

# Inaugural-Dissertation

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Diplom-Biologe Oliver Henschel  
aus Münster

Tag der mündlichen Prüfung:.....

**Funktion der muskelspezifischen Kinase MuSK:  
Analyse durch konditionale Inaktivierung  
im transgenen Tiermodell**

Gutachter: Prof. Dr. G. Elisabeth Pollerberg  
PD Dr. Veit Witzemann

# Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Veit Witzemann für die Überlassung des Themas, sowie für seine fortwährende Unterstützung und Diskussionsbereitschaft bedanken. Er gab mir so zu jeder Zeit Anleitungen und die Freiheiten, diese Arbeit durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Bert Sakmann danke ich für sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit und seine Bereitschaft mir die Theorie der Elektrophysiologie näher zu bringen.

Bei Prof. Dr. G. Elisabeth Pollerberg möchte ich mich für ihr Interesse an dieser Arbeit bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Koenen, für seine Anregungen und Tipps sowie die lohnenden Diskussionen.

Ein besonderer Dank gilt Karina Bahrenhoff und Daniela Durst, die mir viel Arbeit bei der Genotypisierung meiner Mäuse und RNA-Präparation abgenommen haben. Boris Hesser gilt mein Dank, da er die Grundlage für diese Arbeit gelegt und mit Tipps und Anregungen zum Fortgang dieser Arbeit beigetragen hat.

Ein grosses Dankeschön für fortwährende Unterstützung, ein angenehmes Arbeitsklima und die gute Laune im Labor gilt natürlich allen „Mollies“, namentlich Michaela Bauer, Dagmar Gross, Ulrike Mersdorf, Mahmud Monem, Sandra Nickel, Patrick Opherk, Anna Pekala, Jan Rathenberg, Wolfram Schleich, Tatjana Schweizer, Verena Wimmer, Peter Yampolsky und Jörg Zehelein.

Im besonderen bedanke ich mich bei Tae Eun Jin für die Hilfe bei der Muskeluntersuchung, sowie bei Dr. Christoph Peter, der mir sehr bei der Fertigstellung dieser Arbeit geholfen hat.

Ein Dank gilt auch Dr. Jaap J. Plomp in Leiden, der mich bei den elektrophysiologischen Messungen unterstützt hat und, sowie Dr. Willem Tichelaar für die Hilfe bei der Elektronenmikroskopie.

Für hilfreiche Anmerkungen und Unterstützung möchte ich mich auch bei Dr. Randy Bruno, Dr. Dirk Feldmeyer, Dr. Thomas Kuner, Dr. Thomas Nevian und Dr. Jack Walters bedanken.

Weiterhin danke ich auch allen nicht namentlich genannten Kollegen und Kolleginnen der Abteilung Zellphysiologie, und allen anderen Mitarbeiter am MPIImF, die zum guten Arbeitsklima und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ebenfalls sei allen Freunden gedankt, die mich immer unterstützt und motiviert haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern, die immer Vertrauen in mich haben und jederzeit für mich da sind.

für Angelika, Wolfgang,  
David und Peter



## Zusammenfassung

In der Entwicklung der neuromuskulären Synapse (NMJ) spielt die muskelspezifische Kinase (MuSK) eine zentrale Rolle. Die Expression der Acetylcholinrezeptoren (AChR) ist in den Muskelfasern während der Embryonalphase von MuSK abhängig, so dass MuSK-defiziente Tiere keine NMJ entwickelt haben und bei der Geburt sterben. Diese Ergebnisse erlauben jedoch keine Aussage darüber, welchen Einfluss MuSK auf die etablierte NMJ besitzt.

Zur Klärung dieser Fragestellung wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Mauslinie (MuSK/Cre) etabliert und analysiert, in der mit Hilfe des Cre-loxP-Systems eine postnatale Inaktivierung von MuSK erreicht wird. Diese Tiere sind bei Geburt lebensfähig und besitzen normal etablierte NMJ. Ab der dritten Woche entwickeln sie jedoch eine progressive Muskelschwäche, die vor Erreichen des 30. Lebensstags (P30) zum Tode führt. Histologische Untersuchungen zeigen, dass es in diesen Tieren zu einem Auflösen der etablierten NMJ kommt, da die Inaktivierung von MuSK zu einem Verlust von AChR und zum Verschwinden der subsynaptischen Kerne führt. Darüber hinaus zeigen die innervierenden Motoneurone ein extensives Wachstum und verstärktes Verzweigen, sowie atypische Innervierungen der Synapsen. Eine daraus resultierende gestörte Transmission konnte durch elektrophysiologische Analysen belegt werden. Als Reaktion auf diese gestörte Verbindung zwischen Neuron und Muskel ändert sich in den MuSK/Cre-Tieren die Faserzusammensetzung der Muskeln. Neben dem Auflösen der etablierten NMJ kann in den MuSK/Cre-Tieren auch eine Neubildung von NMJ beobachtet werden. Da es in der Entwicklung der NMJ zu einem Untereinheiten austausch in den AChR kommt, wurde die Expressionen der fötalen  $\gamma$ - als auch der adulten  $\epsilon$ AChR-Untereinheit und von MuSK gemessen. Die Expression der  $\gamma$ AChR-Untereinheit ist ebenso wie die Expression von MuSK signifikant verstärkt, während die Expression der  $\epsilon$ AChR leicht reduziert ist. Durch die Generierung und Analyse der Mauslinie MuSK/Cre: $\gamma$ GFP konnte eine Synthese der  $\gamma$ AChR-Untereinheit festgestellt werden, doch war es histologisch und elektrophysiologisch nicht möglich deren Einbau in die NMJ nachzuweisen.

Neben der Generation der MuSK/Cre-Tiere wurde in der vorliegenden Arbeit auch eine Methode etabliert, in Muskelfasern einen Knock-Down von synapsenspezifischen Proteinen mit Hilfe der Einzelfaserinjektion von siRNA-codierenden Plasmiden zu erreichen. So konnte eine Beteiligung von Dvl und PAK an der Erhaltung der Struktur der NMJ bewiesen werden.

Zusammengefasst konnte mit den MuSK/Cre-Tieren die essentielle Funktion von MuSK für der Struktur- und Funktionserhaltung der NMJ nachgewiesen werden. Da es in diesen Tieren zu einem gleichzeitigem Auflösen und Neu-etablierung von NMJ kommt, können diese Tiere in Zukunft auch weitere Einblicke in die molekularen und zellulären Mechanismen dieser Prozesse geben. Auch könnte das extensive Wachstum der Motoneurone eine genauere Analyse der dazu notwendigen Faktoren und Bedingungen erlauben. Darüber hinaus ist es möglich, die MuSK/Cre-Maus als ein Modell für einige myasthenische Syndrome zu verwenden, da gefundene Fälle von Myasthenie in Menschen auf eine Reduktion von MuSK durch Autoimmun-Antikörper beruhen. Zusätzlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass mit einer Einzelfaserinjektion von siRNA-codierenden Plasmiden die Untersuchung synapsenspezifischer Proteinen gezielt untersucht werden können.

## Summary

The muscle specific kinase (MuSK) plays a crucial role in development of the neuromuscular junction (NMJ). The expression of the nicotinic acetylcholine receptors (AChR) in the embryonic muscle fibers depends on the activity of MuSK. Thus MuSK-deficient mice die directly after birth because of the lack of established NMJ. Nevertheless, the role of MuSK in an adult NMJ still remains unclear.

To resolve these questions in this work a mouse line (Musk/Cre) was established and analyzed, where MuSK was conditionally inactivated by use of the Cre-loxP system. These mice are healthy and viable at birth and show normally developed NMJ. But from the third week on they develop severe muscle weakness leading to death before postnatal day 30. Their NMJ revealed structural changes and finally disappear which could be observed by histological analysis. In addition the motoneurons show extensive growth and sprouting and atypical innervations of the synapses. Multiple innervated synapses were detected with immunohistochemistry and electrophysiological methods. Probably, as a consequence of alterations in neuronal stimulation the muscles changed their fiber type composition. With the loss of established NMJ formation of new synapses can be observed in MuSK/Cre mice. In this respect it was of interest to analyze the subunit composition of the AChR with regard to the expression of the fetal  $\gamma$ - and adult  $\epsilon$ AChR subunits. The results show that the expression of  $\gamma$ AChR subunit and MuSK is significantly increased, while the expression of the  $\epsilon$ AChR subunit is slightly reduced. By generating and analyzing the mouse line MuSK/Cre: $\gamma$ GFP the synthesis of the  $\gamma$ AChR subunit could be verified, but its incorporation in the NMJ was not detectable by histological and electrophysiological analysis.

In addition a method was established, where in single muscle fibres a knock down of synapse specific proteins can be achieved by injection of plasmids encoding for specific siRNA. With this method the contribution of the Dvl and PAK in the MuSK-signalling pathway to the maintenance of postsynaptic structure of the NMJ was confirmed.

In summary the results show, that MuSK is not only necessary for development, but is also essential for maintenance and proper function of established NMJ. Because of simultaneously disappearances and new forming of NMJ in muscles of the MuSK/Cre mice, it would be possible to use these mice to obtain more deep insights into molecular and cellular mechanism of these processes. Also the extensive growth of motoneurons could be used to examine the required factors and their influence. This mouse line can furthermore serve as a model organism for specific myasthenic syndromes, because some human patients exhibit MuSK specific autoimmune antibodies resulting in muscle weakness.

Additionally in this work it could be shown, that injection of siRNA encoding plasmids can be used as a tool to analyze the function synapse specific proteins.

# I Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG .....	4
SUMMARY.....	5
I INHALTSVERZEICHNIS .....	6
II ABKÜRZUNGEN .....	9
III EINLEITUNG.....	11
III.1 DIE NEUROMUSKULÄRE SYNAPSE .....	11
III.1.1.1 Aufbau und Funktion der NMJ .....	11
III.1.1.2 Der nikotische Acetylcholinrezeptor (AChR).....	12
III.1.1.3 Das Endplatten- und Aktionspotential .....	12
III.1.1.4 Das Miniature Endplate Potential (MEPP) .....	12
III.1.1.5 Die Muskelkontraktion.....	13
<i>III.1.2 Entwicklung der NMJ.....</i>	<i>13</i>
III.1.2.1 Das Prepatterning .....	14
III.1.2.2 Agrin und die muskelspezifische Kinase (MuSK).....	15
III.1.2.3 MuSK-abhängige Signalkaskaden .....	17
III.1.2.4 Regulation der subsynaptischen Transkription .....	18
III.1.2.5 Innervierung und Synapsen-Eliminierung .....	20
III.2 GENERIERUNG TRANSGENER TIERE .....	22
III.3 DAS CRE-LOXP-SYSTEM .....	23
III.4 GEN-INAKTIVIERUNG DURCH RNA INTERFERENCE.....	23
III.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....	24
IV ERGEBNISSE.....	26
IV.1 GENERIERUNG UND GENOTYPISIERUNG DER TIERE $MUSK^{LOXP/-};CRE$ BZW. $MUSK^{LOXP/LOXP};CRE$ .....	26
IV.2 NACHWEIS DER CRE-AKTIVITÄT IN MUSKELGEWEBE DURCH EIN LACZ-REPORTERGEN .....	29
IV.3 NACHWEIS DES DER CRE-VERMITTELTEN REKOMBINATION DURCH KOMPETITIVE PCR	30
IV.4 PHÄNOTYPISCHE VERÄNDERUNG DER $MUSK/CRE$ - TIERE .....	32
IV.4.1 Körperliche Veränderung der $MuSK/Cre$ -Tiere .....	32
IV.4.2 Messungen des Körpergewichts .....	33
IV.4.3 Messung der Muskelkraft .....	34
IV.4.4 Analyse der Fasertypen im Soleusmuskel.....	35
IV.5 ANALYSE MORPHOLOGISCHER UND FUNKTIONELLER VERÄNDERUNGEN DER NMJ .....	37
IV.5.1 Anzahl und Verteilung und der NMJ im Diaphragma.....	37
IV.5.2 Analyse der Synapsengrösse.....	40
IV.5.3 Postnatale Neubildung von Synapsen .....	41
IV.5.4 Untersuchungen der präsynaptischen Veränderung.....	41
IV.5.4.1 Analyse der Innervierung.....	42
IV.5.4.2 Visualisierung des präsynaptischen Markerproteins Synaptophysin.....	44
IV.5.5 Untersuchungen der postsynaptischen Veränderungen .....	47
IV.5.5.1 Nachweis des Verlustes von MuSK an der NMJ.....	47
IV.5.5.2 Visualisierung des postsynaptischen Proteins Rapsyn.....	48
IV.5.5.3 Einfluss der Inaktivierung von MuSK auf das Transkriptionsverhalten synapsenspezifischer Proteine.....	49
IV.5.5.4 Lokalisation der subsynaptischen Kerne.....	52

IV.5.5.5 Ultrastrukturelle Veränderungen.....	54
IV.5.6 <i>Elektrophysiologische Untersuchungen an Hemidiaphragmen</i> .....	56
IV.5.6.1 MEPPs.....	56
IV.5.6.2 EPPs.....	57
IV.5.6.3 Schnellere Abnahme der EPP-Amplitude bei 20-Hz-Stimulation.....	58
IV.5.6.4 Elektrophysiologischer Nachweis multipler Innervierungen.....	59
IV.5.6.5 MEPCs.....	60
IV.6 GENERIERUNG UND ANALYSE DER TIERE MUSK/Cre:γGFP.....	61
IV.6.1 <i>Phänotyp der MuSK/Cre:γGFP-Tieren</i> .....	62
IV.6.2 <i>Nachweis von γAChR-GFP in adulten MuSK/Cre:γGFP-Tieren</i> .....	62
IV.7 ANALYSE VON MUSK, DVL, PAK DURCH siRNAs.....	64
IV.7.1 <i>Herstellung der siRNA-codierenden Plasmide</i> .....	64
IV.7.2 <i>Auswertung der erfolgten Injektionen</i> .....	65
IV.7.2.1 nGFP.....	65
IV.7.2.2 Dvl.....	66
IV.7.2.3 MuSK.....	67
IV.7.2.4 PAK.....	67
<b>V DISKUSSION .....</b>	<b>69</b>
V.1 MUSK <sup>LoxP/LoxP</sup> BZW. MUSK <sup>LoxP/-</sup> -TIERE BESITZEN NORMALE NMJ.....	69
V.2 DIE CRE-EXPRESSION IST DEN MUSKELN UND EINZELNEN MUSKELFASERN MOSAIKARTIG UND ZEITLICH VERSCHIEDEN.....	70
V.3 MUSK/CRE-TIERE ENTWICKELN PROGRESSIVE MUSKELSCHWÄCHE.....	71
V.4 POSTSYNAPTISCHE VERÄNDERUNG DER NMJ.....	72
V.5 ELIMINIERUNG UND NEUBILDUNG VON NMJ IN MUSK/CRE-TIEREN.....	74
V.6 VERÄNDERTE EXPRESSION DER AChR-UNTEREINHEITEN IN MUSK/CRE-TIEREN.....	75
V.7 DIE INNERVIERUNG UND DAS WACHSTUM DER MOTORNEURONE IST IN DEN MUSK/CRE-TIEREN GESTÖRT.....	77
V.8 DIE γAChR-UNTEREINHEIT KANN IN DEN NEU GEBILDETEN SYNAPSEN NICHT NACHGEWIESEN WERDEN.....	78
V.9 VERÄNDERUNGEN DER MUSKELZUSAMMENSETZUNG DURCH INAKTIVIERUNG VON MUSK.....	80
V.10 EINZELFASERINJEKTION VON siRNA-CODIERENDEN PLASMIDEN.....	81
V.11 MUSK ALS URSACHE MYASTHENISCHER SYNDROME.....	82
V.12 AUSBLICK.....	83
<b>VI MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>84</b>
VI.1 MATERIAL.....	84
VI.1.1 <i>Chemikalien</i> .....	84
VI.1.2 <i>Allgemeine Lösungen:</i> .....	84
VI.2 ENZYME.....	84
VI.3 POLYMERASEN.....	84
VI.4 PRIMER UND OLIGONUKLEOTIDE.....	85
VI.4.1 <i>PCR-Primer:</i> .....	85
VI.4.2 <i>Oligonukleotide:</i> .....	85
VI.4.3 <i>Kit-Systeme</i> .....	86
VI.4.4 <i>Größenmarker</i> .....	86
VI.4.4.1 <i>DNA:</i> .....	86
VI.4.4.2 <i>Protein:</i> .....	87
VI.4.5 <i>Sonstige Medien und Materialien</i> .....	87
VI.4.6 <i>Antikörper und Toxine</i> .....	87

<i>VI.4.7 Geräte</i> .....	88
<i>VI.4.8 Software</i> .....	89
<b>VI.5 METHODEN</b> .....	89
<i>VI.5.1 Molekularbiologische Standardmethoden</i> .....	89
VI.5.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> .....	90
VI.5.1.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen und PCR-Produkten .....	90
VI.5.1.3 Isolierung genomischer DNA aus Muskelgewebe.....	90
VI.5.1.4 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien.....	90
VI.5.1.5 DNA-Sequenzierung.....	90
VI.5.1.6 PCR-Analysen genomischer DNA.....	91
VI.5.1.7 Kompetitive PCR .....	92
VI.5.1.8 Isolierung von RNA aus Muskelgewebe .....	92
VI.5.1.9 Herstellung von cDNA mit Hilfe der RT-PCR.....	93
VI.5.1.10 Real Time-PCR.....	93
<i>VI.5.2 Biochemische Methoden</i> .....	94
VI.5.2.1 Isolierung von Proteinen aus Muskelgewebe.....	94
VI.5.2.2 Western-Blot .....	94
<i>VI.5.3 Histologische Methoden</i> .....	95
VI.5.3.1 Isolierung von Muskelgewebe .....	95
VI.5.3.2 Immunhistochemische Färbung von Diaphragmen .....	95
VI.5.3.3 Herstellung von Gefrierschnitten .....	96
VI.5.3.4 ATP-Färbung .....	96
VI.5.3.5 LacZ-Färbung.....	97
VI.5.3.6 Einzelfaserinjektion .....	97
<i>VI.5.4 Mikroskopische Methoden</i> .....	98
VI.5.4.1 Konfokale Mikroskopie .....	98
VI.5.4.2 Elektronenmikroskopie .....	98
<i>VI.5.5 Elektrophysiologie</i> .....	99
VI.5.5.1 Messungen der MEPPs und EPPs.....	99
VI.5.5.2 Messungen der MEPCs.....	100
<i>VI.5.6 Kraftmessung der Vorderextremitäten</i> .....	100
<b>VII REFERENZEN</b> .....	<b>101</b>

## II Abkürzungen

A		GAPDH	Glyceraldehy-3-Phosphat Dehydrogenase
Abb.	Abbildung	GDNF	glia cell derives neurotrophic factor
abs.	absolut	GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
ACh	Acetylcholin	H	
AChE	Acetylcholinesterase	h	Stunde
AChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor	HRP	Horseradish-Peroxidase
AP	Aktionspotential	I	
ATP	Adenosintriphosphat	IgG	Immunglobulin
B		K	
Btx-rh	$\alpha$ Bungarotoxin-Rhodamin	kb	Kilobasenpaar
bp	Basenpaar	kDa	Kilodalton
BSA	Bovine Serum Albumin	KO	Knock Out
bzw.	beziehungsweise	L	
C		l	Liter
Ca	Calcium	M	
ChAT	Cholin-Acetyltransferase	mg	Milligram
Cl	Chlorid	M	molar
CMS	congenitales myasthenisches Syndrom	MCK	Muskelcreatinkinase
D		Mg	Magnesium
DAPI	4',6-Diamidino-2- phenylindole	MEPC	miniature endplate current
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure	MEPP	miniature endplate potential
dNTP	Desoxy- Nukleotridtriphosphat	min	Minute
DTT	Dithiotreitrol	ml	Milliliter
Dvl	Dishevelled	mM	millimolar
E		ms	Millisekunde
E	embryonaler Tag	mRNA	messenger RNA
<i>E.coli</i>	Escherichia coli	Musk	muskelspezifische Kinase
EDTA	Ethylendiamin-tetra- Essigsäure	mV	Millivolt
EM	Elektronenmikroskop	N	
EPP	evoked endplate potential	n	Anzahl
ES-Zellen	embryonale Stammzellen	N	Newton
EtBr	Ethidiumbromid	nA	Nanoampere
F		Na	Natrium
FA	Formaldehyd	Neo	Neomycin-phosphotransferase
G		ng	Nanogramm
g	Gramm	nl	Nanoliter
		NMJ	neuromuscular junction

## Abkürzungen

---

P		Tris	N-tris-hydroxymethylamino-methan
P	postnataler Tag		
P	Phosphor		
PAK	p21-activated Kinase	U	
PBS	phosphat buffered saline	ÜN	über Nacht
PCR	polymerase chain reaction		
PFA	Paraformaldehyd	W	
		WT	Wildtyp
R			
RNA	Ribonukleinsäure	Z	
RT	Raumtemperatur	z.B.	zum Beispiel
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction	$\gamma$ AChR	fetaler Acetylcholinrezeptor
		$\epsilon$ AChR	adulter Acetylcholinrezeptor
S			
s	Sekunde	$\tau$	Abfallzeitkonstante Tau
siRNA	small interfering RNA	$\mu$ g	Mikrogramm
		$\mu$ l	Mikroliter
T			
Tab.	Tabelle		

## **III Einleitung**

Für einen Organismus ist es lebensnotwendig, die Reize aus der Umwelt zu registrieren und auf sie angemessen reagieren zu können. Für die Signalaufnahme, deren Weiterleitung und Verarbeitung hat sich im Laufe der Evolution das Nervengewebe der Tiere entwickelt, das aus unterschiedlichen hochspezialisierten Zelltypen besteht.

### **III.1 Die neuromuskuläre Synapse**

Die Kontaktstelle zwischen dem Muskel und dem innervierenden Motoneuron wird als neuromuskuläre Synapse (engl. neuromuscular junction, NMJ) bezeichnet. Jede Muskelfaser ist im adulten Tier nur von einem Motoraxon innerviert und kann daher als ein einfaches Modell für neuronale Verschaltung dienen. Sie ist aufgrund ihrer peripheren Lage zudem leicht zugänglich und mit 50 µm Durchmesser etwa 100 mal grösser als die neuronalen Synapsen im Gehirn. Aus diesen Gründen ist die NMJ im Laufe der Jahrzehnte die am besten untersuchte chemische Synapse in Wirbeltieren geworden.

#### ***III.1.1 Aufbau und Funktion der NMJ***

Die NMJ wird durch das präsynaptische Nervenende, die postsynaptische Muskelfaser und durch die terminale Schwann'sche Zelle gebildet. Die Nervenendigung und die Muskelfasermembran begrenzen dabei den synaptischen Spalt, in der sich die Basallamina befindet. In diesem Spalt wird vom Nerv der Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) ausgeschüttet, das an die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (AChR) in der postsynaptischen Membran bindet. Anschliessend wird es durch die in der Basallamina befindliche Acetylcholinesterase gespalten und inaktiviert. Die postsynaptische Membran ist durch in die Muskelfaser hineinragende Einfaltungen gekennzeichnet. An den Rändern dieser Einfaltungen liegen die Acetylcholinrezeptoren, während in den Tälern die spannungsabhängigen Na<sub>v</sub>1.4-Kanäle zu finden sind.



### ***III.1.2 Der nikotinische Acetylcholinrezeptor (AChR)***

Der AChR ist ein pentamerer Glycoprotein und besteht in der Embryonalphase aus zwei  $\alpha$ - und je einer  $\beta$ -,  $\delta$ - und  $\gamma$ - Untereinheit. Die N-terminalen Enden der  $\alpha$ -Untereinheiten bilden jeweils mit den N-Terminalen Bereichen der  $\delta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit die Bindestellen für ACh. Wenn je ein Molekül ACh an diese beiden Bindestellen gebunden hat, öffnet sich der Ionenkanal, der jeweils von der zweiten Membrandomäne (M2) der Untereinheiten gebildet wird (FATT, P. et al., 1951; Miyazawa, A. et al., 2003; Fuchs, S. et al., 2003). Im Laufe der perinatalen Entwicklung wird die fötale  $\gamma$ -Untereinheit durch die adulte  $\varepsilon$ -Untereinheit ersetzt, was in Mäusen etwa zwei Wochen nach der Geburt abgeschlossen ist (FATT, P. et al., 1951; Sakmann, B. et al., 1978; Witzemann, V. et al., 1987; Witzemann, V. et al., 1989; Witzemann, V. et al., 1991; Kues, W. A. et al., 1995). Durch diesen  $\gamma/\varepsilon$ -Austausch verändern sich die elektrophysiologischen Eigenschaften des Rezeptors, indem die Kanalöffnungszeiten abnimmt, sich die Leitfähigkeit und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität aber erhöhen (FATT, P. et al., 1951; Mishina, M. et al., 1986; Villarroel, A., 1996).

### ***III.1.3 Das Endplatten- und Aktionspotential***

Die Signalübertragung vom Nerv auf die Muskelfaser erfolgt über ACh, das in den Vesikeln innerhalb der Nervenendigung gespeichert wird. Trifft dort ein Aktionspotential ein, wird es an den aktiven Zonen der präsynaptischen Membran in den synaptischen Spalt sezerniert. An der postsynaptischen Membran bindet es an die AChR, was einen zeitlich begrenzten Einstrom von Kationen bewirkt. Hierdurch entsteht eine kurzzeitige Depolarisation der Membran, die sich bis in die Tiefen der Membraneinfaltungen fortsetzt (FATT, P. et al., 1951). Überschreitet dieser Spannungsabfall einen bestimmten Schwellenwert, so öffnen sich die hier liegenden  $\text{Na}_v1.4$ -Kanäle und verstärken die Membrandepolarisation, so dass ein Aktionspotential (Evoked Endplate Potential, EPP) entsteht.

### ***III.1.4 Das Miniature Endplate Potential (MEPP)***

Neben einem EPP kann es an der neuromuskulären Synapse zu spontanen Depolarisationen von 0,5 – 1 mV der Membran kommen, die jedoch zu schwach sind

um ein Aktionspotential auszulösen. Daher werden diese Ereignisse, die zuerst von Katz und Kollegen beschrieben wurden, „miniature endplate potentials (MEPP) genannt (FATT, P. et al., 1952). Sie werden im Ruhezustand ungefähr einmal pro Sekunde durch spontane Ausschüttung eines Vesikels von dem Nervenende hervorgerufen. Dadurch werden etwa 5000 Moleküle ACh freigesetzt, die ein MEPP auslösen und als Transmitterquant bezeichnet werden (KATZ, B. et al., 1967). Im Gegensatz dazu werden bei einer Stimulation des Neurons ungefähr 150 Quanten von dem Nervenende ausgeschüttet, was dann zu einem EPP führt (DEL CASTILLO, J. et al., 1954; Colquhoun, D. et al., 1998).

### ***III.1.5 Die Muskelkontraktion***

Das lokal erzeugte Aktionspotential wandert beidseits entlang der Fasermembran, bis es auf die Einstülpungen (Transversale Tubuli; T-Tubuli) trifft. Die hier liegenden spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle ändern ihre Konformation und aktivieren die mit ihnen assoziierten Ryanodinrezeptoren im sarkoplasmatischen Reticulum. Hierdurch kommt es zu einem plötzlichem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Das  $\text{Ca}^{2+}$  bindet an Troponin C und dieses gibt daraufhin die Bindungsstelle von Aktin für Myosin frei. Unter ATP-Verbrauch kann nun Myosin am Aktinfilament entlangwandern, und es kommt zu einer Muskelkontraktion.

### ***III.1.6 Entwicklung der NMJ***

Die Entwicklung der NMJ ist eine Serie von komplexen Interaktionen der drei unterschiedlichen Zellen, aus denen die NMJ aufgebaut ist. Die Entwicklung beginnt ab dem 12. Tag der Embryonalentwicklung (E12) und ist erst um den 15. postnatalen Tag (P15) abgeschlossen. In deren Verlauf kommt es dabei zu wesentlichen Veränderungen auf molekularer und morphologischer Ebene (Abb. I). Die Struktur der NMJ beginnt sich herauszubilden, indem sich AChR und andere synaptische Proteine konzentrieren und unter dieser Stelle Kerne der Muskelfaser akkumulieren (Couteaux, R., 1973). Anfangs besitzt eine neu gebildete Synapse eine runde undifferenzierte Struktur und ist von mehreren Motoaxonen innerviert. Im Laufe der Entwicklung kommt es zu Einfaltungen der postsynaptischen Membran und die NMJ differenziert zu einer

„Brezel“-Struktur. Zusätzlich ziehen sich die Neurone zurück, so dass schliesslich nur ein Axon die Synapse innerviert (Sanes, J. R. et al., 2001).

### ***III.1.6.1 Das Prepatterning***

Am elften Tag der Embryonalentwicklung entstehen durch Fusion von Myoblasten multinukleäre Zellen, aus denen sich dann die einzelnen Muskelfasern herausbilden. Einen Tag später beginnen die Motoneuronen die Muskelfasern zu innervieren. Bevor dies jedoch geschieht, kommt es in der Mitte der Fasern zu einer Konzentration von AChR und Neuregulin. Es konnte gezeigt werden, dass dieser als „Prepatterning“ bezeichneter Vorgang unabhängig vom Motoaxon oder von neuronalen Faktoren ist, aber von der Aktivität der muskelspezifischen Kinase MuSK abhängig ist (Lin, W. et al., 2001; Yang, X. et al., 2001). Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass die Funktion des fötalen  $\gamma$ AChR einen Einfluss auf dieses Prepatterning hat (Dr. Koenen, persönliche Mitteilung), doch sind die weiteren molekularen Mechanismen bisher unklar.

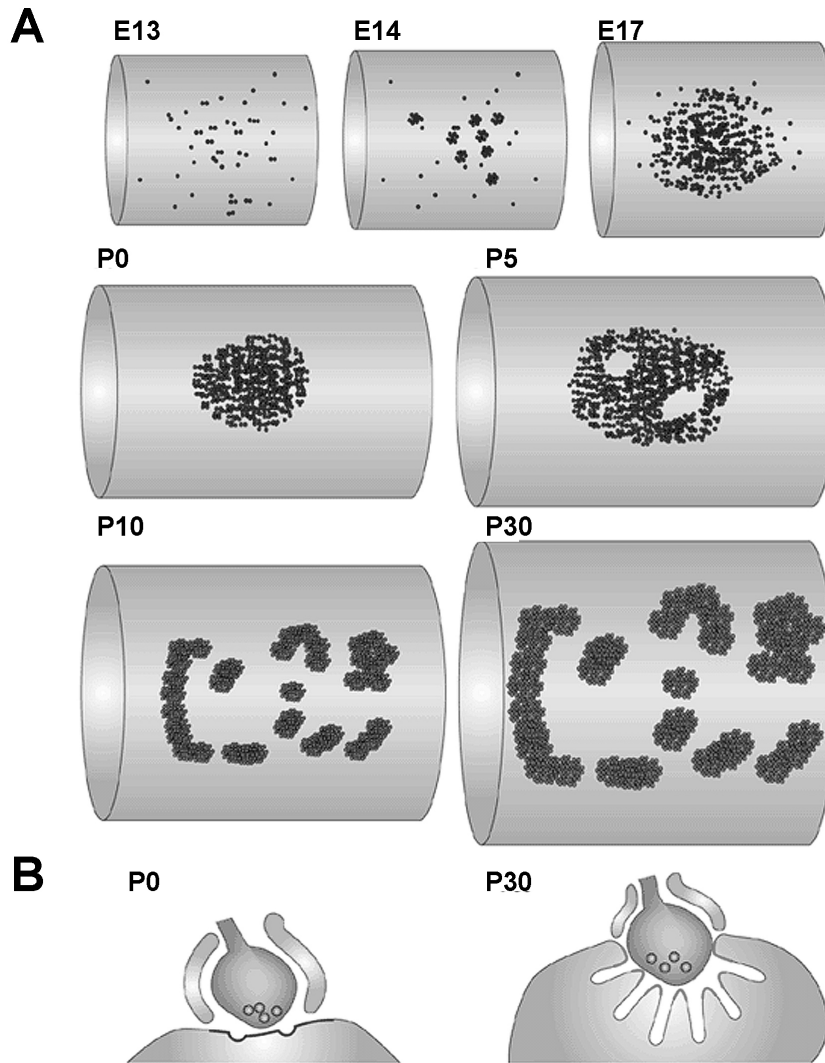


Abb. I: Entwicklung der NMJ

(A) AChR bilden kleine Mikroaggregate, die sich im Verlauf der Entwicklung weiter zusammenlagern und verdichten (E13 – E17). Bei P0 besitzen die NMJ eine runde und kompakte Struktur. Diese differenziert sich weiter zur Bretzel-Struktur, die zusammen mit der Muskelfaser wächst (P10 – P30). (B) Während der postnatalen Entwicklung bilden sich die postsynaptischen Einfaltungen aus. (aus: Sanes, J. R. et al., 2001)

### III.1.6.2 Agrin und die muskelspezifische Kinase (MuSK)

Bei der Suche nach Faktoren, die für die Entwicklung der NMJ verantwortlich sind, wurde aus dem elektrischem Organ des *Torpedo californica* das Proteoglycan Agrin isoliert (Nitkin, R. M. et al., 1987). Es ist ein 200 kDa grosses Proteoglycan, das vom Nervenende sezerniert wird und sich in die Basallamina des synaptischen Spaltes einlagert. Agrin kann postsynaptische Differenzierungen stimulieren und ist für die

Entwicklung und Stabilität der NMJ notwendig. Dies konnte anhand von Agrin-Knock-Out-Mäusen gezeigt werden, in deren Muskeln es nur in wenigen Fasern zu einer Akkumulation von AChR kommt (McMahan, U. J., 1990; Jones, G. et al., 1997). Zwar wird Agrin auch von anderen Zelltypen, wie unter anderem von Muskelzellen in anderen Splicevarianten produziert, doch besitzt ausschliesslich die neuronale Z<sup>+</sup>-Isoform die Fähigkeit, die Entwicklung der NMJ zu stabilisieren. Obwohl einige Oberflächenmoleküle der Muskelfasermembran wie Integrin, Laminin u.a. als Rezeptor für Agrin dienen können, konnte nur für die muskelspezifisch Kinase MuSK gezeigt werden, dass sie essentiell für die Agrin-vermittelte Differenzierung der NMJ ist (Glass, D. J. et al., 1997; Bezakova, G. et al., 2003). MuSK ist eine Rezeptor Tyrosin Kinase, deren extrazellulärer Bereich von vier Immunglobulin-ähnlichen (Ig) Domänen und einer Cystein-reichen Region (CRD) gebildet wird (Abb. II) (DeChiara, T. M. et al., 1996). Der intrazelluläre Teil besteht aus einer Juxtadomäne, der Kinase-Domäne und dem carboxyterminalen Ende. Agrin verstärkt die Dimerisierung und Autophosphorylierung von MuSK. Wie in kultivierten Muskelzellen und *in vivo* gezeigt werden konnte, ist für diesen Prozess die Kinaseaktivität von MuSK notwendig (Glass, D. J. et al., 1996; Zhou, H. et al., 1999; Herbst, R. et al., 2000; Sander, A. et al., 2001). Dabei kommt es zur Phosphorylierung des Tyrosin Y553, sowie zur nachfolgenden Phosphorylierung der Tyrosine Y754, Y750 und Y754 (Herbst, R. et al., 2000; Till, J. H. et al., 2002). Da bisher keine direkte Interaktion zwischen Agrin und MuSK nachgewiesen werden konnte, wird bisher ein Adapterprotein MASC (myotube-specific accessory component; Glass, D. J. et al., 1996) postuliert. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass auch Carbohydrate an den extrazellulären Ig-Domänen von MuSK eine Rolle bei dessen Aktivierung spielen (Martin, P. T. et al., 1999). Eine Liganden-unabhängige Aktivierung von MuSK ist ebenfalls möglich, da durch Einzelfaserinjektionen von MuSK ohne Ectodomäne postsynaptische Differenzierungen induziert werden konnten (Sander, A. et al., 2001). Die Muskelfasern von MuSK-Knock-Out-Mäusen zeigen im Gegensatz zu den Agrin-Knock-Out Tieren keine Anzeichen synaptischer Differenzierung (DeChiara, T. M. et al., 1996; Yang, X. et al., 2001). In den Kernen der Muskelfasern dieser Tiere können zwar neben der Transkription der AChR-Untereinheiten auch die synapsenspezifische Proteine wie die AChE und ErbB-Rezeptoren nachgewiesen werden, diese sind jedoch in der gesamten Fasermembran gleichmässig verteilt. Dies zeigt, dass MuSK nicht nur für die

Entwicklung der NMJ, sondern auch schon für das Prepatterning der postsynaptischen Komponenten notwendig ist.

