitenzellnische

Die heterologe Interaktion zwischen den Zelloberflächenrezeptoren JAM-2 und JAM-3 vermittelt die Fusion von schnell-kontrahierenden Muskelfasern im Zebrafisch (Powell und Wright, 2011). Die Bindung der beiden Moleküle ist essentiell für die Erkennung und die Adhäsion von Muskelvorläuferzellen, aber nicht allein ausreichend um die Fusion von Muskelzellen auszulösen.

JAM-3 wird auch in der Maus an der Adhäsionsstelle zwischen Satellitenzelle und Muskelfaser exprimiert (D. Bröhl, unveröffentlichte Beobachtung). Zur Analyse einer möglichen Funktion von JAM-2 während der Myogenese in der Maus untersuchte ich *Jam2*-Knockout Mäuse (Arcangeli *et al.*, 2011). Mäuse, die kein funktionsfähiges *Jam2* exprimierten, waren lebensfähig und fertil.

Zuerst analysierte ich die Fähigkeit der *Jam2*-defizienten Myoblasten zu fusionieren. Dazu isolierte ich aus E18.5 und P23 alten Tieren einzelne Muskelfasern aus *M. brachioradialis* und *M. extensor carpi radialis* (E18.5) beziehungsweise aus dem EDL-Muskel bei P23 und bestimmte die Zahl der Kerne (Abb. 4.9A, C). Die Muskelfasern der E18.5 alten Wildtypen enthielten $66,6 \pm 1,6$ Kerne. Die Muskelfasern der *Jam2*-defizienten Mäuse enthielten die gleiche Anzahl Kerne. Im Alter von P23 enthielten die Fasern der Kontroll- und *Jam2*-defizienter Mäuse $257,9 \pm 1,6$ Nuclei. Der Verlust von *Jam2* führt demnach nicht zu einem Fusionsdefizit oder zu reduziertem Faserwachstum.

Weiterhin untersuchte ich ob JAM-2 für die Adhäsion von Satellitenzellen und Muskelfaser notwendig ist. Dazu analysierte ich immunhistologische Färbungen der Rückenmuskulatur von E18.5 und P23 alten Kontroll- und *Jam2*-defizienten Tieren (Abb. 4.9B, D). Die Satellitenzellen wurden mit anti-Pax7- und die Muskelfasern mit anti-Laminin Antikörpern gefärbt. Die Quantifizierung der Pax7⁺ Zellen zeigte, dass $16,1 \pm 0,4$ Satellitenzellen pro 100 Muskelfasern unter der Lamina lokalisiert waren, während sich nur eine geringe Anzahl ($1,8 \pm 0,4$ Pax7⁺ Zellen/100 Muskelfasern) außerhalb der Lamina im interstitiellen Raum befand. Die Anzahl der Pax7⁺ Zellen in der *Jam2* Mutante innerhalb der Lamina und im Interstitium war unverändert. Dies konnte ich auch bei Kontroll- und *Jam2*-defizienten Mäusen im Alter von P23 beobachten. Der

Oberflächenrezeptor JAM-2 spielt demnach keine wesentliche Rolle bei der Adhäsion der Satellitenzellen an die Muskelfasern und der Erhaltung der Stammzellnische.

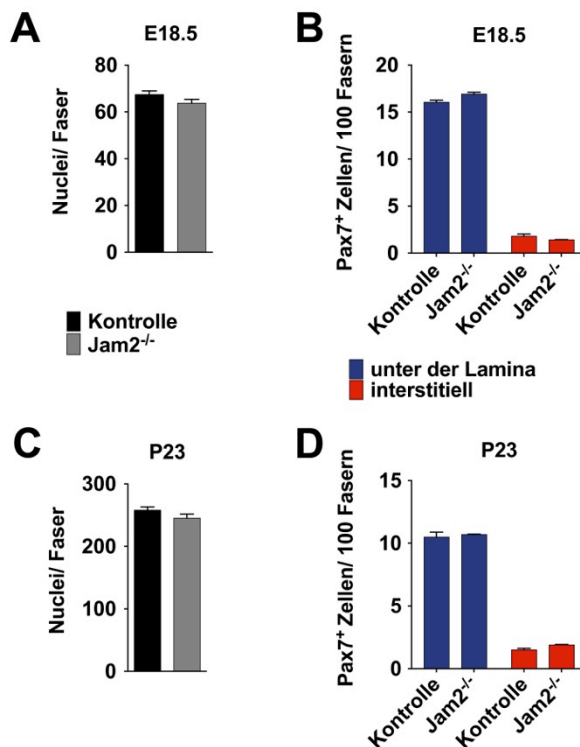


Abbildung 4.9: JAM-2 wird nicht zur Fusion von Myoblasten und nicht bei der Adhäsion von Satellitenzellen an die Muskelfasern benötigt. Quantifizierung der Nuclei in einzelnen Muskelfasern des *M. brachioradialis* und *M. extensor carpi radialis* bei E17.5 (A) und des EDL bei P23 (C) in Kontrolltieren und in *Jam2*-defizienten Tieren. Quantifizierung der Pax7⁺ Zellen/100 Muskelfasern innerhalb der Lamina und interstitiell der Rückenmuskeln bei E17.5 (B) und gesamt bei P23 (D) in Kontrolltieren und in *Jam2*-defizienten Tieren.

4.2.3. *Melanoma cell adhesion molecule* (MCAM) ist für die Myogenese nicht essentiell

MCAM wird ebenfalls in fetalen Muskelzellen exprimiert (Cerletti *et al.*, 2006). Um eine mögliche adhäsive Funktion bei der Myoblastenfusion zu analysieren, quantifizierte ich die Zahl der Kerne pro Muskelfaser *in vivo*. Ich isolierte einzelne Muskelfasern aus dem *M. brachioradialis* und *M. extensor carpi radialis* (E18.5) beziehungsweise aus dem EDL bei P23 und färbte die Nuclei mit DAPI. Im Vergleich zu Kontrolltieren war die Zahl der Nuclei in den Muskelfasern der *MCAM*-Mutanten bei E18.5 und P23 nicht reduziert (Abb. 4.10A, C). Muskelfasern der E18.5-Kontrolltiere enthielten mit $65,8 \pm 5,1$ eine ähnliche Zahl an Kernen wie *MCAM*-defiziente Fasern mit $66,7 \pm 0,1$ Nuclei. Die

Anzahl der Kerne von Kontroll- und *MCAM*-mutanten Fasern stieg im Alter von 23 Tagen nach der Geburt auf 222 ± 16 beziehungsweise 228 ± 18 Kerne. Der Verlust von *MCAM* veränderte demnach nicht die Fusionseffizienz der Myoblasten *in vivo*.

In einem weiteren Experiment untersuchte ich die Fähigkeit der *MCAM*-defizienten Satellitenzellen an Muskelfasern zu adhären und die Satellitenzellnische zu besiedeln. Dazu analysierte ich die Zahl der Pax7⁺ Zellen, die unterhalb der Laminin⁺ Basallamina und im interstitiellen Raum der Rückenmuskulatur lokalisiert waren. Im Vergleich zur Kontrolle war die Anzahl der Pax7⁺ Zellen in der *MCAM*-Mutante unverändert (Abb. 4.10B). Etwa 15 Satellitenzellen befanden sich innerhalb der Basallamina, während drei Pax7⁺ Zellen/100 Fasern im interstitiellen Raum lokalisiert waren. Auch im juvenilen Stadium (P23) gab es zwischen Kontrolltieren und *MCAM*-defizienten Tieren keine Unterschiede in der Anzahl der Pax7⁺ Zellen (Abb. 4.10D). Allerdings gab es insgesamt weniger Pax7⁺ Zellen als bei E18.5-Tieren. So waren nur etwa sieben Pax7⁺ Zellen/100 Muskelfasern unterhalb der Lamina lokalisiert, während nur eine Satellitenzelle im interstitiellen Raum war. *MCAM*-defiziente Satellitenzellen zeigten somit keine veränderte Adhäsion an Muskelfasern.

