

Diss ETH 6212

UNTERSUCHUNGEN ZUR ZELL-SUBSTRAT-ADHAESION, ZELL-ZELL-  
ADHAESION UND ZELLFUSION EMBRYONALER HUEHNER-  
SKELETTMUSKELZELLEN

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
der

EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von

CHIQUET MATTHIAS

Dipl. Natw. ETH

geboren am 24. Februar 1951

von Riehen (Kt. Basel-Stadt)

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. H.M. Eppenberger, Referent

Prof. Dr. H. Moor, Korreferent

1978

## ZUSAMMENFASSUNG

Myogene Zellen aus dem Brustmuskel 11-tägiger Hühnerembryonen setzen sich in Kultur auf dem Substrat fest, strecken sich, wandern umher, bilden spezifische Zellkontakte untereinander und fusionieren zu vielkernigen Myotuben (8).

Ein serumfreies "LH"-Medium (21), in dem myogene Zellen in Suspension kultiviert werden können, erlaubte die Untersuchung der Zell-Substrat-Adhäsion. Aus Pferdeserum, welches das Haften suspendierter Myoblasten am Substrat bewirkte, wurde ein Haftfaktor isoliert, der mit gereinigtem humanem "cold insoluble globulin" (25) oder Fibronectin (33) immunologisch identisch war. Das isolierte Pferdeserum-Fibronectin (und ebenso humanes Fibronectin) bewirkte Zell-Substrat-Adhäsion wie Pferdeserum, wenn es dem "LH"-Medium zugegeben wurde oder wenn die Kulturschalen damit beschichtet waren. Monospezifische Antikörper gegen Human-Fibronectin präzipitierten spezifisch Pferde-Fibronectin aus Pferdeserum und inhibierten die Aktivität des Serums zu über 80 %; Pferde-Fibronectin ist somit der wichtigste Serum-Haftfaktor.

Hühner-Fibronectin (38), das von Fibroblasten-Zelloberflächen oder aus Fibroblasten-konditioniertem Medium isoliert worden war, besass die gleiche Aktivität bezüglich Haften von Myoblasten wie Pferde- und Menschen-Fibronectin. Durch Immunpräzipitation radioaktiver Zellextrakte mit Anti-Human-Fibronectin konnte nachgewiesen werden, dass Hühner-Fibroblasten, nicht aber -Myoblasten Fibronectin synthetisieren und ins Medium abgeben. Immunfluoreszenz-Markierung zeigte ein Fibronectin-Netzwerk auf der Oberfläche von Fibroblasten, während Myoblasten nicht markiert waren. Myoblasten sind somit von exogenem Fibronectin abhängig, um am Substrat haften zu können.

Spezifische Zell-Zell-Adhäsion zwischen myogenen Zellen konnte mit Hilfe einer Versuchsanordnung von Bischoff und Lowe (122)

gemessen werden. Radioaktive markierte Myoblasten wanderten auf dem Substrat und bildeten (im Gegensatz zu Fibroblasten) spezifische Kontakte zu unmarkierten Myotuben. Extraktion der Myotuben mit EDTA setzte die Zell-Zell-Adhäsion herab, Zugabe des EDTA-Extraktes stellte sie teilweise wieder her. EGTA-Behandlung hatte keinen Einfluss. Das Ausmass der Zell-Zell-Adhäsion hing von der Vorbehandlung der Zellen und von der Zusammensetzung des Kulturmediums ab. Myoblasten bildeten auch zu Glutaraldehydfixierten Myotuben spezifische Kontakte. Es wird diskutiert, ob EDTA spezifische Adhäsionsfaktoren von den Zelloberflächen wewölöst oder nur auf Zell-Substrat-Adhäsion und Zellwanderung wirkt.

Die Zellfusion zwischen Myoblasten wurde mit Hilfe der Gefrierätz-Methode untersucht. Nach einer lateralen Umverteilung der Membranpartikel scheint die Fusion benachbarter Plasmalemmen von partikelfreien Stellen auszugehen, wobei gleichzeitig mehrere Fusionsporen gebildet werden. "Gap junctions" sind offenbar nicht an der Fusion beteiligt. Mangel an extrazellulärem  $Ca^{2+}$  hemmte nicht nur die Ausbildung von Filopodien und Zellkontakten (125), sondern auch direkt die Fusion aneinandergrenzender Plasmalemmen.

ABSTRACT

A horse serum component mediating substrate attachment of chicken myoblasts was isolated and identified as horse serum fibronectin. Inhibition experiments with monospecific antibodies against human plasma fibronectin (cold insoluble globulin) demonstrated that horse serum fibronectin represents the most important serum attachment factor. Attachment-promoting chicken fibronectin is synthesized, accumulated, and released by chicken fibroblasts, but not myoblasts. Myoblast attachment therefore depends on the presence of exogenous fibronectin.

Myoblast-specific cell-cell adhesion was measured with an autoradiographic assay. Attached myoblasts (not fibroblasts) formed contacts to living or aldehyde-fixed myotubes, dependent on pretreatment of the cells and on medium composition.

Myoblast fusion was investigated by the freeze etching technique. Lateral displacement of membrane particles establishes small particle-free domains; membrane fusion appears to proceed simultaneously from several such domains that are in close proximity. Gap junctions clearly are not involved in membrane fusion.