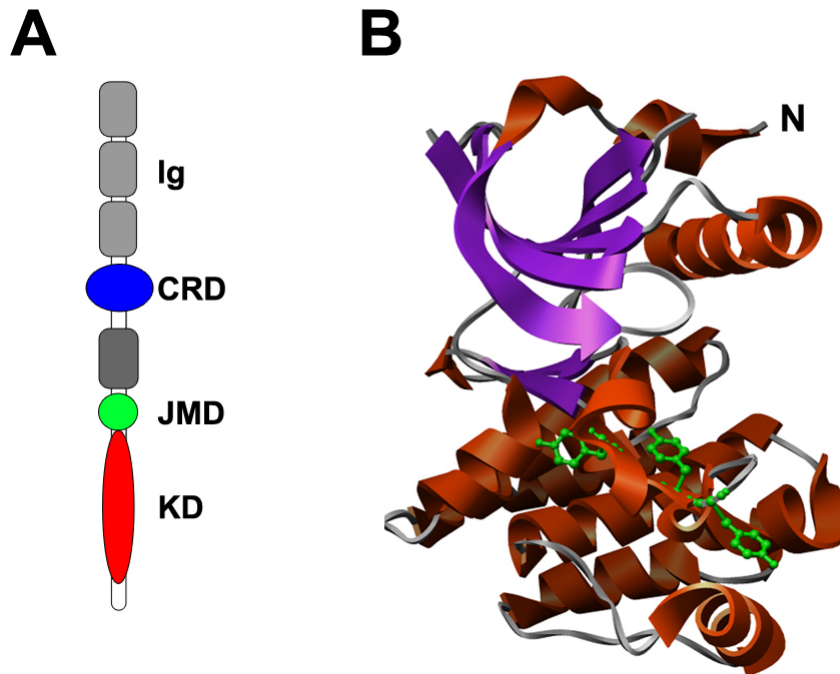


Abb. II: Struktur von MuSK

(A) Domänen-Organisation von MuSK. Es besitzt extrazellulär vier Imunglobulin-ähnliche Bereiche (Ig; grau) und eine Cystein-reiche Domäne (CRD). Intrazellulär liegen die Juxtamembran-Domäne (JMD) und die Kinase-Domäne (KD). (B) Kristallstruktur der cytoplasmatischen Domänen mit 8  $\beta$ -Faltblattstrukturen (violett) und 10  $\alpha$ -Helices (orange). Die Tyrosine Tyr750/754/755 sind grün dargestellt. (Nach:Herbst, R. et al., 2000; Till, J. H. et al., 2002)

### III.1.6.3 MuSK-abhängige Signalkaskaden

Durch die Aktivierung von MuSK kommt es über bisher nicht vollständig geklärte Signalkaskaden zu einer Phosphorylierung der AChR und als Folge davon zur Akkumulation der Rezeptoren, die möglicherweise über Interaktionen mit dem Zytoskelett abläuft (Dai, Z. et al., 2000). Ein wichtiges Bindeglied zwischen der Aktivierung von MuSK und der AChR-Akkumulation stellt das 43 kDa grosse periphere Membran-assoziierte Protein Rapsyn dar. Es liegt in 1:1 Stöchiometrie mit den AChR vor und verbindet die AChR mit  $\beta$ -Dystroglycan (Apel, E. D. et al., 1995). Dies

geschieht über direkte Kontakte mit den Untereinheiten der AChR und weiteren Rapsyn-Molekülen, so dass Rapsyn für die Akkumulation der AChR an der NMJ essentiell ist (Gautam, M. et al., 1995; Ramarao, M. K. et al., 2001). Wie dieser Mechanismus jedoch direkt durch MuSK reguliert wird, ist weitgehend unbekannt.

Die Kinasen Abl1 und Abl2 scheinen ebenfalls bei der Akkumulation der AChR eine Rolle zu spielen, da sie mit MuSK einen Komplex formen und eine dominant-negative Form der Abl-Kinasen die Akkumulation der Rezeptoren *in vitro* verhindern kann (Finn, A. J. et al., 2003). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Kinasen Src, Fyn und Yes akkumulierte AChR-Aggregate stabilisieren. (Smith, C. L. et al., 2001). Diese Kinasen können durch Agrin aktiviert werden, haben jedoch keinen direkten Einfluss auf die Phosphorylierung der AChR (Mittaud, P. et al., 2001). Daneben werden in Muskelzellen GTPasen wie Rac1, Cdc42, Rho und PAK phosphoryliert. Dieser Prozess ist für die Agrin/MuSK-vermittelte Akkumulation der AChR notwendig, doch ist die Signalkaskade noch nicht vollständig geklärt (Weston, C. et al., 2003). Das Protein Dishevelled (Dvl) wurde bei der Suche nach direkten Bindungspartnern von MuSK gefunden. Es interagiert dabei mit der Juxta- und Kinasedomäne von MuSK. Bei dieser Interaktion ist auch die Kinase Pak beteiligt, wie sich in Versuchen in C2C12-Zellen herausstellte (Luo, Z. G. et al., 2002). Weitere Proteine, die mit MuSK interagieren, sind die Membran-assoziierte Guanylkinase MAGI-1c, sowie Syne-1 (Apel, E. D. et al., 2000; Strochlic, L. et al., 2001). Zu erwähnen ist, dass Syne-1 vorwiegend in den Kernmembranen der subsynaptischen Kerne der NMJ angereichert ist, und diese mit dem Zytoskelett zu verbinden scheint (Starr, D. A. et al., 2003). Somit könnte die Interaktion von MuSK mit Syne-1 für die Akkumulation der Kerne unter der NMJ verantwortlich sein, doch gibt es dafür bisher keinen direkten Beweis. Diese bisherigen Erkenntnisse zeigen, dass die Agrin-vermittelte Akkumulation der AChR von MuSK und dessen initiierte Signalkaskaden abhängig ist. Der genaue Ablauf ist dabei aber weitestgehend unbekannt.

### ***III.1.6.4 Regulation der subsynaptischen Transkription***

An der NMJ ist die Dichte der AChR und anderer synaptischer Proteinen stark erhöht. Während sich dort etwa 10000 Moleküle AChR pro  $\mu\text{m}^2$  befinden, sind es in der übrigen Fasermembran etwa zehn Moleküle pro  $\mu\text{m}^2$  (Colledge, M. et al., 1998). Diese

Konzentration an der NMJ geschieht zum einen durch die physikalische Interaktionen der AChR mit anderen synaptischen Proteinen, zum anderen durch die Kontrolle auf transkriptioneller Ebene. So wird mit Beginn der Synapsenentwicklung die Expression der AChR in den subsynaptischen Kernen verstärkt, während sie in den anderen Kernen der Muskelfaser fast abgeschaltet wird (Merlie, J. P. et al., 1985; Sanes, J. R. et al., 2001). Dies geschieht offenbar durch die elektrische Aktivität an der Synapse, die über  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Kinasen die extrasynaptische Transkription der AChR-Untereinheiten vermindert (Altiok, N. et al., 2001). Die Expression der synaptischen Rezeptor-mRNA wird dagegen über MuSK aktiviert, da ektopische Expression von MuSK dort die Expression synaptischer Proteine induziert (Jones, G. et al., 1999; Sander, A. et al., 2001). Es wird angenommen, dass diese Expression über die Aktivierung von erbB2 und erbB4-Rezeptoren durch Neuregulin erfolgt (Rimer, M. et al., 1998). Diese werden phosphoryliert und initiieren eine Signalkaskade, die über Aktivierung von Ras und MAP-Kinasen Erk und Jun zu einer Phosphorylierung und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie GABP führt. Dieser Ets-Transkriptionsfaktor bindet an die DNA an der sog. N-Box, deren Sequenz in den Promotoren der synaptischen Proteine gefunden werden kann (Chan, R. Y. et al., 1999; Fromm, L. et al., 2001; Briguet, A. et al., 2000; Mejat, A. et al., 2003).



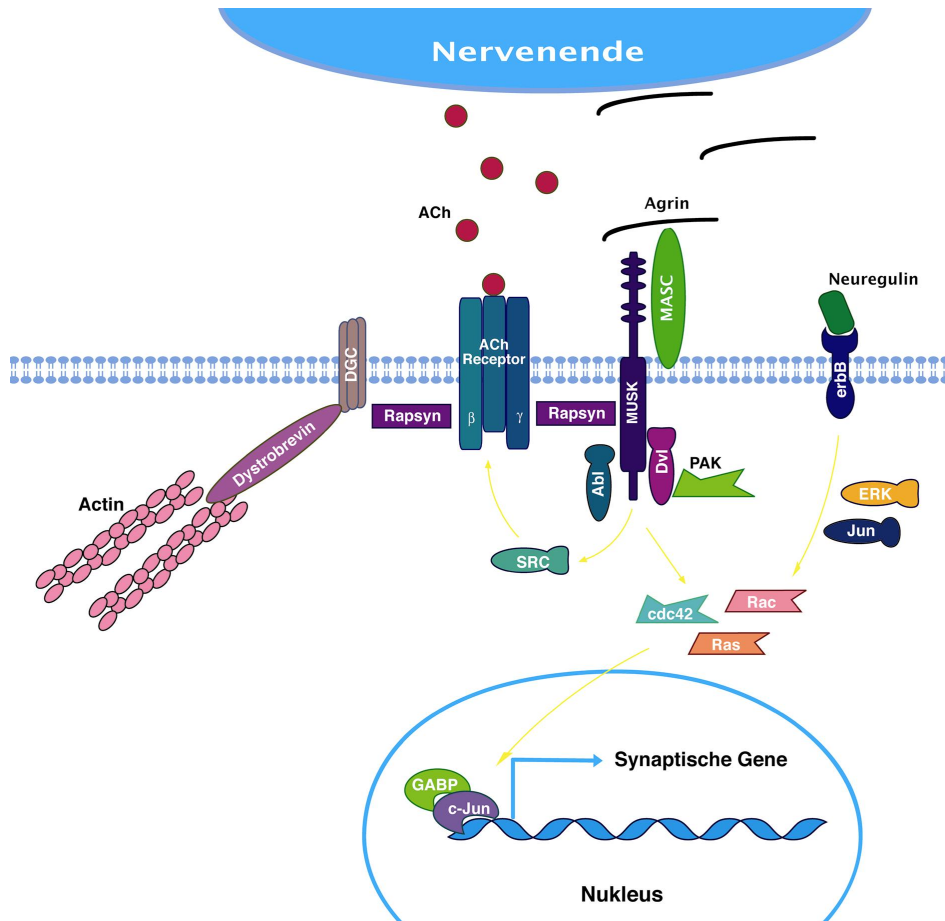


Abb. III: Schematische Darstellung der MuSK-abhängigen Signalkaskaden an der NMJ

AChR sind über Rapsyn und dem Dystroglycankomplex (DGC) mit dem Zytoskelett verbunden. Das vom Nervenende sezernierte Agrin aktiviert über MASC die Kinase MuSK, was über Src-Kinasen (SRC) zur Phosphorylierung und Aggregation der AChR führt. Neuregulin bindet an die erbB-Rezeptoren und aktiviert über die Jun- und Erk-Kinase die GTPasen cdc42, Ras und Rac, die auch über einen MuSK-abhängige Kaskade aktiviert werden können. Diese führen über die Transkriptionsfaktoren GABP und c-Jun zur Expression synaptischer Gene.

### III.1.6.5 Innervierung und Synapsen-Eliminierung

Neben den postsynaptischen Veränderungen kommt es im Verlauf der Entwicklung der NMJ auch zu Veränderungen der Präsynapse und der Motoneuronen. Die Neuronen beginnen um E12 in den Muskel einzuwachsen und formen zuerst einen Hauptnervenstrang, von dem sich dann einzelne Axone abzweigen und später die Synapsen innervieren. Während der Embryonalentwicklung wird eine NMJ dabei von mehreren Axonen verschiedener Motoneuronen innerviert. Nach der Geburt kommt es

zum Verlust von synaptischen Kontakten, so dass eine NMJ schliesslich nur von einem Axon innerviert ist (Brown, M. C. et al., 1976). Dieser Vorgang der Rückbildung kann sowohl im zentralen als auch im peripherem Nervensystem beobachtet werden, und wird als Synapsen-Eliminierung bezeichnet (Cohen-Cory, S., 2002). Bei diesem Prozess verändern sich die konkurrierenden Nervenendigungen der Axone über der Postsynapse stetig, doch kann von der relativen Fläche eines Nervenendes über der Postsynapse nicht auf dessen späteren Verbleib oder Rückzug geschlossen werden (Zito, K., 2003). Als Faktoren für den Wachstumsstop der Axone bei der Innervierung und die folgende Synapsen-Eliminierung werden vom Nervenende ausgeschüttete Moleküle, sowie von der Muskelfaser gebildete Eliminierung-fördernde und -hemmende, sowie mögliche retrograde Signale wie GDNF postuliert (Lichtman, J. W. et al., 2000; Keller-Peck, C. R. et al., 2001; English, A. W., 2003). Offenbar spielen bei diesem Prozess jedoch auch die Aktivität der Synapsen eine Rolle, da induzierte asynchrone Aktivität die Eliminierung von Axonen forcieren kann (Busetto, G. et al., 2000). Die genauen Mechanismen der Synapsen-Eleminierung sind jedoch bisher weitgehend unbekannt (Wyatt, R. M. et al., 2003).

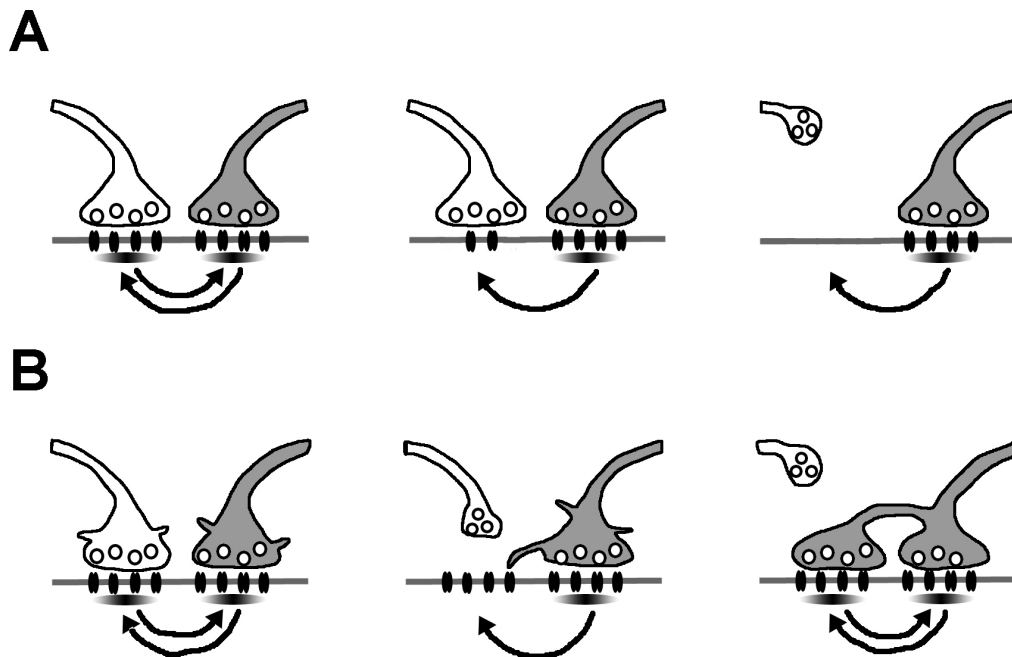


Abb. IV: Schematische Darstellung der Synapsen-Eliminierung an der NMJ

(A) Durch Aktivität werden von der Muskelfaser ein Eliminierung-förderndes (rote Pfeile), als auch ein verhinderndes Signal (diffuse Wolke) an der Synapse produziert (links). Synapsen mit geringer Aktivität (helles Axon) sind so weniger gegen das Eliminierungssignal des stärker aktiven Axons (graues Axon) geschützt. Die AChR-Konzentration nimmt ab und das Axon zieht sich zurück (mitte und rechts). (B) Wenn sich das schwächere Axon zurückzieht (helles Axon) kommt es in manchen Fällen zu einer Okkupation des freierwerdenden postsynaptischen Bereichs durch das verbleibende Axon (graues Axon). (verändert nach Zito, K., 2003)

### III.2 Generierung transgener Tiere

Durch die Entwicklung der Gen-Targeting Technik in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) wurde es möglich, gezielte genetische Manipulationen am Genom der Maus vorzunehmen, um die Funktion von Genen im Tiermodell untersuchen zu können (Evans, M. J. et al., 1981; Thompson, S. et al., 1989). Zu diesem Zweck werden ES-Zellen isoliert, *in vitro* durch homologe Rekombination genetisch manipuliert und in Blastocysten injiziert. Die sich daraus entwickelnden chimären Tiere können dann die genetische Veränderung an die Nachkommen vererben. So ist es möglich, fremdes Genmaterial dauerhaft in das Genom einzufügen (Knock-In) oder Gene oder wichtige Gensequenzen zu deletieren (Knock-Out). Ein Nachteil dieser Methode ist, dass

Transkriptions-regulatorische Elemente des verwendeten Selektionmarkers die Expression benachbarter Gene stören können. Zudem kann der Knock-Out eines Gens zum frühen embryonalem Tod des Tieres führen. Dies deutet dann zwar auf eine essentielle Funktion des Genproduktes bei der Entwicklung des Tieres hin, schliesst aber die Untersuchung seiner Funktion zum späteren Zeitpunkt aus. Diese Nachteile lassen sich durch Verwendung einer konditionalen Genmodifikation umgehen, bei der durch sequenzspezifische Rekombination eine gewebsspezifische und zeitliche Kontrolle möglich ist. Dies kann durch die Verwendung des Cre-loxP-Systems geschehen.

### III.3 Das Cre-loxP-System

Die zu Superfamilie der  $\lambda$  - Integrasen gehörende Rekombinase Cre (causes recombination of the bacteriophage P1 genome) ist in der Lage, spezifisch DNA-Sequenzen zu rekombinieren (Kuhn, R. et al., 1995; Branda, C. S. et al., 2004). Dabei führt sie das Öffnen des DNA-Stranges, das Herausschneiden eines DNA-Abschnittes und die Ligaton ohne zusätzliche Kofaktoren durch. Dies geschieht an 13 bp langen Zielsequenzen, den loxP-Sequenzen (locus of crossover (x) in P1). Wenn die loxP-Sequenzen auf einem DNA-Strang dieselbe Richtung aufweisen, wird der von ihnen flankierte Bereich durch die Cre Rekombinase herausgeschnitten. Dieser Prozess ist durch den Verlust des herausgeschnittenen DNA-Abschnittes irreversibel. Durch die örtlich und temporär gezielte Expression von Cre kann so ein von loxP-Sites flankiertes Zielgen inaktiviert werden, ohne dass seine Funktion vorher beeinträchtigt worden ist. In Kombination mit der Gen-Targeting Technik ergibt sich so die Möglichkeit, ein Gen im Tiermodell lokal und zeitlich kontrolliert zu inaktivieren (Gu, H. et al., 1994).

### III.4 Gen-Inaktivierung durch RNA interference

Neben eines Knock-Outs kann die Inaktivierung eines Gen auch durch einen Knock-Down geschehen, bei dem posttranskriptionell die mRNA degradiert wird. Dieser Mechanismus der Expressionskontrolle (engl.: „RNA interference“; RNAi) konnte sowohl in Pflanzen, als auch in Modellorganismen wie Nematoden, Fliegen und in der Maus nachgewiesen werden (Fjose, A. et al., 2001; Hannon, G. J., 2002). Bei diesem Prozess wird zur Ziel-RNA homologe Doppelstrang-RNA (dsRNA) von einer

Ribonuklease III (Dicer) in 21-22 bp lange RNA-Moleküle geschnitten (engl.: „short interfering RNA“; siRNA). Diese rekrutieren dann den Nucleasekomplex RISC sequenzspezifisch an die mRNA, die daraufhin degradiert wird. Während bisher im Nematoden *Caenorhabditis elegans* dieser Mechanismus zur Analyse vieler Genfunktionen genutzt worden ist, ergeben sich in Säugerzellen Probleme aufgrund der zellulären Interferon-Immunantwort auf die fremde dsRNA. Dies kann jedoch durch direktes Einbringen von siRNA in die Zellen unterbunden werden, was *in vitro* an tierischen und humanen Zellen gezeigt werden konnte (Miyagishi, M. et al., 2002; Paul, C. P. et al., 2002). Ein direktes Einbringen von siRNA in einzelne Muskelfasern könnte so zur Untersuchung von synapsenspezifischen Proteinen *in vivo* genutzt werden.

### III.5 Zielsetzung der Arbeit

1996 konnte durch die Generierung einer MuSK-defizienten Maus gezeigt werden, dass MuSK essentiell für die Entwicklung der neuromuskulären Synapse ist (DeChiara, T. M. et al., 1996). Zur genauen Analyse der Funktion von MuSK wurden deshalb in den letzten Jahren die unterschiedlichsten biochemischen Methoden genutzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Kinasedomäne für die Funktion von MuSK notwendig ist, und dabei bestimmte Tyrosine phosphoryliert werden müssen. Neben direkten Interaktionspartnern wie Dvl wurden in Zellkulturexperimenten Hinweise auf die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden durch MuSK gefunden, doch ist der genaue Mechanismus bisher unbekannt. Bisher ist es auch nicht möglich, die gefundenen Erkenntnisse im Tiermodell zu überprüfen, da die MuSK-defizienten Mäuse perinatal sterben und so auch die mögliche Funktion von MuSK in einer adulten Synapse unklar bleibt. In dieser Arbeit soll mit Hilfe des Cre-loxP-Systems eine konditionale Inaktivierung von MuSK in Mäusen erreicht werden, um dessen physiologische Funktion im adultem Muskel analysieren zu können. Zu diesem Zweck wurden Tiere, deren MuSK-Kinasedomäne von loxP-Sequenzen flankiert sind, mit Tieren gekreuzt, die erst ab der Geburt Cre in der Skelettmuskulatur exprimieren. Dies sollte gewährleisten, dass MuSK bei der Entwicklung der NMJ vorhanden ist, und diese sich normal entwickeln können. Ebenfalls soll im Rahmen dieser Arbeit auch getestet werden, ob sich ein siRNA-vermittelter Knock-Down eines Proteins auch in einzelnen Muskelfasern erreichen lässt. Verglichen mit der Generierung eines Knock-Out-Tieres wäre diese Methode wesentlich schneller, kostengünstiger und würde mehrere Ansätze

und Kontrollen im gleichem Versuchstier erlauben, da jeweils nur einzelne Muskelfasern injiziert würden. Deshalb wurden siRNA-codierende Plasmide mit Hilfe der Einzelfaserinjektion in Fasern des Soleus-Muskels von Mäusen injiziert, um Synapsen-spezifische Proteine zu reduzieren und deren Einfluss auf die Erhaltung der NMJ zu untersuchen. Die Analysen der Inaktivierung von MuSK in adulten NMJ wurden schliesslich mit verschiedenen biochemischen, histochemischen und elektrophysiologischen Methoden durchgeführt. Mit den erhaltenen Ergebnissen sind somit erstmals Aussagen über den Einfluss von MuSK auf die Erhaltung und Funktion der NMJ *in vivo* möglich.

## IV Ergebnisse

### IV.1 Generierung und Genotypisierung der Tiere $\text{MuSK}^{\text{loxP}/-}:\text{Cre}$ bzw. $\text{MuSK}^{\text{loxP}/\text{loxP}}:\text{Cre}$

Die Funktion von MuSK in entwickelten NMJ konnte bisher nicht im Tiermodell untersucht werden, da  $\text{MuSK}^{-/-}$ -Tieren vor Abschluss der synaptischen Entwicklung bei der Geburt sterben (DeChiara, T. M. et al., 1996). Dies sollte mit der Generierung von Mäusen umgangen werden, in denen mit Hilfe des Cre-loxP-Systems die Funktion MuSK nach der Synapsenentwicklung ausgeschaltet wird. Um diese konditionale Inaktivierung von MuSK *in vivo* zu erreichen, wurden Tiere generiert, die zwei loxP-flankierte MuSK-Allele oder ein loxP-flankiertes MuSK-Allel und eine MuSK-Kinase-Deletion besitzen ( $\text{MuSK}^{\text{loxP}/\text{loxP}}$ ,  $\text{MuSK}^{\text{loxP}/-}$ ) und zugleich die Recombinase Cre in den Muskelfasern exprimieren ( $\text{MuSK}^{\text{loxP}/\text{loxP}}:\text{Cre}$ ,  $\text{MuSK}^{\text{loxP}/-}:\text{Cre}$ ). Zu diesem Zweck wurden  $\text{MuSK}^{\text{loxP}/\text{loxP}}$ - und  $\text{MuSK}^{\text{loxP}/-}$ -Tiere einer Mauslinie verwendet, die zuvor von Dr. Hesser in unserem Labor etabliert worden war. In einzelnen Muskelfasern dieser Tiere konnte MuSK durch Einzelfaserinjektion von Cre-codierenden Plasmiden erfolgreich inaktiviert werden (Hesser, B. A., 2000). Um eine Inaktivierung durch Cre in allen Muskelfasern zu gewährleisten, wurden diese Tiere mit transgenen Mäusen gekreuzt, die von Dr. Kahn (Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School, Boston, USA) zur Verfügung gestellt wurden. Diese Mäuse besitzen das Cre Recombinase-Gen unter der Kontrolle des Promotors der Muskelkreatinkinase (MCK), so dass die Expression spezifisch in Skelett- und Herzmuskulatur stattfindet. Dessen Expression beginnt am Embryonaltag 17 und erreicht maximale Aktivität am zehnten Tag nach der Geburt (P10), die bis zum Tode anhält (Bruning, J. C. et al., 1998). Ein Verpaarungsschema ist in Abb. 1 dargestellt.

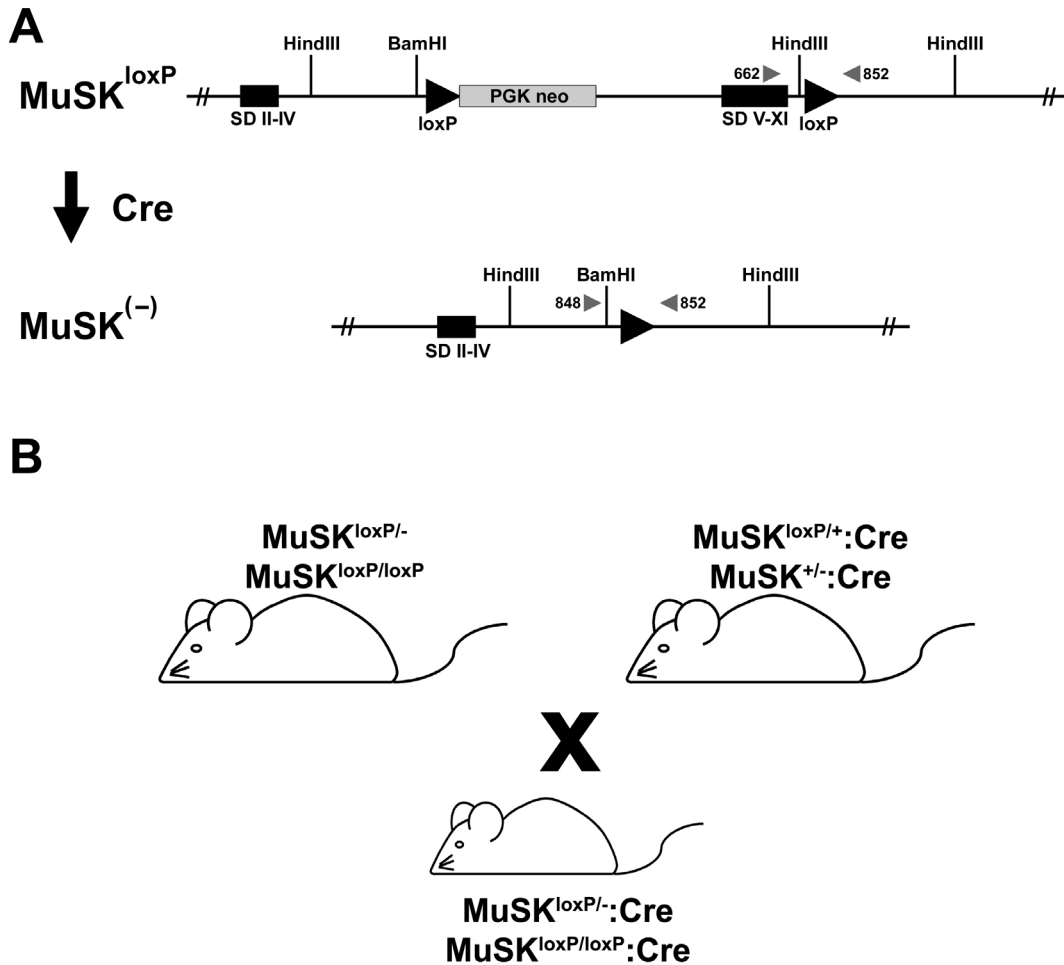


Abb. 1: Schematische Darstellung des loxP-flankierten MuSK-Gens vor und nach erfolgter Rekombination und Verpaarungsschema

(A) Im oberen Teil ist der modifizierte Abschnitt des MuSK-Gens dargestellt. Die Subdomänen II-V und V-XI von MuSK sind auf den schwarz dargestellten Exonbereichen lokalisiert. Letztere sind zusammen mit der PGK-neo-Selektionskassette (grauer Balken) von den loxP-Erkennungssequenzen flankiert (schwarze Pfeile). Neben Schnittstellen genutzter Restriktionsenzyme sind die Bindestellen der zur Genotypisierung verwendeten Primer als graue Pfeile eingezeichnet. Unten ist ein Schema dieses Abschnitts nach erfolgter Rekombination dargestellt. (B) Schema durchgeführter Verpaarungen, die zur konditionalen Inaktivierung von MuSK führen.

Aus diesen Kreuzungen gingen Tiere hervor, die sowohl das Cre-Transgen, als auch den Genotyp  $\text{MuSK}^{\text{loxP}/-}$  oder  $\text{MuSK}^{\text{loxP}/\text{loxP}}$  besaßen (Abb. 1 B). Zur Genotypisierung dieser Tiere wurden PCR-Analysen mit isolierter genomischer DNA aus Schwanzbiopsien durchgeführt. Sofern die Tiere das Cre-Transgen besaßen, konnte mit den Primern Cre 77F und Cre 630R ein etwa 400 bp grosses PCR-Produkt nachgewiesen werden. Mit den Primern 852 und 662



erhielt man ein 872 bp grosses PCR-Produkt, wenn das Wildtyp-Allel  $\text{MuSK}^+$  vorlag, oder eine 906 bp Bande für das  $\text{MuSK}^{\text{loxP}}$ -Allel. Das rekombinierte  $\text{MuSK}$ -Allel (KO) wurde mit den Primern 848 und 852 nachgewiesen, was ein 202 bp grosses PCR-Produkt ergab (Abb. 2).

Da bei den weiteren Analysen kein Unterschied zwischen  $\text{MuSK}^{\text{loxP}/-}$ : Cre und  $\text{MuSK}^{\text{loxP}/\text{loxP}}$ : Cre-Tieren auszumachen war, werden sie im weiteren Verlauf dieser Arbeit zusammen als  $\text{MuSK}/\text{Cre}$ -Tiere bezeichnet.

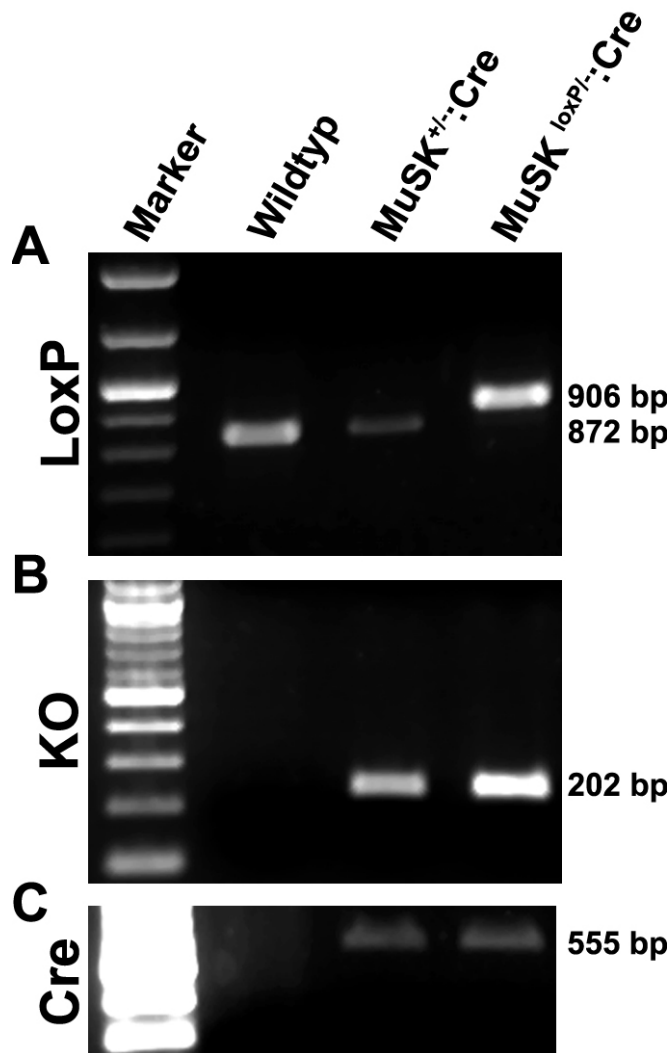


Abb. 2: Genotypisierung der  $\text{MuSK}/\text{Cre}$ -Tiere durch PCR

Mit isolierter genomischer DNA wurden je drei PCR-Reaktionen durchgeführt und die PCR-Produkte in 2%igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. (A) Mit den Primern 852 und 662 ergeben sich für ein loxP-flankiertes  $\text{MuSK}$ -Allel ein 906 bp grosses Produkt, für

das Wildtyp-Allel zu einem 872 bp grosses Produkt. (B) Bei erfolgter Rekombination kann mit den Primern 848 und 852 ein 202 bp grosses Fragment amplifiziert werden. (C) Das Transgen Cre wurde mit den Primern Cre77F und Cre630R und das amplifizierte 555 bp grosse Produkt nachgewiesen.