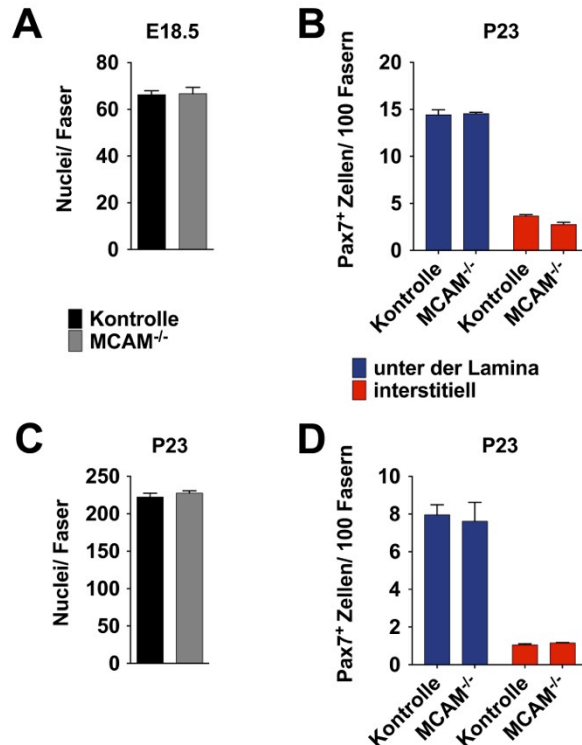


Abbildung 4.10: MCAM wird nicht bei der Fusion von Myoblasten und bei der Adhäsion von Satellitenzellen an die Muskelfasern benötigt. Quantifizierung der Nuclei in einzelnen Muskelfasern des *M. brachioradialis* und *M. extensor carpi radialis* bei E17.5 (A) und des EDL bei P23 (C) in Kontrolltieren und in *MCAM*-defizienten Tieren. Quantifizierung der Pax7⁺ Zellen/100 Muskelfasern innerhalb der

Lamina und interstitiell der Rückenmuskeln bei E17.5 (B) und P23 (D) in Kontrolltieren und in *MCAM*-defizienten Tieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass weder VCAM-1, JAM-2 oder MCAM als essentielle Counterrezeptoren von Integrinen während der Myoblastenfusion agieren. Des Weiteren spielen diese drei Adhäsionsmoleküle bei der Adhäsion von Satellitenzellen an Muskelfasern und somit bei ihrer Besiedelung der Satellitenzellnische keine essentielle Rolle.

5. Diskussion

Muskelfasern sind Synzytien, die durch die Fusion von Myoblasten entstehen (Jansen und Pavlath, 2008). Myoblastenfusion ist für die Bildung und das Wachstum der Muskelfasern während der Entwicklung und für die Regeneration nach Muskelverletzungen unerlässlich und wichtig für die kontraktile Kapazität der Skelettmuskulatur. Auf zellulärer Ebene ist Fusion ein Prozess, der aus mehreren Abschnitten besteht: Adhäsion, Ausrichten der fusionierenden Zellmembranen, Ausbildung von spezialisierten Mikrodomänen entlang der Kontaktstelle und der anschließenden Fusion der Zellen. In *Drosophila* führt die Ig-Superfamilien-Molekülvermittelte Adhäsion zweier Myoblasten zur Aktivierung einer Signalkaskade, die in der Polymerisierung von Aktin kulminiert. F-Aktin-reiche Strukturen an der Kontaktstelle zweier Myoblasten bringen die Membranen in unmittelbare Nähe und erlauben die Bildung sogenannter Fusionsporen, die sich erweitern bis die Membran letztendlich zusammenbricht und die Myoblasten fusionieren.

In meiner Dissertation untersuchte ich verschiedene Aspekte der Myoblastenfusion. Im ersten Teil führte ich epistatische Experimente durch und analysierte, inwieweit Integrine, CDC42 und RAC1 in einer Signalkaskade funktionieren. Die Tatsache, dass ich durch die Aktivierung von RAC1 die Fusionsdefizite von *Cdc42*- und *Integrin β 1*-mutanten Myoblasten retten konnte, deutet darauf hin, dass eine Integrin-abhängige Aktivierung von RAC1 die Fusion von Myoblasten kontrolliert. Meine Beobachtung, dass durch die Expression von aktiviertem *Rac1* der Fusionsphänotyp der *ILK*-mutanten Myoblasten ebenfalls minimiert wird, weist darauf hin, dass eine Integrin-vermittelte Signalübertragung während der Fusion von Myoblasten benötigt wird. Integrin β 1 ist essentiell für Myoblastenfusion, wird aber nur in einem der beiden Fusionspartner benötigt. Integrine werden aktiviert, indem sie auf dem anderen Fusionspartner Oberflächenmoleküle, sogenannte Counterrezeptoren, erkennen. Im zweiten Teil meiner Arbeit untersuchte ich mit Hilfe genetischer Experimente, ob VCAM-1, JAM-2 und MCAM mögliche Counterrezeptoren von Integrin β 1 während der Myoblastenfusion sind. Diese Moleküle waren als Interaktionspartner von Integrin β 1 bereits beschrieben. Meine Untersuchungen zeigen, dass keines dieser drei Moleküle essentiell für

Myoblastenfusion ist. Demnach könnte ein bisher nicht bekanntes Molekül als Integrin-Counterrezeptor wirken oder mehrere dieser Moleküle wirken redundant.

5.1. RAC1 überträgt Integrin-Signale während der Myoblastenfusion

Epistase-Experimente werden in der Genetik eingesetzt, um Interaktionen von Genen, zum Beispiel in Signaltransduktionsketten zu untersuchen. Dabei wird beobachtet, dass Gene, deren Produkte sich gegenseitig kontrollieren, oft sehr ähnliche Phänotypen besitzen. Durch Aktivierung einer funktionellen Komponente, die nachgelagert eine Funktion ausübt, können Defizite in vorgeschalteten Komponenten ausgeglichen werden. So können Mutationen eines Liganden kompensiert werden, wenn gleichzeitig aktivierende Mutationen im Rezeptor oder in nachgeschalteten Signaltransduktionskomponenten vorliegen.

5.1.1. Die Expression von aktiviertem RAC1 führt zur Hyperfusion

Zur Untersuchung der Hierarchie von Integrin $\beta 1$, ILK und den GTPasen CDC42 und RAC1 bei der Myoblastenfusion führte ich Epistase-Experimente durch. Dabei setzte ich ein transgenes Allel ein, das eine aktivierte Variante von *Rac1* exprimiert: *Rac1G12V* (Srinivasan *et al.*, 2009). Durch die Verwendung von *Lbx1^{Cre}* wurde aktiviertes *Rac1* in migrierenden Vorläuferzellen exprimiert. Die ubiquitäre Expression von aktiviertem *Rac1* im *ROSA26*-Locus führte zu einer höheren Fusionseffizienz der Myoblasten. Die Aktivierung von RAC1 innerhalb der Zelle wird normalerweise räumlich und zeitlich stark reguliert. Dies erfolgt einerseits über den Austausch von GTP und GDP, aber auch durch die Lokalisation der GTP-gebundenen Form von RAC1 nahe seiner Effektoren an der Zellmembran. Die Hyperfusion der *Rac1^{DA}*-Myoblasten *in vivo* und *in vitro* zeigt, dass die Regulation der RAC1-Aktivität für die Fusionseffizienz von Myoblasten essentiell ist. In Zebrafisch wurde bei der Expression von aktiviertem *rac1* ebenfalls Hyperfusion von Myoblasten beobachtet (Srinivas *et al.*, 2007). In *Drosophila* hingegen führt die Expression von *Rac1* zu einem kompletten Verlust der Myoblastenfusion. Dies deutet darauf hin, dass trotz gemeinsamer Komponenten der Signalwege, unterschiedliche Mechanismen in *Drosophila* und Maus bei der Myoblastenfusion wirken.

Als Kontrolle für die Funktionalität des aktivierten RAC1 exprimierte ich aktiviertes *Rac1* im *Rac1*-defizienten Hintergrund. Meine Untersuchungen zeigten, dass aktiviertes RAC1 in der Lage war, das Fusionsdefizit der *Rac1*-mutanten Myoblasten, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu reduzieren. Dabei war die Rettung des Fusionsdefizits *in vitro* stärker ausgeprägt als *in vivo*. Mögliche Ursachen sind die im Medium oder Matrigel enthaltenen Wachstumsfaktoren beziehungsweise die Komposition und räumliche Verteilung der Myoblasten *in vitro*. Die Expression eines Allels des aktivierten *Rac1* interferierte demnach nicht mit der Myoblastenfusion und reduzierte das Fusionsdefizit der *Rac1*-mutanten Myoblasten.

5.1.2. RAC1 wird während der Myoblastenfusion CDC42-abhängig aktiviert.

Im Gegensatz zu *Drosophila* ist die GTPase CDC42 in der Maus essentiell für die Myoblastenfusion (Luo *et al.*, 1994; Vasyutina *et al.*, 2009). Außerdem sind die Fusionsphänotypen der *Cdc42*-Mutante sehr ähnlich zu *Rac1*-defizienten Mäusen. Interagieren CDC42 und RAC1 in einer Kaskade, ist es möglich den Mangel des einen mit der Aktivierung des anderen auszugleichen. In der Literatur wurde gezeigt, dass CDC42 RAC1 aktivieren kann. Bosse *et al.* beschreiben, dass Mutationen von *Cdc42* zur reduzierten Aktivität von RAC1 führen können (Bosse *et al.*, 2007). Diese CDC42-abhängige RAC1 Aktivierung ist allerdings stark Zelltyp-spezifisch und findet in Fibroblasten statt, konnte in anderen Zelltypen aber nicht beobachtet werden.

