

DBcAMP와 retinoic acid를 이용한 마우스 배아줄기의 평활근세포 분화

박성수, 강주원*

전남대학교 수의과대학
(접수 2008. 9. 10, 게재승인 2008. 10. 27)

Differentiation of mouse embryonic stem cell into smooth muscle cells by DBcAMP and retinoic acid

Sung-Soo Park, Ju-Won Kang*

College of Veterinary medicine, Chonnam National University, Gwanju, 500-757
(Received 10 September 2008, accepted in revised from 27 October 2008)

Abstract

The differentiation of mouse embryonic stem(ES) cell into smooth muscle cells(SMC) may play a major role in cardiovascular development and under pathophysiological conditions. Therefore, in the present study, we have examined the differentiation of ES cells and its related gene expression. SMC differentiation was indicated by cellular morphology and time-dependent induction of dibutyryl adenosine 3,5-cyclic monophosphate(DBcAMP) and retinoic acid(RA) on smooth muscle α -actin(SMaA), smooth muscle myosin heavy chain(SMMHC) gene expression. The control was undifferentiated ES cells(protein expressions represent 50-60kDa Oct-4). The results of this study show that morphology of embryoid body and confirmation of SMaA expression by immunocytochemistry. Moreover, SMMHC and desmin expression was significantly increased by time dependent manner(5, 7, 15 days), in contrast to SMaA expression was slightly decreased on 15days. In conclusion, DBcAMP and RA stimulate mouse ES cells differentiation into SMC and enhanced SMaA, SMMHC and desmin expression.

Key words : Embryonic stem(ES)cell, DBcAMP, Retinoic acid, Smooth muscle myosin heavy chain(SMMHC), Smooth muscle α -actin(SMaA)

*Corresponding author.

Phone : +82-62-530-2853, Fax : +82-62-530-2852

E-mail : juwondr@empas.com

서 론

줄기세포는 개체를 구성하는 세포나 조직의 근간이 되는 세포이고, 미분화된 상태를 유지하며, 자기재생(self-renewal) 및 특정한 세포로의 분화 뿐 만 아니라 손상된 조직을 복구시키는 능력을 가지고 있다.

배아줄기세포는 착상 전 배아의 배반포 단계에서 형성되는 내세포덩어리(ICM)에서 유래되고 영구적으로 자가 재생할 수 있는 전능성과 특정 세포로 분화할 수 있는 능력을 가진다¹⁾. 1980년대 초 마우스배아줄기가 최초로 소개된 이후²⁾ 1998년에는 인간의 배아줄기가 확립됨으로써³⁾ 재생의학, 유전공학과 같은 유관분야의 연구발전에 지대한 영향을 미치고 있다. 마우스 배아줄기세포는 원형의 덩어리 형태로 증식하여 하나 하나세포를 관찰하기가 어렵지만, 발육단계에서는 표지항체인 배아항원(stage-specific embryonic antigens, SSEA) SSEA-1이 발현된다⁴⁾. 배아줄기세포들은 마우스 섬유아세포(mouse embryonic blast, MEF)와 같은 지지세포와 함께 배양하여 미분화 상태를 유지하였다. 그러나 인간세포가 동물에서 유래한 병원체에 노출될 위험성 때문에 최근에는 지지세포, 혈관대체물질, bFGF(basic fibroblast growth factor) 또는 TGF- β 1(tans-forming growth factor- β 1) 등을 세포를 배양할 때 첨가하여 세포의 미분화 상태를 유지시키는 연구가 다양하게 진행되고 있다⁵⁻⁷⁾. 마우스 배아줄기세포 경우에는 지지세포대신 LIF(leukemia inhibitory factor)와 같은 사이토카인을 첨가하여 미분화상태로 장기간 배양이 가능하다. 그러나 인간 배아줄기 세포는 LIF에 의해 세포특성이 조절되지 않는다⁸⁾.

평활근세포는 주로 혈관, 위장관, 방광 등을 구성하는 세포이다. 맥관계의 세포는 다양한 형태의 세포로부터 유래하지만⁹⁾, 생리학적, 병리학적으로 혈관질환의 치료가능성을 높이기 위하여 줄기세포의 평활근세포 분화와 혈관내피세포 등에 관한 연구가 진행되고 있다¹⁰⁻¹²⁾.