## **IV.2 Nachweis der Cre-Aktivität in Muskelgewebe durch ein LacZ-Reportergen**

Da die Inaktivierung von MuSK von der Aktivität des MCK-Promoters abhängig ist, der die Expression der Cre-Recombinase steuert, wurde das Expressionsmuster von Cre im Muskelgewebe untersucht. Cre-Mäuse wurden mit transgenen ROSA26R-Tieren verpaart. Diese Tiere besitzen das  $\beta$ -Galaktosidase-Gen (LacZ) hinter einem  $\beta$ -Actin-Promotor, die jedoch durch das loxP-flankierte Chloramphenicoltransferase-Gen (CAT) voneinander getrennt sind (loxP/LacZ; Soriano, P., 1999). Erst nach Cre vermittelter Rekombination kann der  $\beta$ -Actin-Promoter die LacZ-Transkription aktivieren (loxP/LacZ/Cre; Abb. 3 A). In den Nachkommen, die sowohl das Cre- als auch LacZ-Gen besitzen (LacZ:Cre), kann so die Aktivität von Cre anhand der LacZ-Aktivität in einzelnen Muskelfasern beobachtet werden. Zu diesem Zweck wurden Diaphragmen von 30 Tage alten LacZ:Cre-Tieren entnommen und eine LacZ-Färbung durchgeführt. Wie Abb. 3 B und C zeigt, ist die durch LacZ-Aktivität entstandene Blaufärbung nicht homogen. So zeigen sich Unterschiede zwischen den Fasern im Diaphragma (B) und auch innerhalb einzelner Fasern (C), was auf die Vielzahl der Kerne und die unterschiedliche Cre-Aktivität in den einzelnen Kernen der Muskelfaser zurückzuführen ist.

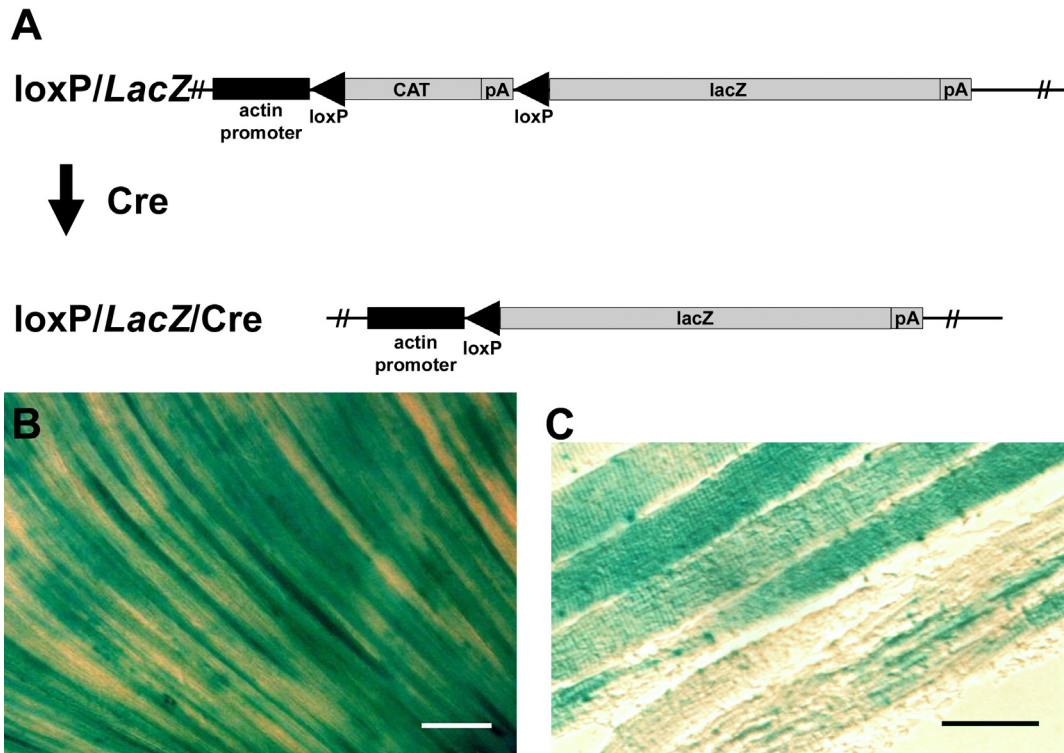


Abb. 3: Schematische Darstellung des geflochten LacZ-Gens (A) und nach erfolgter Rekombination (B), sowie LacZ-Färbung von Diaphragmen(C)

In (A) ist das LacZ-Transgen schematisch dargestellt. Vor dem  $\beta$ -Galactosidasegen (LacZ) mit der Poly-Adenylierungssequenz (pA) liegt das CAT-Gen mit der pA-Sequenz, was von zwei loxP-Sites flankiert wird. Durch Cre-vermittelte Rekombination wird das CAT-Gen deletiert, so dass das lacZ-Gen nicht mehr vom  $\beta$ -Actin-Promoter getrennt liegt und abgelesen werden kann. (B) und (C) zeigen Diaphragmen von P30 *LacZ:Cre*-Tieren nach LacZ-Färbung. (Maßstab: (B) 50  $\mu$ m; (C) 200  $\mu$ m)

### IV.3 Nachweis des der Cre-vermittelten Rekombination durch kompetitive PCR

Da die Cre-Aktivität im Muskelgewebe örtlich und temporär nicht gleichmässig ist, wurde der zeitliche Verlauf der Inaktivierung von MuSK durch kompetitive PCR analysiert. Hierfür wurde genomische DNA aus Muskeln der Hinterbeine von MuSK/Cre-Tieren verschiedenen Alters isoliert. Mit Hilfe der Primer 848, 852 und 662 wurden in einem Ansatz sowohl der rekombinierte Teil des MuSK-Gens (KO), als auch der modifizierte Abschnitt der DNA (loxP) amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden über 2%-Agarosegele aufgetrennt und digital fotografiert (Abb. 4 A). Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten der mit Ethidiumbromid gefärbten PCR-Produkte erfolgte mit dem Programm IPLab Gel. Durch das Verhältnis der Intensitäten der LoxP- zu den KO-PCR-

Produkten ergibt sich somit ein Maß für die erfolgte Aktivität der Cre Recombinase.

Wie Abb. 4 B verdeutlicht, liegt das Verhältnis der gemessenen Fluoreszenzintensitäten der Amplifikate des KO- zum loxP-Allel ( $Q_{KO/loxP}$ ) bei P10 bei 1,3. Dieser Wert nahm mit zunehmendem Alter der Tiere kontinuierlich ab, so dass die Analyse der genomischen DNA eines 25 Tage alten MuSK/Cre-Tieres einen Quotient von 0,7 ergab. Die Ausgleichsgeraden verdeutlicht den linearen Trend der erfolgten Rekombination und somit die konstante Aktivität der Cre Recombinase.

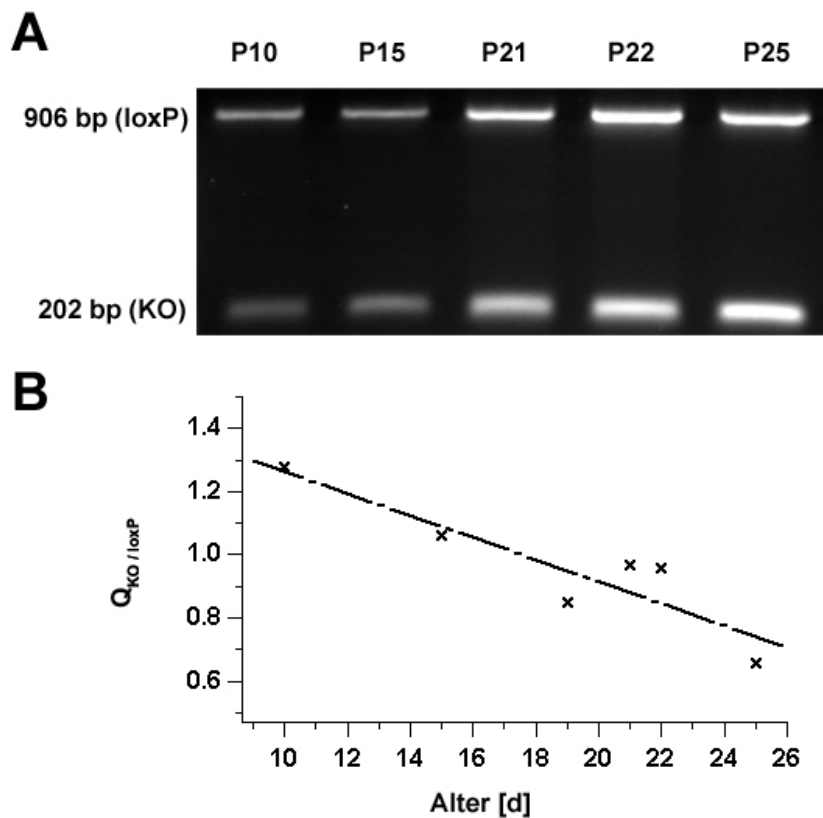


Abb. 4: Kontinuierliche Cre-vermittelt Rekombination in der Skelettmuskulatur von MuSK/Cre-Tieren

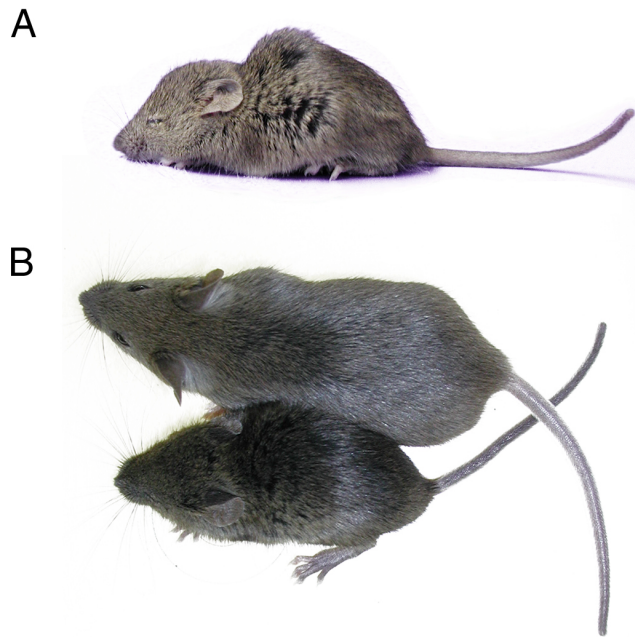
(A) PCR-Produkte der kompetitiven PCR zum Nachweis des geflochten (loxP) und des rekombinierten MuSK-Transgens (KO). Hierfür wurde jeweils genomische DNA von MuSK/Cre-Tieren unterschiedlichen Alters als Template benutzt und die Produkte in einem 2%igem Agarosegel aufgetrennt. (B) Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der PCR-Produkte von KO zu loxP. Die Linie repräsentiert die lineare Ausgleichsgerade.

#### **IV.4 Phänotypische Veränderung der MuSK/Cre- Tiere**

Im Gegensatz zu MuSK<sup>-/-</sup>-Tieren, die bei der Geburt sterben (DeChiara, T. M. et al., 1996), sind MuSK/Cre Tiere nach der Geburt lebensfähig und nicht von Wildtyp-Geschwistern zu unterscheiden. Sie atmen und können sich normal bewegen. Erst ab der dritten Lebenswoche werden phänotypische Veränderungen sichtbar.

##### ***IV.4.1 Körperliche Veränderung der MuSK/Cre-Tiere***

Ab P15 können bei MuSK/Cre-Mäusen mit zunehmendem Alter deutliche körperliche Veränderungen beobachtet werden, die auf progressive Muskelschwäche hindeuten. Sie bekommen ein struppiges Fell, bilden einen Buckel aus und es entwickelt sich eine deutliche Fehlstellung der Hinterextremitäten (Abb. 5). Die Tiere bekommen mit fortschreitendem Alter Schwierigkeiten die Augen zu öffnen und sich zu bewegen. Diese phänotypische Veränderungen verstärken sich, so dass die Tiere vor dem 30. Tag sterben.



**Abb. 5: P22 MuSK/Cre-Maus mit Wildtyp-Geschwister**

Die MuSK/Cre-Maus hat geschlossene Augen und besitzt einen Buckel, sowie eine Fehlstellung der Hinterbeine, die auf Muskelschwäche zurückzuführen sind. (B) verdeutlicht die kleinere Größe im Vergleich zu dem Wildtyp-Geschwister.

#### ***IV.4.2 Messungen des Körpergewichts***

Das Körpergewicht von MuSK/Cre-Tieren und den Wildtyp-Geschwistern wurde täglich ab dem fünfzehnten Tag bis zu ihrem Tod gemessen. Abb. 6 zeigt die ermittelten Werte der beiden Gruppen. Bis P18 war das Gewicht beider Gruppen etwa gleich (MuSK/Cre:  $7,7 \pm 0,4$  g; Wildtyp:  $7,9 \pm 0,2$  g). Ab P19 gab es bei den Wildtyp Tieren eine tägliche Gewichtszunahme von ungefähr 1,2 g. Dies setzte sich bis P30 fort, so dass die Tiere dann durchschnittlich  $16,6 \pm 0,6$ g wogen. Die MuSK/Cre-Tiere dagegen verloren ab P19 bis zu 0,2 g, was sich bis zu deren Tod fortsetzte (P29:  $6,1 \pm 0,4$  g).

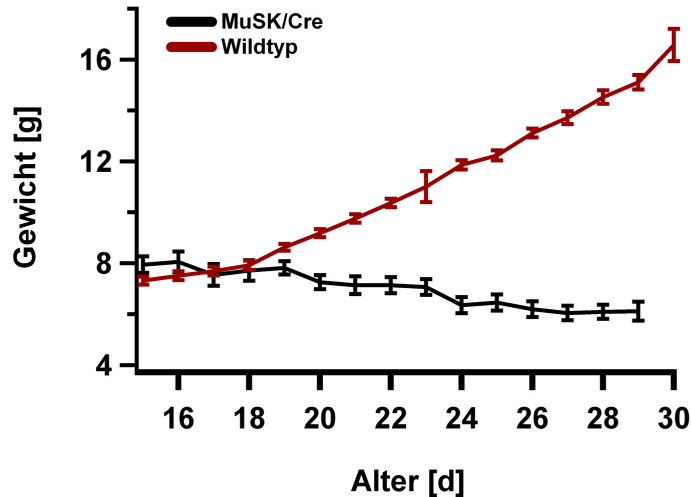


Abb. 6: Körpergewicht von 15 – 30 Tage alten MuSK/Cre- und Wildtyp-Tieren

Das Körpergewicht von MuSK/Cre-Tieren ( $n = 2 - 15$ ) und Wildtyp-Tieren ( $n = 8 - 44$ ) wurde zwischen P15 und P30 täglich gemessen. Das Diagramm stellt die jeweiligen Mittelwerte, sowie die Standardabweichungen als Fehlerbalken dar.

#### IV.4.3 Messung der Muskelkraft

Um den Verlauf der progressiven Muskelschwäche in den Tieren zu bestimmen, wurde ab P15 täglich die Griffstärke der Vorderextremitäten gemessen (Abb. 7). Schon zu Beginn besaßen die MuSK/Cre-Tiere mit  $0,13 \pm 0,05$  N eine wesentlich geringere Griffstärke als die Wildtyp-Tiere mit  $0,35 \pm 0,02$  N. Diese zeigten bis zum Ende der Messungen einen stetige Kraftzunahme, so dass sie am Tag 30 eine Griffstärke von  $1,03 \pm 0,02$  N erreichten. Die Griffstärke der MuSK/Cre-Tiere dagegen reduzierte sich fortwährend und waren am Ende nicht mehr messbar.

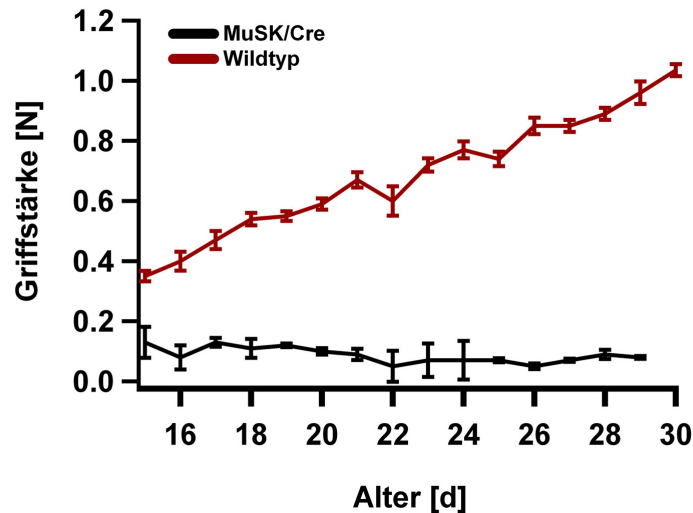


Abb. 7: Griffstärke von MuSK/Cre- und Wildtyp-Tieren von P15 bis P30

Die Griffstärke von MuSK/Cre-Tieren ( $n = 2 - 11$ ) und Wildtyp-Tieren ( $n = 8 - 24$ ) wurde zwischen P15 und P30 täglich gemessen. Das Diagramm stellt die jeweiligen Mittelwerte, sowie die Standardabweichungen als Fehlerbalken dar.

#### IV.4.4 Analyse der Fasertypen im Soleusmuskel

Skelettmuskeln bestehen aus verschiedenen Muskelfasertypen mit unterschiedlichen zellulären und molekularen Eigenschaften. Aufgrund dieser Zusammensetzung unterscheiden sich die Muskeln in ihrer Stabilität und im Ermüdungsverhalten, so dass sie sich in die langsamen Typ1-Faser (MyHC1), und den schnellen Typ2A- und den intermediären 2B/2D-Fasern (MyHC2A, MyHC2B/2D) einteilen lassen (Pette, D. et al., 2001). Mit Hilfe der ATP-Färbung an Gefrierschnitten von Soleusmuskeln von MuSK/Cre- und Wildtyp-Tieren wurden die Verhältnisse der Fasertypen den Muskeln ermittelt (Abb. 8 A). Wie die Auswertung in Abb. 8 B zeigt, sind die Soleusmuskeln von P15 Wildtyp- und MuSK/Cre-Tieren, sowie in P19 MuSK/Cre-Tieren aus Typ1- und Typ2A-Fasern zusammengesetzt. Während diese Zusammensetzung in älteren Wildtyp-Tieren bestehen bleibt, kommt es in MuSK/Cre-Tieren zu deutlichen Veränderungen (Abb. 8 C). Bei P22 und P25 liegt der Anteil der Typ2A-Fasern in Soleusmuskeln von MuSK/Cre-Tieren bei  $74,2 \pm 0,9\%$  bzw.  $71,4 \pm 1,7\%$ . Der Anteil der Typ1-Fasern beträgt  $23,8 \pm 1,8\%$  bzw.  $26,5 \pm 1,0$



%. Ebenso sind mit  $1,9 \pm 0,5$  % (P22) und  $2,1 \pm 0,7\%$  (P25) mehr Typ2B/2D-Fasern vorhanden als in Muskeln von Kontrolltieren ( $0,9 \pm 0,4\%$ ; P60). In P28 MuSK/Cre-Tieren beträgt der Anteil der Typ2B/2D-Fasern sogar  $10,4 \pm 0,6\%$ , während der Anteil der Typ2A-Fasern bei  $56,6 \pm 0,2\%$  und der Anteil der Typ1-Fasern bei  $33,0 \pm 0,7\%$  liegt.

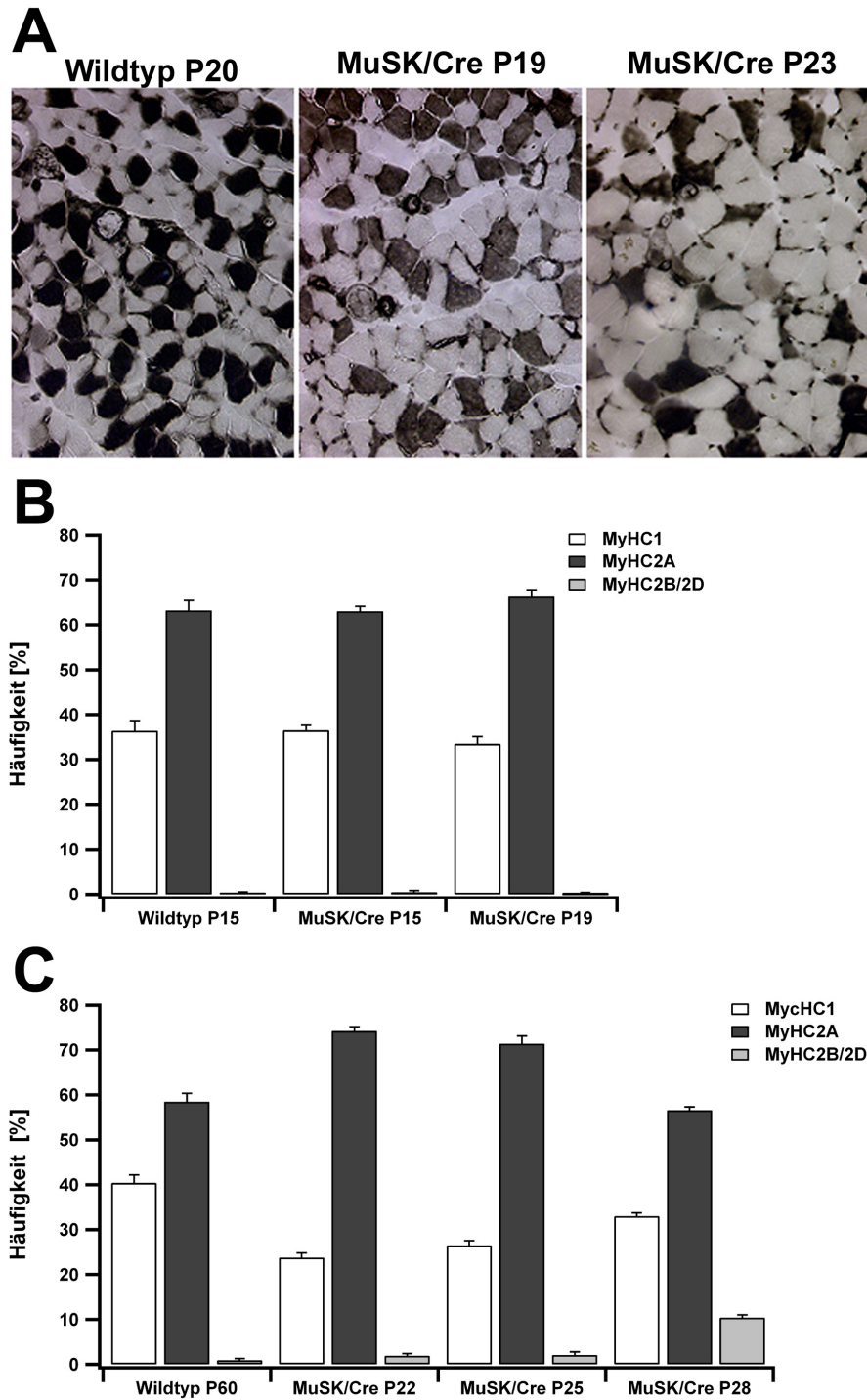


Abb. 8: ATP-Färbung an Gefrierschnitten von Soleumuskeln und deren quantitative Auswertung

ATP-Färbungen (bei pH 4,6) an Gefrierschnitten von Soleusmuskeln eines P20 Wildtyp-Tieres, sowie zweier MuSK/Cre-Tieren (P19 und P23). Typ 1-Fasern erscheinen schwarz, Typ 2A-Fasern dunkelgrau und Typ 2B/2D-Fasern hellgrau. (B) Statistische Verteilung der Fasertypen in MuSK/Cre – und Wildtyp-Tieren bis P20. (C) Statistische Verteilung der Fasertypen in älter als 20 Tage alten MuSK/Cre – und Wildtyp-Tieren (n = 294 – 892).

## **IV.5 Analyse morphologischer und funktioneller Veränderungen der NMJ**

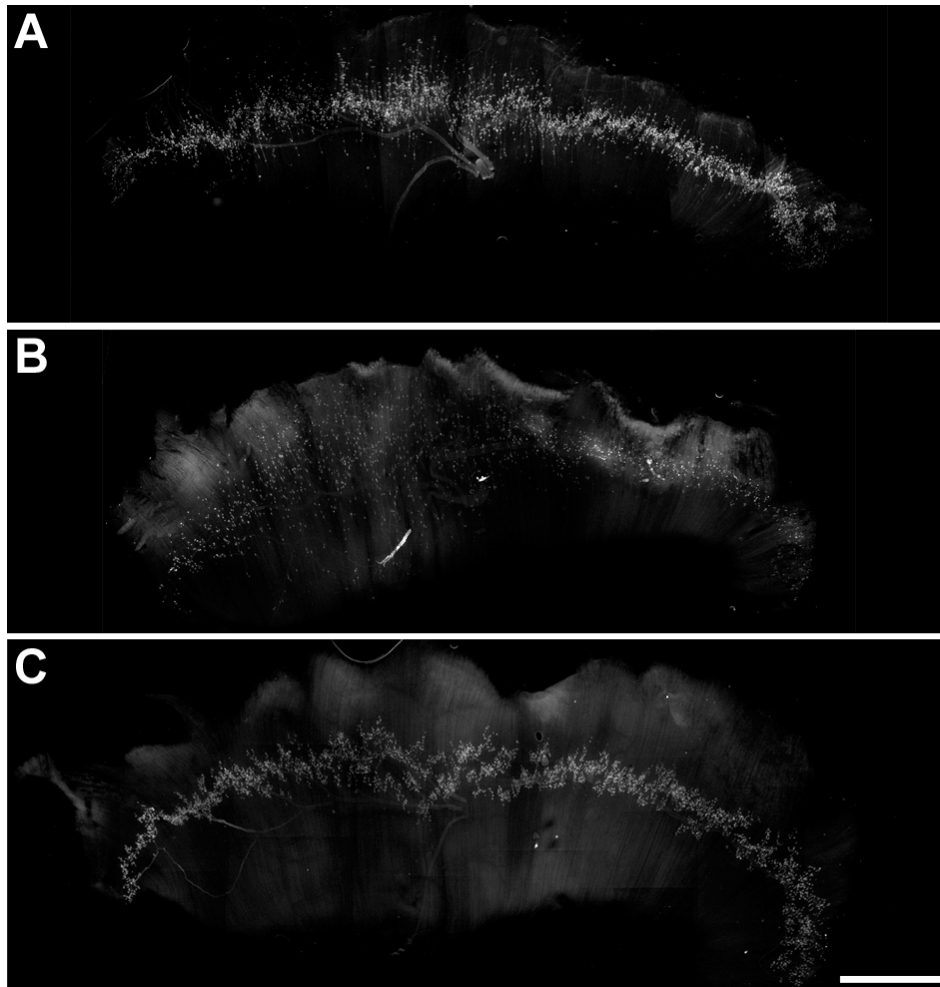
Die Veränderungen, die durch die konditionale Inaktivierung von MuSK im gesamten Muskel sowie an den Motoneuronen verursacht worden sind, wurden histologisch und physiologisch analysiert. Zur Lokalisation von synapsenspezifischen Proteinen wurden immunhistologische Methoden und Fluoreszenz- sowie konfokale Mikroskopie durchgeführt. Zusätzlich wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt, um ultrastrukturelle Veränderungen an den Synapsen sichtbar zu machen. Die Funktion der NMJ wurden durch Untersuchungen ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften analysiert.

### ***IV.5.1 Anzahl und Verteilung und der NMJ im Diaphragma***

Mit Übersichtsaufnahmen von Hemidiaphragmen wurde untersucht, ob die progressive Inaktivierung von MuSK die Lokalisation und Verteilung der Synapsen beeinflusst. MuSK/Cre- und Wildtyp-Tieren wurde das Diaphragma entnommen und die Synapsen anhand der AChR mit Rhodamin-gekoppeltem Bungarotoxin (Btx-rh) markiert. Die Visualisierung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop und angeschlossener Digitalkamera.

Abb. 9 zeigt exemplarische Aufnahmen von Hemidiaphragmen mit Btx-rh markierten Synapsen. Im P15 MuSK/Cre-Tier sind die Synapsen mehrheitlich in der Mitte des Muskels als „Endplatten-Band“ angeordnet, doch liegen auch einige ausserhalb des Bandes (Abb. 9 A). Im Diaphragma eines P20 MuSK/Cre-Tieres ist dagegen kein Endplatten-Band erkennbar, denn die Synapsen sind über den gesamten Muskel verteilt (Abb. 9 B). Im Gegensatz dazu sind die Synapsen im Diaphragma eines Wildtyp-Tieres zu jedem

Zeitpunkt des Lebens in der Mitte des Muskels lokalisiert, wie am Beispiel am Diaphragma eines P20 gezeigt ist (Abb. 9 C).



**Abb. 9: Verteilung von Synapsen in Diaphragmen von Wildtyp- und MuSK/Cre-Tieren**

**Linke Diaphragmahälfte von einem P15 (A) und P20 MuSK/Cre-Tier (B) und P20 Wildtyp-Tier (C). Die Synapsen wurden mit Btx-rh markiert. (Maßstab: 2 mm)**

In Hemidiaphragmen von P21 Tieren wurden in den jeweiligen medianen Bereichen dorsal des Nerveneintrittspunkts die Anzahl der Synapsen quantifiziert (Abb. 10 A, B). Auch hier sind deutlich die Unterschiede der Lokalisation der Btx-rh markierten Endplatten zu erkennen. Die Summe der gemessenen Intensitäten der markierten Synapsen über die medial-laterale Distanz zeigt, dass die Synapsen im Wildtyp auf einem etwa 700  $\mu\text{m}$  breiten Bereich liegen, während im MuSK/Cre dieser Bereich etwa 1,5 mm breit ist (Abb. 10 C). Die Auszählung der Synapsen in diesen Aufnahmen ergab, dass in

MuSK/Cre-Tieren mit  $551 \pm 88$  signifikant weniger Synapsen vorhanden sind als in Wildtyp-Tieren ( $832 \pm 77$ ;  $p < 0,05$ ; Abb. 10 D).

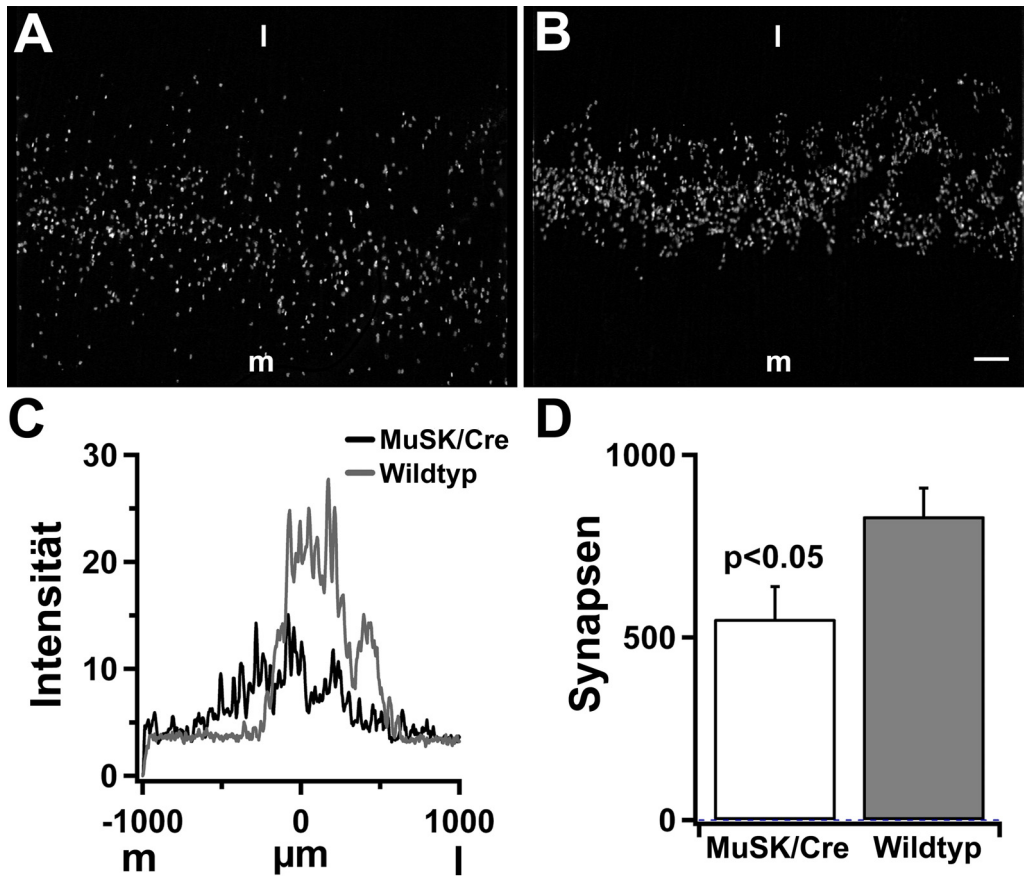


Abb. 10: Verteilung und Anzahl der Synapsen in Diaphragmen von MuSK/Cre- und Wildtyp -Tieren

Verteilung von Btx-rh markierten Synapsen im linken Hemidiaphragma von 21 Tage alten MuSK/Cre- (A) und Wildtyp-Tieren (B; Maßstab: 200  $\mu$ m). (C) Die Summe der Fluoreszenz-Intensitäten ist als Indikator für die Verteilung der Synapsen von der medialen (m) zur lateralen (l) Seite dargestellt. (D) Durchschnittliche Anzahl von Synapsen im wie in (A) und (B) gezeigten 2,2 x 2,9 mm großen Bereich der Diaphragmen (Anzahl der Tiere: MuSK/Cre: n = 3; Wildtyp: n = 2; P21 und P22). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen.

### IV.5.2 Analyse der Synapsengrösse

Um einen Einfluss der Inaktivierung von MuSK auf die Morphologie der NMJ abzuleiten, wurden die Längsdurchmesser von Synapsen von P15, sowie P24 - P28 MuSK/Cre- und Wildtyp-Tieren gemessen. Dies wurde an konfokalen Aufnahmen zufällig ausgewählter Btx-rh markierten Synapsen von Diaphragmen durchgeführt. Abb. 11 zeigt die prozentuale Verteilung der gemessenen Durchmesser. Insgesamt waren 88% aller Synapsen in fünfzehn Tage alten MuSK/Cre- und Wildtyp-Tieren zwischen 15  $\mu\text{m}$  und 30  $\mu\text{m}$  lang. Etwa 45 % aller Synapsen dieser Tiere besaßen dabei Längsdurchmesser von 20 – 25  $\mu\text{m}$ . Die Größenverteilung der Synapsen der P25 und P26 MuSK/Cre- und Wildtyp-Tiere dagegen zeigen deutlich Unterschiede. Während in den Wildtyp-Tieren 85 % aller Synapsen zwischen 15  $\mu\text{m}$  und 30  $\mu\text{m}$  lang sind, liegt der prozentuale Anteil in MuSK/Cre Tieren bei 70 %. Darüber hinaus besaßen mehr Synapsen in MuSK/Cre-Tieren einen kleineren Durchmesser als 15  $\mu\text{m}$  (12 %) oder waren grösser als 35  $\mu\text{m}$  (9 %) als es bei den Synapsen in Wildtyp-Tiere gleichen Alters der Fall war (2 % bzw. 3 %).