Meine Analyse von Myoblasten, die aktiviertes *Rac1* im *Cdc42*-defizienten Hintergrund exprimieren, weist darauf hin, dass CDC42 während der Myoblastenfusion RAC1 aktiviert. Die Expression von aktiviertem *Rac1* glich den Mangel an CDC42 in *Cdc42*-mutanten Myoblasten aus und Fusion fand statt. *In vitro* verdoppelte sich der Fusionsindex ebenfalls und erreichte Wildtyp-Niveau. Muskelfasern aus *Cdc42*^{-/-}; *Rac1*^{DA/+}; *Lbx1*^{Cre}-Tieren enthielten doppelt so viele Nuclei wie *Cdc42*-mutante Muskelfasern. *In vivo* war die Rettung allerdings weniger stark ausgeprägt, denn auch in der Gegenwart von aktiviertem RAC1 erreichte die Fusion nicht die Effizienz, die in Kontrolltieren beobachtet wurde.

Die Rettung des Fusionsdefizites deutet darauf hin, dass die Expression von aktiviertem *Rac1* das Fehlen von CDC42 ausgleicht und die beiden GTPasen CDC42 und RAC1 während der Myoblastenfusion miteinander interagieren, d. h. RAC1 in einer CDC42-abhängigen Weise aktiviert wird.

5.1.3. Signalweiterleitung während der Myoblastenfusion

Die direkte Aktivierung von RAC1 durch CDC42 ist eine mögliche Variante der Interaktion beider Moleküle während der Myoblastenfusion. RAC1 ist in der Lage, direkt an N-WASP zu binden oder indirekt den WAVE-Komplex zu aktivieren, um somit die ARP2/3-gesteuerte Aktin-Polymerisierung zu regulieren (Abdul-Manan *et al.*, 1999; Eden *et al.*, 2002; Tomasevic *et al.*, 2007). Die Polymerisierung von Aktin durch ARP2/3 ist essentiell für Myoblastenfusion in *Drosophila* und der Maus (Lahmann, 2012; Richardson *et al.*, 2007). Beide NPFs, N-WASP und WAVE, spielen während der Myoblastenfusion in der Maus eine Rolle. N-WASP ist essentiell für die Myoblastenfusion, und die Mutation von N-WASP führt zu mononukleären Muskelfasern (Gruenbaum-Cohen *et al.*, 2012). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass möglicherweise auch der WAVE-Komplex eine Rolle bei der Myoblastenfusion in Säugetieren besitzt. Die Mutation von *WAVE1* führt zu Muskelatrophien in der Maus (Dahl *et al.*, 2003). Des Weiteren bewirkt die selektive Inhibition des *Nck-associated protein* (*Nap1*) durch RNA-Interferenz in C2C12-Zellen eine Reduktion des Fusionsindex (Nowak *et al.*, 2009). NAP1 ist ein Bestandteil des WAVE-Komplexes und das Homolog des *Drosophila*-Gens *Kette*, das ebenfalls Fusion kontrolliert.

In *Drosophila* wurde gezeigt, dass ARP2/3 in fusionierenden Myoblasten durch WASp und den WAVE-Komplex aktiviert wird. WASp und das *WASp interacting protein* (D-WIP) sind essentiell für die Ausbildung F-Aktin-reicher Foci während der Myoblastenfusion (Kim *et al.*, 2007; Schafer *et al.*, 2007). Daneben spielt der WAVE-Komplex eine entscheidende Rolle bei der Myoblastenfusion (Berger *et al.*, 2008; Richardson *et al.*, 2007; Schroter *et al.*, 2004). Direkte Vergleiche zeigten, dass beide NPFs distinkte Funktionen während der Myoblastenfusion in *Drosophila* besitzen. Der WAVE-Komplex bewirkt eine Aktin-Polymerisierung und damit Erzeugung von Kräften, die der Bildung von Fusionssporen dient. Myoblasten, die Mutationen in WAVE oder Kette, einem Mitglied des WAVE-Komplexes, tragen, bilden zwar F-Aktin-reiche Strukturen,

aber keine Fusionsporen aus (Gildor *et al.*, 2009). Hingegen ist die durch WASp erzeugte Aktin-Polymerisierung für die Vergrößerung bereits bestehender Fusionsporen verantwortlich (Berger *et al.*, 2008; Gildor *et al.*, 2009; Massarwa *et al.*, 2007). Darüberhinaus sind beide NPFs auch während der Bildung der adulten Flugmuskulatur in *Drosophila* essentiell (Mukherjee *et al.*, 2011).

Allerdings spielen weder CDC42, noch Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂), zwei etablierte Aktivatoren von WASp bei der Myoblastenfusion, eine Rolle in *Drosophila* (Luo *et al.*, 1994; Massarwa *et al.*, 2007; Schafer *et al.*, 2007). Folglich ist die Identität des Aktivators von WASp in *Drosophila* unbekannt.

Für die Übermittlung des Fusionsignals in der Maus sind zwei Modelle vorstellbar. In Ersterem wird RAC1 direkt durch CDC42 aktiviert, so dass die Bindung der NPFs, N-Wasp und/oder WAVE, über RAC1 realisiert wird und zum lokalen Umbau des Aktin-Zytoskeletts führt (Abb. 5.1A). Im Zweitem werden die GTPasen CDC42 und RAC1 unabhängig voneinander aktiviert und aktivieren wiederum verschiedene NPFs (Abb. 5.1B). In diesem Fall kann ein Mangel an CDC42 durch die ubiquitäre Expression von aktiviertem *Rac1* kompensiert werden, und es kommt durch eine Aktivierung des parallel wirkenden RAC1/WAVE-Signalwegs zur Rettung des Fusionsdefizits der *Cdc42*-mutanten Myoblasten.

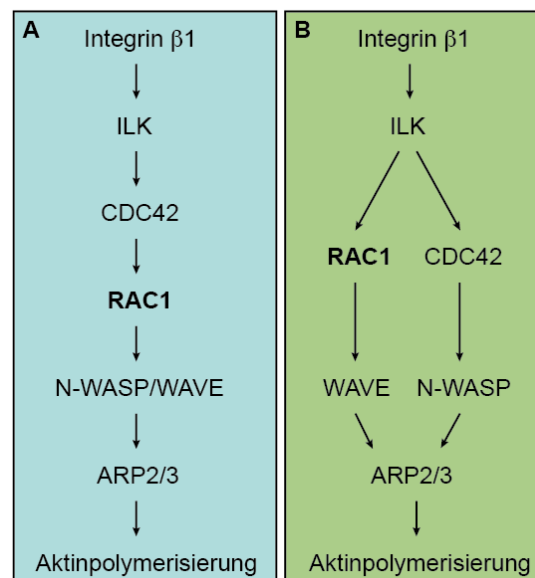


Abbildung 5.1: Modelle möglicher Signalkaskaden während der Myoblastenfusion in der Maus.

(A) Nach der Bindung von Integrin $\beta 1$ an einen unbekanntem Counterrezeptor wird das Fusionsignal über ILK an die kleine GTPase CDC42 übertragen. Die Aktivierung von RAC1 ist CDC42-abhängig. Die ARP2/3-vermittelte Polymerisierung von Aktin wird durch N-WASP und eventuell WAVE aktiviert. RAC1 spielt möglicherweise eine zentrale Rolle bei der Aktivierung von N-WASP und/oder WAVE. (B)

Nach der Adhäsion der beiden fusionierenden Myoblasten über Integrin $\beta 1$ und einen unbekanntem Counterrezeptor wird das Signal über ILK an RAC1 weitergeleitet und ARP2/3 durch den NPF WAVE aktiviert. Daneben kommt es zur Bindung von CDC42 an N-WASP. Dies löst die Autoinhibition von N-WASP und aktiviert ARP2/3.