마우스 배아줄기세포로부터 평활근 분화에 이용되는 물질은 MKL1 또는 RA, DBc-AMP와, 세포내 인자들로서 Pax3, Tbx1, FoxC1, serum response factor, bone morphogenetic proteins (BMPs), Wnts, endothelin(ET)-1, estrogen 그리고 FGF8 등이 있다. 그리고 평활근 세포에 선택적인 유전자인 smooth muscle α -actin (SM α A), myocardin, smoothelin-B 및 smooth muscle myosin heavy chain(SMMHC)발현으로 평활근세포로의 분화를 확인 하고 있다^{13,14)}.

따라서 본 연구에서는 DBcAMP와 RA를 이용하여, desmin 및 SMMHC와 SM α A 단백질의 발현여부를 확인하여 궁극적으로는 마우스 배아 줄기세포가 평활근세포로 분화 되는지를 알아보았다.

재료 및 방법

실험재료

마우스 배아줄기세포는 ATCC (ESE14-TG2a)로부터, fetal bovine serum은 Bio-whittaker (Walkersville, MD, USA)로부터, All-trans retinoic acid (atRA)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)로부터, Dibutyryl adenosine 3,5- cyclic monophosphate (DBcAMP)는 Roche (Indianapolis, IN)에서, RT-PCR용 SM α A (for-ward, reverse), SMMHC (forward, reverse) sequence는 Biomed chemical company (Seoul, Korea)에서, Western-blot 용 desmin은 Santa Cruz Biotechnology (Delaware, CA, USA)에서 각각 구입하였다.

배아체 형성과 마우스 배아줄기 세포의 배양

마우스 배아줄기세포는 DMEM (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) 배지에서 배양했다. DMEM 배지에는 3.7 g/L sodium bicarbonate, 1% penicillin과 streptomycin, 1.7 mM L-glutamine, 0.1 mM β -mercaptoethanol, 5 ng/ml mouse leukemia inhibitory factor 및

15% fetal bovine serum (FBS)를 첨가하였다. Embryonic stem cell-embryoid body (ESC-EB)를 만들기 위해서 트립신 처리를 한 후, 72 시간동안 hanging drop(10 μ l)으로 배양접시에 분주했다. 배양접시에 배지(LIF 및 β -mercaptoethanol을 제거하고, 20% 혈청첨가)를 첨가해서 3일간 배양하여 6일째 되는날에 gelatin 처리를 한 배양접시에 세포를 분주해서 24시간정도 배양접시에 부착시켰다. 7, 8, 9일째 되는 날에 10nM의 RA와 0.5mM의 DB-cAMP를 처리하고 배지는 매일 교체하였다.

면역형광항체염색

배아체를 4%의 paraformaldehyde에 10분 고정하고 PBS로 세정한 후, 0.5% Triton X-100을 처리 후 3% BSA으로 차단시켰다. Anti-SMA(clone 1A4; Sigma)를 1:5000으로 희석해서 처리 후 공초점 현미경(fluoview 300, Olympus)으로 확인하였다.

RNA 추출과 RT-PCR

총 RNA는 Tel-Test InC (Friendwood, Tex, USA)로부터 구입한 STAT-60, 페놀과 guanidine isothiocyanate 용액을 사용하여 마우스 배아 줄기세포로부터 추출했다. 3 μ l의 RNA에 2 μ l의 Oligo-dT primer를 넣고 reverse transcription system kit (AccuPower RT Pre-Mix, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하기 위해 42 $^{\circ}$ C 60분, 94 $^{\circ}$ C 5분, 역전사시켰다. 그 후 RT 산물 3-5 μ l를 PCR kit (Accupower PCR PreMix, Korea)로 증폭시켰다. 증폭시킨 과정을 요약하면 다음과 같다. 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성을 하고 SMAa의 경우 94 $^{\circ}$ C에서 45초, 56 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1분의 과정을 25 cycle 후에 72 $^{\circ}$ C 에서 5분 처리하였다. SMMHC의 경우는 경우 94 $^{\circ}$ C에서 45초, 56 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1분의 과정을 36 cycle 후에 72 $^{\circ}$ C에서 5분 처리하였다. SMAa의 sequence는 forward CGCTGTC-AGGAACCCTGAGA, reverse CGAAGCCGGCC-

TTACAGA, SMMHC의 sequence는 forward TGGACACCATGTCAGGGAAA, reverse AT-GGACACAAGTGCTAAGCAGTCT. β -Actin은 PCR의 RNA의 양에 따라 조절하여 수행하였다.