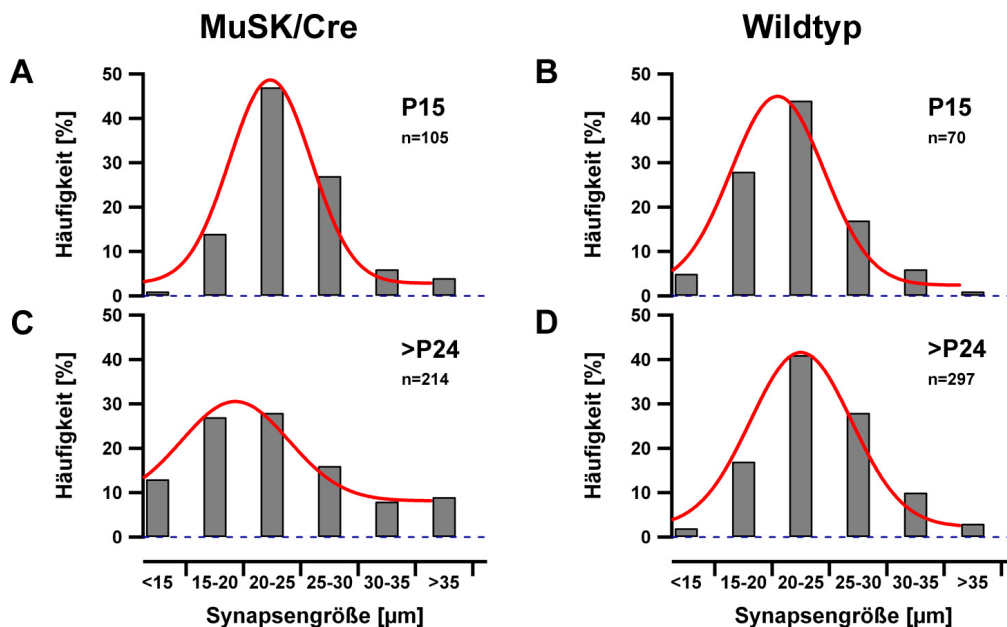
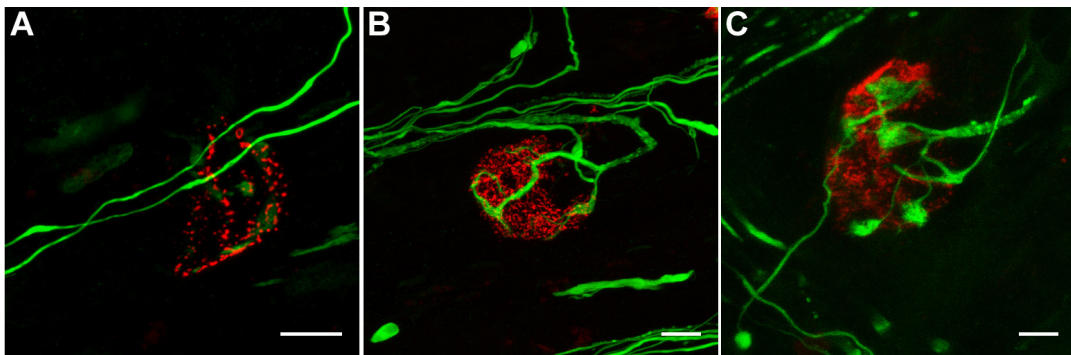


Abb. 11: Häufigkeitsverteilung der Synapsengrösse in MuSK/Cre- und Wildtyp-Tieren

Der Längsdurchmesser von Btx-rh gefärbten Synapsen in Diaphragmen von P15 Tieren (A und B) und >P24 Tieren (C und D) wurden ermittelt und deren prozentuale Häufigkeit aufgetragen (n = 1 – 4). Die roten Kurven repräsentieren die jeweiligen Gauss'schen Ausgleichskurven.

### ***IV.5.3 Postnatale Neubildung von Synapsen***

Bei der Bildung der NMJ beginnen AChR Aggregate zu bilden und zu akkumulieren, so dass ihre postsynaptische Anordnung bei der Geburt des Tieres eine runde Plaque-ähnliche Struktur bildet. Diese neu entstandenen Synapsen sind auch in Diaphragmen von älter als 10 Tage alten MuSK/Cre-Tieren zu finden. In Abb. 12 sind drei Endplatten in verschiedenen Entwicklungsstadien abgebildet. Während in Abb. 12 A wenige Akkumulationen von AChR sichtbar sind, ist in Abb. 12 B und C schon deutlich die Plaque-Form der Synapsen erkennbar. Dabei ist die Verdichtung der AChR-Cluster in der Synapse in Abb. 12 C schon weiter fortgeschritten als in B. Ein weiteres Kennzeichen der neu gebildeten Synapsen ist die multiple Innervierung, die in B und C sichtbar ist. Während die NMJ in A nicht innerviert ist, sind es in B zwei und in C drei Motoneurone, die Synapse innervieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass in MuSK/Cre-Tieren nach Tag P10 neue Synapsen gebildet werden, während in Wildtyp-Tieren zu diesem Zeitpunkt keine neuen Synapsen mehr etabliert werden.



**Abb. 12: Konfokale Aufnahmen entstehender Synapsen im Diaphragma eines MuSK/Cre-Tiers**

Von (A) nach (C) sind Btx-rh markierte Synapsen in frühen aufeinander folgenden Entwicklungsstadien abgebildet. Die Motoneuronen wurden mit Antikörper gegen Neurofilament visualisiert (Maßstab: 10 µm).

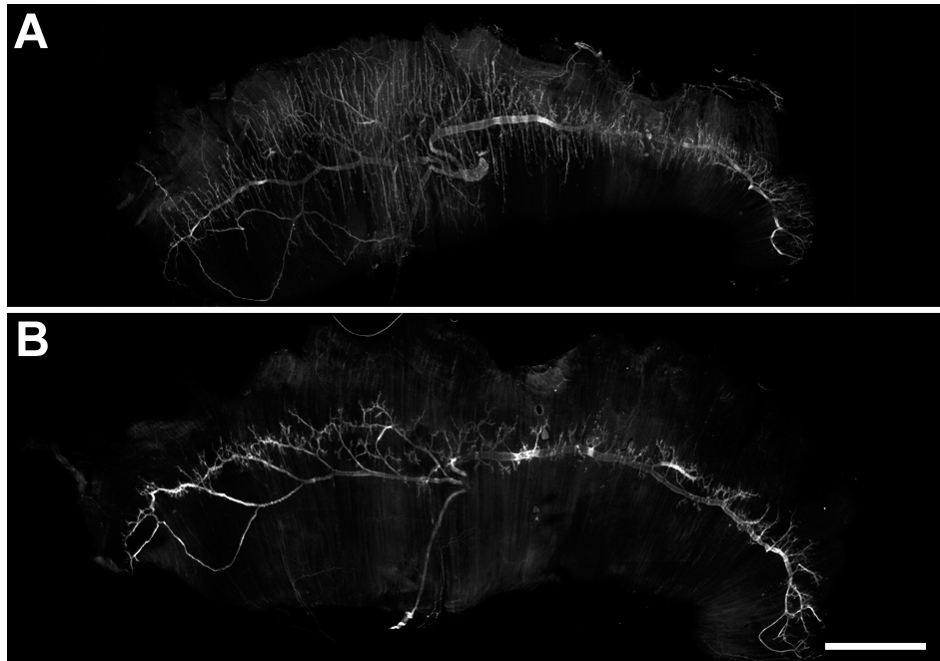
### ***IV.5.4 Untersuchungen der präsynaptischen Veränderung***

Neben den postsynaptischen Veränderungen wurde ferner untersucht, ob die konditionale Inaktivierung von MuSK in den MuSK/Cre-Tieren Veränderungen der Präsynapse und Einfluss auf die Motoneurone zur Folge hat. Zu diesem

Zweck wurden die Neurone mit Antikörpern gegen das neuronale Protein Neurofilament und die Präsynapse mit Antikörper gegen Synaptophysin markiert. Die Visualisierung erfolgte jeweils mit fluoreszierenden Zweitantikörpern und mit einem konfokalem Mikroskop.

#### ***IV.5.4.1 Analyse der Innervierung***

Die Motoneurone im Diaphragma eines 20 Tage alten MuSK/Cre-Tiers zeigen im Vergleich zum Kontrolltier ein erheblich verstärktes Wachstum (Abb. 13). Zwar verläuft der Hauptstrang auch im medianen Teil des Muskels, doch wachsen die abzweigenden Neuronen im MuSK/Cre-Tier parallel zu den Muskelfasern bis zum Rand des Muskels.



**Abb. 13: Verstärktes Wachstum der Motoraxone in Diaphragmen von MuSK/Cre-Tieren**

**Linke Diaphragmahälfte von einem P20 MuSK/Cre- (A) und Wildtyp-Tier (B). Die Motoneurone wurden mit Antikörper gegen Neurofilament markiert (Maßstab: 2 mm).**

### ***Ungerichtetes Wachstum und Innervierung***

Konfokale Aufnahmen einzelner mit Btx-rh markierten Synapsen zeigen, dass eine Wildtyp-Synapse von einem Motoneuron innerviert wird (Abb. 14 A). Das Neuron teilt sich über der Postsynapse in mehrere feine Axone auf, die sich dann über die Gebiete mit den konzentrierten AChR verteilen.

Im Gegensatz dazu sind in MuSK/Cre-Tieren (>P20) oft Neurone zu beobachten, die zwar eine Synapse innervieren, das Wachstum aber nicht eingestellt haben. Stattdessen wachsen sie über die Endplatte hinaus und zeigen dann ein ungerichtetes Wachstum, ohne eine Synapse zu innervieren (Abb. 14 B, C, E). Viele dieser Neuronen bilden dabei ein verdicktes Ende aus, was ein Kennzeichen für dessen Zurückweichen ist (Abb. 14 B, D, F). Darüber hinaus besitzen die Axone der MuSK/Cre-Tiere eine grössere Variabilität im Durchmesser als die Axone in Wildtyp-Tieren, was deutlich an den Neuronen in Abb. 14 D und F erkennbar ist. Das Wachstum mancher Axone ist zudem so stark, dass die Postsynapse fast vollständig vom Nervengewebe bedeckt ist (Abb. 14 D, F). In den MuSK/Cre-Tieren können zusätzlich Synapsen gefunden werden, die durch mehrere Neurone innerviert sind (Abb. 14 B, D – F). Diese multiple Innervierung kommt in Wildtyp-Tieren zu Beginn der Synapsenentwicklung vor, kann jedoch in adulten Tieren nicht mehr beobachtet werden (Abb. 14 A).

Demnach zeigen die Motoneurone in MuSK/Cre-Tieren (>P20) ein sehr heterogenes Wachstums- und Innervierungsverhalten, was auf die Inaktivierung von MuSK zurückgeführt werden kann.



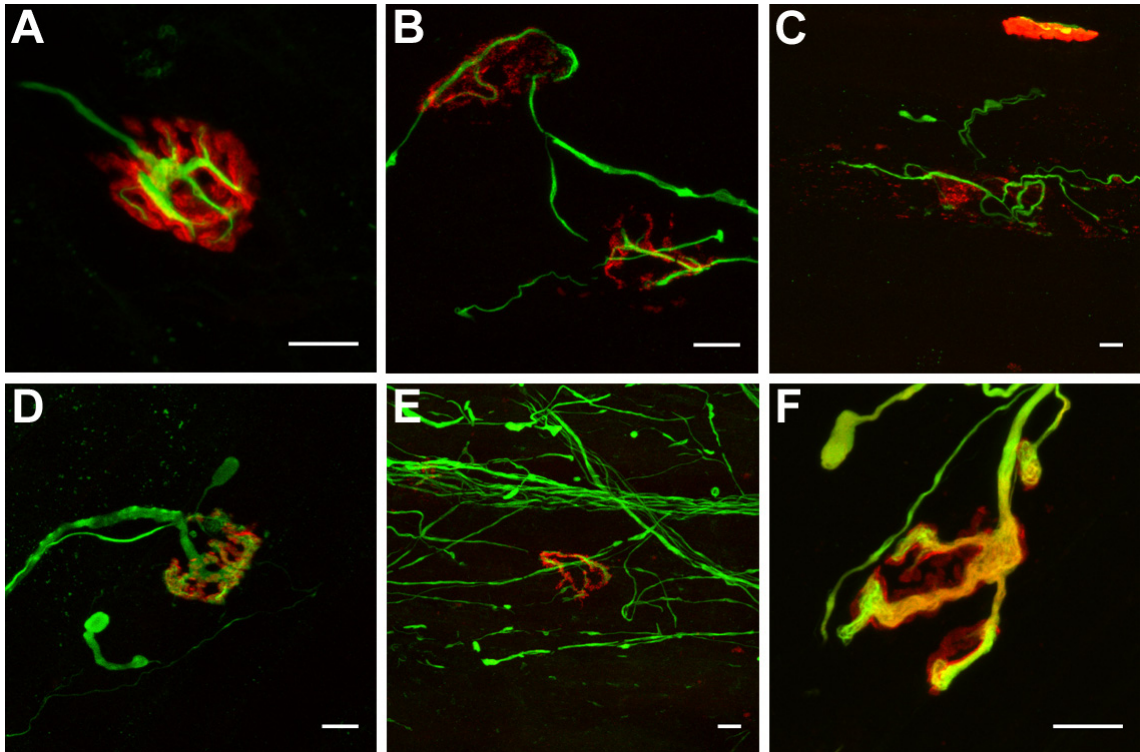


Abb. 14: Unterschiedliche Innervierung von Synapsen in MuSK/Cre-Tieren

Btx-rh markierte Synapse und mit Antikörper gegen Neurofilament markierte Neuronen von >P20 Wildtyp- (A) und MuSK/Cre-Tieren (B-F) (Maßstab: 10µm).

#### IV.5.4.2 Visualisierung des präsynaptischen Markerproteins Synaptophysin

Das Membranprotein Synaptophysin ist in der präsynaptischen Membran lokalisiert, und kann somit als Marker für die Präsynapse verwendet werden. Mögliche Veränderungen der Präsynapse können demzufolge durch Visualisierung von Synaptophysin untersucht werden. Um dies in MuSK/Cre-Tieren zu untersuchen, wurde Synaptophysin an Synapsen von Diaphragmen mit Antikörper markiert und diese durch einen fluoreszierenden Zweitantikörper nachgewiesen. Während im Wildtyp-Diaphragma die Projektionen konfokaler Aufnahmen zeigen, dass die Btx-rh markierte AChR mit Synaptophysin colokalisiert sind, ergibt sich in MuSK/Cre-Tieren ein heterogenes Bild (Abb. 15). Bei Synapsen mit geringer AChR-Dichte ist nur eine geringe Colokalisation vorhanden, während andere Synapsen eine vollständige Colokalisation der Prä- mit der Postsynapse zeigen.

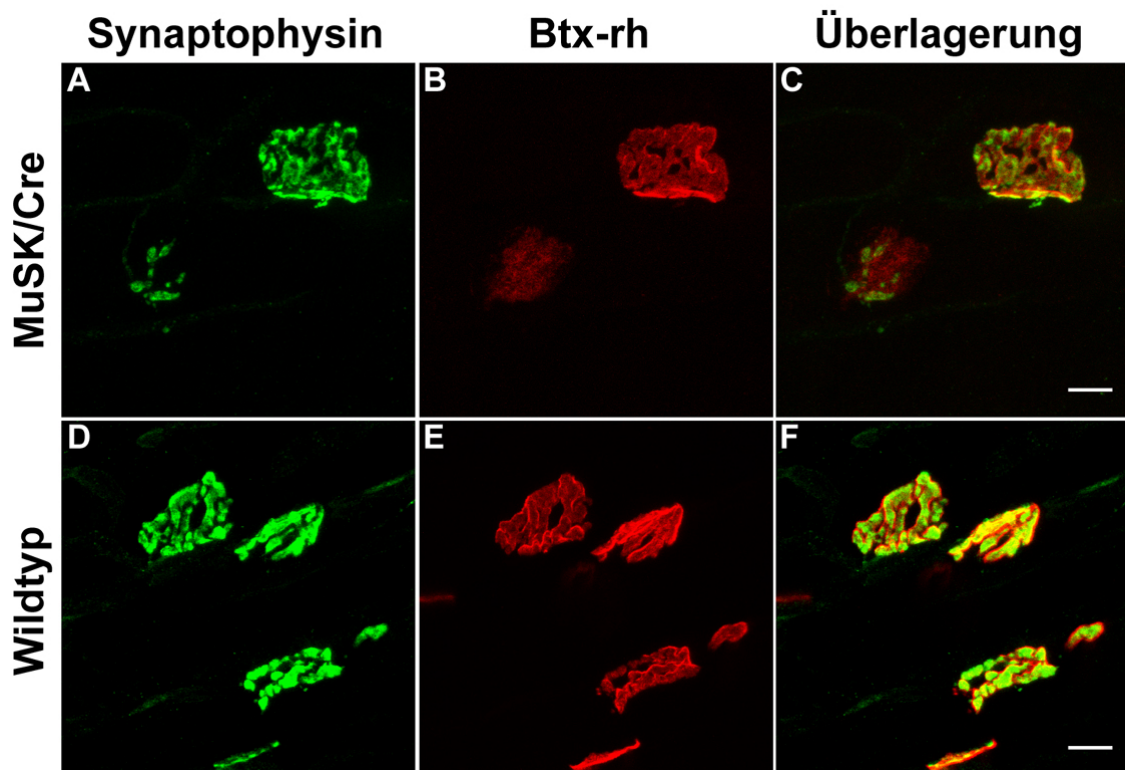


Abb. 15: Nachweis von Synaptophysin an der NMJ

Synapsen eines P21 MuSK/Cre- (A-C) und Wildtyp-Tier (D-F) wurden mit Btx-rh markiert (B, E) und Synaptophysin mit Antikörper visualisiert (A, D). C und F zeigen das jeweilige Überlagerungsbild (Maßstab: 10  $\mu$ m)

Dies wird auch durch statistische Auswertung der Flächenverhältnisse von Synaptophysin zu AChR, und damit Verhältnis Prä- zur Postsynapse, belegt. Im Vergleich zu Wildtyp-Tieren ist in MuSK/Cre-Tieren eine breitere Variabilität der Flächenverhältnisse zu beobachten. Dabei sind in nur 57 % der Synapsen dieser Tiere mehr als die Hälfte der Postsynapse mit der Präsynapse colokalisiert. In Wildtyp-Tieren ist dagegen diese Colokalisation in mehr als 85% aller Synapsen zu beobachten (Abb. 16).

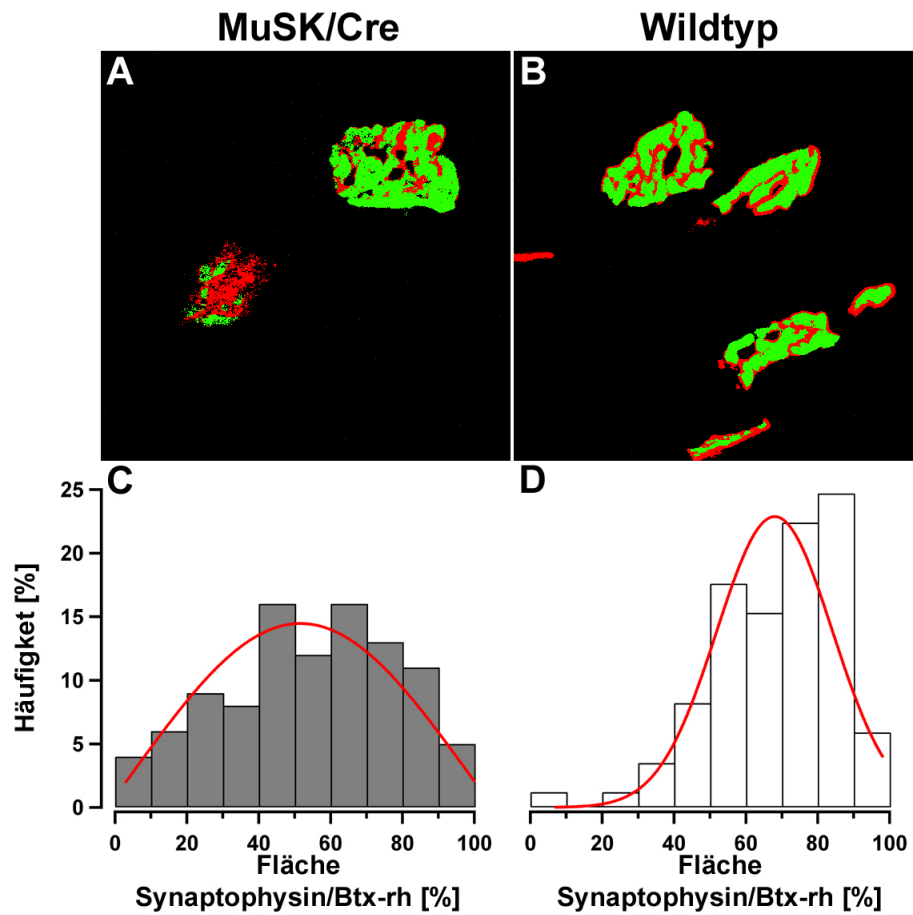


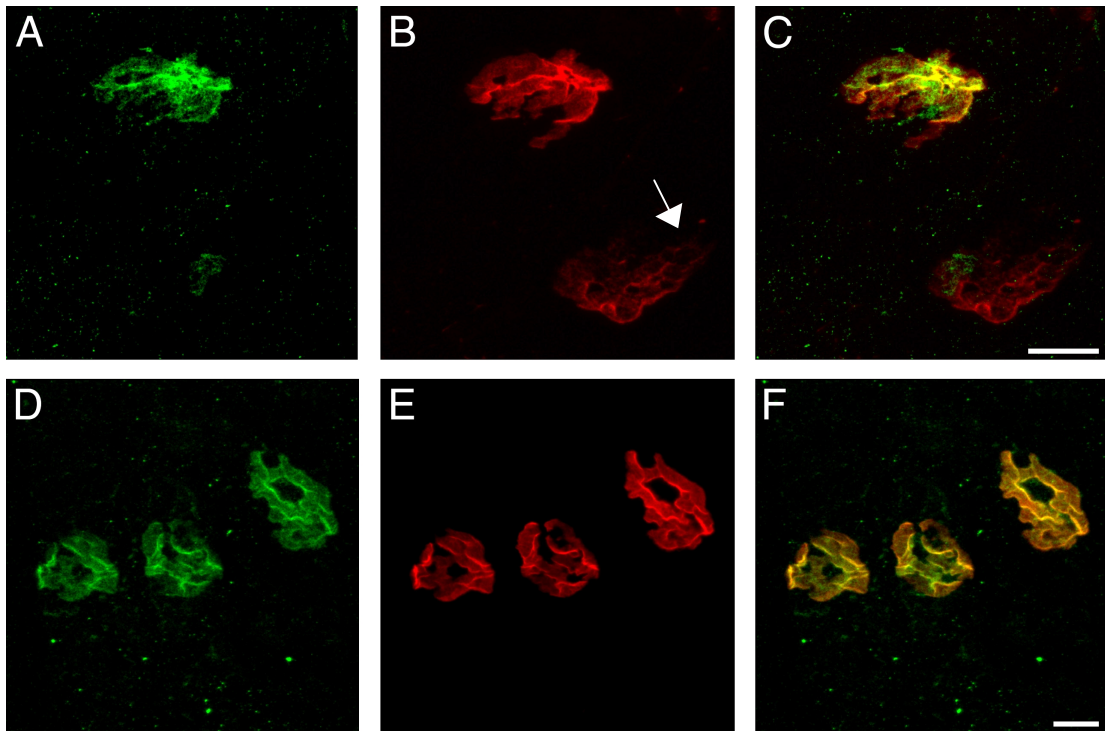
Abb. 16: Flächenverhältnis von Prä- zur Postsynapse

Signalmaximierte Beispielbilder von Synaptophysin (grün) und Btx-rh (rot) markierten MuSK/Cre- (A) und Wildtyp-Synapsen (B). Häufigkeitsverteilung der Flächenverhältnisse der Synaptophysin markierten Präsynapse zur Fläche der Btx-rh markierten Postsynapse. (C) Verteilung von 99 Synapsen aus MuSK/Cre-Tieren (D) Verteilung von 84 Synapsen aus Wildtyp-Tieren.

## ***IV.5.5 Untersuchungen der postsynaptischen Veränderungen***

### ***IV.5.5.1 Nachweis des Verlustes von MuSK an der NMJ***

Um zu untersuchen, ob die Inaktivierung von MuSK dessen Lokalisierung an der NMJ beeinflusst, wurde MuSK mit Hilfe von spezifischen Antikörpern markiert. Zur Visualisierung mit dem konfokalem Mikroskop wurde ein Fluorescein-markierter Zweitantikörper verwendet und die Synapse mit Btx-rh sichtbar gemacht. In Abb. 17 sind die Aufnahmen von Synapsen eines P19 MuSK/Cre- sowie Wildtyp-Tieres dargestellt. Dessen Synapsen zeigen die typische Brezel-Struktur mit einer hohen AChR-Dichte, wobei MuSK mit den Rezeptoren colokalisiert ist (Abb. 17 D-F). Die NMJ eines MuSK/Cre-Tieres zeigen dagegen ein differenziertes Bild, wie exemplarisch in Abb. 17 A-C dargestellt. Während eine NMJ die Struktur einer Wildtyp-Synapse besitzt, besitzt die zweite eine geringere Dichte der AChR, verliert an komplexer Struktur und scheint sich aufzulösen. In diesen „zerfallenden Bereichen“ der Synapse konnte auch kein MuSK-Protein nachgewiesen werden. Nur in Bereichen von Synapsen liess sich MuSK nachweisen, die noch eine hohe AChR-Dichte aufwiesen, wie es z.B. auch bei der ersten NMJ auch der Fall ist. Dabei ist die Colokalisation mit den AChR jedoch weniger genau als in den NMJ eines Wildtyp-Tieres (Abb. 17 F).



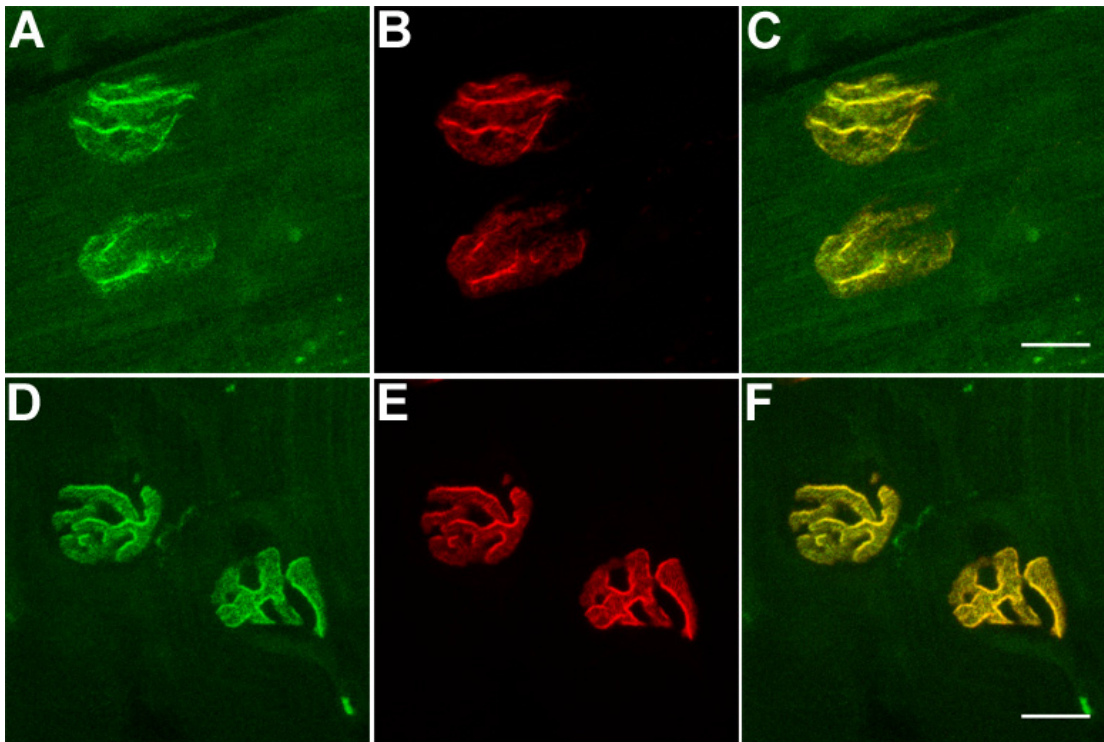
**Abb. 17: Nachweis von MuSK an der NMJ**

Synapsen von MuSK/Cre- (A-C) und Wildtyp-Tieren (D-F) wurden mit Btx-rh markiert (B, E) und MuSK mit Antikörper visualisiert (A, D). (C) und (F) zeigen das jeweilige Überlagerungsbild (Maßstab: 10 µm).

#### ***IV.5.5.2 Visualisierung des postsynaptischen Proteins Rapsyn***

Das Membranprotein Rapsyn verbindet die AChR mit dem Zytoskelett der Muskelfaser und ist somit für die Stabilität und Erhaltung der postsynaptischen Struktur notwendig. Da MuSK für die Lokalisation von Rapsyn an der Synapse erforderlich ist, wurde die Lokalisation von Rapsyn mit einer Antikörperfärbung in Diaphragmen von P20-Tieren nachgewiesen. Es zeigte sich, dass es keine Veränderung der Lokalisation in Synapsen von MuSK/Cre-Tieren gibt. Rapsyn ist auch an den sich auflösenden Synapsen mit den AChR colokalisiert, wie es in den Wildtyp-Synapsen der Fall ist (Abb. 18). Allerdings nimmt dort die Dichte von Rapsyn ebenso ab wie die Dichte der AChR.





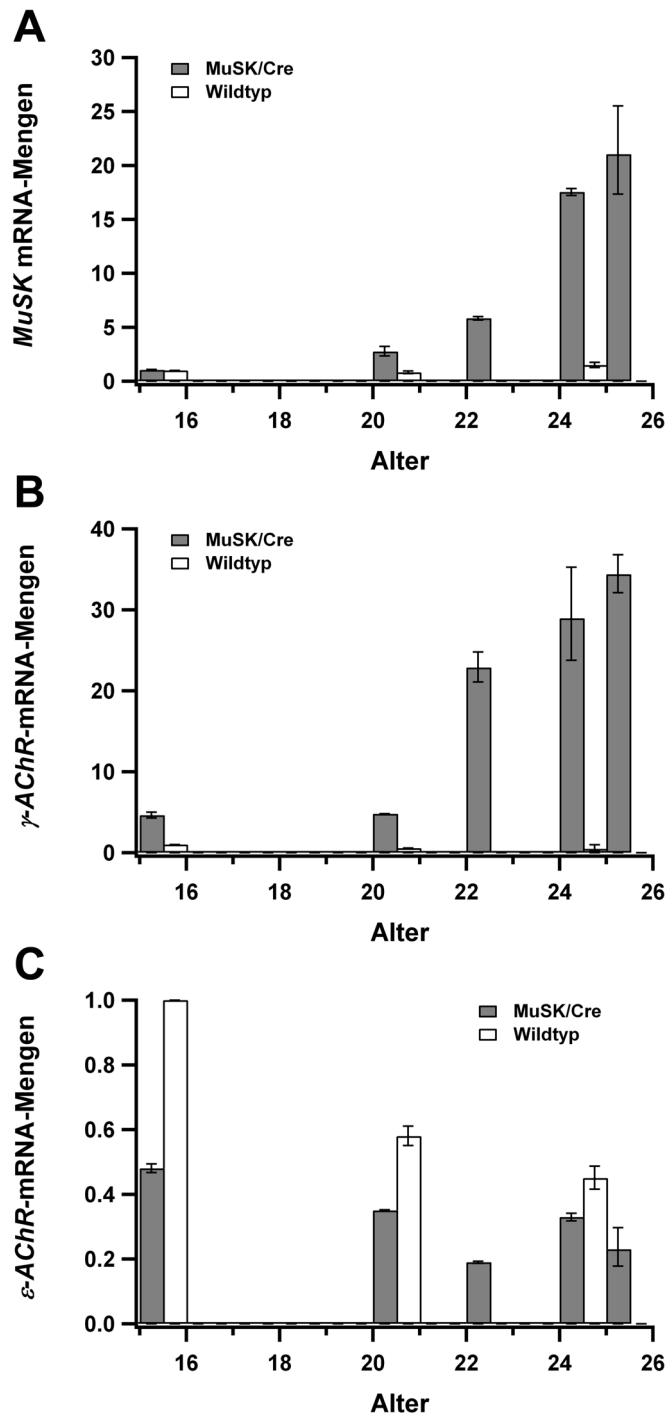
**Abb. 18:** Nachweis von Rapsyn an der NMJ

Synapsen von MuSK/Cre- (A-C) und Wildtyp-Tieren (D-F) wurden mit Btx-rh markiert (B, E) und Rapsyn mit Antikörper visualisiert (A, D). (C) und (F) zeigen das jeweilige Überlagerungsbild (Maßstab: 10  $\mu$ m)

#### *IV.5.5.3 Einfluss der Inaktivierung von MuSK auf das Transkriptionsverhalten synapsenspezifischer Proteine*

Um den Einfluss der Inaktivierung von MuSK auf die Transkription der AChR-Untereinheiten zu untersuchen, wurden die mRNA-Mengen der embryonalen  $\gamma$ AChR und der adulten  $\epsilon$ AChR-Untereinheiten, sowie die Mengen der MuSK-mRNA quantitativ gemessen. Zu diesem Zweck wurde RNA aus Muskelgewebe von Hinterbeinen verschieden alter MuSK/Cre- und Wildtyp-Tieren isoliert und die Mengen der mRNA mit quantitativer RT-PCR analysiert. Als Mengenstandard für die eingesetzten RNA wurden die gemessene Mengen der mRNA der Glyceraldehyde-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet und die quantifizierten Werte der mRNA entsprechend normalisiert. Während im Wildtyp-Tier die Menge der MuSK-mRNA mit dem Alter nicht ansteigt, gibt es mit zunehmenden Alter der MuSK/Cre-Tiere eine fortwährenden Anstieg der Expression. Im 25 Tage alten Tier ist 22mal mehr MuSK-mRNA als in einem P15 Wildtyp-Tier nachweisbar (Abb. 19 A). Analog

geschieht dieser Anstieg der Expression mit der embryonalen  $\gamma$ AChR-Untereinheit (Abb. 19 B). Verglichen mit der Expression im P15 Wildtyp-Tier besitzt die  $\gamma$ AChR im 25 Tage alten MuSK/Cre-Tier eine 34fach höhere Expression. Bei der Expression der  $\epsilon$ AChR-Untereinheit konnte dagegen keine wesentliche Veränderungen beobachtet werden (Abb. 19 C). Zwischen Tag 15 und Tag 25 kommt es sowohl in MuSK/Cre- als auch in Wildtyp-Tieren nur zu einer geringen Reduktion der Expression.



**Abb. 19: Quantitative Analyse der relativen mRNA-Mengen von MuSK,  $\gamma$ - und  $\epsilon$ AChR in MuSK/Cre- und Wildtyp-Tieren**

Durch quantitative RT-PCR wurden die relativen Mengen der mRNA von MuSK (A),  $\gamma$ AChR (B) und  $\epsilon$ AChR (C) in Muskelgewebe der Hinterbeine verschieden alter MuSK/Cre- und Wildtyp-Tiere gemessen. Als interner Mengenstandard diente GAPDH. Die jeweilige Menge im P15 Wildtyp-Tier diente als Referenz.



#### ***IV.5.5.4 Lokalisation der subsynaptischen Kerne***

Unter der NMJ kommt es während der postnatalen Entwicklung zur Akkumulation von Kernen in der Muskelfaser. Da es durch die Inaktivierung von MuSK zur Auflösung von NMJ in MuSK/Cre-Tieren kommt, wurde das Verhalten der subsynaptischen Kerne untersucht. Hierfür wurden Soleusmuskeln herauspräpariert, die AChR mit Btx-rh und die Kerne DAPI gefärbt und mit einem konfokalem Mikroskop aufgenommen. Abb. 20 A zeigt die Projektion einer Synapse im MuSK/Cre-Tier mit geringer AChR-Dichte und sich auflösender Struktur. In Abb. 20 B ist eine Wildtyp-Synapse mit hoher AChR-Dichte und ihrer Brezel-Struktur abgebildet. Zur Lokalisation der subsynaptischen Kerne wurden 3D-Rekonstruktionen mit der Software Imaris (Bitplane, Zürich, Schweiz) erstellt. Während unter der sich auflösenden Synapse keine Kerne zu finden sind, sind Kerne unter der Wildtyp-Synapse lokalisiert (Abb. 20 C, D).