5.1.4. Die Integrin-vermittelte Signalübertragung führt zur Aktivierung von RAC1 während der Myoblastenfusion

Myoblasten von *Integrin $\beta 1$* - und *ILK*-Mutanten zeigen ähnliche Fusionsdefizite wie *Rac1*- und *Cdc42*-mutante Myoblasten (Czajkowski, 2014; Vasyutina *et al.*, 2009). In Epistase-Experimenten verwendete ich zur Rettung der Fusionsdefizite der *Integrin $\beta 1$* - und *ILK*-Mutanten die Linie *Rac1^{DA}*. Zur Deletion der Stoppkassette durch Cre-vermittelte Rekombination setzte ich *Pax3^{Cre}* ein, wobei die Expression der Rekombinase nicht nur die Expression von aktiviertem *Rac1* bewirkte, sondern gleichzeitig konditionelle Mutationen in *Integrin $\beta 1$* beziehungsweise *ILK* einführte. Ich konnte eine partielle Rettung der Fusionsdefizite durch Aktivierung von RAC1 erreichen. Die Rettung der Fusionsdefizite von *Integrin $\beta 1$* -, und *ILK*-defizienten Myoblasten, die in Kultur fusionierten, war besonders stark ausgeprägt, und ich erreichte ähnliche Fusionseffizienzen, wie sie mit Kontroll-Myoblasten beobachtet wurden. *In vivo* war die Rettung allerdings weniger stark ausgeprägt, und auch in der Gegenwart von aktiviertem RAC1 waren noch starke Fusionsdefizite zu beobachten. Die Reduktion des Fusionsdefizites der *Integrin $\beta 1$* - und *ILK*-mutanten Myoblasten durch die Expression von aktiviertem *Rac1* in meinen Epistase-Experimenten lässt vermuten, dass die Aktivierung von Integrin $\beta 1$ und ILK zur Aktivierung von RAC1 führt.

Aus Experimenten in der Arbeitsgruppe von C. Birchmeier und aus Resultaten von anderen Arbeitsgruppen sind sechs Gene bekannt, die zu sehr starken Fusionsdefiziten in Myoblasten *in vivo* führen, nämlich *Integrin $\beta 1$* , *ILK*, *Talin1/2*, *Cdc42* und *Rac1* (Conti *et al.*, 2009; Czajkowski, 2014; Schwander *et al.*, 2003; Vasyutina *et al.*, 2009). Auch in anderen Zellsystemen wurde gezeigt, dass die Interaktion von Integrinen mit der extrazellulären Matrix zur Aktivierung von RAC1 führt (Choma *et al.*, 2004; Del Pozo und Schwartz, 2007; Price *et al.*, 1998). Des Weiteren wurde beschrieben, dass Integrine durch die Bindung und Rekrutierung von Talin und Tiam1, einem RAC1 spezifischen GEF, die Aktivierung von RAC1 und damit die polarisierte Zellmigration regulieren

können (Wang *et al.*, 2012). Dabei interagiert Tiam1 mit dem Par-Komplex und CDC42 und vermittelt so die CDC42-abhängige Aktivierung von RAC1 in Verbindung mit Integrinen (Nishimura *et al.*, 2005). Talin und CDC42 sind demnach kritische Regulatoren für die Aktivierung von RAC1 als Antwort auf die extrazelluläre Bindung von Integrinrezeptoren.

Zusammen legen diese Beobachtungen die Hypothese nahe, dass Integrin $\beta 1$, ILK, Talin1/2, und CDC42 in einer einzigen Signaltransduktionskaskade funktionieren und zusammen die Aktivierung von RAC1 während der Myoblastenfusion kontrollieren.

5.1.5. Funktion von Aktin während der Myoblastenfusion

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen zeigen, dass die Integrin-vermittelte Adhäsion von Myoblasten eine Signalkaskade in Gang setzt, die letztendlich zur Aktivierung von RAC1 führt. Die Funktionen von RAC1 sind häufig Zelltyp-spezifisch und reichen von zellulären Antworten wie sekretorischen Prozessen, Phagozytose, Zellpolarisation und Migration über Auf- und Abbau von Zelladhäsionen (Bosco *et al.*, 2009). Eine gut untersuchte Funktion ist die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts. Auch in Myoblasten deuten die Fusionsdefizite der *Integrin*-, *Cdc42*-, *Rac1*- und *N-Wasp*-Mutanten darauf hin, dass RAC1 zur Aktivierung von N-WASP führt und damit zum lokalen Umbau von F-Aktin. Die Funktion, die der lokale Umbau während der Myoblastenfusion in der Maus spielt, ist noch unbekannt. In *Drosophila* dient der ARP2/3-vermittelte Umbau des Aktin-Zytoskelett u. a. der Vergrößerung bereits bestehender Fusionsporen (Gildor *et al.*, 2009). Ebenso konnte gezeigt werden, dass Aktinakkumulation für die Bildung sogenannter *podosome like structures* (PLS), fingerförmiger Ausstülpungen der Zellmembran, verantwortlich ist (Sens *et al.*, 2010). Jedoch erhöht das alleinige Näherbringen der Membranen ohne Ausbildung der PLS die Fusionsraten nicht (Shilagar di *et al.*, 2013).

Eine weitere Funktion der Aktinfilamente, neben der Erzeugung mechanischer Kräfte, könnte der Transport von Fusogenen sein. Fusogene sind Proteine, die in der Lage sind Membranen zu fusionieren. Spontan fusionieren biologische Membranen nicht miteinander, da sie auf ihrer Oberfläche elektrisch stark geladen sind und es erhebliche Energie benötigt, Membranen in direkten Kontakt zu bringen. Trotzdem findet in vielen Systemen Fusion statt, z.B. werden Neurotransmitter an der Synapse durch Fusion von Vesikeln ausgeschüttet oder Peptidhormone durch Fusion von Vesikeln mit der

Zellmembran sezerniert. Virale Fusogene sind besonders gut charakterisiert. Sie erlauben ein Verschmelzen von viralen und zellulären Membranen und damit eine Infektion der Zelle. Damit es nicht zu unkontrollierten Fusionen kommt, muss die Aktivierung von Fusogenen präzise reguliert werden, entweder durch Aktivierung des Proteins oder durch den gezielten Membrantransport. In *Caenorhabditis* sind die Fusogene EFF-1 und AFF-1 für Zell-Zell-Fusionen von epidermalen Zellen beziehungsweise Ankerzellen verantwortlich. Ihr Transport zur Zellmembran wird daher stark reguliert (Podbilewicz *et al.*, 2006; Sapir *et al.*, 2007). Ob Fusogene auch bei der Fusion von Myoblasten in Vertebraten eine Rolle spielen, kann angenommen werden, die molekulare Identität der Fusogene ist aber unbekannt.

Obwohl die Akkumulation von F-Aktin an der Kontaktstelle während der Myoblastenfusion in *Drosophila* gut dokumentiert und bewiesen ist, ist sie bei Vertebraten nur schwer darstellbar. Ich untersuchte primäre Myoblasten von *Lifect*-Mäusen, welche GFP- bzw. RFP-markiertes F-Aktin exprimieren (Riedl *et al.*, 2010). In Zeitraffer-Aufnahmen der Fusion dieser primären Myoblasten konnte ich nur in einem Teil der fusionierenden Myoblasten lokale Akkumulation des F-Aktins beobachten (unveröffentlichte Beobachtung). Es ist möglich, dass ich stattfindende F-Aktin-Akkumulationen in meinen Beobachtungen nicht erfasste. So nahm ich in meinen Experimenten die Aktinverteilung alle fünf Minuten auf. Da die Aktinpolymerisierung ein sehr transients Prozess ist, genügt diese zeitliche Auflösung möglicherweise nicht. Des Weiteren könnte ich feinste F-Aktin-*spikes* bei der von mir gewählten Vergrößerung nicht erkannt haben. Es ist allerdings auch möglich, dass F-Aktin bei der Myoblastenfusion in Vertebraten andere Funktionen übernimmt und eine Akkumulation von F-Aktins deswegen nicht an der Fusionsstelle benötigt wird, sondern z.B. beim Vesikeltransport in der Zelle eine Rolle spielt.

5.2. Adhäsionsmoleküle während der Myoblastenfusion

Integrine vermitteln die Adhäsion der fusionierenden Myoblasten. Sie werden allerdings nur in einem der Fusionspartner benötigt (Czajkowski, 2014). Dies bedeutet, dass spezielle Counterrezeptoren auf der anderen Zelle existieren, die während der Fusion Integrin $\beta 1$ binden und aktivieren. Ich untersuchte in meiner Arbeit drei verschiedene, mögliche Counterrezeptoren: VCAM-1, JAM-2 und MCAM. Meine Untersuchungen

zeigen, dass keiner dieser Rezeptoren Partner von Integrin $\beta 1$ während der Myoblastenfusion oder bei der Adhäsion der Satellitenzellen an die Muskelfaser ist.