Western blot 분석

세포 균질화액 (20 μ g 단백질)을 10% SDS-polyacrylamide gel을 이용해 전기영동 시킨 후 nitrocellulose로 옮겼다. Blots은 TBST [10mM Tris-HCl, (pH 7.6), 150mM NaCl, 0.05% Tween-20]으로 세정한 후, 막은 5% 탈지유로 1시간동안 차단한 다음, 권장된 농도에 맞춰서 적절한 1차 항체로 배양했다. 그 다음 막을 세정하고, goat anti-rabbit IgG 또는 horseradish peroxidase를 부착시킨 goat antimouse IgG로 1차 항체를 검출하였다. 밴드는 enhanced chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech, England, UK)로 확인하였다.

통계분석

결과는 means \pm standard errors (SE)로 표시하였다. 모든 실험은 ANOVA를 이용해서 분석한 후, Bonnferroni Dunn test를 이용하여 대조군과 평균을 비교해서 분석하였다. $P < 0.05$ 인 결과를 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

마우스 배아 줄기세포의 미분화 확인

LIF를 처리하여 배양한 대조군에서는 Oct-4 (50-60kDa)가 발현되었지만, 배아체를 형성시켜 평활근세포로 분화시키고자 하는 실험군에서는 Oct-4가 발현되지 않았다 (Fig 1A). 그리고 LIF를 처리하여 미분화된 세포는 관찰되지 않았으나 (Fig 1B), DBcAMP 및 RA를 처리한 실험군에서는 분화된 배아체의 형태를 관찰 할 수 있었다(Fig 1C).

면역형광항체염색에 의한 SMaA 발현 확인

LIF를 처리하여 미분화 상태를 유지한 대조군에서는 관찰되지 않았으며(Fig 2A), SMaA도 거의 발현되지 않았다(Fig 2B). 그러나 DB-

cAMP 및 RA를 처리하여 분화를 유도한 실험군에서는 배아체의 형태가 관찰되었으며(Fig 2C), 분화된 마우스 배아줄기세포에서는 SMaA의 발현양상이 뚜렷하게 나타났다(Fig 2D).

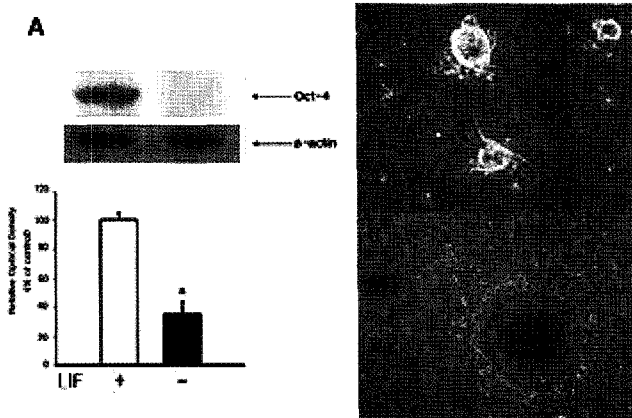


Fig 1. Confirmation of undifferentiated mouse ES cells.

A. Protein expressions represent 50-60 kDa of Oct-4 and 41 kDa of β-actin.

B. Morphology of undifferentiated mouse ES-cell treated by leukemia inhibitory factor(LIF).

C. Morphology of embryoid body made by hanging drop and treated retinoic acid and DBcAMP.

*P < 0.05 VS control.

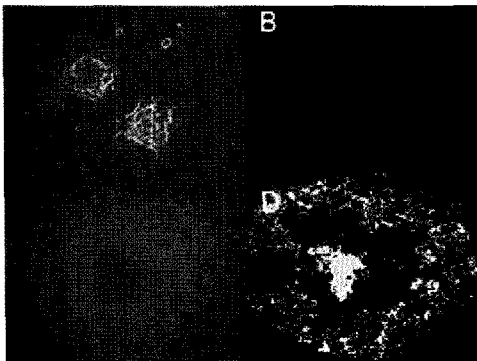


Fig 2. Confirmation of SMaA expression by immunocytochemistry.