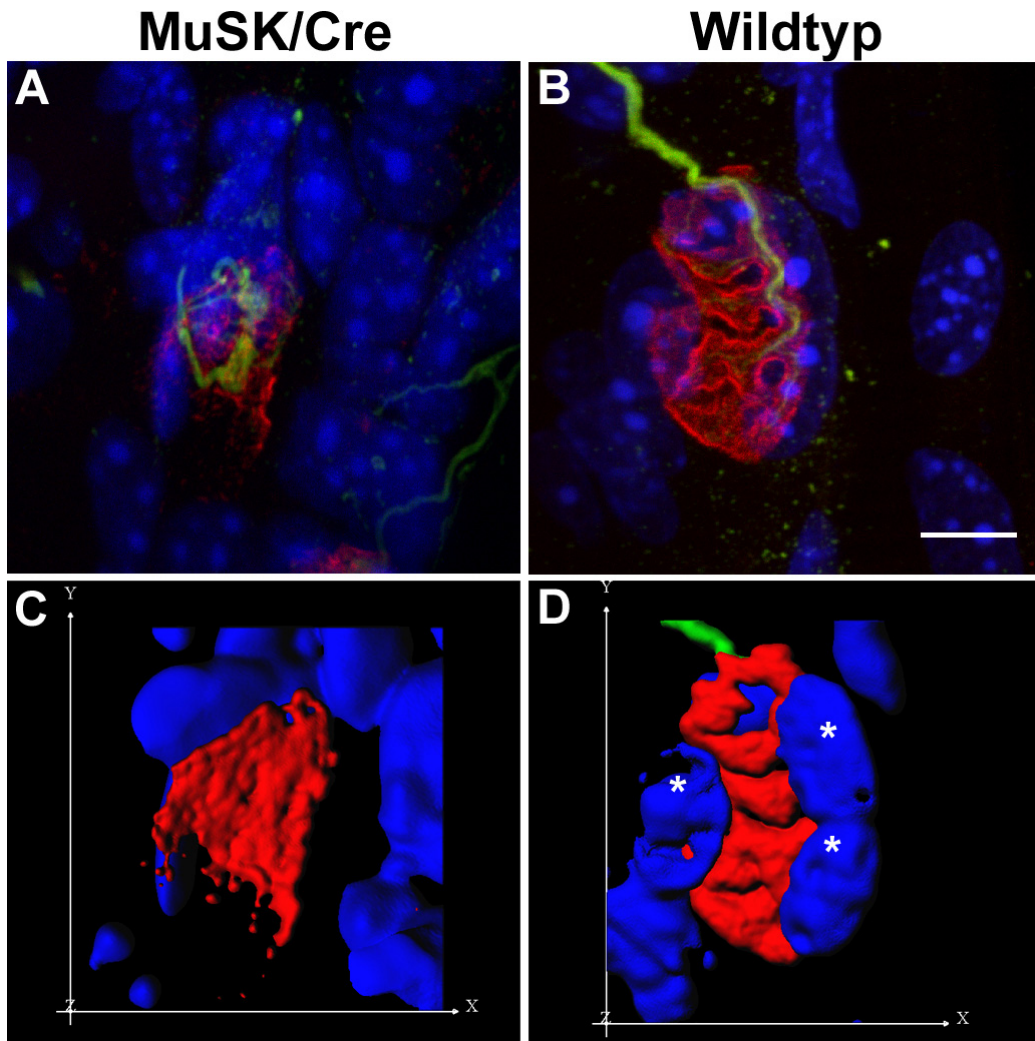
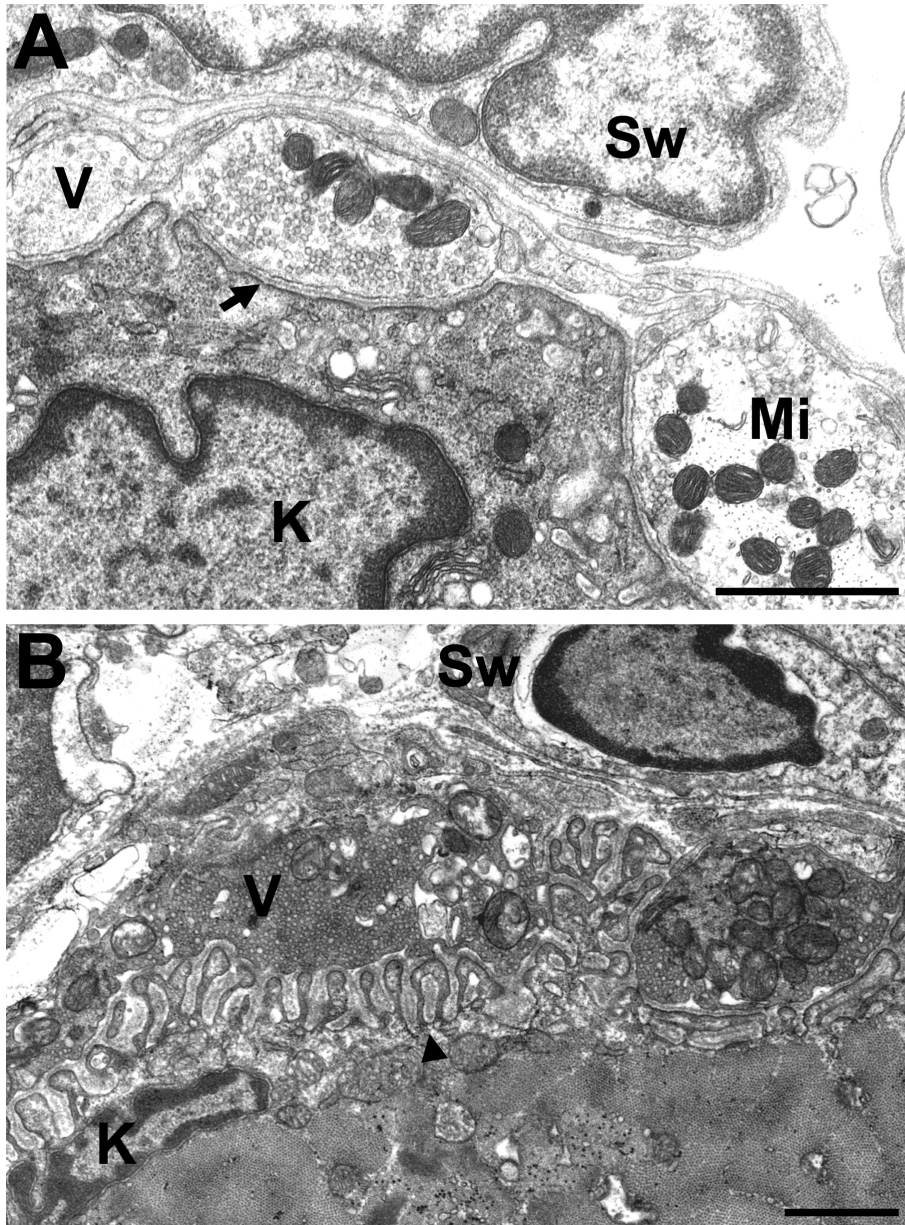


Abb. 20: Lokalisation von Kernen der Muskelfaser

Eine sich auflösende Synapse eines MuSK/Cre-Tieres (A) und eine Synapse eines Wildtyp-Tieres (B) wurden mit Btx-rh markiert, Motoneurone mit Antikörper gegen Neurofilament und die Kerne mit DAPI gefärbt. Zur Lokalisation der Kerne wurden 3D-Rekonstruktionen der konfokalen Aufnahmen errechnet. Die Darstellungen in (C) und (D) zeigen die intrazelluläre Seite der jeweiligen Synapsen. Die subsynaptischen Kerne sind mit Sternchen markiert. (Maßstab: 5  $\mu\text{m}$ )

#### ***IV.5.5.5 Ultrastrukturelle Veränderungen***

Zur Untersuchung von ultrastrukturellen Veränderungen wurden Synapsen von Soleusmuskeln mit dem Elektronenmikroskop analysiert. Abb. 21 zeigt die Aufnahme einer NMJ eines 27 Tage alten MuSK/Cre-Tieres (Abb. 21 A) und eines Wildtyp-Tieres (Abb. 21 B). In beiden Synapsen ist jeweils die Präsynapse mit den darin enthaltenen Vesikeln und den Mitochondrien zu erkennen. Über der Präsynapse liegt die Schwann'sche Zelle. Im synaptischen Spalt ist in beiden Fällen die Basallamina sichtbar. Auch subsynaptische Kerne können unter den Einfaltungen der postsynaptischen Membran lokalisiert werden. Auffallend ist, dass die postsynaptische Membran deutlich weniger Einfaltungen besitzt. Noch vorhandene Einfaltungen weisen dabei meist eine geringe Tiefe auf (Abb. 21 A). So befinden sich in den MuSK/Cre Synapsen durchschnittlich  $0,8 \pm 0,1$  Einfaltungen pro  $\mu\text{m}$  postsynaptischer Membran, während sie im Wildtyp  $2,3 \pm 0,3$  Einfaltungen pro  $\mu\text{m}$  aufweist.



**Abb. 21:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Synapsen 27 Tage alter MuSK/Cre- (A) und Wildtyp-Tiere (B).

Die Nervenenden mit den Vesikeln (V) und Mitochondrien (Mi) sind von der Schwann'schen Zelle (Sw) bedeckt. In beiden Aufnahmen sind subsynaptische Kerne zu erkennen (K). Die postsynaptische Membran der MuSK/Cre-Synapse ist weitgehend flach (Pfeil in A) und besitzt nur an wenigen Stellen Einfaltungen, während in der Kontroll-Synapse durchgehend Einfaltungen vorhanden sind (Pfeilspitze in B). In beiden Fällen ist die Basallamina deutlich zu sehen (Maßstab: 1  $\mu$ m).

#### IV.5.6 Elektrophysiologische Untersuchungen an Hemidiaphragmen

Zur Untersuchung der Funktionalität der NMJ in MuSK/Cre-Tieren, wurden verschiedene elektrophysiologische Eigenschaften untersucht. So wurden neben den Miniaturendplattenströmen (engl.: „miniature endplate currents“; MEPCs) auch Miniaturendplattenpotentiale (engl.: „miniature endplate potentials“, MEPPs), sowie induzierte Endplattenpotentiale (engl.: „evoked endplate potentials“; EPPs) gemessen.

##### IV.5.6.1 MEPPs

MEPPs wurden an isolierten linken Hemidiaphragmen von P21-P24 Tieren bei Raumtemperatur gemessen. Dabei wurden von der jeweiligen Faser etwa 30 MEPPs gemessen und diese dann gemittelt. In Abb. 22 A sind die gemittelten MEPPs je einer Faser eines MuSK/Cre und Wildtyp-Tieres dargestellt, Abb. 22 B zeigt Ausschnitte der aufgenommenen Einzel-MEPPs. Es ist deutlich die geringere Amplitude der MuSK/Cre –MEPPs gegenüber den Wildtyp-MEPPs zu erkennen. In MuSK/Cre-Tieren beträgt die Amplitude  $0,93 \pm 0,12$  mV und ist verglichen mit der Amplitude der MEPPs in P22-P24 Wildtyp-Tieren ( $1,76 \pm 0,09$  mV) signifikant reduziert ( $p < 0,01$ ).

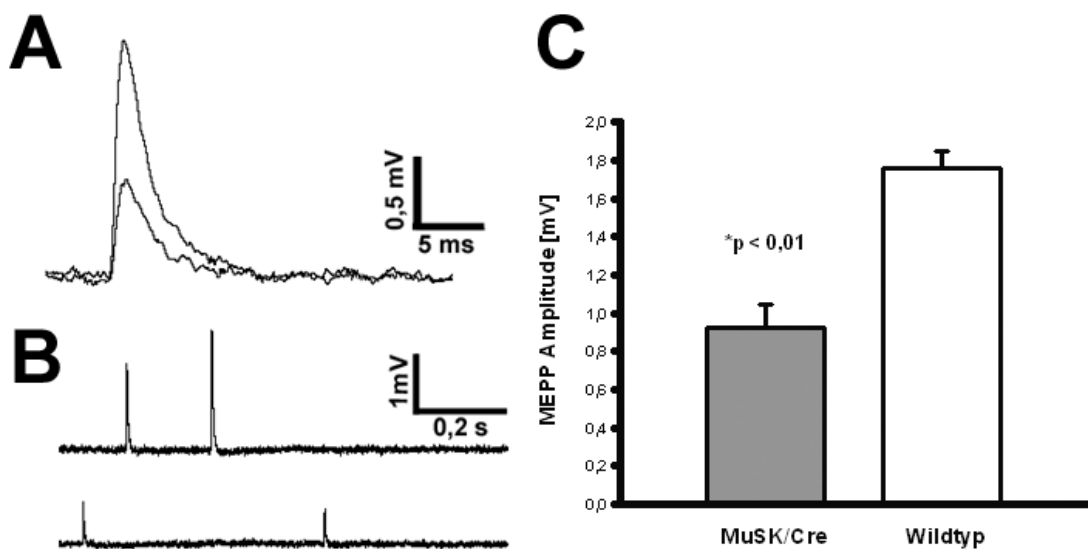


Abb. 22: Exemplarische Darstellung aufgezeichneter MEPP von Synapsen aus MuSK/Cre- und Wildtyp-Tieren

(A) Gleichzeitige exemplarische Darstellung der aufgezeichneten MEPP einer Synapse im MuSK/Cre- und Wildtyp-Tieres (höhere Amplitude). (B) Exemplarische Ausschnitte der MEPP-Aufnahmen über einen Zeitraum von einer Sekunde. (C) Diagramm mit den durchschnittlichen Amplitude der gemessenen MuSK/Cre- und Wildtyp-Synapsen (n = 60). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen.

#### IV.5.6.2 EPPs

Neben der Analyse der MEPPs wurde an den Hemidiaphragmen wurde durch Stimulation des Nerven bei 0,3 Hz EPPs induziert und gemessen. Um dabei Muskelkontraktionen zu verhindern, wurden hierfür die  $\text{Na}^{2+}$ -Kanäle des Muskels spezifisch mit dem Schlangengift  $\alpha$ -Conotoxin blockiert. Die gemessenen EPPs der Synapsen in MuSK/Cre –Tieren zeigen wie die MEPPs eine reduzierte Amplitude ( $20 \pm 3,1$  mV) verglichen mit den Werten, die im Wildtyp-Tier gemessen werden konnten ( $28,4 \pm 1$  mV, Abb. 23).

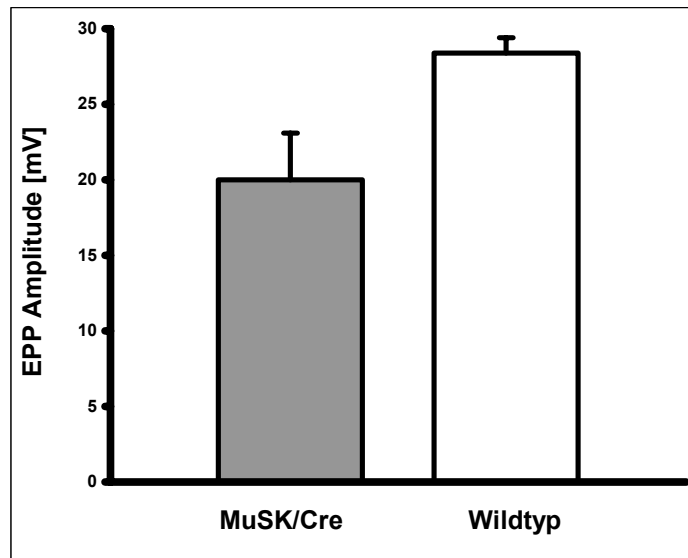


Abb. 23: Amplituden von EPPs von Synapsen in MuSK/Cre- und Wildtyp-Diaphragmen

Die durchschnittliche Amplitude der EPPs der Synapsen in MuSK/Cre-Tieren ist mit  $20 \pm 3,1$  mV signifikant geringer als in Kontrolltieren ( $28,4 \pm 1$  mV; n = 20 – 30;  $p^* < 0,05$ ).

#### IV.5.6.3 Schnellere Abnahme der EPP-Amplitude bei 20-Hz-Stimulation

Da die Präsynapsen in MuSK/Cre-Tieren aufgrund der nachgewiesenen Synaptophysin-Verteilung oft stark verändert sind, sollte gemessen werden, ob die Synapsen der MuSK/Cre-Tiere während einer hochfrequenten Serie von Stimulationen ausreichende Mengen ACh ausschütten können. Zu diesem Zweck wurden durch 20 Hz-Stimulation des Nerven eine Serie von 35 kurz aufeinander folgender EPPs induziert und gemessen (Abb. 24 A). Die Amplituden der EPPs wurden dabei jeweils auf die Amplitude des ersten induzierten EPP normalisiert. Bei den ersten zehn EPPs konnte sowohl in MuSK/Cre- als auch in den Kontroll-Tieren eine starke Abnahme der Amplitude registriert werden. Im Wildtyp besitzen die danach folgenden EPP dann 80% des Wertes der Ausgangsamplitude. In MuSK/Cre-Tieren dagegen nehmen die EPP-Amplituden weiter ab, und liegen ab dem 15. EPP schliesslich bei etwa 70% der Ausgangsamplitude (Abb. 24 B)

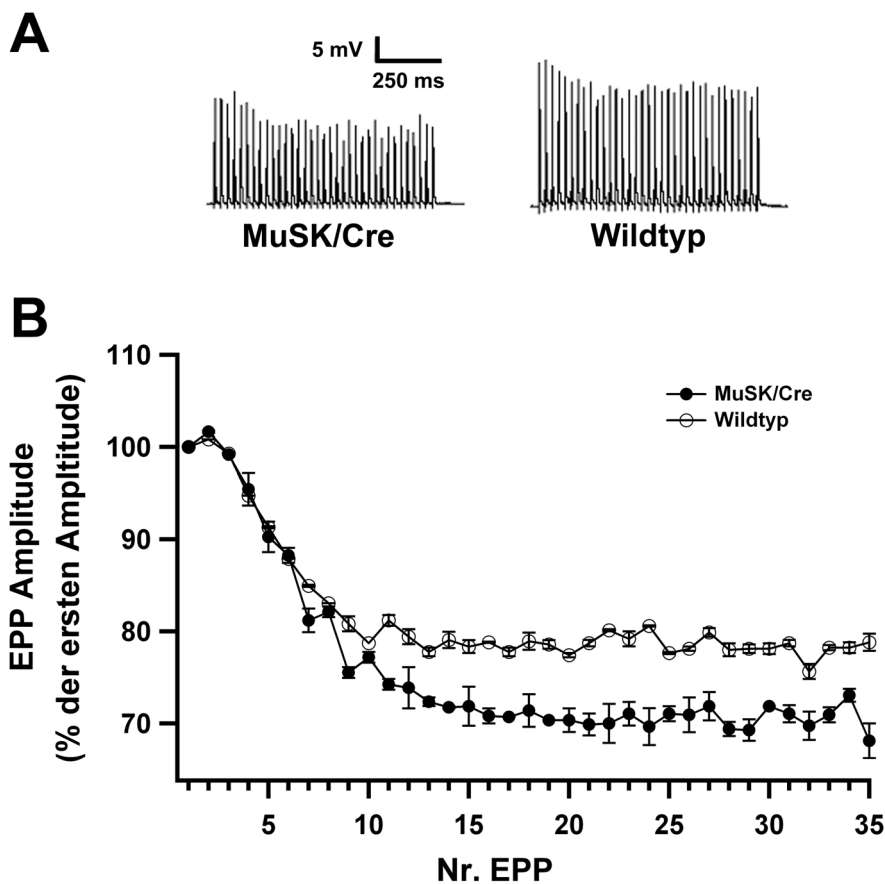


Abb. 24: EPPs von Synapsen in MuSK/Cre- und Wildtyp-Diaphragmen während 20 Hz-Stimulation des Nerven

(A) Exemplarische Aufnahme der 35 stimulierte EPPs einer MuSK/Cre- und Wildtyp-Synapse. (B) Diagramm der

durchschnittliche Amplituden der EPPs als prozentuale Werte der jeweils ersten Messwertes ( $n = 4$ ). Die Balken repräsentieren die Standardabweichungen.

#### IV.5.6.4 Elektrophysiologischer Nachweis multipler Innervierungen

Bei der Messung der EPPs in MuSK/Cre-Diaphragmen konnten mehrfach Synapsen gefunden werden, deren EPPs eine multiple Amplitude aufwiesen. Abb. 25 A zeigt die Messung einer solchen Synapse, die drei verschiedene Amplituden mit etwa 10 mV, 25 mV und 35 mV (Pfeile) aufweist. Sie ist somit dreifach innerviert. Die Messung einer einfach innervierten Synapse ergibt dagegen nur eine Amplitude, da sie nur von einem Axon innerviert ist (Abb. 25 B).

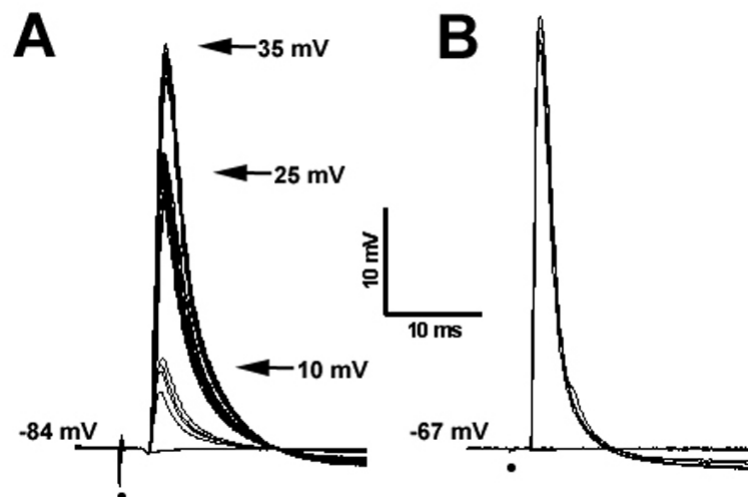


Abb. 25: Multiple Innervierung in MuSK/Cre-Tieren

(A) Exemplarische EPPs einer dreifach innervierten Synapse im MuSK/Cre-Tier. Die drei unterschiedlichen Amplituden von 10 mV, 25 mV und 35 mV sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. (B) Exemplarische Aufnahme von EPPs einer einfach innervierten Synapse. Das jeweilige Haltepotential ist eingetragen, sowie die Zeitpunkt der Stimulation durch einen Punkt gekennzeichnet.



#### ***IV.5.6.5 MEPCs***

Durch den Austausch der embryonalen  $\gamma$ - durch die adulte  $\epsilon$ AChR-Untereinheit während der postnatalen Entwicklung, werden die elektrophysiologischen Eigenschaften des Rezeptors verändert. Die mittlere Kanaloffenzeit des  $\gamma$ AChR ist länger als die des  $\epsilon$ AChR, so dass die Abfallzeitkonstante Tau ( $\tau$ ) der Miniaturendplattenströme Aussagen über die Kanalzusammensetzung einer Synapse erlaubt. Da eine erhöhte Expression der  $\gamma$ AChR-Untereinheit in älteren MuSK/Cre-Tieren nachzuweisen war, soll durch Messungen von MEPC an Diaphragmen das Vorhandensein der  $\gamma$ AChR in den Synapsen geklärt werden. Zu diesem Zweck wurden MEPC an isolierten linken Hemidiaphragmen von  $>P21$  Tieren bei Raumtemperatur mit einer Zwei-Elektroden-Stromklemme gemessen (Abb. 26 A, B). Es zeigte sich, dass es keinen signifikanten Unterschied der Amplituden in den Synapsen der MuSK/Cre-Tiere ( $-3,07 \pm 1,15$  nA;  $n = 34$ ) im Vergleich zu den MEPCs in Kontroll-Tieren ( $-2,62 \pm 0,69$  nA;  $n = 25$ ) gibt (Abb. 26 C). Ebenso konnte kein signifikanter Unterschied in der Länge der Abfallzeitkonstante  $\tau$  in den Synapsen der MuSK/Cre- und Wildtyp-Tieren festgestellt werden (MuSK/Cre:  $0,84 \pm 0,4$  ms,  $n = 49$ ; Wildtyp:  $0,98 \pm 0,23$  ms,  $n = 24$ ; Abb. 26 D). Damit ist also kein  $\gamma$ AChR in den Synapsen der MuSK/Cre-Tiere nachweisbar.

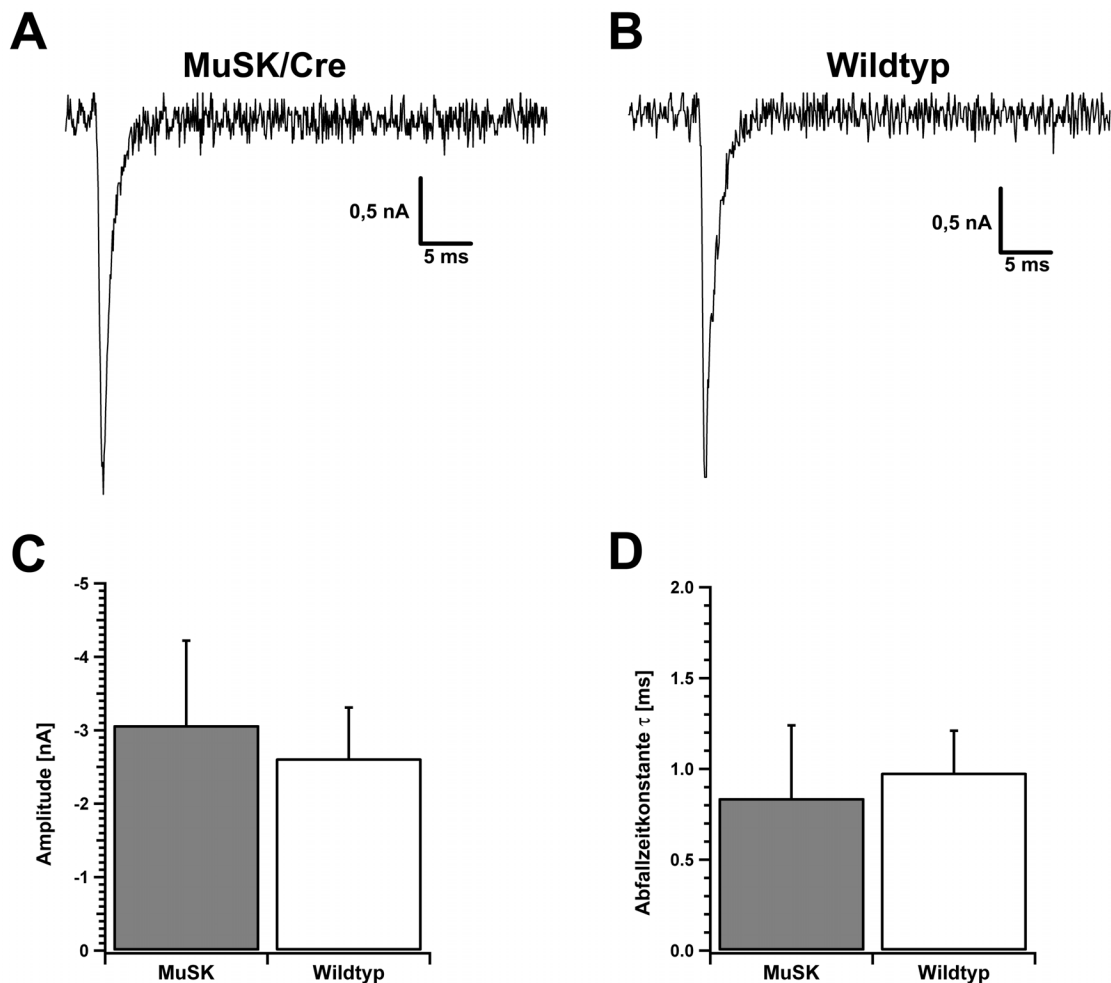


Abb. 26: Messung von MEPC der Synapsen in MuSK/Cre- und Wildtyp-Diaphragmen

Exemplarische MEPCs von Synapsen im Diaphragmen eines 27 Tage alter MuSK/Cre-Tieres und eines P 28 Wildtyp-Tieres (B). (C) Mittlere Amplituden der gemessenen MEPCs. (D) Mittleren Abfallzeitkonstanten  $\tau$  von 49 Synapsen von MuSK/Cre-Tieren und 24 Synapsen aus Wildtyp-Tieren. (C) Alle Messungen wurden bei einem Haltepotential von  $-65$  mV und Raumtemperatur durchgeführt. Die Daten wurden mit einem Intervall von  $75 \mu\text{s}$  digitalisiert. Es wurden nur MEPCs ausgewertet, deren Stromanstiegszeit von 10% auf 90% der maximalen Amplitude im Bereich unter  $0,5$  ms liegt, und von denen mehr als 30 Einzel-MEPC aufgezeichnet wurden.

#### IV.6 Generierung und Analyse der Tiere MuSK/Cre: $\gamma$ GFP

In den MuSK/Cre-Tieren kommt es zur postnatalen Etablierung von Synapsen und eine verstärkte Expression der embryonalen  $\gamma$ -AChR-Untereinheit, jedoch nicht zu dessen Einbau in die postnatal entstandenen Synapsen, wie die elektrophysiologischen Messungen der MEPCs zeigen konnten. Um zu klären,

ob die fötale  $\gamma$ AChR-Untereinheiten in den MuSK/Cre-Tieren überhaupt gebildet werden, soll dies mit Hilfe von GFP-markierten  $\gamma$ -AChR-Untereinheiten geklärt werden. Zu diesem Zweck wurden im Labor vorliegende transgene Mäuse ( $\gamma$ GFP) verwendet, die ein Fusionsprodukt von GFP und der  $\gamma$ AChR-Untereinheit exprimieren ( $\gamma$ AChR-GFP; Dissertation S.Gensler, 2001). Diese wurden mit  $\text{MuSK}^{\text{loxP/loxP}-}$ ,  $\text{MuSK}^{\text{loxP}/-}$ , sowie  $\text{MuSK}^{+/-}$ :Cre-Tieren verpaart. Deren Nachkommen waren jeweils heterozygot für  $\gamma$ AChR-GFP und wurden so miteinander verpaart, dass die Nachkommen den Genotyp  $\text{MuSK}^{\text{loxP/loxP}}:\text{Cre}:\gamma\text{GFP}$  und  $\text{MuSK}^{\text{loxP}/-}:\text{Cre}:\gamma\text{GFP}$  besaßen. Sie werden im Folgendem als MuSK/Cre: $\gamma$ GFP-Tiere bezeichnet.

#### ***IV.6.1 Phänotyp der MuSK/Cre: $\gamma$ GFP-Tieren***

Die MuSK/Cre: $\gamma$ GFP-Tiere sind nach der Geburt lebensfähig und unterscheiden sich nicht von Wildtyp-Tieren. Analog zu den MuSK/Cre-Tieren verläuft ihre Entwicklung in den ersten zwei Wochen normal und entwickeln ab P15 eine progressive Muskelschwäche, die vor P30 zum Tode führt.

#### ***IV.6.2 Nachweis von $\gamma$ AChR-GFP in adulten MuSK/Cre: $\gamma$ GFP-Tieren***

Um sicherzustellen, dass es in den MuSK/Cre: $\gamma$ GFP-Tieren  $\gamma$ AChR-GFP hergestellt wird, sollte es durch Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurde Gesamtprotein aus Skelettmuskeln der Hinterbeine P22 MuSK/Cre: $\gamma$ GFP-Tiere und eines MuSK/Cre-Tieres isoliert und eine Immunopräzipitation mit einem GFP-Antikörper durchgeführt. Nach Auftrennung in einem 8%igem PAA-Gel, wurde die aufgetrennten Proteine auf einen PDVF-Membran transferiert und mit Antikörper detektiert. Abb. 27 A zeigt den Nachweis des  $\gamma$ AChR-GFP mit einem GFP-Antikörper. Im Muskelgewebe von MuSK/Cre-Tieren, die homozygot oder heterozygot für  $\gamma$ AChR-GFP waren konnte ein etwa 90 kDa grosses Protein nachgewiesen werden. Im Muskelgewebe eines MuSK/Cre-Tieres dagegen ist dieses nicht nachweisbar, da hier kein Signal zu erkennen ist. Zusammen mit dem Nachweis des etwa 50 kDa grossen rekombinanten GFP-Proteins zeigt dies, dass der

verwendete Antikörper spezifisch GFP erkennt. Der Nachweis mit einem  $\gamma$ AChR-Antikörper (Abb. 27 B) zeigt ebenfalls die Signale etwa 90 kDa grossen Proteine im Muskelgewebe der MuSK/Cre: $\gamma$ GFP-Tier und bestätigt, dass das nachgewiesene 90 kDa grosse Protein  $\gamma$ AChR-GFP ist.

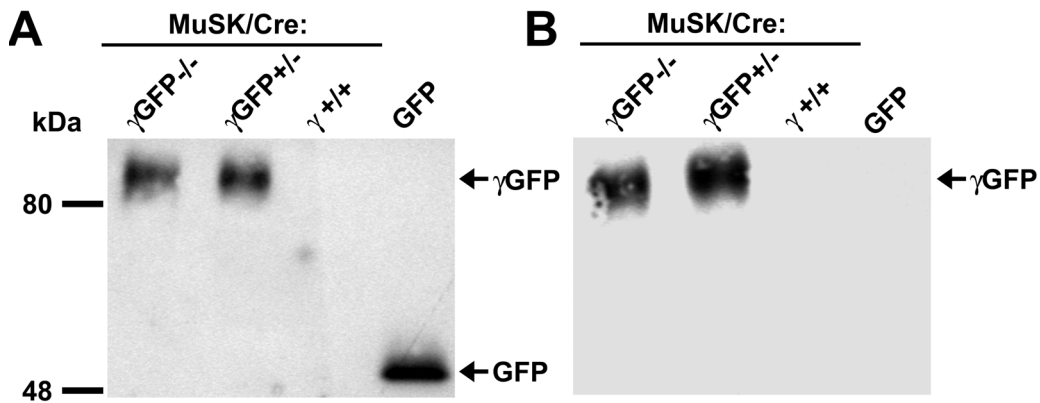


Abb. 27: Nachweis von  $\gamma$ GFP in Muskelgewebe der MuSK/Cre:GFP-Tiere

Western-Blot von mit einem GFP-Antikörper immunopräzipitiertem Proteinextrakt aus Muskelgewebe eines P22 MuSK/Cre: $\gamma$ GFP<sup>-/-</sup> -Tieres, eines P22 MuSK/Cre: $\gamma$ GFP<sup>+/-</sup> -Tieres und eines P22 MuSK/Cre-Tieres. Als Kontrolle für den verwendeten GFP-Antikörper wurde rekombinantes GFP verwendet. (A) Nachweis mit einem GFP-Antikörper. (B) Nachweis mit einem AChR-Antikörper

Zusätzlich wurden die Synapsen in einem Diaphragma eines P22 MuSK/Cre: $\gamma$ GFP-Tieres mit Btx-rh markiert. In Abb. 28 sind konfokale Aufnahmen einzelner Synapsen dargestellt. Obwohl die Synapse mit der kompakten Struktur eine hohe Dichte der Btx-rh markierten AChR aufweist, kann keine Fluoreszenz von GFP in diesen Synapsen erfasst werden.