5.2.1. VCAM-1

Das Ig-Superfamilienmolekül VCAM-1 ist ein bedeutender Counterrezeptor von Integrinen im Immunsystem. So vermittelt die Interaktion von Integrin $\alpha 4 \beta 1$ und VCAM-1 die Migration und Extravasation von Leukozyten (Osborn *et al.*, 1994). Da VCAM-1 auch während der Embryonalentwicklung an der Kontaktstelle zwischen sekundären Myoblasten und primären Myotuben und an der Kontaktstelle zwischen Satellitenzellen und Muskelfasern exprimiert wird, untersuchte ich seine Funktion während der Myogenese (Rosen *et al.*, 1992). Meine genetischen Experimente zeigten, dass konditionelle VCAM-1 Mutanten keine Defizite bei der Myoblastenfusion aufwiesen. Muskelfasern dieser Mutanten enthielten zu verschiedenen Zeitpunkten ihrer Entwicklung (E17.5 und P23) ebenso viele Nuclei wie Muskelfasern der Kontrolltiere. Außerdem hatte der Verlust von VCAM-1 keine Auswirkungen auf die Lage der Satellitenzellen innerhalb ihrer Stammzellnische.

5.2.2. JAM-2

Junctional adhesion molecules sind eine evolutionär hochkonservierte Gruppe von Adhäsionsmolekülen. Einerseits sind sie für die Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen während der Leukozytenmigration verantwortlich, andererseits regulieren sie die Zellpolarität und Bildung von *tight junctions* in Epithel- und Endothelzellen. Powell *et al.* untersuchten erstmals die Funktion der Jams während der Myogenese (Powell und Wright, 2011). Die heterologe Interaktion von JAM-2 und JAM-3 ist essentiell für die Myoblastenfusion in Zebrafisch. Genetische Analysen der *Jam2* Mausmutanten zeigten, dass der Rezeptor JAM-2 keine Funktion während der Myoblastenfusion in der Maus hat. Ebenso ist er nicht essentiell für die Besiedlung der Stammzellnische. *Jam2*-defiziente Satellitenzellen befinden sich im gleichen Verhältnis innerhalb der Basallamina wie die der Kontrolltiere. Die essentielle Funktion von JAM-2 in der Myoblastenfusion wurde also während der Evolution nicht konserviert. Entweder wird JAM-2 in der Myoblastenfusion der Maus nicht eingesetzt, oder andere Gene wie *Jam3* wirken redundant.

5.2.3. MCAM

In der Maus wird MCAM von proliferierenden Myoblasten und Endothelzellen exprimiert (Cerletti *et al.*, 2006). Die Inhibition der *MCAM*-Expression durch RNA-Interferenz in C2C12-Zellen verstärkt die Myoblastenfusion. Außerdem wird *MCAM* an der Adhäsionsstelle zwischen Satellitenzellen und Muskelfasern exprimiert und ist für die korrekte Lokalisation der Satellitenzellen in ihrer Stammzellnische, innerhalb der Basallamina, mitverantwortlich (Brohl *et al.*, 2012). Genetische Analysen der *MCAM* Nullmutanten offenbarten allerdings, dass MCAM während der Myoblastenfusion keine essentielle Rolle spielt. Muskelfasern, die ich aus *MCAM*-defizienten Mäusen isolierte, enthielten eine unveränderte Anzahl an Nuclei im Vergleich zu Kontroll-Muskelfasern. Dies zeigte, dass MCAM nicht als Counterrezeptor für Integrin $\beta 1$ fungiert. Ebenso konnte ich nachweisen, dass die Adhäsion zwischen Satellitenzellen und Muskelfasern nicht allein durch MCAM vermittelt wird. Die Mutation von *MCAM* führt nicht zu einer veränderten Lokalisation der Pax7⁺ Satellitenzellen.

5.2.4. Die Rolle von Adhäsionsmolekülen während der Myoblastenfusion

Nephrin und Neph1 sind Homologe in Vertebraten zu den Ig-Superfamilienmolekülen Sns und Duf, die in *Drosophila* während der Myoblastenfusion die Adhäsion der Founderzelle und der FCMs vermitteln. Während Nephrin eine Funktion bei der Myoblastenfusion in Vertebraten hat, konnte dies für Neph1 nicht bestätigt werden (Donoviel *et al.*, 2001; Sohn *et al.*, 2009a).

Die Funktion anderer Adhäsionsmoleküle bei der Myoblastenfusion wurde bereits untersucht. So zeigten *in vitro*-Untersuchungen, bei denen M-Cadherin mit Peptiden, Antikörpern oder RNA-Interferenz blockiert wurde, ein Fusionsdefizit der Myoblasten (Charrasse *et al.*, 2007; Charrasse *et al.*, 2006; Mege *et al.*, 1992; Zeschnigk *et al.*, 1995). Allerdings konnten Hollnagel *et al.* nachweisen, dass M-Cadherin *in vivo* nicht bei der normalen Entwicklung der Skelettmuskulatur involviert ist (Hollnagel *et al.*, 2002). Ebenso wurde für N-Cadherin gezeigt, dass es keine Rolle während der Myoblastenfusion spielt (Charlton *et al.*, 1997; Radice *et al.*, 1997).

Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse von *in vitro* und *in vivo* Studien und letztendlich für das Nichtauffinden eines Counterrezeptors für Integrin $\beta 1$ ist vermutlich die Komplexität des Fusions-Prozesses. Außerdem agieren diese Rezeptoren höchstwahrscheinlich redundant. Untersuchen ließe sich dies mit der Kombination der verschiedenen Einzelmutationen zu Doppel- und Trippelmutanten. Die Herstellung dieser Mutanten hätte allerdings den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit gesprengt.

6. Zusammenfassung

Myoblastenfusion ist essentiell für die Entwicklung und Regeneration von Muskelfasern. Die kleine GTPase RAC1 ist dabei ein zentrales Molekül und vermittelt Signale, die zur Aktinpolymerisierung und zum Membranzusammenbruch während der Fusion führen. Weitere für die Myoblastenfusion in der Maus essentielle Moleküle sind Integrine, *Integrin-linked-kinase*, Talin1 und Talin2, CDC42 und N-WASP.

In meiner Dissertation ermittelte ich die Epistase dieser Gene mithilfe genetischer Experimente. Meine Ergebnisse zeigen, dass RAC1 Integrin-Signale weiterleitet und übermittelt. Des Weiteren wird RAC1 CDC42-abhängig aktiviert. Dies bedeutet, dass Integrine und die GTPasen CDC42 und RAC1 höchstwahrscheinlich in einer linearen Signalkaskade agieren. Ein alternatives Szenario ist die getrennte Aktivierung von CDC42 und RAC1. Dies kulminiert wiederum in der Aktivierung der Aktin-Nukleation-fördernden Faktoren N-WASP und WAVE. Lokale Aktinakkumulationen können unterschiedliche Funktionen besitzen: (1) Transport von Fusogenen zur Membran, (2) Erzeugung von Kräften, die beim Herstellen/Öffnen der Fusionsporen helfen und (3) Abtransport von Zellmembranmaterial bei Membranzusammenbruch.

Weiterhin konnte ich nachweisen, dass die Adhäsionsmoleküle VCAM-1, JAM-2 und MCAM nicht essentiell für die Myoblastenfusion und die Adhäsion von Satellitenzellen an Muskelfasern ist. Sie sind demnach nicht die Counterrezeptoren für Integrin $\beta 1$ in diesen Prozessen. Unklar ist allerdings, inwieweit diese Ig-Superfamilienmoleküle redundant wirken und bei Mutation einander ersetzen können.

7. Summary

Myoblast fusion is essential for development and regeneration of muscle fibers. RAC1, a GTPase and key player, mediates signals leading to actin polymerisation and membrane breakdown during fusion process. Other essential molecules in this pathway are integrins, ILK, talin 1 and talin 2, CDC42 and N-Wasp.

In this thesis, I determined the epistasis of genes that are known to be essential in myoblast fusion by means of genetic experiments. My results show that activation of actin-nucleation by integrins is mediated by the small GTPase RAC1. Furthermore, RAC1 is activated by small GTPase CDC42 in a linear fashion. Another scenario could be that both GTPases are activated simultaneously and act together to activate actin-nucleation factors like N-WASp and WAVE. The accumulation of actin near the site of fusion can have several functions: (I) transport of fusogens to/from the site of fusion, (II) generation of forces to produce and open fusion pores and (III) transport of excess membrane material from the site of fusion.

Furthermore, I showed that the adhesion molecules VCAM-1, JAM-2 and MCAM are not essential for myoblast fusion in the mouse and the adhesion of a satellite cell to a myofiber in the satellite cell niche. Therefore, they are not counter receptors for integrin β 1. Nevertheless, it is possible that these Ig superfamily proteins are redundant and replace each other if one is mutated.