A. Morphology of undifferentiated mouse ES-cell treated by leukemia inhibitory factor (LIF).

B. SMaA doesn't expressed in undifferentiated mouse ES-cell treated by leukemia inhibitory factor (LIF).

C. Morphology of embryoid body made by hanging drop and treated retinoic acid and DBcAMP.

D. SMaA expressed on differentiated mouse ES-cell treated by retinoic acid and DBcAMP

마우스 배아 줄기세포에 대한 DBcAMP 및 RA의 영향

마우스 배아줄기 세포를 DBcAMP 및 RA를 첨가해서 배양하고 SMaA과 SMMHC의 발현 정도를 RT-PCR을 통해 관찰한 결과, SMMHC는 대조군에 비해 5일, 7일, 15일에서 시간 의존적으로 mRNA의 발현 양상이 뚜렷하게 나타났다(Fig 3A). SMaA의 경우에서도 대조군에 비해 5일, 7일, 15일에서 유의성 있게 mRNA가 발현되었지만, 15일이 경과하면 감소되는 양상을 보였다(Fig 3B). 그리고 Western blot을 이용한 desmin의 발현정도는 대조군에

서는 매우 낮지만, 실험군에서는 5일에서 15일로 시간경과에 따라 시간 의존적으로 뚜렷이 증가하였다(Fig 4).

고 찰

최근 줄기세포의 추출 및 분화의 기술이 급속하게 발달함에 따라 줄기세포를 이용한 난치성 질환들의 세포치료법 개발에 더 많은 관심과 노력을 기울이고 있다. 가장 전형적인 배아줄기세포 미분화 표지인자로는 Oct4가 있으며, 이 단백질은 다른 종류의 전사인자들과 상호연관성을 가지며, 배아줄기세포에서 발현하는 다

양한 유전자를 조절하게 된다. 그 중 HMG (high mobility group) box protein SOX2와 forkhead family member FoxD3가 대표적으로 Oct4와 기능적으로 연결하여 줄기세포의 전능성을 유지하는데 중요한 역할을 한다⁴⁾. 본 연구에서는 마우

스 배아줄기세포의 미분화를 확인하기 위해서 LIF를 첨가하여 배양한 대조군에서는 Oct-4 (50-60kDa)가 발현되었지만, 배아체를 형성한 실험군은 Oct-4가 발현되지 않았다.

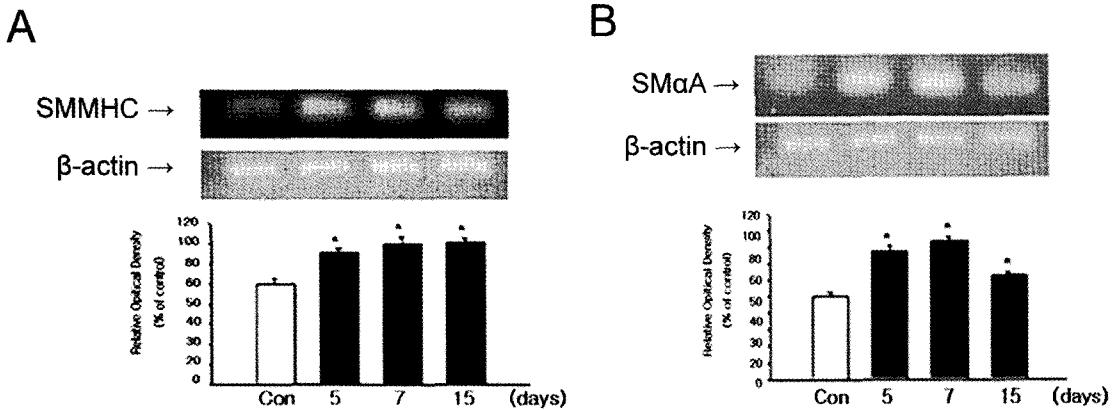


Fig 3. Effect of RA and DBcAMP on SMMHC and SMaA gene expression.