Mit der Generierung der MuSK/Cre: $\gamma$ GFP-Tiere konnte somit nachgewiesen werden, dass in diesen Tieren die embryonale  $\gamma$ AChR-Untereinheit hergestellt wird, jedoch nicht in die neu gebildeten Synapsen eingebaut wird.

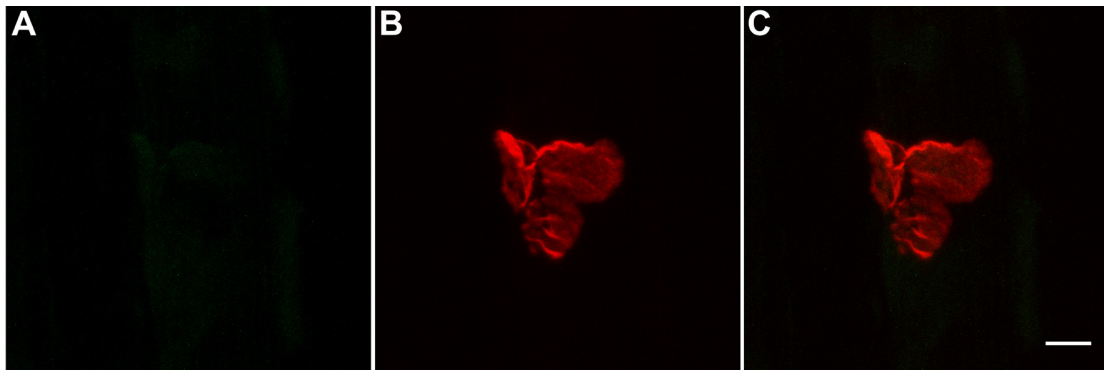


Abb. 28: Junge Synapse in einer P 22 MuSK/Cre:γGFP-Tiere

In der jungen Synapse eines P22 MuSK/Cre:γGFP--Tieres ist kein GFP-Signal zu erkennen (A), obwohl die mit Btx-rh markierten AChR eine hohe Dichte aufweisen (B). (C) zeigt das Überlagerungsbild (Maßstab: 5  $\mu$ m).

## IV.7 Analyse von MuSK, Dvl, Pak durch siRNAs

Im Rahmen dieser Arbeit sollten siRNAs durch Einzelfaserinjektion in Muskelfasern eingebracht werden, und so der Einfluss einzelner Proteine auf die Erhaltung der NMJ untersucht werden.

### IV.7.1 Herstellung der siRNA-codierenden Plasmide

Da siRNA nach zwei bis drei Tagen in Zellen abgebaut werden, wurden Plasmide hergestellt, die die Vorläufer-dsRNA der siRNA hinter einem Maus-spezifischen U6-Promotor besitzen. Durch deren Injektion wird so ständiges Vorhandensein der siRNA in den Fasern gewährleistet. Für die Zielproteine MuSK, Dvl und PAK wurden jeweils drei Plasmide konstruiert. Mit Hilfe des „siRNA Target Finder“ ([http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA\\_finder.html](http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html), Ambion, USA) wurden die Sequenzen der Ziel-mRNA ausfindig gemacht, an die siRNAs binden und so mit grösster Wahrscheinlichkeit zu dessen Degradation führen. Die korrespondierenden Oligonukleotide (Tabelle 1) wurden von der Firma MWG (München) hergestellt, und anschliessend in den Vektor pSilencer 1.0 U6 ligiert. Die korrekte Insertion wurde durch Sequenzierung bestätigt. Die Injektionen erfolgte jeweils mit den drei Plasmiden in einzelne Fasern des Soleusmuskels von P50 – P100 Wildtyp-Tieren. Zusätzlich wurde zusammen

mit den siRNA-Plasmiden ein Plasmid injiziert, das für GFP oder nGFP (#585) unter dem CMV-Promotor codiert. Dies ermöglichte die erfolgreich injizierten Fasern anhand der Anwesenheit des GFP zu identifizieren. Die Analyse der erfolgten Injektionen erfolgte zehn Tage nach Injektion.

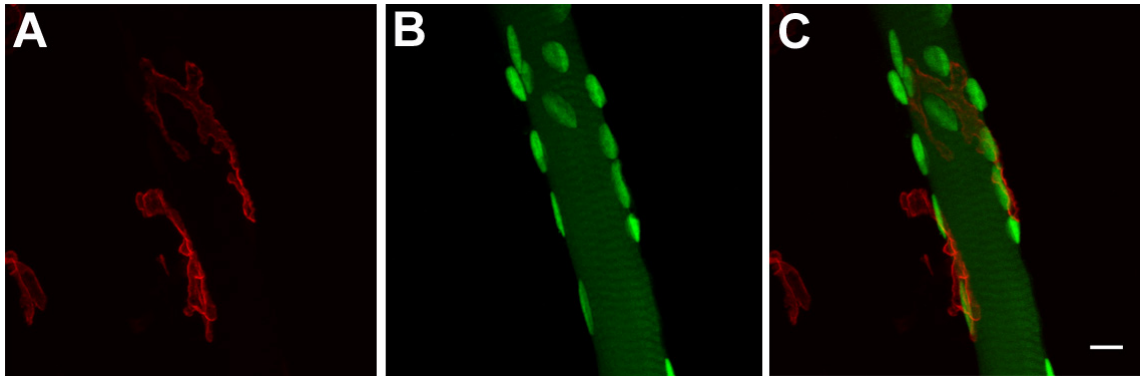
<b>Protein</b>	<b>Zielsequenz der mRNA</b>	<b>Plasmid</b>
MuSK	AAACTGTAGATGCCTTGGTTG	MuSK 104
	AAACCATCTGTGTCCTGGATC	MuSK 445
	AATCCCACAATGTCACCTTTG	MuSK 656
Dvl	AAGAACGTGCTCAGCAACCGG	Dvl 100
	AAGTCCATGGACCAGGACTTC	Dvl 148
	AAGGAGGAGATCTTCGATGAC	Dvl 178
PAK	AACGGCGTAGACATCCAGGAC	PAK 199
	AACCCTAAACCACGGCTCCAA	PAK 285
	AAGGAGCGACCAGAGATTTCT	PAK 397

**Tab. 1: Zielsequenzen der mRNA der zu untersuchenden Proteine und die hergestellten korrespondierenden Plasmide**

## ***IV.7.2 Auswertung der erfolgten Injektionen***

### ***IV.7.2.1 nGFP***

Abb. 29 zeigt eine Muskelfaser, die erfolgreich mit einem für nGFP-codierenden Plasmid injiziert worden ist. Es sind zwei Synapsen mit typischer "Brezel-Struktur" zu sehen. Die linke ist dabei auf der Faser lokalisiert, was an den subsynaptischen Kerne erkennbar ist. Dies zeigt, dass durch die GFP-Expression die Struktur der Endplatte nicht verändert wird.

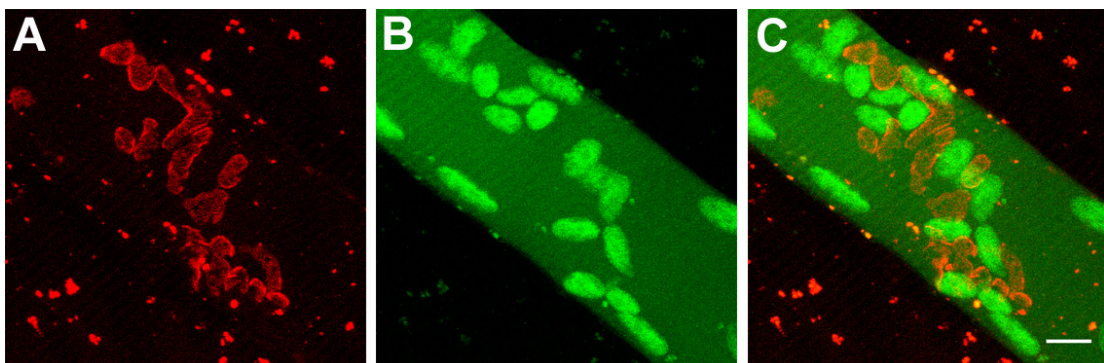


**Abb. 29: nGFP injizierte Muskelfaser**

(A) Btx-rh markierte Synapsen. (B) Mit nGFP erfolgreich injizierte Muskelfaser. (C) Die Überlagerung zeigt, dass eine Synapse mit der Brezel-Struktur auf der injizierten Faser liegt (Maßstab: 10µm).

#### *IV.7.2.2 Dvl*

Abb. 30 zeigt zwei nebeneinander liegende Fasern, die erfolgreich mit Plasmiden Dvl 100, Dvl 148 und Dvl 178 und nGFP injiziert worden sind. Die Kerne und deren Akkumulation sind unter den Synapsen deutlich zu erkennen. Die postsynaptische Struktur der beiden Synapsen zeigt aber keine typische Brezel-Struktur, sondern die AChR bilden einzelne grössere Akkumulationen, die nicht zusammen hängen. Dies zeigt, dass durch siRNA spezifisch gegen Dvl, die Strukturbildung der Synapse gestört werden kann. Demnach ist Dvl an diesem Prozess beteiligt.



**Abb. 30: Mit Dvl 100, Dvl 148, Dvl 178 und nGFP injizierte Muskelfasern**

(A) Btx-rh markierte Synapsen, die eine unnormale Struktur aufweisen. (B) Mit nGFP markierte Kerne der zwei erfolgreich injizierten Muskelfasern. (C) Die Überlagerung zeigt, dass die Synapsen auf den injizierten Faser liegen (Maßstab: 10 µm).

### IV.7.2.3 *MuSK*

Bei den Injektionen von Plasmiden für siRNA spezifisch gegen MuSK (MuSK 104, MuSK 445, MuSK 656) konnten keine wesentlichen Unterschiede in der Struktur gegenüber Synapsen nicht injizierter Fasern festgestellt werden. Abb. 31 zeigt eine erfolgreich injizierte Faser, die anhand des GFP im Cytosol zu erkennen ist. Die Synapse zeigt eine Akkumulation mit hoher Dichte der AChR und „Brezel“-Struktur. Es ist zwar kein Auflösen der Struktur zu beobachten, wie es in Synapsen von MuSK/-Tieren der Fall ist, doch ist hier eine ungewöhnliche Form der Synapse zu erkennen. Offensichtlich kann mit den verwendeten siRNA nicht die selbe Wirkung auf die Synapse erzielt werden, wie sie durch konditionale Inaktivierung von MuSK erreicht wird. Allerdings kann auch nicht eine zu ungenaue Injektion und eine ungenügende Menge der gebildeten siRNAs ausgeschlossen werden.

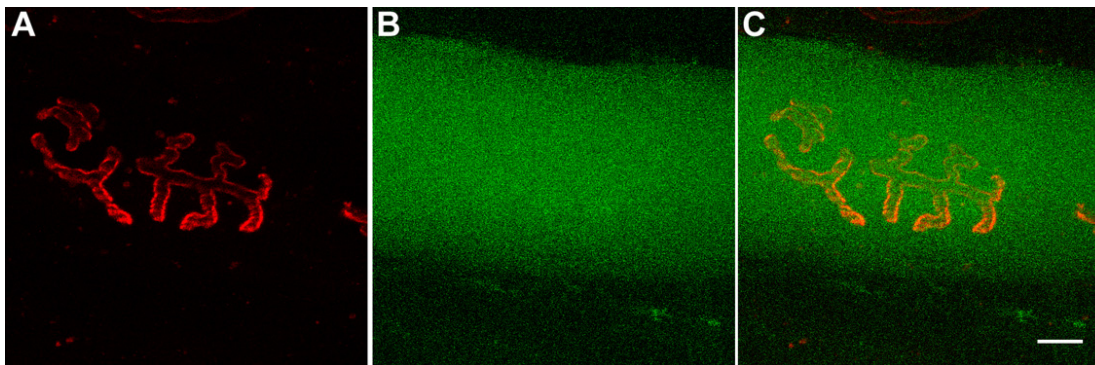


Abb. 31: MuSK 104, MuSK 445, MuSK 656 und GFP injizierte Muskelfasern

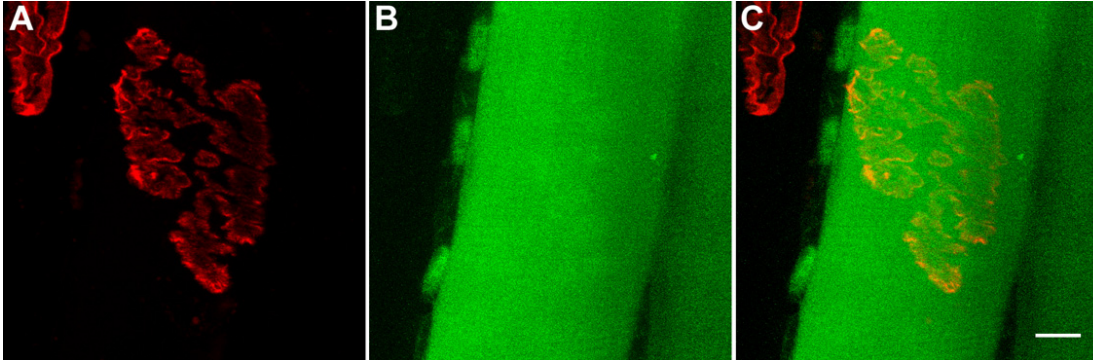
(A) Mit GFP markierte Muskelfaser. (B) Btx-rh markierte Synapse, die eine unnormale Struktur aufweist. (C) Die Überlagerung zeigt, dass die Synapsen auf den injizierten Faser liegt. (Maßstab: 5  $\mu$ m)

### IV.7.2.4 *PAK*

Die Synapsen der Fasern, die mit Plasmiden PAK 199, PAK 285 und PAK 397 injiziert worden sind, zeigen eine unregelmässige Dichte der AChR. Wie in Abb. XX dargestellt, besitzt der Rand darüber hinaus keine definierte Grenze, sonder erscheint ungleichmäßig und diffus. Die Synapse der nicht injizierten Faser (oberer Teil Abb. 32) weist dagegen eine klare Grenze zwischen Synapse und übriger Membran auf. Dies Ergebnisse verdeutlichen, dass mit den



eingebrachten siRNA spezifisch gegen PAK die Strukturhaltung der Synapse gestört werden kann. Darüber hinaus kann auch die Beteiligung von PAK am Prozess der Strukturbildung der Synapse *in vivo* bestätigt werden.



**Abb. 32: Mit PAK 199, PAK 285 und PAK 397 und nGFP injizierte Muskelfasern**

**(A) Mit GFP markierte Muskelfaser. (B) Btx-rh markierte Synapsen. (C) Die Überlagerung zeigt, dass die Synapse mit dem ungleichmässigen Rand auf der auf den injizierten Faser liegt (Maßstab: 5  $\mu\text{m}$ ).**

## V Diskussion

Die Entstehung der neuromuskulären Synapse (NMJ) ist ein komplexer Vorgang, an dem die Muskelfaser, das Motoraxon und die Schwann'sche Zelle, sowie von ihnen produzierte Signalstoffe beteiligt sind. Obwohl die NMJ aufgrund ihres einfachen Aufbaus die bisher bestuntersuchte Synapse ist, sind die genauen biochemischen und molekularen Mechanismen dieses Prozesses weitestgehend unbekannt. Dessen Aufklärung kann dabei auch das Wissen und Verständnis über die Entwicklung neuronaler Synapsen im Gehirn erweitern. Eine zentrale Rolle bei der Entwicklung der NMJ besitzt die Muskel-spezifische Kinase MuSK. Sie induziert das Prepatterning in der embryonalen Muskelfaser und ist Teil des Rezeptorkomplexes für Agrin, das vom Motorneuron sezerniert wird. Da es in MuSK-defizienten Tieren zu keiner Bildung von NMJ kommt, konnten bisher keine Aussagen über die Funktion von MuSK in adulten Synapsen gemacht werden (DeChiara, T. M. et al., 1996). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit mit Hilfe des Cre/loxP-Systems eine Mauslinie generiert, in der MuSK erst postnatal inaktiviert wird.

### V.1 MuSK<sup>loxP/loxP</sup> bzw. MuSK<sup>loxP/-</sup>-Tiere besitzen normale NMJ

MuSK-defiziente Mäuse sterben bei der Geburt, so dass die physiologische Funktion von MuSK im adulten Muskel nicht zu untersuchen ist (DeChiara, T. M. et al., 1996). In unserem Labor wurde eine transgene Mauslinie etabliert, deren Tiere ein „gefloxtes“-MuSK-Gen besitzen (MuSK<sup>loxP</sup>; Hesser, B. A., 2000). Diese Mäuse sind von Wildtyp-Tieren nicht zu unterscheiden, und sie besitzen normal entwickelte NMJ. Durch Verpaarungen der MuSK<sup>loxP/+</sup>-Tiere entstandene MuSK<sup>loxP/loxP</sup>-Tiere sind nicht von Wildtyp-Tieren zu unterscheiden und deren Synapsen entwickeln sich normal. Durch Transfektion von MuSK<sup>loxP</sup>-ES-Zellen mit Cre-Recombinase konnten auch eine transgene MuSK<sup>+/-</sup>-Mauslinie etabliert werden. Auch diese Tiere entwickeln sich normal und sind nicht von Wildtyp-Tieren zu unterscheiden. Die Einführung der loxP-Erkennungssequenzen in das MuSK-Gen führt somit zu keiner Einschränkung der Funktion von MuSK. Obwohl eine Verringerung der Expressionsrate von MuSK nicht auszuschließen ist, kann mit den MuSK<sup>loxP/-</sup>-Tieren gezeigt werden, dass nur die Expression eines MuSK-Allels für die Funktionsfähigkeit einer NMJ notwendig ist.

Daher konnten die Tiere im Rahmen dieser Arbeit zur Generierung weiterer transgener Linien verwendet werden.

Um eine konditionale Inaktivierung von MuSK in adulten Muskeln zu erreichen, wurden  $\text{MuSK}^{\text{loxP}/-}$  und  $\text{MuSK}^{\text{loxP}/\text{loxP}}$ -Tiere mit transgenen Tieren verpaart, die Cre-Recombinase in der Skelettmuskulatur exprimieren. Aus diesen Verpaarungen gingen Tiere ( $\text{MuSK}/\text{Cre}$ ) hervor, die den Genotyp  $\text{MuSK}^{\text{loxP}/\text{loxP}}:\text{Cre}$  oder  $\text{MuSK}^{\text{loxP}/-}:\text{Cre}$  besaßen.

## **V.2 Die Cre-Expression ist den Muskeln und einzelnen Muskelfasern mosaikartig und zeitlich verschieden**

Die Inaktivierung von MuSK in den  $\text{MuSK}/\text{Cre}$ -Tieren ist von der Aktivität der Cre-Recombinase abhängig. Die Inaktivierung von MuSK im postnatalem bzw. adultem Muskel wurde mit „Cre-Deleter“-Mäusen erreicht, die Cre unter der Kontrolle des Promotors der Muskel-Kreatinkinase (MCK) exprimieren (Bruning, J. C. et al., 1998). Dieser führt zur spezifischen Expression in Herz- und Skelettmuskulatur, die in der Ratte bei E17 beginnt und das Maximum bei P10 erreicht, was dann den Rest des Lebens beibehalten wird (Trask, R. V. et al., 1990). Diese ist vom späten Expressionsstart des MCK-Promotors und dessen Eigenschaft abhängig, in schnellen Muskelfasern eine höhere Expression zu verursachen als in langsamen Fasern (Dunant, P. et al., 2003), doch liegen bisher keine Daten zur Expression von Cre in der Skelettmuskulatur vorliegen. Die Verpaarung von Cre-exprimierenden Tiere mit LacZ-Reporter-Tieren (Soriano, P., 1999) beweist, dass durch die Cre-Aktivität das LacZ-Gen aktiviert und die  $\beta$ -Galactosidase exprimiert wird. Die Analyse von Muskelgewebes von P30-LacZ/Cre-Tieren zeigt allerdings, dass das Expressionsmuster nicht gleichmäßig sondern mosaikartig ist. Auch ist die Expressionsstärke zwischen den Fasern und innerhalb einer Faser ungleichmäßig, doch kann in allen Fasern eine Expression von Cre nachgewiesen werden. Daher kommt es in  $\text{MuSK}/\text{Cre}$ -Tieren nicht zur gleichmässigen Inaktivierung von MuSK an allen NMJ, sondern zu einer während der postnatalen Entwicklung stets zunehmenden Inaktivierung von MuSK, die schliesslich zum frühzeitigem Tod der Tiere führt.

### **V.3 MuSK/Cre-Tiere entwickeln progressive Muskelschwäche**

Im Gegensatz zu MuSK-defizienten Tieren sind MuSK/Cre-Tiere postnatal lebensfähig. Sie können atmen, sich bewegen und sind bis zum Ende der zweiten Woche auch nicht von Wildtyp-Tieren zu unterscheiden. Ab P15 aber entwickeln sie jedoch eine progressiv verlaufende Muskelschwäche, und bekommen Schwierigkeiten sich zu bewegen und Nahrung aufzunehmen. Durch Messungen des Körpergewichts und der Muskelkraft konnte gezeigt werden, dass ab P15 die MuSK/Cre-Tiere im Gegensatz zu Wildtyp-Tieren nicht mehr an Gewicht zunehmen, sondern sogar im weiteren Verlauf der Entwicklung an Gewicht verlieren. Da sich die Muskelkraft der Vorderextremitäten ebenfalls nicht mehr verstärkt, kann man davon ausgehen, dass das reduzierte Körpergewicht durch den Verlust von Muskelmasse hervorgerufen wird. Diese progressive Muskelschwäche führt schließlich vor P30 zum Tod, der wahrscheinlich durch nicht mehr funktionsfähige Atmung verursacht wird.

Der Grund für den progressiven Verlauf der Muskelschwäche stellt die Inaktivierung von MuSK durch die Expression der Cre-Recombinase in den Muskelfasern dar. Aufgrund der mosaikartigen Expression von Cre in den Muskelfasern zu unterschiedlichen Zeitpunkten, kommt es nicht zu einer gleichzeitigen globalen Inaktivierung von MuSK, so dass MuSK nicht in allen NMJ zur selben Zeit inaktiviert wird. Jedoch gibt es eine fortwährende entwicklungsabhängige Zunahme der Cre-Expression in den Muskelfasern, so dass Cre-vermittelte Inaktivierung von MuSK im Muskel kontinuierlich ist. Der lineare Verlauf konnte dabei durch kompetitiven PCR mit genomischer DNA aus Muskelgewebe dieser Tiere belegt werden. Dabei ist es wahrscheinlich, dass die Tiere durch die verzögerte globale Inaktivierung von MuSK noch relativ lange nach der Geburt leben. Würde eine gleichmässige Expression von Cre in allen Kernen stattfinden, wären die lethalen Folgen der Inaktivierung von MuSK schon zu einem früheren Zeitpunkt zu erwarten.

Aus diesen genannten Gründen wird in den MuSK/Cre-Tieren eine kontinuierliche Inaktivierung von MuSK in den Muskeln erreicht, die ein progressive Muskelschwäche verursacht.

#### V.4 Postsynaptische Veränderung der NMJ

In innervierten adulten Muskeln ist MuSK in der NMJ konzentriert. Durch progressive Cre-Aktivität wird MuSK in den MuSK/Cre-Tieren konditional inaktiviert. Daher wurde die Morphologie der NMJ dieser Tiere mit verschiedenen histochemischen und immunohistochemischen Methoden an Diaphragmen und Soleusmuskeln untersucht. Die AChR der Postsynapse wurden mit Btx-rh markiert und MuSK mit spezifischen Antikörper nachgewiesen. Konfokale Aufnahmen einzelner Synapsen zeigen, dass neben Synapsen, die wie Wildtyp-Synapsen eine Brezel-Struktur besitzen, Synapsen mit reduzierter AChR-Dichte und zerfallener Struktur zu finden sind. In diesen Synapsen ist weniger MuSK nachzuweisen als in Synapsen von Wildtyp-Tieren. Offenbar kommt es durch die Inaktivierung von MuSK zu einer massiven Störung der Akkumulation der AChR und der Einbau neuer AChR in die postsynaptische Struktur wird behindert. Dies würde auch das Auftreten kleiner Akkumulationen von AChR neben den sich auflösenden Synapsen erklären. Allerdings kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass der verwendete Antikörper ein Epitop in der Kinasedomäne erkennt. So wäre inaktives MuSK zwar in der Synapse lokalisiert und mögliche Kinase-unabhängige strukturelle Funktionen erfüllen, könnte mit dem genutzten Antikörper aber nicht nachgewiesen werden.

Um den genaueren molekularen Mechanismus dieser Akkumulationsstörungen der AChR zu analysieren, wurde in den Synapsen der MuSK/Cre-Tieren die Lokalisation von Rapsyn untersucht. Da Rapsyn sowohl mit der Juxtadomäne von MuSK als auch mit den AChR interagieren soll (Apel, E. D. et al., 1997), könnte eine Inaktivierung von MuSK auch die Interaktion von Rapsyn mit den AChR beeinflussen. Daher wurde Rapsyn mit spezifischen Antikörper markiert und mit einem fluoreszierenden Zweitantikörper und konfokaler Mikroskopie nachgewiesen. Die Aufnahmen dieser Synapsen ergaben, dass Rapsyn weiterhin mit den AChR colokalisiert ist, und auch an den Stellen mit geringer Rezeptordichte in der Dichte reduziert ist. Die Interaktion von Rapsyn mit den Rezeptoren in der postsynaptischen Membran wird demnach nicht durch die fehlende Kinaseaktivität von MuSK beeinträchtigt, so dass auch in den Synapsen der MuSK/Cre-Tiere die AChR über Rapsyn mit dem Zytoskelett verbunden sind (Apel, E. D. et al., 1997 ;Ramarao, M. K. et al., 2001).

Die im Fluoreszenzmikroskop sichtbaren Veränderungen der postsynaptischen Organisation der AChR wurden auch auf ultrastruktureller Ebene

elektronenmikroskopisch untersucht. Die postsynaptische Membran ist normalerweise durch viele Einfaltungen gekennzeichnet, die eine räumliche Trennung der AChR von den spannungsgesteuerten Na<sup>+</sup>-Kanälen (Na<sub>v</sub>1.4-Kanälen) ermöglichen. In den NMJ von MuSK/Cre-Tieren ist die Anzahl dieser Einfaltungen deutlich reduziert und es gibt Bereiche der Membran, die keine Einfaltungen aufweisen. Es wird angenommen, dass die Einfaltungen der postsynaptischen Membran durch adhäsive Kräfte zwischen ihr und der Präsynapse zusammen mit dem Wachstum der Muskelfasern verursacht werden (Marques, M. J. et al., 2000). Die fehlenden Einfaltungen einiger Synapsen in den MuSK/Cre-Tieren können daher durch die gestörte Verbindung zwischen den Nervenenden und der Muskelfasern zurückzuführen sein, wie sie in diesen Tieren zu beobachten sind.

Zusätzlich zeigen konfokale Aufnahmen der sich auflösenden NMJ, dass unter den veränderten Bereichen dieser Synapsen nur noch wenige bis keine subsynaptischen Kerne mehr zu finden sind. Alle Kerne der Muskelfaser sind von einem Mikrotubuli-Netzwerk umgeben, das mit der Zellmatrix verbunden ist (Ralston, E. et al., 2001). Über Dynein und andere an das +-Ende der Mikrotubuli bindende Proteine wird so die Bewegung und Position der Kerne in der Faser reguliert (Morris, N. R., 2003). Unter den sich auflösenden Synapsen der MuSK/Cre-Tieren verschwinden die Kerne. Durch die Inaktivierung von MuSK werden also Veränderungen in der Positionierung der Kerne verursacht, die möglicherweise auf Veränderungen der Interaktionen zwischen Kern und dem Zellskeletts zurückzuführen sind. Bei diesem Prozess könnte das Protein Syne-1 eine Rolle spielen, das vor allem in der Kernhülle der subsynaptischen Kerne vorkommt und auch mit MuSK interagieren kann (Apel, E. D. et al., 2000). Demnach würde der Verlust von MuSK an der NMJ über Syne-1 zu einer schwächeren oder fehlenden Verbindung zwischen der Synapse und den darunter liegenden Kernen führen. Als Folge würden die Kerne nicht mehr unter den Synapse fixiert werden. Obwohl dies in den Synapsen der MuSK/Cre-Tieren zu beobachten ist, bleibt dieser Mechanismus weitgehend Spekulation und bedarf zur Aufklärung weiterführende Untersuchungen.

Bisher war es nur möglich, die Notwendigkeit der Kinaseaktivität in der Etablierung der NMJ zu demonstrieren (Jones, G. et al., 1999; Sander, A. et al., 2001) und für die synaptische Lokalisation die Rolle der Juxtadomäne von MuSK zu zeigen (Herbst, R. et al., 2002). Zusammen zeigen die Untersuchungen der Postsynapsen in den NMJ von

MuSK/Cre-Tieren, dass die Kinaseaktivität für die Lokalisation von MuSK und AChR in die Postsynapse und so für ihre Erhaltung notwendig ist.

## **V.5 Eliminierung und Neubildung von NMJ in MuSK/Cre-Tieren**

Die NMJ liegen im Diaphragma von Wildtyp-Tieren median angeordnet und bilden so das Endplattenband. Die Position der Synapsen wird dabei schon in der Embryonalentwicklung durch die MuSK-vermittelte Konzentration von Neuregulin und AChR in der Mitte der Muskelfasern festgelegt (Lin, W. et al., 2001; Yang, X. et al., 2001). In Hemidiaphragmen von MuSK/Cre-Tiere können ab Beginn der dritten Woche deutliche Auswirkungen der Inaktivierung von MuSK auf die Position der Btx-rh markierten Synapsen ausgemacht werden. Schon bei P15 sind im peripheren Bereich des Muskels, und damit außerhalb des Endplattenbandes NMJ zu finden. Im Diaphragma eines P22 MuSK/Cre-Tieres ist das Endplattenband nicht mehr erkennbar, und die Synapsen sind über die ganze Fläche des Muskels verteilt. Da sich in der Muskelfaser die Position der Synapse nie verändert, werden offenbar ab Beginn der dritten Lebenswoche Synapsen in den MuSK/Cre-Tieren eliminiert.

Gleichzeitig werden außerhalb des synaptischen Bandes jedoch auch neue NMJ etabliert. Die mosaikartige und stetige Cre-Expression im Muskel führt dazu, dass mit steigendem Alter der Tiere Cre in immer mehr Kernen aktiv ist. Damit sind auch immer mehr subsynaptische Kerne betroffen und MuSK wird an den Synapsen inaktiviert. Die neu gebildeten Synapsen entstehen im Bereich der Kerne, wahrscheinlich noch muSK exprimieren, und besitzen die typische Plaque-Struktur einer embryonalen Synapse. Sie sind teilweise mehrfach innerviert und sind wesentlich kleiner als dem postnatalem Alter entsprechende Synapsen. Ausserdem unterscheiden sich die gebildeten Synapsen in den MuSK/Cre-Tieren durch ihre Lokalisation ausserhalb des ehemals eng begrenztem synaptischem Band deutlich von regenerierenden Synapsen nach Denervierung, die an der selben Stelle auf der Faser erneuert werden (Sanes, J. R. et al., 1999).

Die Neubildung der Synapsen spiegelt sich in der Grössenverteilung der Synapsendurchmesser wider, da in älteren MuSK/Cre-Tieren viermal mehr Synapsen mit einem kleinem Durchmesser ( $<15 \mu\text{m}$ ) als in Wildtyp-Tieren oder jungen MuSK/Cre-Tieren gefunden werden können. Aufgrund dieser Befunde ist anzunehmen,

dass Fasern, deren ursprüngliche Synapsen inaktiviert wurden, in der Lage sind neue synaptische Kontaktstellen zu bilden. Kerne deren *MuSK* noch nicht durch Cre inaktiviert wurde, exprimieren MuSK, das dann die Expression der AChR induziert und diese lokal begrenzt akkumuliert. Dieser Vorgang entspricht so möglicherweise dem embryonalem Prepatterning. Jedoch scheint der Muskel nicht in der Lage zu sein, alle eliminierten Synapsen zu ersetzen und normale Muskelfunktion aufrechtzuerhalten, da die MuSK/Crew-Tiere vor P30 sterben. Dies konnte durch eine Quantifizierung der Synapsen bestätigt werden, bei der die Anzahl der NMJ in Diaphragma eines MuSK/Cre-Tieren signifikant geringer ist als in vergleichbaren Bereichen eines Wildtyp-Tieres. Hinzu kommt, dass die kontinuierliche Expression von Cre mit zunehmendem Alter der Tiere die Expression global verhindert.

## **V.6 Veränderte Expression der AChR-Untereinheiten in MuSK/Cre-Tieren**

Die Konzentration der AChR an der NMJ wird durch physikalischen Interaktionen mit anderen synaptischen Proteinen als auch durch Regulation auf transkriptioneller Ebene kontrolliert (Mejat, A. et al., 2003). Hierbei spielt MuSK eine zentrale Rolle, da ektopisches MuSK die Expression der AChR induziert (Jones, G. et al., 1999; Sander, A. et al., 2001). Darüber hinaus aktiviert MuSK in der Mitte der sich entwickelnden Muskelfasern seine eigene Expression und auch dort die Expression der AChR. Als Folge entwickeln sich an diesen Stellen die Synapsen (Lin, W. et al., 2001; Yang, X. et al., 2001; Lacazette, E. et al., 2003).

Um einen Einfluss der konditionalen Inaktivierung von MuSK auf das Expressionsverhalten von MuSK und den  $\gamma$ - und  $\epsilon$ AChR-Untereinheiten in den MuSK/Cre-Tieren zu untersuchen, wurde die  $\gamma$ - und  $\epsilon$ mRNA-Mengen durch relative quantitative Real Time-PCR untersucht (Winer, J. et al., 1999; Livak, K. J. et al., 2001). Dabei zeigte sich, dass sich die Expression von MuSK mit zunehmendem Alter der MuSK/Cre-Tiere auf das 23fache bei P25 erhöht. Die Fasern reagieren also offensichtlich auf den Verlust von funktionellem MuSK und dem sich anschließendem Zerfall der Synapse. Dieser inaktiviert die Muskelfaser ähnlich wie nach Denervation und es kommt dadurch zu einer stark erhöhten Expression von MuSK. Mit den gewählten Primern wurde bei der Messung der Expression von MuSK ein DNA amplifiziert, die im Bereich des Exon 4 des MuSK-Gens liegt. Aus diesem Grund



konnte nicht zwischen der durch die Cre-Rekombination verursachte kürzere mRNA und die ungekürzte mRNA unterschieden werde. Da neu gebildeten Synapsen ausserhalb des synaptischen Bandes zu erkennen sind, findet die gesteigerte Expression von MuSK offensichtlich auch an neuen Stellen der Muskelfasern statt, denn für die Bildung postsynaptischer Strukturen ist MuSK notwendig (DeChiara, T. M. et al., 1996; Lin, W. et al., 2001; Yang, X. et al., 2001). Aufgrund der erhöhten MuSK-Expression könnte man spekulieren, dass extrasynaptisches MuSK zu den alten Synapsen transportiert und dort wieder konzentriert wird. Sander et al. haben aber gezeigt, dass MuSK lokal über den exprimierenden Synapsen verbleibt und nur unwesentlich weit transportiert werden kann (Sander, A. et al., 2001; Hesser, B. A., 2000). Daher kann auch von extrasynaptischen Kernen kein funktionsfähiges MuSK in die zerfallenden Synapsen eingebaut werden, und den Zerfall unterbinden.