8. Literatur

- Abdul-Manan, N., Aghazadeh, B., Liu, G. A., Majumdar, A., Ouerfelli, O., Siminovitch, K. A. und Rosen, M. K.** (1999). Structure of Cdc42 in complex with the GTPase-binding domain of the 'Wiskott-Aldrich syndrome' protein. *Nature* **399**, 379-83.
- Abmayr, S. M. und Pavlath, G. K.** (2012). Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Development* **139**, 641-56.
- Aghazadeh, B., Zhu, K., Kubiseski, T. J., Liu, G. A., Pawson, T., Zheng, Y. und Rosen, M. K.** (1998). Structure and mutagenesis of the Dbl homology domain. *Nat Struct Biol* **5**, 1098-107.
- Arcangeli, M. L., Frontera, V., Bardin, F., Obrados, E., Adams, S., Chabannon, C., Schiff, C., Mancini, S. J., Adams, R. H. und Aurrand-Lions, M.** (2011). JAM-B regulates maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow. *Blood* **118**, 4609-19.
- Bader, B. L., Rayburn, H., Crowley, D. und Hynes, R. O.** (1998). Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins. *Cell* **95**, 507-19.
- Bate, M.** (1990). The embryonic development of larval muscles in *Drosophila*. *Development* **110**, 791-804.
- Baylies, M. K., Bate, M. und Ruiz Gomez, M.** (1998). Myogenesis: a view from *Drosophila*. *Cell* **93**, 921-7.
- Bazzoni, G.** (2003). The JAM family of junctional adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 525-30.
- Berger, S., Schafer, G., Kesper, D. A., Holz, A., Eriksson, T., Palmer, R. H., Beck, L., Klambt, C., Renkawitz-Pohl, R. und Onel, S. F.** (2008). WASP and SCAR have distinct roles in activating the Arp2/3 complex during myoblast fusion. *J Cell Sci* **121**, 1303-13.
- Biressi, S., Tagliafico, E., Lamorte, G., Monteverde, S., Tenedini, E., Roncaglia, E., Ferrari, S., Cusella-De Angelis, M. G., Tajbakhsh, S. und Cossu, G.** (2007). Intrinsic phenotypic diversity of embryonic and fetal myoblasts is revealed by genome-wide gene expression analysis on purified cells. *Dev Biol* **304**, 633-51.
- Bos, J. L.** (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* **49**, 4682-9.
- Bosco, E. E., Mulloy, J. C. und Zheng, Y.** (2009). Rac1 GTPase: a "Rac" of all trades. *Cell Mol Life Sci* **66**, 370-4.

- Bosse, T., Ehinger, J., Czuchra, A., Benesch, S., Steffen, A., Wu, X., Schloen, K., Niemann, H. H., Scita, G., Stradal, T. E., Brakebusch, C. und Rottner, K.** (2007). Cdc42 and phosphoinositide 3-kinase drive Rac-mediated actin polymerization downstream of c-Met in distinct and common pathways. *Mol Cell Biol* **27**, 6615-28.
- Bour, B. A., Chakravarti, M., West, J. M. und Abmayr, S. M.** (2000). Drosophila SNS, a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion. *Genes Dev* **14**, 1498-511.
- Bridgewater, R. E., Norman, J. C. und Caswell, P. T.** (2012). Integrin trafficking at a glance. *J Cell Sci* **125**, 3695-701.
- Brohl, D., Vasyutina, E., Czajkowski, M. T., Griger, J., Rassek, C., Rahn, H. P., Purfurst, B., Wende, H. und Birchmeier, C.** (2012). Colonization of the satellite cell niche by skeletal muscle progenitor cells depends on Notch signals. *Dev Cell* **23**, 469-81.
- Capers, C. R.** (1960). Multinucleation of skeletal muscle in vitro. *J Biophys Biochem Cytol* **7**, 559-66.
- Casey, P. J.** (1994). Lipid modifications of G proteins. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 219-25.
- Cerletti, M., Molloy, M. J., Tomczak, K. K., Yoon, S., Ramoni, M. F., Kho, A. T., Beggs, A. H. und Gussoni, E.** (2006). Melanoma cell adhesion molecule is a novel marker for human fetal myogenic cells and affects myoblast fusion. *J Cell Sci* **119**, 3117-27.
- Charlton, C. A., Mohler, W. A., Radice, G. L., Hynes, R. O. und Blau, H. M.** (1997). Fusion competence of myoblasts rendered genetically null for N-cadherin in culture. *The Journal of cell biology* **138**, 331-6.
- Charrasse, S., Comunale, F., Fortier, M., Portales-Casamar, E., Debant, A. und Gauthier-Rouviere, C.** (2007). M-cadherin activates Rac1 GTPase through the Rho-GEF trio during myoblast fusion. *Molecular biology of the cell* **18**, 1734-43.
- Charrasse, S., Comunale, F., Grumbach, Y., Poulat, F., Blangy, A. und Gauthier-Rouviere, C.** (2006). RhoA GTPase regulates M-cadherin activity and myoblast fusion. *Molecular biology of the cell* **17**, 749-59.
- Chevallier, A., Kieny, M. und Mauger, A.** (1977). Limb-somite relationship: origin of the limb musculature. *J Embryol Exp Morphol* **41**, 245-58.
- Choma, D. P., Pumiglia, K. und DiPersio, C. M.** (2004). Integrin alpha3beta1 directs the stabilization of a polarized lamellipodium in epithelial cells through activation of Rac1. *J Cell Sci* **117**, 3947-59.
- Christ, B., Jacob, H. J. und Jacob, M.** (1977). Experimental analysis of the origin of the wing musculature in avian embryos. *Anat Embryol (Berl)* **150**, 171-86.
- Chrostek, A., Wu, X., Quondamatteo, F., Hu, R., Sanecka, A., Niemann, C., Langbein, L., Haase, I. und Brakebusch, C.** (2006). Rac1 is crucial for hair follicle integrity but is not essential for maintenance of the epidermis. *Mol Cell Biol* **26**, 6957-70.

- Conti, F. J., Monkley, S. J., Wood, M. R., Critchley, D. R. und Muller, U.** (2009). Talin 1 and 2 are required for myoblast fusion, sarcomere assembly and the maintenance of myotendinous junctions. *Development* **136**, 3597-606.
- Czajkowski, M.**, The role of Notch and Integrin- β 1 signaling in muscle development (Diss. Freie Universität Berlin 2014)
- Dahl, J. P., Wang-Dunlop, J., Gonzales, C., Goad, M. E., Mark, R. J. und Kwak, S. P.** (2003). Characterization of the WAVE1 knock-out mouse: implications for CNS development. *J Neurosci* **23**, 3343-52.
- Del Pozo, M. A. und Schwartz, M. A.** (2007). Rac, membrane heterogeneity, caveolin and regulation of growth by integrins. *Trends Cell Biol* **17**, 246-50.
- DeMali, K. A., Balciunaite, E. und Kazlauskas, A.** (1999). Integrins enhance platelet-derived growth factor (PDGF)-dependent responses by altering the signal relay enzymes that are recruited to the PDGF beta receptor. *J Biol Chem* **274**, 19551-8.
- DerMardirossian, C. und Bokoch, G. M.** (2005). GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol* **15**, 356-63.
- Dietrich, S., Abou-Rebyeh, F., Brohmann, H., Blatt, F., Sonnenberg-Riethmacher, E., Yamaai, T., Lumsden, A., Brand-Saberi, B. und Birchmeier, C.** (1999). The role of SF/HGF and c-Met in the development of skeletal muscle. *Development* **126**, 1621-9.
- Dietrich, S., Schubert, F. R., Healy, C., Sharpe, P. T. und Lumsden, A.** (1998). Specification of the hypaxial musculature. *Development* **125**, 2235-49.
- Donoviel, D. B., Freed, D. D., Vogel, H., Potter, D. G., Hawkins, E., Barrish, J. P., Mathur, B. N., Turner, C. A., Geske, R., Montgomery, C. A., Starbuck, M., Brandt, M., Gupta, A., Ramirez-Solis, R., Zambrowicz, B. P. und Powell, D. R.** (2001). Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Molecular and cellular biology* **21**, 4829-36.
- Duxson, M. J., Usson, Y. und Harris, A. J.** (1989). The origin of secondary myotubes in mammalian skeletal muscles: ultrastructural studies. *Development* **107**, 743-50.
- Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A. V., Mann, M. und Kirschner, M. W.** (2002). Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* **418**, 790-3.
- Engleka, K. A., Gitler, A. D., Zhang, M., Zhou, D. D., High, F. A. und Epstein, J. A.** (2005). Insertion of Cre into the Pax3 locus creates a new allele of Splotch and identifies unexpected Pax3 derivatives. *Dev Biol* **280**, 396-406.
- Etienne-Manneville, S. und Hall, A.** (2001). Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell* **106**, 489-98.
- Flemming, W.** (1882). Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung.