- A. After mouse ES cells were treated with RA and DBcAMP for different periods (5, 7, 15 days), SMMHC expression was analysed by RT-PCR.
- B. After mouse ES cells were treated with RA and DBcAMP for different periods(5, 7, 15 days), SMaA expression was analysed by RT-PCR. * $P < 0.05$ vs control.

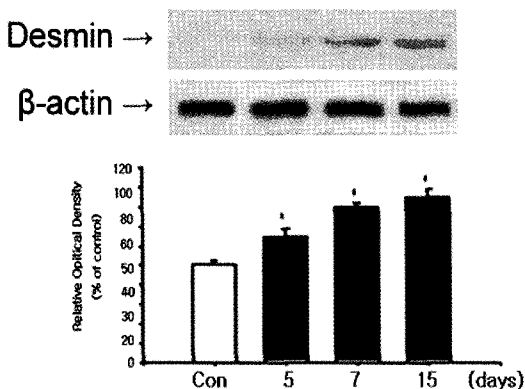


Fig 4. Effect of RA and DBcAMP on desmin protein expression. After mouse ES cells were treated with RA and DBcAMP for varying periods (5, 7, 15 days), desmin protein expression were analyzed by western blot. * $P < 0.05$ vs control.

이 결과는 내세포덩어리에서 외배엽으로 분화하는 동안 mRNA수준은 감소하였으며, Oct 3/4나 Rex-1, UTF-1 등 세포의 미분화 표지인자¹⁷⁾를 확인할 수 있었다는 결과와 일치하였다. 형태학적으로는 LIF를 처리하여 미분화를 유지하는 세포와 DBcAMP 및 RA를 처리하여 분화된 배아체의 형태를 관찰하여 세포가 정상적으로 분화되고 있는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 면역형광항체염색에서도 동일하게 관찰되었으며, LIF를 처리한 대조군에서는 SMaA는 거의 발현되지 않았다. 그러나 DBcAMP 및 RA를 처리하여 분화를 유도한 실험군에서는 배아체의 형태가 관찰되었으며, 분화된 세포에서는 SMaA 발현양상이 뚜렷하게 나타났다.

평활근세포로 완전히 분화가 되었을 때는 평활근 세포에 선택적인 유전자인 SMMHC,

SMaA, myocardin, smoothelin-B, SM22a¹⁸⁾ 및 tolokin¹⁹⁾ 등이 존재한다. 혈관 평활근은 발생 초기에는 (myosin heavy chain, MHC) MHC-1만 관찰되고, MHC-2는 나타나지 않았다²⁰⁾. 그리고 혈관 특유표지인 (platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM)는 미분화된 쥐의 배아줄기세포에서는 발현되지 않는다고 보고하였다²¹⁾. 본 연구에서는 DBcAMP 및 RA 첨가해서 마우스 배아줄기세포를 배양하고 SMaA과 SMMHC의 발현 정도를 관찰한 결과 SMMHC는 대조군에 비해 5일, 7일, 15일에서 mRNA의 발현 양상은 뚜렷하였다. 시험관 내에서도 배양조건에 따라 신경세포가 평활근세포로 분화하면서 세포형태학적, 시간 의존적으로 평활근세포 표지인자 (SM22alpha, SMMHC, APEG-1, Smooth muscle alpha-action)로 분화되었다는 결과와도 일치하였다²²⁾. SMaA의 경우에서도 대조군에 비해 5일, 7일, 15일에서 강한 양상의 mRNA가 발현 되었지만, 15일이 경과하면 감소되었다. 초파리 배아, 심근, 골격근, 척추동물 평활근 세포 등의 분화에서 myocyte enhancer binding factor-2 (MEF-2)가 발현되며²³⁾, MEF-2는 세포분화초기에 나타나고²⁴⁾, 포유동물에서 MEF-2에 의해서 활성화되는 유전자 가운데는 desmin이 있다. 심근, 골격 또는 평활근 세포와 같은 모든 근 조직에 발현되는 근육의 특수한 단백질 유전자인 desmin은 세포외부근섬유를 유지하는 transcytoplasmic integrating matrix를 형성하는데 필요하다고 보고하였다²⁵⁾. 평활근세포로 분화할 때 desmin의 발현수준이 낮으면 2차적으로 근세포의 형성이 감소되지만, 배아체가 형성되면 desmin mRNA와 단백질이 축적 된다고 하였다²⁶⁾. 본 연구에서 desmin의 발현 정도를 조사한 결과 대조군에서는 매우 낮지만, 실험군에서는 5일에서 15일로 시간경과에 따라 시간 의존적으로 desmin 발현 양상이 뚜렷이 증가하였다. 이와 같은 결과는 근육 특이적인 중간필라멘트 단백질인 desmin은 근모세포에서는 낮은 수준으로 나타나지만, 분화가 시작되면 몇 배 증가하여 발현되며²⁷⁾, MyoD,