Neben der erhöhten Expression von MuSK kommt es in Muskeln der MuSK/Cre-Tiere auch zu einer verstärkten Expression der fötalen  $\gamma$ AChR-Untereinheit (>35fach bei P25), während die Expression der adulten  $\epsilon$ AChR-Untereinheit leicht reduziert ist. Für die erhöhte Expression der  $\gamma$ AChR-Untereinheit ist wahrscheinlich wie für MuSK die mangelnde Muskelaktivität verantwortlich. Die erhöhte  $\gamma$ AChR-Expression wird in denervierten Muskeln oder in pharmakologisch inaktiviert Muskeln beobachtet (Witzemann, V. et al., 1989; Witzemann, V. et al., 1991).

Im Gegensatz zur dazu ist die Transkription der  $\epsilon$ AChR-Untereinheit ist von der Agrin-MuSK-Signalkaskade abhängig, die die Bindung des Transkriptionsfaktor GABP an die N-Box des Promoters der  $\epsilon$ AChR-Untereinheit induziert (Schaeffer, L. et al., 1998, Lacazette, E. et al., 2003). Die reduzierte Expression von  $\epsilon$ AChR kann daher auf eine mögliche verringerte Aktivierung durch das neuronale Agrin zurückzuführen sein. In der Tat ist in den MuSK/Cre-Tiere ein extrem variables Wachstum und auch Innervierungsmuster der Neurone zu beobachten, so dass die Agrin-Ausschüttung an den Synapsen vermindert ist.

## **V.7 Die Innervierung und das Wachstum der Motorneurone ist in den MuSK/Cre-Tieren gestört**

Zur Visualisierung und Untersuchung der innervierenden Motorneurone in den MuSK/Cre-Tieren, wurden diese mit Antikörper gegen Neurofilament markiert und mit konfokaler Mikroskopie nachgewiesen.

Zu Beginn der Entwicklung der NMJ im Diaphragma werden die Synapsen von mehreren Motoraxonen innerviert. Im Laufe der Entwicklung werden die überzähligen Axone jedoch zurückgebildet, so dass schließlich der Hauptstrang von Motorneuronen median im Muskel liegt. Von diesem zweigen Motoraxone ab und innervieren die Synapsen, die sich im synaptischen Band befinden (Sanes, J. R. et al., 2001).

Neben der fortschreitenden Eliminierung und gleichzeitiger Neubildung von Synapsen sind in MuSK/Cre-Tieren deutliche Unterschiede im Wachstumsverhalten der Motoraxone zu beobachten. So zeigt die Übersichtsaufnahme eines Hemidiaphragmas eines P20 MuSK/Cre-Tieres, dass der Hauptnervenstrang noch zentral im Muskel verläuft, die Motoraxone aber an den Fasern entlang über den gesamten Muskel verlaufen. Aufnahmen mit höherer Vergrößerung zeigen zudem, dass die Motoraxone oft eine Synapse innervieren und weiter zur nächsten Synapse wachsen. Demnach scheinen die Neuronen durch eine Innervierung nicht mehr am Wachstum gehindert zu werden und wachsen weiter, um eine andere Endplatte zu innervieren. Neben mehrfachen Verzweigungen der Axone können auch viele verdickte Endigungen ausgemacht werden. Diese werden „Retraction bulbs“ genannt und sind ein Zeichen für sich zurückziehende Neuronen (Riley, D. A., 1977). Demnach geschieht das extreme Wachstum der Motorneurone nur über eine begrenzte Strecke, auch wenn es dabei nicht zur Innervierung einer Synapse kommt.

Mit einem Antikörper gegen Synaptophysin wurde das Nervenende dargestellt. In den zerfallenden Synapsen, die nur noch eine geringe AChR-Dichte besitzen, ist auch die Fläche reduziert, die durch präsynaptische Membranen bedeckt ist. Während in mehr als 85% aller Synapsen von Wildtyp-Tieren mehr als die Hälfte der Postsynapse von der Präsynapse bedeckt ist, sind es in MuSK/Cre-Tieren nur 57%. Darüber hinaus ist die Verteilung der Flächenverhältnisse von Prä- zu Postsynapse in diesen Tieren wesentlich variabler, was durch die unterschiedlichen Entwicklungsstufen der Synapsen in den MuSK/Cre-Tieren erklärt werden kann.

Die Analysen zeigen, dass das extensive Wachstum der Motoraxone in den MuSK/Cre-Tieren als eine direkte Folge der Eliminierung der postsynaptischen Struktur durch die Inaktivierung von MuSK angesehen werden kann. Die fehlende Aktivität von MuSK führt wahrscheinlich zu einer Reduzierung der Rezeptordichte und einem Verlust der postsynaptischen Strukturen, was dann in einer reduzierten Transmission dieser Synapsen resultiert und verstärktes Wachstum der Axone hervorruft. Wie die Messungen der MEPPs und EPPs zeigten, ist in den MuSK/Cre-Tieren die Transmission signifikant reduziert, und auch die Fähigkeit der Präsynapsen, ausreichend ACh bei wiederholter Stimulation auszuschütten ist vermindert. In der Tat ist reduzierte oder fehlende Transmission ein Grund für verstärktes Neuronenwachstum, wie vor allem in embryonalem Gewebe gezeigt werden konnte (Banks, G. B. et al., 2003; Terrado, J. et al., 2001). Auch kann im Gewebe adulter Tiere ein verstärktes Nervenwachstum durch präsynaptische oder postsynaptische Blockade der Transmission induziert werden (Brown, M. C. et al., 1977; Holland, R. L. et al., 1980). Neben der Transmission werden auch den Schwann'schen Zellen sowie muskulären und neuronalen Faktoren wie NCAM, IGF und CNTF eine Rolle bei der Regulation der Wachstums der Motoraxone zugeschrieben (Love, F. M. et al., 1999; English, A. W., 2003; Tam, S. L. et al., 2003). Da in den MuSK/Cre-Tieren das Nervenwachstum durch die Inaktivierung von MuSK induziert wird, könnte auch in diesen Tieren die Einflüsse der genannten Faktoren weiter untersucht werden, da deren genaue Mechanismen weitgehend ungeklärt sind.

### **V.8 Die $\gamma$ AChR-Untereinheit kann in den neu gebildeten Synapsen nicht nachgewiesen werden**

Im Verlauf der Synapsenbildung während der Embryonalentwicklung und nach Denervierung eines adulten Muskels wird die Expression der fötalen  $\gamma$ AChR-Untereinheit verstärkt und das Protein in die NMJ eingebaut (Witzemann, V. et al., 1987; Witzemann, V. et al., 1989). Da sich in den MuSK/Cre-Tieren nach P15 neue NMJ entwickeln und die Expression der mRNA der  $\gamma$ AChR-Untereinheit um das 30fache verstärkt ist, musste geklärt werden, ob sich auch  $\gamma$ AChR in diesen Synapsen befindet. Da kein verfügbarer Antikörper eine ausreichende Lokalisation am Gewebe ermöglicht, wurde mit der MuSK/Cre-Mauslinie eine Mauslinie gekreuzt, die eine  $\gamma$ AChR-GFP-Untereinheit exprimiert (Gensler, S, 2001). Aus daraus resultierenden

MuSK/Cre: $\gamma$ GFP-Tieren wurde Muskelgewebe entnommen und mit immunochemischen Analysen eindeutig auch die Synthese der  $\gamma$ AChR-GFP-Untereinheit gezeigt. Mit konfokaler Mikroskopie an Diaphragmen dieser Tiere konnte jedoch keine  $\gamma$ AChR-GFP-Untereinheiten in den Synapsen detektiert werden. Ein Grund könnte ein möglicherweise zu geringer Anteil von  $\gamma$ AChR-GFP-Untereinheiten sein, so dass die GFP-Fluoreszenz unter der Nachweisgrenze liegt. Ein negativer Einfluss des GFP auf die Funktion des Kanals und den Einbau in die Synapse kann dagegen ausgeschlossen werden (Gensler, S, 2001). Eine weitere Möglichkeit das Vorhandensein von  $\gamma$ AChR in den Kanälen zu überprüfen ergibt sich durch die unterschiedlichen elektrophysiologischen Eigenschaften der  $\gamma$ - und  $\epsilon$ -Untereinheiten enthaltenen AChR. So ist die durchschnittliche Kanaloffenzeit des Kanals mit der  $\gamma$ AChR-Untereinheit länger als die des AChR mit der  $\epsilon$ AChR-Untereinheit, so dass durch Messung der Abfallzeitkonstante  $\tau$  der Endplattenströme, eine Aussage über die Eigenschaften der vorhandenen Endplattenrezeptoren getroffen werden kann. Es zeigt sich, dass es keinen Unterschied zwischen den ermittelten  $\tau$ -Werten der Synapsen in MuSK/Cre-Tieren und gleichaltrigen Wildtyp-Tieren gibt. Die dabei zur Messung verwendeten Tiere hatten ausgeprägte Muskelschwäche, so dass bei den jeweils zufällig ausgewählten Synapsen normale Synapsen als auch zerfallende und neu gebildete Synapsen waren. Bei allen Messungen ergaben sich hinsichtlich der  $\tau$ -Werte keine Unterschiede und es ist unwahrscheinlich, dass einige Synapsen die  $\gamma$ AChR-Untereinheit enthalten, sie aber nicht gemessen wurden. Diese elektrophysiologischen Daten bestätigen damit die histologischen Ergebnisse und zeigen, dass trotz Produktion des  $\gamma$ AChR diese Untereinheit nicht nachweisbar in die Synapsen eingebaut wird. Somit unterscheidet sich die Entwicklung der neuen Synapsen in den MuSK/Cre-Tieren nach P15 wesentlich in der Entwicklung von Synapsen nach Denervation, und zeigt, dass für diesen Vorgang die fötale  $\gamma$ AChR-Untereinheit nicht essentiell ist. Ein Grund könnte darin liegen, dass zu deren Einbau Faktoren benötigt werden, die erst nach Denervation eines Muskels vorhanden sind oder aktiviert werden. Da in den Muskeln der MuSK/Cre-Tiere kein Verlust der neuronalen Aktivität vorliegt, könnten diese Faktoren durch fehlende neuronale Signalen oder durch fehlende Aktivität des Muskels induzierte Faktoren sein. Somit würden diese in den denervierten Muskeln, nicht aber in den Muskel der MuSK/Cre-Tieren aktiviert werden und den Einbau der Rezeptoren mit der  $\gamma$ AChR-Untereinheit in die Synapsen ermöglichen. In der Tat konnte eine Regulation

durch elektrische Aktivität der Expression synaptischer Proteine wie AChR gezeigt werden (Altiok, N. et al., 2001), doch inwieweit dies auf die Situation in den MuSK/Cre-Tieren übertragbar ist, bleibt zu klären.

## **V.9 Veränderungen der Muskelzusammensetzung durch Inaktivierung von MuSK**

Die Eigenschaften eines Muskels, kurzfristig schnelle oder ausdauernd langsame Bewegungen auszuführen, ist von der Zusammensetzung aus den verschiedenen Fasertypen abhängig, die sich auch durch verschieden Anteile spezieller Myosine auszeichnen. Diese Zusammensetzung kann jedoch durch Belastung, Hormone, Altern, vor allem aber durch neuronale Aktivität beeinflusst werden (Pette, D. et al., 2001). Für die Entwicklung des Fasertypen ist das Aktivitätsprofil des Motoneurons dabei ausschlaggebend, was mit verschiedenen Denervations- und Stimulationsexperimenten gezeigt werden konnte (Schiaffino, S. et al., 1996). Die Fasertypen können unter anderem mit Hilfe der ATP-Färbung unterschieden werden, da in ihnen die myofibrilläre ATPase unterschiedlich stark vorhanden ist. Die ATP-Färbung wurde an Gefrierschnitten von Soleusmuskeln von Wildtyp- und MuSK/Cre-Tieren unterschiedlichen Alters durchgeführt. Die Soleusmuskeln von P15 Wildtyp-Tieren sind danach zu 65% aus den schnellen Typ2A- und aus 35% langsamen Typ1-Fasern aufgebaut. Diese Zusammensetzung ändert sich im Laufe des Alters nur geringfügig (Typ1: 40%, Typ2a: 60%). Die Soleusmuskeln in P15 MuSK/Cre-Tieren besitzen die gleiche Zusammensetzung wie die Muskeln gleichaltriger Kontrolltiere. In P22 – P25 MuSK/Cre-Tieren ist dagegen der Anteil der Typ 2A-Fasern auf über 70% angestiegen, die der Typ1-Fasern auf unter 30% reduziert. Diese Änderung in der Zusammensetzung bestätigt die gestörte Innervierung der Muskelfasern, da dadurch die relative Zusammensetzung der speziellen Myosine geändert wird und sich so der Anteil der schnellen Fasern in einem langsamen Muskel wie dem Soleusmuskel erhöht (Huey, K. A. et al., 1998; Jakubiec-Puka, A. et al., 1999). Andererseits lassen die Analysen der Soleusmuskeln eines P28 MuSK/Cre-Tieres dagegen auf eine Reinnervierung der Muskelfasern schließen, da hier der Anteil der langsamen Typ1-Fasern bei 33% und der Anteil der schnellen Typ2A-Fasern bei 56% liegt. Der Anteil der Typ2B/2D-Fasern ist sogar auf über 10% angestiegen. Dieser Effekt konnte auch in Ratten nach

Reinnervierung beobachtet werden, in denen die Muskeln zuvor denerviert worden waren (Jakubiec-Puka, A. et al., 1990).

Die Muskeln der MuSK/Cre-Tiere zeigen eine direkte Reaktion auf die Eliminierung bestehender NMJ und folgender Innervierung neuer Synapsen. Da die Fasertypen durch die relativen Konzentrationen der Myosin-Arten bestimmt werden, könnte die Reaktion auf transkriptioneller Ebene reguliert sein, die von der elektrischen Aktivität abhängig ist (Altiok, N. et al., 2001). Um dies genauer zu überprüfen ist geplant ein Expressionsprofil der Muskeln von MuSK/Cre-Tieren zu erstellen, um so tiefere Einblicke in die Regulation der Muskelfaserentwicklung zu gewinnen.

## **V.10 Einzelfaserinjektion von siRNA-codierenden Plasmiden**

Durch Injektion von Plasmiden in einzelne Muskelfasern kann die Funktion und der Einfluss des codierten Proteins auf die NMJ untersucht werden (Jones, G. et al., 1997; Hesser, B. A., 2000; Sander, A. et al., 2001). Diese Methode wurde in dieser Arbeit verwendet, um siRNA-codierende Plasmide in Fasern zu injizieren und durch folgende posttranskriptionelle Degradation der mRNA ein Protein gezielt auszuschalten. Nach der Injektion der siRNA-Plasmide gegen MuSK besitzt die Synapse keine Brezel-Form, doch gibt es hier kein Auflösen der Struktur wie in MuSK/Cre-Tieren. Ursache hierfür kann eine nicht vollständige Degradation der mRNA sein, die auf eine zu geringe Produktion von siRNAs oder auf eine unvollständige Bindung an die mRNA zurückzuführen sein könnte. Demnach wären noch ausreichende Mengen MuSK an der Postsynapse vorhanden. Da die Analysen 15 Tage nach der Injektion durchgeführt worden ist, kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass nach längerer Inkubationszeit die Wirkung der siRNA deutlicher zu sehen wäre und es zu starken Veränderungen und sogar zur Auflösung der synaptischen Strukturen kommen würde. Es ist bekannt, dass MuSK-induzierte Signale über Dishevelled (Dvl) an Kinasen wie PAK weitergeleitet werden (Luo, Z. G. et al., 2002). Aus diesem Grund wurden Plasmide hergestellt, die für siRNAs gegen Dvl bzw. PAK codieren. Bei der Injektion der siRNA-Plasmide gegen PAK zeigen die Synapsen eine ungleichmässige AChR-Dichte und keine klare Abgrenzung zur übrigen Muskelmembran. Nach der erfolgreichen Injektion der siRNA-Plasmide gegen Dvl sind die AChR zwar dicht akkumuliert, doch besitzen die Synapsen keine typische Brezel-Struktur, sondern die AChR liegen in separaten Akkumulationen

vor. Somit konnte durch siRNA vermittelte Inaktivierung *in vivo* ein direkter Einfluss von Dvl und PAK auf die Akkumulation der AChR an der NMJ gezeigt werden, was die bisherigen Daten aus *in vitro*-Versuchen bestätigt (Luo, Z. G. et al., 2002). Obwohl zu diesem Zeitpunkt bisher keine genauen Quantifizierungen vorliegen, unterstreichen die erhaltenen Daten die erfolgreiche Verwendung der Einzelfaserinjektion von siRNA zur Analyse des Einfluss einzelner Genprodukte auf die Entwicklung und/oder Erhaltung der NMJ (Kong, X. C. et al., 2004).

### **V.11 MuSK als Ursache myasthenischer Syndrome**

MuSK/Cre-Tiere entwickeln eine progressive Muskelschwäche, die bis P30 zum Tode führt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die NMJ dieser Tiere aufgrund der Inaktivierung von MuSK auflösen und die Innervierung der Muskeln massiv gestört ist. Auch die Ursachen von Muskelschwäche (Myasthenie) in Menschen liegen in Defekten präsynaptischer, synaptischer und postsynaptischer Proteine. So konnten neben Mutationen in den Genen der fünf AChR-Untereinheiten auch Mutationen in Genen der Acetylcholinesterase (AChE), der Cholinacetyl-Transferase (ChAT), Rapsyn und weiteren synapsenspezifischen Proteinen identifiziert werden, die als congenitale myasthenische Syndrome (CMS) zusammengefasst werden (Engel, A. G. et al., 2003). Da Inaktivierung von MuSK während der Embryonalentwicklung zum Tode führt (DeChiara, T. M. et al., 1996), konnten bisher im Menschen noch keine MuSK-Mutationen gefunden werden. Jedoch könnte eine Mutation, die zur unvollständigen Inaktivierung von MuSK führt MuSK-induzierte CMS verursachen. Darüber hinaus gibt es autoimmune Formen der myasthenischen Syndrome (AMS), die durch Antikörperbildung gegen synapsenspezifische und motoneuronale Proteine ausgelöst werden. Dabei richtet sich in etwa 85% dieser Fälle die Antikörper gegen eine AChR-Untereinheit, doch konnten auch Patienten gefunden werden, die Antikörper gegen MuSK besitzen (Vincent, A. et al., 2003).

## V.12 Ausblick

Die bisherigen Analysen der MuSK/Cre-Tiere zeigten, dass die Aktivität von MuSK für die Erhaltung der NMJ essentiell ist und die Tiere eine progressive Muskelschwäche entwickeln, die zum Tode führt. Aufgrund der gleichzeitigen Eliminierung vorhandener und Etablierung neuer Synapsen ermöglichen die MuSK/Cre-Tiere alle Stadien der Entwicklung, Erhaltung und Eliminierung von NMJ in einem adulten Tier zu beobachten und zu untersuchen.

So ist geplant, die Inaktivierung von MuSK in einzelnen Fasern der Tiere zeitlich zu verfolgen, indem die selbe Synapse über Tage immer wieder mit einem konfokalem Mikroskop betrachtet wird. Durch Einkreuzen einer Mauslinie, die GFP in den Motorneuronen exprimiert, könnte mit dieser Technik auch das Verhalten der Motorneurone bei diesem Prozess genauer studiert werden.

Ebenfalls in Vorbereitung ist die genaue Analyse der Expressionsraten weiterer synaptischer Proteine, um ein genaueres Bild der genetischen Regulation der Entwicklung und Erhaltung einer NMJ zu erhalten.

Da es Fälle der AMS gibt, die auf Antikörper gegen MuSK beruhen, kann die MuSK/Cre-Maus als Modell für diese Formen der Myasthenien dienen, und so tiefere Einblicke in zellulären und molekularen Vorgänge dieser Krankheiten zu erlangen. Zusätzlich könnten mit dieser Mauslinie anhand der gewonnenen Erkenntnisse neue Therapien entwickelt und getestet werden.



## VI Material und Methoden

### VI.1 Material

#### VI.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, falls nicht anderweitig angegeben, von der Firma Roth (Heidelberg) bezogen.

#### VI.1.2 Allgemeine Lösungen:

PBS (Phosphate Buffered Saline):	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	4,3 mM	$\text{NH}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
	1,4 mM	$\text{KH}_2\text{PO}_4$

Ringer (Elektrophysiology Grade):	125 mM	NaCl
	25 mM	$\text{NaHCO}_3$
	2,5 mM	KCl
	1,25 mM	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$
	1 mM	$\text{MgCl}_2$
	25 mM	Glukose
	2 mM	$\text{CaCl}_2$

### VI.2 Enzyme

Alle Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs (Beverly, USA) bezogen.

### VI.3 Polymerasen

Hot Star Taq Polymerase	Quiagen (Hilden, Deutschland)
Reverse Transcriptase	Invitrogen (Carlsbad, USA)

## VI.4 Primer und Oligonukleotide

Alle Primer und Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Sie wurden nach Lieferung mit H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 1µg/µl eingestellt.

Die Sequenzen sind in 5'-3' Orientierung angegeben:

### VI.4.1 PCR-Primer:

848	CTC TTG CAA GAA ATA TGT TGT CTC AGG C
852	TGT AGG AAC GTA ACC GGG ATG TTC
662	CTG GTC CTC CAC CCC TGT C
Cre77F	CGA GTG ATG AGG TTC GCA AG
Cre630R	CAG CGT TTT CGT TCT GCC
g536R	AGG AGG AGC GGA AGA TGG
gE4F	GGT GCG ACT ATC GCC TGC GC

### VI.4.2 Oligonukleotide:

MuSK104for	ACTGTAGATGCCTTGGTTGTTCAAGAGACAACCAAGGCA TCTACAGTTTTTTT
MuSK104rev:	AATTAATAAACTGTAGATGCCTTGGTTGTCTCTTGAAC AACCAAGGCATCTACAGTGGCC
MuSK445for:	ACCATCTGTGTCCTGGATCTTCAAGAGAGATCCAGGACA CAGATGGTTTTTTT
MuSK445rev:	AATTAATAAAACCATCTGTGTCCTGGATCTCTCTTGAAG ATCCAGGACACAGATGGTGGCC
MuSK656for:	TCCCACAATGTCACCTTTGTTCAAGAGACAAAGGTGACA TTGTGGGATTTTTT
MuSK656rev:	AATTAATAAAATCCCACAATGTCACCTTTGTCTCTTGAAC AAAGGTGACATTGTGGGAGGCC
Dvl100for:	GAACGTGCTCAGCAACCGGTTCAAGAGACCGGTTGCTGA GCACGTTCTTTTTT
Dvl100rev:	AATTAATAAAAGAACGTGCTCAGCAACCGGTCTCTTGAAC CGGTTGCTGAGCACGTTTCGGCC
Dvl148for:	GTCCATGGACCAGGACTTCTTCAAGAGAGAAGTCCTGGT CCATGGACTTTTTT
Dvl148rev:	AATTAATAAAAGTCCATGGACCAGGACTTCTCTCTTGAAG AAGTCCTGGTCCATGGACGGCC
Dvl178for	GGAGGAGATCTTCGATGACTTCAAGAGAGTCATCGAAGA TCTCCTCCTTTTTT

Dvl178rev: AATTAAAAAAGGAGGAGATCTTCGATGACTCTCTTGAAG  
 TCATCGAAGATCTCCTCCGGCC  
 PAK199for: CGGCGTAGACATCCAGGACTTCAAGAGAGTCCTGGATGT  
 CTACGCCGTTTTTT  
 PAK199rev: AATTAAAAAACGGCGTAGACATCCAGGACTCTCTTGAAG  
 TCCTGGATGTCTACGCCGGGCC  
 PAK285for: CCCTAAACCACGGCTCCAATTCAAGAGATTGGAGCCGTG  
 GTTTAGGGTTTTTT  
 PAK285rev: AATTAAAAACCCTAAACCACGGCTCCAATCTCTTGAAT  
 TGGAGCCGTGGTTTAGGGGGCC  
 PAK397for GGAGCGACCAGAGATTTCTTTCAAGAGAAGAAATCTCTG  
 GTCGCTCCTTTTT  
 PAK397rev AATTAAAAAAGGAGCGACCAGAGATTTCTTCTCTTGAAA  
 GAAATCTCTGGTCGCTCCGGCC

### ***VI.4.3 Kit-Systeme***

DNA free	Ambion (Austin, USA)
DNeasy 96 Tissue Kit	Quiagen (Hilden, Deutschland)
Super Signal	Pierce (Rockford, USA)
TaqMan- Assays-on-Demand	AppliedBiosystems (USA)
QUIAGEN Plasmid Purification	Quiagen (Hilden, Deutschland)
QIAprep Miniprep	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)

### ***VI.4.4 Größenmarker***

#### ***VI.4.4.1 DNA:***

Lambda DNA EcoRI+HindIII Marker	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
Gene Ruler 100 bp DNA Ladder	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)

**VI.4.4.2 Protein:**

Precision Plus Protein Prestained Standards      Bio-Rad (München, Deutschland)

**VI.4.5 Sonstige Medien und Materialien**

Araldit CY212	Agar Scientific (Stansted, England)
Athene-Kupfer-Netzchen	Plano (Wetzlar, Deutschland)
Big Dye Terminator Mix	ABI (Foster City, USA)
Biomax MS	KODAK (Rochester, USA)
BSA	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Citifluor	Agar Scientific (Stansted, England)
Formvarfilm	Plano (Wetzlar, Deutschland)
dNTPs	Pharmacia (Erlangen, Deutschland)
PBS	Gibco Invitrogen (Carlsbad, USA)
Hybon P-Membran	Amersham (Little Chalfont, England)
Mikrokapillaren GB 150F	Science Products (Hofheim; Deutschland)
Vectashield with DAPI	Vector Laboratories (Bulingame, USA)

**VI.4.6 Antikörper und Toxine**

Bodipy-Goat-anti-Rabbit-IgG (rIgG-bp)	Molecular Probes (Eugene, USA)
Fluorescein-Goat-anti-Rabbit-IgG	Roche (Basel, Schweiz)
Rabbit-Horseradish Peroxidase-Antifluorescein-IgG	Amersham (Little Chalfont, England)
Rabbit-anti-MuSK	zur Verfügung gestellt von Dr. Ruegg (Basel, Schweiz)
Rabbit-anti-Rapsyn	zur Verfügung gestellt von Dr. Fröhner (Chapel Hill, USA)

Rabbit-anti-GFP	MoBiTec (Göttingen, Deutschland)
Rabbit-anti-Neurifilament 150 kDa	Chemicon (Temecula, USA)
IRabbit-anti-Synaptophysin	Zymed (San Francisco, USA)
Rhodamin- $\alpha$ Bungarotoxin (Btx-rh)	Molecular Probes (Eugene, USA)

#### ***VI.4.7 Geräte***

3730 DNA-Analyzer	ABI (Foster City, USA)
AD-Converter ITC-16	Instrutech (Great Neck, USA)
Axoclamp-2B Verstärker	Axon Instruments (Union City, USA)
Elektronenmikroskop EM400	Phillips (Deutschland)
EM-Trim Fräse	Leica Microsystems (Heidelberg, Deutschland)
Mikropipettenhalter (Headstage)	Axon Instruments (Union City USA)
Mikromanipulator (motorisiert)	Luigs&Neumann (Ratingen, Deutschland)
Mikromanipulator (handbetrieb)	Leica Microsystems (Heidelberg, Deutschland)
Konfokales Mikroskop TCS NT	Leica Microsystems (Heidelberg, Deutschland)
Kryostat	Bright (Huntingdon, England)
Newtonmeter	Columbus Instruments (Columbus, USA)
Polytron	Kinematic (Littau, Schweiz)
Reichert-Ultracat Mikrotom	Leica Microsystems (Heidelberg, Deutschland)

Sequence Detection System 7900HT	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Thermocycler TGradient	Biometra (Göttingen, Deutschland)

### ***VI.4.8 Software***

ABI Prism 7000 SDS	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Excel	Microsoft (Unterschliessheim, Deutschland)
IgorPro	Wavemetrics (Lake Oswego, USA)
ImageJ	NIH (Washington, USA)
Imaris	Bitplane (Zürich, Schweiz)
IPLab	Scanalytics (Fairfax, USA)
Mini Analysis Program	Synaptosoft Inc. (Decatur, USA)
Pule+Pulsefit	HEKA (Lambrecht, Deutschland)
Photoshop 8.0	Adobe Systems Inc. (San Jose, USA)

## **VI.5 Methoden**

### ***VI.5.1 Molekularbiologische Standardmethoden***

Die Standardmethoden der Molekularbiologie wurden nach Standardprotokollen des Laborhandbuchs Maniatis (Maniatis 1997) durchgeführt. Dies waren Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen, Dephosphorylierung von DNA-Enden, Ligation, Transformation und Elektrophorese von DNA in Agarosegelen. Sie werden im Folgenden nicht weiter behandelt.

#### ***VI.5.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli***

Zur Isolierung geringer Mengen Plasmid-DNA (bis 20µg) aus *E.coli* wurde das „Qiaprep Miniprep Kit“, für grosse Mengen (bis 500µg) das „Qiagen Maxi Kit“ (jeweils Qiagen) verwendet.

#### ***VI.5.1.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen und PCR-Produkten***

Aus Agarosegelen wurde DNA mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ isoliert. Das „QIAquick PCR Purification Kit“ (jeweils Qiagen) wurde zur Aufreinigung von DNA aus PCR- und Dephospholyierungsansätzen verwendet.

#### ***VI.5.1.3 Isolierung genomischer DNA aus Muskelgewebe***

Das isolierte Muskelgewebe wurde in 300 µl Extraktionspuffer und 2 µl Proteinase K (20 mg/ml; Quiagen) pro 100 mg Gewebe für 2 h bei 50 °C inkubiert. Nach einer weiteren Inkubation bei 37 °C über Nacht wurde dem Gemisch 500 µl LiCl (5 M) und 600 µl Chloroform zugegeben und für 30 min geschüttelt. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm wurde die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäss überführt und mit 1 ml EtOH vermischt. Nach erneuter Zentrifugation für 15 min bei 13000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 70%igem EtOH gewaschen. Die Lösung wurde nach 5 min Zentrifugation entfernt, die DNA getrocknet und anschliessend in 100 – 200 µl Wasser aufgenommen.

#### ***VI.5.1.4 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien***

Genomische DNA wurde aus Schwanzbiopsien mit dem „DNeasy 96 Tissue Kit“ (Qiagen) isoliert und aufgearbeitet.

#### ***VI.5.1.5 DNA-Sequenzierung***

Die Sequenzierung wurde mit dem „Big Dye Terminator Mix“ und dem Kapillar-Sequenzierer „3730 DNA Analyzer“ (jeweils ABI) mit den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### ***VI.5.1.6 PCR-Analysen genomischer DNA***

Die Genotypisierung der Tiere erfolgte über PCR an isolierter genomischer DNA aus Schwanzbiopsien. Da diese zuvor im 96-well Format aufgereinigt worden ist, wurde keine Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Aus diesem Grund wurden jeweils 1 – 2 µl der isolierten DNA-Proben verwendet. Nach der erfolgten Amplifikation wurden die Produkte in 1,5 %igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt.

PCR-Ansatz:            1 – 2 µl DNA-Lösung  
                              5 µl    10x Hot Star Taq Buffer  
                              8 µl    dNTPs [je 1,25µM]  
                              1 µl    Primer 1 [125 ng/µl]  
                              1 µl    Primer 2 [125 ng/µl]  
                              0,5    Hot Star Taq Polymerase (Quiagen)  
                              ad 50 µl Wasser

Nachweis MuSK-KO:            Primer: 848, 852

Programm:    95 °C 15 min  
                  94 °C 45 sec }  
                  55 °C 45 sec } 32 x  
                  72 °C 60 sec }  
                  72 °C 10 min

Nachweis loxP oder WT: Primer: 852, 662

Programm:    95 °C 15 min  
                  94 °C 45 sec }  
                  60 °C 45 sec } 32 x  
                  72 °C 90 sec }  
                  72 °C 10 min

Nachweis Cre:                    Primer: Cre 77F, Cre 630R

Programm:    95 °C 15 min  
                  94 °C 45 sec }  
                  60 °C 45 sec } 32 x  
                  72 °C 90 sec }  
                  72 °C 10 min



### **VI.5.1.7 Kompetitive PCR**

Es wurde hierfür genomische DNA aus Muskelgewebe isoliert und je 50 ng in einer Reaktion eingesetzt.

PCR-Ansatz:           50 ng genomische DNA  
                          5 µl 10x Hot Star Taq Buffer  
                          8 µl dNTPs [je 1,25 µM]  
                          1 µl Primer 848 [125 ng/µl]  
                          2 µl Primer 852 [125 ng/µl]  
                          1 µl Primer 662 [125 ng/µl]  
                          0,5 Hot Star Taq Polymerase (Quiagen)  
                          ad 50 µl Wasser

Primer: 848, 852, 662

Programm:           95 °C 15 min  
                          94 °C 45 sec }  
                          55 °C 45 sec } 28 x  
                          72 °C 90 sec }  
                          72 °C 10 min

### **VI.5.1.8 Isolierung von RNA aus Muskelgewebe**

Die Isolierung von RNA aus Gewebe wurde nach dem Protokoll von Chomczynski und Sacchi (1987) durchgeführt. Hierbei wird das tiefgefrorene Gewebe in 5 ml kaltem Guanidiniumisothiocyanat (GITC) pro 0,25 mg Gewebe im Polytron (Kinematic) homogenisiert. Anschließend werden 500 µl 2M Natriumacetat (pH 4), 5 ml Phenol und 2 ml Chloroform hinzugefügt und gemischt. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis und Zentrifugation bei 9000 rpm für 20 Minuten wird die wässrige Phase abgenommen und mit gleichem Volumen Isopropanol versetzt. Nach einer weiteren Stunde Inkubation bei -20 °C wird dann die RNA durch Zentrifugation pelletiert und in 1,5 ml 4 M GITC resuspendiert. Das Gemisch wurde in ein neues Gefäß überführt, 500 µl Isopropanol hinzugefügt und die Probe erneut für 1 h bei -20 °C inkubiert. Anschliessend wird die RNA mit einer Tischzentrifuge bei 13000 rpm pelletiert und dann mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen der RNA wird sie in 200 µl Wasser resuspendiert. Zur langfristigen Lagerung bei -20 °C erfolgt die Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat und 2,5 Volumen Ethanol.

### ***VI.5.1.9 Herstellung von cDNA mit Hilfe der RT-PCR***

Mit Hilfe des „DNA-free“ Kits (Ambion) wird 5 µg isolierter RNA aus Muskelgewebe von möglichen Resten genomischer DNA befreit. Dann werden zu den 70 µl Endvolumen 6 ml 3 M Natriumacetat und 150 µl Ethanol hinzugefügt, und die RNA für 5 min bei – 20 °C präzipitiert. Anschliessend wird sie durch Zentrifugation bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge für 10 min pelletiert, und bei 68 °C in 10 µl Wasser gelöst. Diese RNA-Lösung wird mit dem RT-PCR-Mix gemischt, 1 µl Reverse Transkriptase (200 U/µl; Invitrogen) hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschliessend wird die Transkriptase 5 min bei 95 °C inaktiviert.

RT-PCR-Mix: 4 µl	5x RT-Puffer (Invitrogen)
	2 µl 0,1 M DTT
	1 µl RNA-Guard
	1 µl dNTPs Sakmann, B. et al., 1978
	1 µl pd(N <sub>6</sub> )-Primer

### ***VI.5.1.10 Real Time-PCR***

Für die Real-Time PCR werden TaqMan-Assays-on-Demand Gene Expression Products (Applied Biosystems, USA), und die enthaltenen Standardprimer verwendet. Für jede PCR-Reaktion werden jeweils zwei Ansätze durchgeführt. Als zelluläre Referenz wurde die Expression der Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) gemessen.