- Gardner, H., Kreidberg, J., Koteliansky, V. und Jaenisch, R.** (1996). Deletion of integrin alpha 1 by homologous recombination permits normal murine development but gives rise to a specific deficit in cell adhesion. *Dev Biol* **175**, 301-13.
- Geisbrecht, E. R., Haralalka, S., Swanson, S. K., Florens, L., Washburn, M. P. und Abmayr, S. M.** (2008). Drosophila ELMO/CED-12 interacts with Myoblast city to direct myoblast fusion and ommatidial organization. *Dev Biol* **314**, 137-49.
- Georges-Labouesse, E., Mark, M., Messaddeq, N. und Gansmuller, A.** (1998). Essential role of alpha 6 integrins in cortical and retinal lamination. *Curr Biol* **8**, 983-6.
- Gildor, B., Massarwa, R., Shilo, B. Z. und Schejter, E. D.** (2009). The SCAR and WASp nucleation-promoting factors act sequentially to mediate Drosophila myoblast fusion. *EMBO Rep* **10**, 1043-50.
- Grashoff, C., Aszodi, A., Sakai, T., Hunziker, E. B. und Fassler, R.** (2003). Integrin-linked kinase regulates chondrocyte shape and proliferation. *EMBO Rep* **4**, 432-8.
- Gruenbaum-Cohen, Y., Harel, I., Umansky, K. B., Tzahor, E., Snapper, S. B., Shilo, B. Z. und Schejter, E. D.** (2012). The actin regulator N-WASp is required for muscle-cell fusion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 11211-6.
- Gullberg, D., Velling, T., Lohikangas, L. und Tiger, C. F.** (1998). Integrins during muscle development and in muscular dystrophies. *Front Biosci* **3**, D1039-50.
- Haralalka, S., Shelton, C., Cartwright, H. N., Katzfey, E., Janzen, E. und Abmayr, S. M.** (2011). Asymmetric Mbc, active Rac1 and F-actin foci in the fusion-competent myoblasts during myoblast fusion in Drosophila. *Development* **138**, 1551-62.
- Hollnagel, A., Grund, C., Franke, W. W. und Arnold, H. H.** (2002). The cell adhesion molecule M-cadherin is not essential for muscle development and regeneration. *Molecular and cellular biology* **22**, 4760-70.
- Humphries, J. D., Byron, A. und Humphries, M. J.** (2006). Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci* **119**, 3901-3.
- Hutcheson, D. A., Zhao, J., Merrell, A., Haldar, M. und Kardon, G.** (2009). Embryonic and fetal limb myogenic cells are derived from developmentally distinct progenitors and have different requirements for beta-catenin. *Genes Dev* **23**, 997-1013.
- Hynes, R. O.** (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-87.
- Innis, M. A. G., D. H.; Sninsky, J. J.; White, T. J.** (1989). PCR protocols: a guide to methods and applications.
- Jaffe, A. B. und Hall, A.** (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 247-69.

- Jagla, K., Dolle, P., Mattei, M. G., Jagla, T., Schuhbauer, B., Dretzen, G., Bellard, F. und Bellard, M.** (1995). Mouse Lbx1 and human LBX1 define a novel mammalian homeobox gene family related to the Drosophila lady bird genes. *Mech Dev* **53**, 345-56.
- Jansen, K. M. und Pavlath, G. K.** (2008). Molecular control of mammalian myoblast fusion. *Methods Mol Biol* **475**, 115-33.
- Kim, S., Shilagardi, K., Zhang, S., Hong, S. N., Sens, K. L., Bo, J., Gonzalez, G. A. und Chen, E. H.** (2007). A critical function for the actin cytoskeleton in targeted exocytosis of prefusion vesicles during myoblast fusion. *Dev Cell* **12**, 571-86.
- Kjoller, L. und Hall, A.** (1999). Signaling to Rho GTPases. *Exp Cell Res* **253**, 166-79.
- Koni, P. A., Joshi, S. K., Temann, U. A., Olson, D., Burkly, L. und Flavell, R. A.** (2001). Conditional vascular cell adhesion molecule 1 deletion in mice: impaired lymphocyte migration to bone marrow. *J Exp Med* **193**, 741-54.
- Kreidberg, J. A., Donovan, M. J., Goldstein, S. L., Rennke, H., Shepherd, K., Jones, R. C. und Jaenisch, R.** (1996). Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development* **122**, 3537-47.
- Lahmann, I.**, Konditionelle Mutagenese des Arp3-Gens in der Maus: Untersuchungen zur Funktion in der Skelettmuskulatur in vivo und in embryonalen Fibroblasten in vitro (Diss. Technische Universität Braunschweig 2012)
- Laurin, M., Fradet, N., Blangy, A., Hall, A., Vuori, K. und Cote, J. F.** (2008). The atypical Rac activator Dock180 (Dock1) regulates myoblast fusion in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 15446-51.
- Legate, K. R. und Fassler, R.** (2009). Mechanisms that regulate adaptor binding to beta-integrin cytoplasmic tails. *J Cell Sci* **122**, 187-98.
- Legate, K. R., Wickstrom, S. A. und Fassler, R.** (2009). Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev* **23**, 397-418.
- Lehmann, J. M., Riethmuller, G. und Johnson, J. P.** (1989). MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 9891-5.
- Luo, L., Liao, Y. J., Jan, L. Y. und Jan, Y. N.** (1994). Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: Drosophila Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes Dev* **8**, 1787-802.
- Malumbres, M. und Barbacid, M.** (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* **3**, 459-65.
- Massarwa, R., Carmon, S., Shilo, B. Z. und Schejter, E. D.** (2007). WIP/WASp-based actin-polymerization machinery is essential for myoblast fusion in Drosophila. *Dev Cell* **12**, 557-69.

- Mayer, U., Saher, G., Fassler, R., Bornemann, A., Echtermeyer, F., von der Mark, H., Miosge, N., Poschl, E. und von der Mark, K.** (1997). Absence of integrin alpha 7 causes a novel form of muscular dystrophy. *Nat Genet* **17**, 318-23.
- Mege, R. M., Goudou, D., Diaz, C., Nicolet, M., Garcia, L., Geraud, G. und Rieger, F.** (1992). N-cadherin and N-CAM in myoblast fusion: compared localisation and effect of blockade by peptides and antibodies. *Journal of cell science* **103 (Pt 4)**, 897-906.
- Milburn, M. V., Tong, L., deVos, A. M., Brunger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S. und Kim, S. H.** (1990). Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* **247**, 939-45.
- Mintz, B. und Baker, W. W.** (1967). Normal mammalian muscle differentiation and gene control of isocitrate dehydrogenase synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**, 592-8.
- Mukherjee, P., Gildor, B., Shilo, B. Z., VijayRaghavan, K. und Schejter, E. D.** (2011). The actin nucleator WASp is required for myoblast fusion during adult Drosophila myogenesis. *Development* **138**, 2347-57.
- Nishimura, T., Yamaguchi, T., Kato, K., Yoshizawa, M., Nabeshima, Y., Ohno, S., Hoshino, M. und Kaibuchi, K.** (2005). PAR-6-PAR-3 mediates Cdc42-induced Rac activation through the Rac GEFs STEF/Tiam1. *Nat Cell Biol* **7**, 270-7.
- Nobes, C. D. und 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.
- Nowak, S. J., Nahirney, P. C., Hadjantonakis, A. K. und Baylies, M. K.** (2009). Nap1-mediated actin remodeling is essential for mammalian myoblast fusion. *J Cell Sci* **122**, 3282-93.
- Osborn, L., Vassallo, C., Browning, B. G., Tizard, R., Haskard, D. O., Benjamin, C. D., Douglas, I. und Kirchhausen, T.** (1994). Arrangement of domains, and amino acid residues required for binding of vascular cell adhesion molecule-1 to its counter-receptor VLA-4 (alpha 4 beta 1). *J Cell Biol* **124**, 601-8.
- Ouhtit, A., Gaur, R. L., Abd Elmageed, Z. Y., Fernando, A., Thouta, R., Trappey, A. K., Abdraboh, M. E., El-Sayyad, H. I., Rao, P. und Raj, M. G.** (2009). Towards understanding the mode of action of the multifaceted cell adhesion receptor CD146. *Biochim Biophys Acta* **1795**, 130-6.
- Podbilewicz, B., Leikina, E., Sapir, A., Valansi, C., Suissa, M., Shemer, G. und Chernomordik, L. V.** (2006). The C. elegans developmental fusogen EFF-1 mediates homotypic fusion in heterologous cells and in vivo. *Developmental cell* **11**, 471-81.
- Potocnik, A. J., Brakebusch, C. und Fassler, R.** (2000). Fetal and adult hematopoietic stem cells require beta1 integrin function for colonizing fetal liver, spleen, and bone marrow. *Immunity* **12**, 653-63.