Myogenin, MRF4 와 Myf5 등에 의해 활성이 조절된다²⁸⁾. 그리고 desmin이 존재하지 않으면 평활근의 형성이 차단되었다는 선행 보고들과도 일치하였다²⁹⁾. 그러나 본 실험에서는 농도 의존적인 발현양상은 측정하지 못했기 때문에, 배아 줄기세포의 평활근세포 분화 정도가 농도 의존적으로 차이가 있는지에 대해서는 향후 좀 더 연구가 필요할 것으로 생각 된다.

결론적으로 마우스 배아 줄기세포는 DBcAMP 및 RA 영향으로 SMMHC 및 SMaA mRNA 발현이 증가되고, desmin 단백질 발현도 증가되는 것으로 보아 이들 세포가 정상적으로 평활근세포로 분화되었음을 알 수 있었다.

결 론

마우스 배아 줄기세포가 평활근세포로 분화되는 것은 혈관 손상으로 인한 질병에서 손상된 혈관의 치료 가능성을 높여줄 수 있기 때문에 평활근의 분화와 기전규명에 대한 연구가 다양하게 진행되고 있다. 본 연구에서는 DBcAMP 및 RA가 마우스 배아줄기세포를 평활근세포로 분화시킬 수 있는지를 알아보고자 하였다.

마우스 배아줄기세포의 미분화를 확인하기 위해서 LIF를 처리하여 배양한 대조군에서는 Oct-4가 발현되었지만, 배아체를 형성시켜 평활근세포로 분화시키고자 하는 실험군에서는 발현되지 않았다. 그리고 미분화된 세포와 DBcAMP 및 RA를 처리하여 분화된 배아체의 형태가 관찰되었다. 면역형광항체염색 결과 대조군에서는 마우스 배아줄기세포의 분화가 관찰되지 않았으며, SMaA도 거의 발현되지 않았다. 그러나 DBcAMP 및 RA를 처리하여 분화를 유도한 실험군에서는 배아체의 형태가 관찰되었고, SMaA의 발현양상도 뚜렷하게 나타났다. SMMHC는 대조군에 대해서 mRNA의 발현양상이 뚜렷하였으며, SMaA의 경우는 mRNA가 발현되었지만, 15일이 경과하면 감소되는 양상이었다. 그리고 미분

화된 세포에서는 desmin 발현이 매우 낮지만, 실험군에서는 시간 의존적으로 발현 양상이 뚜렷하게 증가하였다. Desmin 단백질 발현이 증가되는 것으로 보아 이들 세포가 정상적으로 평활근세포로 분화되었음을 알 수 있었다. 결론적으로 마우스 배아줄기세포에 DB-cAMP 및 RA를 처리하면 평활근세포의 표지인자인 SM-MHC 및 SM α A mRNA 발현이 증가되었다.

이와 같은 기초자료를 바탕으로 하여 조직 재생학적인 관점에서 배아줄기세포를 평활근세포로 분화를 유도한 후 혈관 손상 등의 치료개선 및 장기의 기능을 회복시키는 가능성을 제시하고자 한다.