PCR-Ansatz:	9 µl RNA (125 µg/ml)
	10 µl TaqMan Universal PCR Master Mix
	1 µl 20x Assays-on-Demand Gene Expression Mix

Programm:	95 °C 10 min
	95 °C 15 sec } 60 °C 40 sec } 45 x

Die Reaktion wird im Sequence Detection System 7900HT durchgeführt, und mit der Software ABI Prism 700 (Applied Biosystems, USA) ausgewertet.

## ***VI.5.2 Biochemische Methoden***

### ***VI.5.2.1 Isolierung von Proteinen aus Muskelgewebe***

Muskelgewebe wurde aus den Hinterbeinen von MuSK/Cre-Tieren isoliert und mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren. In einem Mörser wurde das Gewebe pulverisiert, in 1 ml eiskaltem Extraktionspuffer aufgenommen und anschliessend bei 13000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Dem Überstand wurde 1 µl Anti-GFP-Antikörper (MoBiTec) zugegeben und das Gemisch über Nacht bei 4°C auf einem Roller inkubiert. Dann wurde 30 µl gequollene Protein A Sepharose (Pharmacia) hinzugegeben und 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm folgten drei Waschschrte, indem jeweils das Pellet mit 1 ml Extraktionspuffer versetzt, geschüttelt und erneut zentrifugiert wurde. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet noch einmal mit eiskaltem PBS gewaschen, die Proteine durch Zentrifugation pelletiert und schliesslich in 32 µl Resuspensionspuffer aufgenommen.

Extraktionspuffer:            50 mM Tris pH 7,5  
                                     150 mM NaCl  
                                     5 mM EDTA  
                                     5 mM EGTA  
                                     50 mM NaF  
                                     10 mM Natriumolybdat  
                                     1 mM Natriumorthovanadat  
                                     0,5% Triton X-100  
                                     0,175 mg/ml PMSF  
                                     5 ng/ml Aprotinin  
                                     5 ng/ml Leupeptin

Resuspensionspuffer:        75 mM Tris pH 6,8  
                                     4 % SDS  
                                     4 M Harnstoff  
                                     20 % Glycerin  
                                     1 % β-Mercaptoethanol

### ***VI.5.2.2 Western-Blot***

Western-Blots wurden durchgeführt, um AChR-GFP in Muskelgewebe von MuSK/Cre GFP-/- Tieren nachzuweisen.

Zu diesem Zweck wurden die isolierten Protein in einem 8%igem Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Semi-Dry-Blotting auf eine PVDV-Membran (Hybond-P;

Amersham) transferiert. Nach Blockierung der unspezifischen Bindungen durch 3% BSA in TBST wurde die Membran mit dem antiGFP-Antikörper (MobiTec) in 1% BSA / TBST über Nacht bei 4 °C inkubiert. Zu dessen Nachweis dienten monoklonale Horseradish-Peroxidase (HRP) gekoppelte Antikörper (Amersham), die 1:250000 in 1%BSA / TBST verdünnt wurden. Die Inkubation der Membran erfolgte für 1 h bei RT. Anschließend wurde die Membran für 1 h in TBST gewaschen. Die Detektion der HRP-Aktivität erfolgte mit “Super Signal” (Pierce) und Hyperfilm-ECL (Biorad), wobei die Expositionszeit je nach Stärke des Signals zwischen 30 sec und 2 min betrug.

### ***VI.5.3 Histologische Methoden***

#### ***VI.5.3.1 Isolierung von Muskelgewebe***

Zur Isolierung der Muskeln wurden die Mäuse zuerst mit CO<sub>2</sub> betäubt und anschliessend durch zervikale Dislokation getötet. Die Muskeln wurden herauspräpariert und in mit Sylgard beschichtete und mit Ringer gefüllte Petrischalen mit Insektennadeln fixiert.

#### ***VI.5.3.2 Immunhistochemische Färbung von Diaphragmen***

Um synaptische und neuronale Proteine im Gewebe zu lokalisieren, wurden sie mit spezifischen Antikörpern markiert und durch konfokale Mikroskopie nachgewiesen.

Zu diesem Zweck wurden die Diaphragmen herauspräpariert und mit Insektennadeln in eine mit Sylgard beschichteten Petrischale aufgespannt und für 15 min in 1% Formaldehyd/PBS fixiert. Nach einem Waschriff mit PBS erfolgte eine Inkubation für 1 h in 0,5% Glycin/PBS. Um die Membranen des Gewebes für die Antikörper zu permeabilisieren, wurde es anschliessend bei 4 °C über Nacht in 0,5% Triton X-100/PBS gelagert. Nach kurzem Waschen in PBS erfolgte ebenfalls über Nacht die Inkubation mit dem Primärantikörper in 2% BSA/PBS bei 4 °C. Zum Entfernen ungebundener Antikörper wurde das Gewebe 2 – 8 h in 2% BSA/PBS gewaschen und dann mit dem Zweitantikörper in 2% BSA/PBS erneut über Nacht bei 4 °C inkubiert. Um die AChR zu markieren wurde dieser Lösung zusätzlich Btx-rh zugegeben. Nach 20 minütigem Waschen in 2% BSA/PBS konnte das Gewebe auf einem Objektträger

mit Citiflour (Agar Scientific) eingebettet und mit einem Fluoreszenzmikroskop oder einem konfokalem Mikroskop betrachtet werden.

Verdünnungen:	Primärantikörper:	MuSK:	1:100
		Rapsyn:	1:100
		Neurofilament:	1:200
		Synaptophysin:	1:50
	Sekundärantikörper:	rIgG-bp:	1:500
	Btx-rh (1mg/ml):		1:500

### ***VI.5.3.3 Herstellung von Gefrierschnitten***

Soleus-Muskeln wurden herauspräpariert, mit zwei Insektennadeln auf einem Stück fixierter Leber aufgespannt und in TissueTec-Einbettungsmedium (Sakura, AT Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet. Darauf wird der Muskel in Trockeneis gekühltem Isopentan schockgefrostet und auf Probenhalter fixiert. Bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  werden mit einem Cryostat 5030 (Brighton, Grossbritannien)  $10\text{ }\mu\text{m}$  dünne Longitudinalschnitte vom Muskel hergestellt und auf Polylysin-beschichtete Objektträger aufgezogen.

### ***VI.5.3.4 ATP-Färbung***

Der ATP-Nachweis wurde nach einem verändertem Protokoll von Brooke und Kaiser (1970) durchgeführt. Gefrierschnitte der Muskeln werden für 15 min in Puffer 1 und anschliessend für 2 h in Puffer 2 inkubiert. Es folgen Inkubationen in 1% CaCl und in 2% CoCl<sub>2</sub>-Lösung für je 10 min, sowie für eine Minute in 2% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S. Nach Dehydrierung der Schnitte mit 50%, 70%, 80%, 95% und 100%igem Ethanol werden sie mit Eukitt (Kindler, Freiburg) eingebettet.

Puffer 1:	3,5 mM Barbitol 3.5 mM Natriumacetat pH 4,6
Puffer 2:	3,6 mM ATP 20 mM Barbitol 18 mM CaCl <sub>2</sub> pH 9,4

### **VI.5.3.5 LacZ-Färbung**

Für den Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität im Muskel wurde das Gewebe zunächst h lang in 4 %iger PFA-Lösung fixiert und danach dreimal für je 20 min gewaschen. Nach Zugabe der Färbelösung erfolgte die Farbreaktion bei 37 °C innerhalb von 16 – 18 h. Abschliessend wurde das Gewebe dreimal für je 20 min gewaschen.

Waschlösung: 2 mM  $MgCl_2$   
0,02 % Nonylphenoxypolyethoxyethanol (NP40, Sigma)  
0,02 % Na-Deoxycholat  
in PBS

Färbelösung: 1250  $\mu$ l 4% 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid (X-Gal) in DMSO  
500  $\mu$ l 0,5 M  $K_3Fe(CN)_6$   
500  $\mu$ l 0,5 M  $K_4Fe(CN)_6$   
ad 50 ml Waschlösung

### **VI.5.3.6 Einzelfaserinjektion**

Die Einzelfaserinjektion ermöglicht den *in vivo*-Gentransfer in einzelne Muskelfasern (Sander 2001; Jones 1997), wobei Plasmid-DNA in einzelne Fasern des *musculus soleus* injiziert wird.

Zu diesem Zweck wurde zuerst die Maus durch intraperitoneale Injektion des Narkose-Mix sediert. Anschliessend wurde das linke Hinterbein rasiert, fixiert und chirurgisch geöffnet um den *m. soleus* freizulegen. Die Injektion DNA erfolgte durch eine Mikropipette, die aus einer Mikrokapillaren (Science Products) mit einem DMZ-Puller (XXX) gezogen worden ist. Diese wurde mit der 5  $\mu$ l Injektionslösung befüllt und mit 90 mM KCl-Lösung aufgefüllt. Mit einem Mikromanipulator wurde die Mikropipette dann in die einzelnen Muskelfasern eingeführt, und die Lösung mittels Luftdruck bei etwa 1 bar für 0,1 – 0,3 s injiziert. Auf diese Weise konnten etwa 10-25 Fasern injiziert werden. Anschliessend wurde der Gewebeschnitt vernäht, und der Maus subcutan der Antagonisten-Mix injiziert. Das Aufwachen erfolgte dann auf einer 37 °C warmen Heizplatte.

Injektionslösung: 90 mM KCl  
60 vol% 25 g/ml FastGreen FCF (Sigma)  
40 vol% DNA-Lösung [100 ng/μl]

Narkose-Mix: 60 μl Metetomidin  
160 μl Midazolam  
40 μl Fentanyl  
Injektion: 0,65 μl/g Körpergewicht

Antagonisten-Mix: 60 μl Atipamezol  
800 μl Flumazenil  
120 μl Naloxon  
Injektion: 2,45 μl/g Körpergewicht

## ***VI.5.4 Mikroskopische Methoden***

### ***VI.5.4.1 Konfokale Mikroskopie***

Mit Hilfe konfokaler Mikroskopie können Bilder von verschiedenen Ebenen eines Objekts aufgenommen werden, um diese einzeln oder als zweidimensionale Projektion zu betrachten. Durch sehr geringe Abstände zwischen den Ebenen, können die erhaltenen Daten auch zur 3D-Rekonstruktion der Objekte genutzt werden.

Zur Aufnahme konfokaler Bilder wurde ein Mikroskop Leica TCS NT oder ein Mikroskop Leica TCS SP2 (Leica Microsystems) mit Objektiven 10, 40 und 63facher Vergrößerung verwendet. Die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte mit einem Ar/Kr-Laser bei 488 nm für Grünfluoreszenz und 568 nm für Rotfluoreszenz, sowie durch einen AR UV Laser bei 352 bzw. 364 nm für die Blaufluoreszenz. Die Fluoreszenz wurde mit einem digitalen Photomultiplier detektiert und die Signale mit der TCS-Software (Leica Microsystems) verarbeitet.

### ***VI.5.4.2 Elektronenmikroskopie***

Soleusmuskeln wurden herauspräpariert und 1 h in 4% PFA/PBS fixiert. Nach kurzem Waschen in PBS wurde das Gewebe für 30 min mit Bt-rh (1:500)/BPS inkubiert, um die Synapsen zu visualisieren. Unter einem Fluoreszenzmikroskop wurde anschliessend ein synapsenreicher Bereich mit einem Skalpell aus dem Muskel herausgeschnitten. Nach

erneuter Fixierung in 4% PFA/PBS über Nacht wurde das Gewebe für 2 h mit PBS gewaschen und danach in 2% OsO<sub>4</sub>/1,5% K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> inkubiert. Die erste Kontrastierung wurde nach 3 h Waschen in H<sub>2</sub>O über Nacht mit 0,4% Uranylacetat bei 4 °C durchgeführt. Es folgte dreimaliges Waschen mit H<sub>2</sub>O für jeweils 20 min und anschliessend eine Dehydrierung der Proben durch nachfolgende, jeweils 15 minütige Inkubationen in 30%, 50%, 70% und 100% EtOH. Zur Einbettung der Probe wurde sie zuerst für 3h in Araldit/EtOH (1:1), dann über Nacht in Araldit/EtOH (1:2) und schliesslich für 3 h in Araldit inkubiert. Nach Überführung in eine Giessform wurde diese mit Araldit aufgefüllt und 48 h bei 70 °C ausgehärtet.

Die eingebetteten Gewebeproben wurden mit einer Trim-Fräse (Leica Mikrosystems) angeschnitten, um eine möglichst kleine Schnittfläche herzustellen. An dieser wurden dann mit einem Diamantmesser (Diatome) und einem Ultramikrotom Ultradünnschnitte von etwa 80 nm hergestellt und auf mit Formvar beschichtete Kupfernetzchen (Plano) aufgezogen. Zur Kontrastierung wurden die Schnitte in einer gesättigten Uranylacetatlösung inkubiert und nach viermaligem Waschen in H<sub>2</sub>O an der Luft getrocknet. Es folgte eine Inkubation für 5 min in Reynolds-Bleicitrat dreimaligem Waschen in H<sub>2</sub>O. Nach Trocknung an der Luft konnten die Proben im Elektronenmikroskop Phillips EM 400 betrachtet werden.

## ***VI.5.5 Elektrophysiologie***

### ***VI.5.5.1 Messungen der MEPPs und EPPs***

Die Messungen wurden mit Unterstützung von Dr. J. J. Plomp (Leiden University Medical Center, Leiden, Niederlande) durchgeführt. MEPPs und EPPs wurden in Fasern von präparierten linken Hemidiaphragmen in mit 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> perfundierter Ringerlösung bei 28 °C gemessen. Die intrazellulären Mikrokapillaren waren mit 3 M KCl gefüllt und besaßen einen Widerstand von 20 – 30 MΩ. Von jeder Faser wurden 30 MEPPs gemessen, sowie 30 EPPs bei einer Stimulation des Nervs bei 0,3 Hz aufgezeichnet. Das erhaltene analoge Signal wurde verstärkt und mit einem 1401 System und angeschlossenem SIGAV Computerprogramm (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) bei 10 kHz digitalisiert. Die gemessenen Amplituden wurden auf –75 mV normalisiert und für nicht-lineare Aufrechnung nach McLachlan & Martin



(1981) korrigiert. Die Auswertung erfolgte mit einem PC, sowie dem Programm pClamp (Axon).

#### ***VI.5.5.2 Messungen der MEPCs***

Endplattenpotentiale wurden in Fasern von präparierten linken Hemidiaphragmen in Ringerlösung bei 20 - 22 °C mit Einzel-Elektroden-Spannungsklemme gemessen. Hierbei wurden Mikroelektroden aus Mikrokapillaren mit einem DMZ-Puller gezogen, so dass sie mit mit 3M KCl gefüllt einem Widerstand von 10 - 40 MΩ besaßen. Das Membranpotential wurde bei – 65 mV gehalten, und die analogen Signale mit einem Axoclamp 2A-Verstärker (Axon Instruments) verstärkt, mit einem ITC-16 (Instrutech) digitalisiert und mit Heka Pulse (Heka) auf einem Macintosh PowerPC gespeichert. Die Auswertung erfolgte mit dem MiniAnalysis-Programm (Synptosoft) und Excel (Microsoft).

#### ***VI.5.6 Kraftmessung der Vorderextremitäten***

Die Kraftmessungen wurden mit einem computerisierten Newtonmeter (Columbus Instruments, Columbus, Ohio, USA) durchgeführt, an dem ein triangularer Haltegriff angebracht war (Masu, 1993). Die Maus wurde an den Haltegriff herangeführt, bis sie sich mit den Vorderpfoten an dem Griff festhält. Dann wurde die Maus an der Schwanzwurzel horizontal nach hinten gezogen, bis sie den Griff loslässt. Der Wert der grössten auftretenden Kraft wird dabei vom Newtonmeter gespeichert (in Altiok, N. et al., 2001). Dieser Vorgang wird fünfmal wiederholt und der höchste Wert zur statistischen Auswertung herangezogen.

## VII Referenzen

1. Altioik, N. and Changeux, J. P. (5-1-2001). Electrical activity regulates AChR gene expression via JNK, PKCzeta and Sp1 in skeletal chick muscle. *FEBS Lett.* 487, 333-338.
2. Apel, E. D., Glass, D. J., Moscoso, L. M., Yancopoulos, G. D., and Sanes, J. R. (1997). Rapsyn is required for MuSK signaling and recruits synaptic components to a MuSK-containing scaffold. *Neuron* 18, 623-635.
3. Apel, E. D., Lewis, R. M., Grady, R. M., and Sanes, J. R. (13-10-2000). Syne-1, a dystrophin- and Klarsicht-related protein associated with synaptic nuclei at the neuromuscular junction. *J.Biol.Chem.* 275, 31986-31995.
4. Apel, E. D. and Merlie, J. P. (1995). Assembly of the postsynaptic apparatus. *Curr.Opin.Neurobiol.* 5, 62-67.
5. Banks, G. B., Choy, P. T., Lavidis, N. A., and Noakes, P. G. (1-5-2003). Neuromuscular synapses mediate motor axon branching and motoneuron survival during the embryonic period of programmed cell death. *Dev.Biol.* 257, 71-84.
6. Bezakova, G. and Ruegg, M. A. (2003). New insights into the roles of agrin. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 4, 295-308.
7. Branda, C. S. and Dymecki, S. M. (2004). Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev.Cell* 6, 7-28.
8. Briguet, A. and Ruegg, M. A. (15-8-2000). The Ets transcription factor GABP is required for postsynaptic differentiation in vivo. *J.Neurosci.* 20, 5989-5996.
9. Brown, M. C. and Ironton, R. (3-2-1977). Motor neurone sprouting induced by prolonged tetrodotoxin block of nerve action potentials. *Nature* 265, 459-461.
10. Brown, M. C., Jansen, J. K., and Van Essen, D. (1976). Polyneuronal innervation of skeletal muscle in new-born rats and its elimination during maturation. *J.Physiol* 261, 387-422.
11. Bruning, J. C., Michael, M. D., Winnay, J. N., Hayashi, T., Horsch, D., Accili, D., Goodyear, L. J., and Kahn, C. R. (1998). A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol.Cell* 2, 559-569.
12. Busetto, G., Buffelli, M., Tognana, E., Bellico, F., and Cangiano, A. (15-1-2000). Hebbian mechanisms revealed by electrical stimulation at developing rat neuromuscular junctions. *J.Neurosci.* 20, 685-695.
13. Chan, R. Y., Boudreau-Lariviere, C., Angus, L. M., Mankal, F. A., and Jasmin, B. J. (13-4-1999). An intronic enhancer containing an N-box motif is required

- for synapse- and tissue-specific expression of the acetylcholinesterase gene in skeletal muscle fibers. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 4627-4632.
14. Cohen-Cory, S. (25-10-2002). The developing synapse: construction and modulation of synaptic structures and circuits. *Science* 298, 770-776.
  15. Colledge, M. and Froehner, S. C. (31-3-1998). To muster a cluster: anchoring neurotransmitter receptors at synapses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 3341-3343.
  16. Colquhoun, D. and Sakmann, B. (1998). From muscle endplate to brain synapses: a short history of synapses and agonist-activated ion channels. *Neuron* 20, 381-387.
  17. R. Couteaux, in *Structure and Function of Muscle*, GH Bourne, Ed. (Academic, New York, 1973).
  18. Dai, Z., Luo, X., Xie, H., and Peng, H. B. (18-9-2000). The actin-driven movement and formation of acetylcholine receptor clusters. *J.Cell Biol.* 150, 1321-1334.
  19. DeChiara, T. M., Bowen, D. C., Valenzuela, D. M., Simmons, M. V., Poueymirou, W. T., Thomas, S., Kinetz, E., Compton, D. L., Rojas, E., Park, J. S., Smith, C., DiStefano, P. S., Glass, D. J., Burden, S. J., and Yancopoulos, G. D. (17-5-1996). The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell* 85, 501-512.
  20. DEL CASTILLO, J. and KATZ, B. (28-6-1954). Quantal components of the end-plate potential. *J.Physiol* 124, 560-573.
  21. Dunant, P., Larochele, N., Thirion, C., Stucka, R., Ursu, D., Petrof, B. J., Wolf, E., and Lochmuller, H. (2003). Expression of dystrophin driven by the 1.35-kb MCK promoter ameliorates muscular dystrophy in fast, but not in slow muscles of transgenic mdx mice. *Mol.Ther.* 8, 80-89.
  22. Engel, A. G., Ohno, K., Shen, X. M., and Sine, S. M. (2003). Congenital myasthenic syndromes: multiple molecular targets at the neuromuscular junction. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 998, 138-160.
  23. English, A. W. (2003). Cytokines, growth factors and sprouting at the neuromuscular junction. *J.Neurocytol.* 32, 943-960.
  24. Evans, M. J. and Kaufman, M. H. (9-7-1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
  25. FATT, P. and KATZ, B. (28-11-1951). An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode. *J.Physiol* 115, 320-370.
  26. FATT, P. and KATZ, B. (1952). Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J.Physiol* 117, 109-128.

27. Finn, A. J., Feng, G., and Pendergast, A. M. (2003). Postsynaptic requirement for Abl kinases in assembly of the neuromuscular junction. *Nat.Neurosci.* 6, 717-723.
28. Fjose, A., Ellingsen, S., Wargelius, A., and Seo, H. C. (2001). RNA interference: mechanisms and applications. *Biotechnol.Annu.Rev.* 7, 31-57.
29. Fromm, L. and Burden, S. J. (1-5-2001). Neuregulin-1-stimulated phosphorylation of GABP in skeletal muscle cells. *Biochemistry* 40, 5306-5312.
30. Fuchs, S., Kasher, R., Balass, M., Scherf, T., Harel, M., Fridkin, M., Sussman, J. L., and Katchalski-Katzir, E. (2003). The binding site of acetylcholine receptor: from synthetic peptides to solution and crystal structure. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 998, 93-100.
31. Gautam, M., Noakes, P. G., Mudd, J., Nichol, M., Chu, G. C., Sanes, J. R., and Merlie, J. P. (21-9-1995). Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature* 377, 232-236.
32. S. Gensler, thesis, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (2001).
33. Glass, D. J., Bowen, D. C., Stitt, T. N., Radziejewski, C., Bruno, J., Ryan, T. E., Gies, D. R., Shah, S., Mattsson, K., Burden, S. J., DiStefano, P. S., Valenzuela, D. M., DeChiara, T. M., and Yancopoulos, G. D. (17-5-1996). Agrin acts via a MuSK receptor complex. *Cell* 85, 513-523.
34. Glass, D. J. and Yancopoulos, G. D. (1997). Sequential roles of agrin, MuSK and rapsyn during neuromuscular junction formation. *Curr.Opin.Neurobiol.* 7, 379-384.
35. Gu, H., Marth, J. D., Orban, P. C., Mossmann, H., and Rajewsky, K. (1-7-1994). Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265, 103-106.
36. Hannon, G. J. (11-7-2002). RNA interference. *Nature* 418, 244-251.
37. Herbst, R., Avetisova, E., and Burden, S. J. (2002). Restoration of synapse formation in Musk mutant mice expressing a Musk/Trk chimeric receptor. *Development* 129, 5449-5460.
38. Herbst, R. and Burden, S. J. (4-1-2000). The juxtamembrane region of MuSK has a critical role in agrin-mediated signaling. *EMBO J.* 19, 67-77.
39. B. A. Hesser, thesis, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg (2000).
40. Holland, R. L. and Brown, M. C. (8-2-1980). Postsynaptic transmission block can cause terminal sprouting of a motor nerve. *Science* 207, 649-651.
41. Huey, K. A. and Bodine, S. C. (15-8-1998). Changes in myosin mRNA and protein expression in denervated rat soleus and tibialis anterior. *Eur.J.Biochem.* 256, 45-50.

42. Jakubiec-Puka, A., Ciechomska, I., Morga, J., and Matusiak, A. (1999). Contents of myosin heavy chains in denervated slow and fast rat leg muscles. *Comp Biochem.Physiol B Biochem.Mol.Biol.* 122, 355-362.
43. Jakubiec-Puka, A., Kordowska, J., Catani, C., and Carraro, U. (13-11-1990). Myosin heavy chain isoform composition in striated muscle after denervation and self-reinnervation. *Eur.J.Biochem.* 193, 623-628.
44. Jones, G., Meier, T., Lichtsteiner, M., Witzemann, V., Sakmann, B., and Brenner, H. R. (18-3-1997). Induction by agrin of ectopic and functional postsynaptic-like membrane in innervated muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 2654-2659.
45. Jones, G., Moore, C., Hashemolhosseini, S., and Brenner, H. R. (1-5-1999). Constitutively active MuSK is clustered in the absence of agrin and induces ectopic postsynaptic-like membranes in skeletal muscle fibers. *J.Neurosci.* 19, 3376-3383.
46. KATZ, B. and Miledi, R. (1967). A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses. *J.Physiol* 192, 407-436.
47. Keller-Peck, C. R., Feng, G., Sanes, J. R., Yan, Q., Lichtman, J. W., and Snider, W. D. (15-8-2001). Glial cell line-derived neurotrophic factor administration in postnatal life results in motor unit enlargement and continuous synaptic remodeling at the neuromuscular junction. *J.Neurosci.* 21, 6136-6146.
48. Kong, X. C., Barzaghi, P., and Ruegg, M. A. (2004). Inhibition of synapse assembly in mammalian muscle in vivo by RNA interference. *EMBO Rep.* 5, 183-188.
49. Kues, W. A., Sakmann, B., and Witzemann, V. (1-6-1995). Differential expression patterns of five acetylcholine receptor subunit genes in rat muscle during development. *Eur.J.Neurosci.* 7, 1376-1385.
50. Kuhn, R., Schwenk, F., Aguet, M., and Rajewsky, K. (8-9-1995). Inducible gene targeting in mice. *Science* 269, 1427-1429.
51. Lacazette, E., Le Calvez, S., Gajendran, N., and Brenner, H. R. (26-5-2003). A novel pathway for MuSK to induce key genes in neuromuscular synapse formation. *J.Cell Biol.* 161, 727-736.
52. Lichtman, J. W. and Colman, H. (2000). Synapse elimination and indelible memory. *Neuron* 25, 269-278.
53. Lin, W., Burgess, R. W., Dominguez, B., Pfaff, S. L., Sanes, J. R., and Lee, K. F. (26-4-2001). Distinct roles of nerve and muscle in postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nature* 410, 1057-1064.
54. Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.

55. Love, F. M. and Thompson, W. J. (1-12-1999). Glial cells promote muscle reinnervation by responding to activity-dependent postsynaptic signals. *J.Neurosci.* *19*, 10390-10396.
56. Luo, Z. G., Wang, Q., Zhou, J. Z., Wang, J., Luo, Z., Liu, M., He, X., Wynshaw-Boris, A., Xiong, W. C., Lu, B., and Mei, L. (1-8-2002). Regulation of AChR clustering by Dishevelled interacting with MuSK and PAK1. *Neuron* *35*, 489-505.
57. Marques, M. J., Conchello, J. A., and Lichtman, J. W. (15-5-2000). From plaque to pretzel: fold formation and acetylcholine receptor loss at the developing neuromuscular junction. *J.Neurosci.* *20*, 3663-3675.
58. Martin, P. T., Scott, L. J., Porter, B. E., and Sanes, J. R. (1999). Distinct structures and functions of related pre- and postsynaptic carbohydrates at the mammalian neuromuscular junction. *Mol.Cell Neurosci.* *13*, 105-118.
59. McMahan, U. J. (1990). The agrin hypothesis. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* *55*, 407-418.
60. Mejat, A., Ravel-Chapuis, A., Vandromme, M., and Schaeffer, L. (2003). Synapse-specific gene expression at the neuromuscular junction. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* *998*, 53-65.
61. Merlie, J. P. and Sanes, J. R. (5-9-1985). Concentration of acetylcholine receptor mRNA in synaptic regions of adult muscle fibres. *Nature* *317*, 66-68.
62. Mishina, M., Takai, T., Imoto, K., Noda, M., Takahashi, T., Numa, S., Methfessel, C., and Sakmann, B. (22-5-1986). Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature* *321*, 406-411.
63. Mittaud, P., Marangi, P. A., Erb-Vogtli, S., and Fuhrer, C. (27-4-2001). Agrin-induced activation of acetylcholine receptor-bound Src family kinases requires Rapsyn and correlates with acetylcholine receptor clustering. *J.Biol.Chem.* *276*, 14505-14513.
64. Miyagishi, M. and Taira, K. (2002). U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat.Biotechnol.* *20*, 497-500.
65. Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., and Unwin, N. (26-6-2003). Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* *423*, 949-955.
66. Morris, N. R. (2003). Nuclear positioning: the means is at the ends. *Curr.Opin.Cell Biol.* *15*, 54-59.
67. Nitkin, R. M., Smith, M. A., Magill, C., Fallon, J. R., Yao, Y. M., Wallace, B. G., and McMahan, U. J. (1987). Identification of agrin, a synaptic organizing protein from Torpedo electric organ. *J.Cell Biol.* *105*, 2471-2478.
68. Paul, C. P., Good, P. D., Winer, I., and Engelke, D. R. (2002). Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat.Biotechnol.* *20*, 505-508.

69. Pette, D. and Staron, R. S. (2001). Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem.Cell Biol.* *115*, 359-372.
70. Ralston, E., Ploug, T., Kalhovde, J., and Lomo, T. (1-2-2001). Golgi complex, endoplasmic reticulum exit sites, and microtubules in skeletal muscle fibers are organized by patterned activity. *J.Neurosci.* *21*, 875-883.
71. Ramarao, M. K., Bianchetta, M. J., Lancken, J., and Cohen, J. B. (9-3-2001). Role of rapsyn tetratricopeptide repeat and coiled-coil domains in self-association and nicotinic acetylcholine receptor clustering. *J.Biol.Chem.* *276*, 7475-7483.
72. Riley, D. A. (7-10-1977). Spontaneous elimination of nerve terminals from the endplates of developing skeletal myofibers. *Brain Res.* *134*, 279-285.
73. Rimer, M., Cohen, I., Lomo, T., Burden, S. J., and McMahan, U. J. (1998). Neuregulins and erbB receptors at neuromuscular junctions and at agrin-induced postsynaptic-like apparatus in skeletal muscle. *Mol.Cell Neurosci.* *12*, 1-15.
74. Sakmann, B. and Brenner, H. R. (23-11-1978). Change in synaptic channel gating during neuromuscular development. *Nature* *276*, 401-402.
75. Sander, A., Hesser, B. A., and Witzemann, V. (24-12-2001). MuSK induces in vivo acetylcholine receptor clusters in a ligand-independent manner. *J.Cell Biol.* *155*, 1287-1296.
76. Sanes, J. R. and Lichtman, J. W. (1999). Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Annu.Rev.Neurosci.* *22*, 389-442.
77. Sanes, J. R. and Lichtman, J. W. (2001). Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat.Rev.Neurosci.* *2*, 791-805.
78. Schaeffer, L., Duclert, N., Huchet-Dymanus, M., and Changeux, J. P. (1-6-1998). Implication of a multisubunit Ets-related transcription factor in synaptic expression of the nicotinic acetylcholine receptor. *EMBO J.* *17*, 3078-3090.
79. Schiaffino, S. and Reggiani, C. (1996). Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev.* *76*, 371-423.
80. Smith, C. L., Mittaud, P., Prescott, E. D., Fuhrer, C., and Burden, S. J. (1-5-2001). Src, Fyn, and Yes are not required for neuromuscular synapse formation but are necessary for stabilization of agrin-induced clusters of acetylcholine receptors. *J.Neurosci.* *21*, 3151-3160.
81. Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat.Genet.* *21*, 70-71.
82. Starr, D. A. and Han, M. (15-1-2003). ANChors away: an actin based mechanism of nuclear positioning. *J.Cell Sci.* *116*, 211-216.

83. Strohlic, L., Cartaud, A., Labas, V., Hoch, W., Rossier, J., and Cartaud, J. (28-5-2001). MAGI-1c: a synaptic MAGUK interacting with muSK at the vertebrate neuromuscular junction. *J.Cell Biol.* *153*, 1127-1132.
84. Tam, S. L. and Gordon, T. (2003). Mechanisms controlling axonal sprouting at the neuromuscular junction. *J.Neurocytol.* *32*, 961-974.
85. Terrado, J., Burgess, R. W., DeChiara, T., Yancopoulos, G., Sanes, J. R., and Kato, A. C. (1-5-2001). Motoneuron survival is enhanced in the absence of neuromuscular junction formation in embryos. *J.Neurosci.* *21*, 3144-3150.
86. Thompson, S., Clarke, A. R., Pow, A. M., Hooper, M. L., and Melton, D. W. (27-1-1989). Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell* *56*, 313-321.
87. Till, J. H., Becerra, M., Watty, A., Lu, Y., Ma, Y., Neubert, T. A., Burden, S. J., and Hubbard, S. R. (2002). Crystal structure of the MuSK tyrosine kinase: insights into receptor autoregulation. *Structure.(Camb.)* *10*, 1187-1196.
88. Trask, R. V. and Billadello, J. J. (21-6-1990). Tissue-specific distribution and developmental regulation of M and B creatine kinase mRNAs. *Biochim.Biophys.Acta* *1049*, 182-188.
89. Villarroel, A. (1996). Progression of M-current inhibition after agonist removal. *J.Neurophysiol.* *75*, 518-521.
90. Vincent, A., McConville, J., Farrugia, M. E., Bowen, J., Plested, P., Tang, T., Evoli, A., Matthews, I., Sims, G., Dalton, P., Jacobson, L., Polizzi, A., Blaes, F., Lang, B., Beeson, D., Willcox, N., Newsom-Davis, J., and Hoch, W. (2003). Antibodies in myasthenia gravis and related disorders. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* *998*, 324-335.
91. Weston, C., Gordon, C., Teressa, G., Hod, E., Ren, X. D., and Prives, J. (21-2-2003). Cooperative regulation by Rac and Rho of agrin-induced acetylcholine receptor clustering in muscle cells. *J.Biol.Chem.* *278*, 6450-6455.
92. Winer, J., Jung, C. K., Shackel, I., and Williams, P. M. (15-5-1999). Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal.Biochem.* *270*, 41-49.
93. Witzemann, V., Barg, B., Criado, M., Stein, E., and Sakmann, B. (2-1-1989). Developmental regulation of five subunit specific mRNAs encoding acetylcholine receptor subtypes in rat muscle. *FEBS Lett.* *242*, 419-424.
94. Witzemann, V., Barg, B., Nishikawa, Y., Sakmann, B., and Numa, S. (19-10-1987). Differential regulation of muscle acetylcholine receptor gamma- and epsilon-subunit mRNAs. *FEBS Lett.* *223*, 104-112.
95. Witzemann, V., Brenner, H. R., and Sakmann, B. (1991). Neural factors regulate AChR subunit mRNAs at rat neuromuscular synapses. *J.Cell Biol.* *114*, 125-141.



96. Wyatt, R. M. and Balice-Gordon, R. J. (2003). Activity-dependent elimination of neuromuscular synapses. *J.Neurocytol.* 32, 777-794.
97. Yang, X., Arber, S., William, C., Li, L., Tanabe, Y., Jessell, T. M., Birchmeier, C., and Burden, S. J. (2001). Patterning of muscle acetylcholine receptor gene expression in the absence of motor innervation. *Neuron* 30, 399-410.
98. Zhou, H., Glass, D. J., Yancopoulos, G. D., and Sanes, J. R. (6-9-1999). Distinct domains of MuSK mediate its abilities to induce and to associate with postsynaptic specializations. *J.Cell Biol.* 146, 1133-1146.
99. Zito, K. (9-1-2003). The flip side of synapse elimination. *Neuron* 37, 1-2.