- Powell, G. T. und Wright, G. J.** (2011). Jamb and jamc are essential for vertebrate myocyte fusion. *PLoS Biol* **9**, e1001216.
- Powell, G. T. und Wright, G. J.** (2012). Do muscle founder cells exist in vertebrates? *Trends Cell Biol* **22**, 391-6.
- Price, L. S., Leng, J., Schwartz, M. A. und Bokoch, G. M.** (1998). Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Mol Biol Cell* **9**, 1863-71.
- Pujades, C., Guez-Guez, B. und Dunon, D.** (2002). Melanoma Cell Adhesion Molecule (MCAM) expression in the myogenic lineage during early chick embryonic development. *Int J Dev Biol* **46**, 263-6.
- Radice, G. L., Rayburn, H., Matsunami, H., Knudsen, K. A., Takeichi, M. und Hynes, R. O.** (1997). Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Developmental biology* **181**, 64-78.
- Ren, X. D., Kiosses, W. B. und Schwartz, M. A.** (1999). Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J* **18**, 578-85.
- Richardson, B. E., Beckett, K., Nowak, S. J. und Baylies, M. K.** (2007). SCAR/WAVE and Arp2/3 are crucial for cytoskeletal remodeling at the site of myoblast fusion. *Development* **134**, 4357-67.
- Riedl, J., Flynn, K. C., Raducanu, A., Gartner, F., Beck, G., Bosl, M., Bradke, F., Massberg, S., Aszodi, A., Sixt, M. und Wedlich-Soldner, R.** (2010). Lifeact mice for studying F-actin dynamics. *Nat Methods* **7**, 168-9.
- Rosen, G. D., Sanes, J. R., LaChance, R., Cunningham, J. M., Roman, J. und Dean, D. C.** (1992). Roles for the integrin VLA-4 and its counter receptor VCAM-1 in myogenesis. *Cell* **69**, 1107-19.
- Ruiz-Gomez, M., Coutts, N., Price, A., Taylor, M. V. und Bate, M.** (2000). *Drosophila* dumbfounded: a myoblast attractant essential for fusion. *Cell* **102**, 189-98.
- Russell, A. J., Fincher, E. F., Millman, L., Smith, R., Vela, V., Waterman, E. A., Dey, C. N., Guide, S., Weaver, V. M. und Marinkovich, M. P.** (2003). Alpha 6 beta 4 integrin regulates keratinocyte chemotaxis through differential GTPase activation and antagonism of alpha 3 beta 1 integrin. *J Cell Sci* **116**, 3543-56.
- Sah, V. P., Seasholtz, T. M., Sagi, S. A. und Brown, J. H.** (2000). The role of Rho in G protein-coupled receptor signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**, 459-89.
- Sapir, A., Choi, J., Leikina, E., Avinoam, O., Valansi, C., Chernomordik, L. V., Newman, A. P. und Podbilewicz, B.** (2007). AFF-1, a FOS-1-regulated fusogen, mediates fusion of the anchor cell in *C. elegans*. *Developmental cell* **12**, 683-98.
- Schafer, G., Weber, S., Holz, A., Bogdan, S., Schumacher, S., Muller, A., Renkawitz-Pohl, R. und Onel, S. F.** (2007). The Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) is essential for myoblast fusion in *Drosophila*. *Dev Biol* **304**, 664-74.

Schroter, R. H., Lier, S., Holz, A., Bogdan, S., Klambt, C., Beck, L. und Renkawitz-Pohl, R. (2004). kette and blown fuse interact genetically during the second fusion step of myogenesis in *Drosophila*. *Development* **131**, 4501-9.

Schwander, M., Leu, M., Stumm, M., Dorchies, O. M., Ruegg, U. T., Schittny, J. und Muller, U. (2003). Beta1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly. *Dev Cell* **4**, 673-85.

Sens, K. L., Zhang, S., Jin, P., Duan, R., Zhang, G., Luo, F., Parachini, L. und Chen, E. H. (2010). An invasive podosome-like structure promotes fusion pore formation during myoblast fusion. *J Cell Biol* **191**, 1013-27.

Shilagardi, K., Li, S., Luo, F., Marikar, F., Duan, R., Jin, P., Kim, J. H., Murnen, K. und Chen, E. H. (2013). Actin-propelled invasive membrane protrusions promote fusogenic protein engagement during cell-cell fusion. *Science* **340**, 359-63.

Sieber, M. A., Storm, R., Martinez-de-la-Torre, M., Muller, T., Wende, H., Reuter, K., Vasyutina, E. und Birchmeier, C. (2007). Lbx1 acts as a selector gene in the fate determination of somatosensory and viscerosensory relay neurons in the hindbrain. *J Neurosci* **27**, 4902-9.

Sohn, R. L., Huang, P., Kawahara, G., Mitchell, M., Guyon, J., Kalluri, R., Kunkel, L. M. und Gussoni, E. (2009a). A role for nephrin, a renal protein, in vertebrate skeletal muscle cell fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 9274-9.

Sohn, R. L., Huang, P., Kawahara, G., Mitchell, M., Guyon, J., Kalluri, R., Kunkel, L. M. und Gussoni, E. (2009b). A role for nephrin, a renal protein, in vertebrate skeletal muscle cell fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 9274-9.

Soriano P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* **21**: 70-1.

Srinivas, B. P., Woo, J., Leong, W. Y. und Roy, S. (2007). A conserved molecular pathway mediates myoblast fusion in insects and vertebrates. *Nat Genet* **39**, 781-6.

Srinivasan, L., Sasaki, Y., Calado, D. P., Zhang, B., Paik, J. H., DePinho, R. A., Kutok, J. L., Kearney, J. F., Otipoby, K. L. und Rajewsky, K. (2009). PI3 kinase signals BCR-dependent mature B cell survival. *Cell* **139**, 573-86.

Strunkelnberg, M., Bonengel, B., Moda, L. M., Hertenstein, A., de Couet, H. G., Ramos, R. G. und Fischbach, K. F. (2001). rst and its paralogue kirre act redundantly during embryonic muscle development in *Drosophila*. *Development* **128**, 4229-39.

Taverna, D., Disatnik, M. H., Rayburn, H., Bronson, R. T., Yang, J., Rando, T. A. und Hynes, R. O. (1998). Dystrophic muscle in mice chimeric for expression of alpha5 integrin. *J Cell Biol* **143**, 849-59.

Tomasevic, N., Jia, Z., Russell, A., Fujii, T., Hartman, J. J., Clancy, S., Wang, M., Beraud, C., Wood, K. W. und Sakowicz, R. (2007). Differential regulation of WASP and N-WASP by Cdc42, Rac1, Nck, and PI(4,5)P2. *Biochemistry* **46**, 3494-502.

- Vasyutina, E., Martarelli, B., Brakebusch, C., Wende, H. und Birchmeier, C.** (2009). The small G-proteins Rac1 and Cdc42 are essential for myoblast fusion in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8935-40.
- Vetter, I. R. und Wittinghofer, A.** (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**, 1299-304.
- Wang, S., Watanabe, T., Matsuzawa, K., Katsumi, A., Kakeno, M., Matsui, T., Ye, F., Sato, K., Murase, K., Sugiyama, I., Kimura, K., Mizoguchi, A., Ginsberg, M. H., Collard, J. G. und Kaibuchi, K.** (2012). Tiam1 interaction with the PAR complex promotes talin-mediated Rac1 activation during polarized cell migration. *The Journal of cell biology* **199**, 331-45.
- Wu, X., Quondamatteo, F., Lefever, T., Czuchra, A., Meyer, H., Chrostek, A., Paus, R., Langbein, L. und Brakebusch, C.** (2006). Cdc42 controls progenitor cell differentiation and beta-catenin turnover in skin. *Genes Dev* **20**, 571-85.
- Yang, J. T., Rando, T. A., Mohler, W. A., Rayburn, H., Blau, H. M. und Hynes, R. O.** (1996). Genetic analysis of alpha 4 integrin functions in the development of mouse skeletal muscle. *J Cell Biol* **135**, 829-35.
- Zeschnigk, M., Kozian, D., Kuch, C., Schmoll, M. und Starzinski-Powitz, A.** (1995). Involvement of M-cadherin in terminal differentiation of skeletal muscle cells. *Journal of cell science* **108 (Pt 9)**, 2973-81.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den Schriften wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Außerdem erkläre ich, dass diese Promotion noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegt oder veröffentlicht wurde und dass ich solche Veröffentlichungen vor Abschluss der Promotion nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt.

Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Carmen Birchmeier betreut worden.

Claudia Raßek