참고문헌

1. Niwa H. 2001. Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct Funct* 26 : 137-148.
2. Evans MJ, Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292 : 154-156.
3. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282 : 1145-1147.
4. Koestenbauer S, Zech NH, Juch H, et al. 2006. Embryonic stem cell: similarities and differences between human and murine embryonic stem cells. *Am J Reptod Immunol* 55 : 169-180.
5. Amit M, Sharikic, Margulets V. 2004. Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol Reprod* 70 : 837-845.
6. Hong JH, Song C, Shin YJ, et al. 2004. Estrogen induction of smooth muscle differentiation of human prostatic cells is mediated by transforming growth factor- β . *J Uro* 171: 1965-1969.
7. Chen S, Lechleider RJ. 2004. Transforming growth factor beta induced differentiation of smooth muscle from a neural crest stem cell line. *Circ Res* 94 : 1195-1202.
8. Draper JS, Smith K, Gokhale P. 2004. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 incultured human embryonic stem cell. *Nat Biotechnol* 22: 53-54.
9. Hirschi KK, Mark W, Majesky. 2004. Smooth Muscle Stem Cells. *ana rec part A Discov Mol Cell Evol Biol.* 276 A : 22-33.
10. Baldwin HS, Shen HM, Yan HC, et al. 1994. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31): alternatively spliced, functionally distinct isoforms expressed during mammalian cardiovascular development. *Development* 120 : 2539-2553.
11. Carmeliet P, Collen D. 2000. Transgenic mouse models in angiogenesis and cardiovascular disease. *J Pathol* 190 : 387-405.
12. Carmeliet P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6: 389-395.
13. Madsen CS, Regan CP, Hungerford JE, et al. 1998. Smooth muscle-specific expression of the smooth muscle myosin heavy chain gene in transgenic mice requires 5'-flanking and first intronic DNA sequence. *Circ Res* 82 : 908-917.
14. Regan CP, Manabe I, Owens GK. 2000. Development of a smooth muscle-targeted cre recombinase mouse reveals novel insights regarding smooth muscle myosin heavy chain promoter regulation. *Circ Res* 87 : 363-369.
15. Friel R, van der Sar S, Mee PJ. 2005. Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signaling. *Adv Drug Deliv Rev* 12:57: 1984-1903.

16. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, et al. 2003. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113: 631-643.
17. Rogers MB, Hosler BA, Gudas LJ. 1991. Specific expression of a retinoic acid-regulated, zinc-finger gene, Rex-1, in preimplantation embryos, trophoblast and spermatocytes. *Development* 113: 815-824.
18. Chen S, Kulik M, Lechleider RJ. 2003. Smad proteins regulate transcriptional induction of the SM22 alpha gene by TGF-beta. *Nucleic Acids Res* 31: 1302-1310.
19. Herring BP, Smith AF. 1996. Telokin expression is mediated by a smooth muscle cell-specific promoter. *Am J Physiol* 270: C1656-C1665.
20. Borriero AC, Zanellato AM, Scannapieco G, et al. 1989. Myosin heavy-chain isoforms in adult and developing rabbit vascular smooth muscle. *Eur J Biochem* 183: 413-417.
21. Redick SD, Bautch VL. 1999. Developmental platelet endothelial cell adhesion molecule expression suggests multiple roles for a vascular adhesion molecule. *Am J Pathol* 154: 1137-1147.
22. Jain MK, Layne MD, Watanabe M, et al. 1998. *In vitro* system for differentiating pluripotent neural crest cells into smooth muscle cells. *J Biol Chem* 273: 5993-5996.
23. Lilly B, Zhao B, Ranganayakulu G, et al. 1995. Requirement of MADS domain transcription factor D-MEF2 for muscle formation in *Drosophila*. *Science* 267: 688-693.
24. Gossett L, Kelvin D, Sternberg E, et al. 1989. A new myocyte-specific enhancer binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes. *Mol Cell Biol* 9: 5022-5033.
25. Granger BL, Lazarides E. 1979. Desmin and vimentin exist at the periphery of myofibril Z disc. *Cell* 18: 1053-1063.
26. Capetanaki Y, Ngai J, Lazarides E. 1984. Characterization and regulation in the expression of a gene coding for the intermediate filament protein desmin. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 6909-6913.
27. Li H, Capetanaki Y. 1993. Regulation of the mouse desmin gene: Transactivated by MyoD, MRF4 and Myf5. *Nucleic Acids Res* 21: 335-343.
28. Li H, Capetanaki Y. 1993. Regulation of the mouse desmin gene: Transactivated by MyoD, Myogenin, MRF4 and Myf5. *Nucleic Acids Res* 21: 335-343.
29. Weitzer G, Milner DJ, Kim JU, et al. 1995. Cytoskeletal control of myogenesis: a desmin null mutation blocks the myogenic pathway during embryonic stem cell differentiation. *Dev Biol* 172: 422-439.