

# **Das ventrolaterale Dermomyotom und seine Derivate**

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

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

vorgelegt von

**Diana Lenhard**

aus Siegen

November, 2009

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

Disputation am 04.02.2010

## **INHALTSVERZEICHNIS**

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b><u>EINLEITUNG</u></b>  | <b>1</b>  |
| 1.1      | Die Entstehung der Skelettmuskulatur in Vertebraten   | 1         |
| 1.2      | Die molekulare Kontrolle in der Entwicklung migrierender, hypaxialer Muskelvorläuferzellen                              | 3         |
| 1.2.1    | Die Funktion von Pax3 in der Myogenese  | 4         |
| 1.2.2    | Lbx1 und die Spezifizierung der hypaxialen, migrierenden Muskelvorläuferpopulation                                      | 5         |
| 1.2.3    | Genetische Kontrolle zur Delaminierung hypaxialer Muskelvorläuferzellen durch c-met und HGF/SF                          | 6         |
| 1.2.4    | Migration und Proliferation von Muskelvorläuferzellen   | 7         |
| 1.2.5    | Differenzierung embryonaler Muskelvorläuferzellen und adulter Stammzellen   | 8         |
| 1.2.6    | Pax7: Generierung und Erhalt von Satellitenzellen   | 10        |
| 1.3      | Beteiligung der Somiten an der Angiogenese  | 11        |
| 1.3.1    | Die Generierung von braunen Fettgewebe aus Myoblasten   | 12        |
| 1.4      | Der Ursprung der Kopfmuskulatur ist das kraniale Mesoderm   | 13        |
| 1.5      | Der Notch-Signalweg   | 15        |
| 1.5.1    | RBP-J und andere beteiligte Moleküle des Notch-Signalwegs   | 15        |
| 1.5.2    | Der Einfluss von RBP-J/Notch auf die Somitogenese und Myogenese   | 16        |
| 1.6      | Zielsetzung dieser Arbeit   | 17        |
| <b>2</b> | <b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b>   | <b>19</b> |
| 2.1      | Material  | 19        |
| 2.1.1    | Chemikalien und Enzyme  | 19        |
| 2.1.2    | Bakterienstämme   | 19        |
| 2.1.3    | Vektoren  | 19        |
| 2.1.4    | Antikörper  | 19        |
| 2.1.5    | Mausstämme und transgene Mauslinien   | 21        |
| 2.1.6    | Nährmedien  | 23        |
| 2.1.7    | In Situ-Sonden  | 23        |
| 2.2      | Methoden  | 23        |
| 2.2.1    | Isolierung von Desoxyribonukleinsäuren  | 23        |
| 2.2.1.1  | Präparation von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten  | 23        |
| 2.2.1.2  | Isolierung genomischer DNA aus embryonalem Gewebe und Biopsien  | 24        |
| 2.2.2    | Restriktionshydrolyse von Desoxyribonukleinsäuren, Ligation von DNA-Fragmenten und Transformation kompetenter Bakterien | 24        |
| 2.2.3    | Polymerase-Kettenreaktion (PCR)   | 24        |
| 2.2.3.1  | <u>Pax3cre-PCR:</u>   | 25        |
| 2.2.3.2  | <u>c-Met-PCR:</u>   | 25        |
| 2.2.3.3  | <u>Rosa26-PCR:</u>  | 26        |
| 2.2.3.4  | <u>RBP-J-PCR:</u>   | 26        |
| 2.2.3.5  | <u>Lbx1<sup>GFP</sup>-PCR:</u>  | 27        |
| 2.2.3.6  | <u>Hes1flox-PCR:</u>  | 27        |
| 2.2.3.7  | <u>Hes5-PCR:</u>  | 28        |
| 2.2.3.8  | <u>Lbx1cre-PCR:</u>   | 28        |
| 2.2.4    | Sequenzierung   | 29        |
| 2.2.5    | <i>In vitro</i> -Transkription  | 30        |
| 2.2.6    | Histologische Methoden  | 30        |
| 2.2.6.1  | Herstellung von Gefrierschnitten  | 30        |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 2.2.6.2    | Immunhistologie auf Gefrierschnitten  | 31        |
| 2.2.6.3    | Detektion von Zellproliferation   | 31        |
| 2.2.6.4    | Detektion von Apoptose  | 32        |
| 2.2.6.5    | $\beta$ -Galaktosidase-Färbung  | 32        |
| 2.2.6.6    | <i>In situ</i> -Hybridisierung auf Gefrierschnitten   | 32        |
| 2.2.6.7    | Lipidspezifische Färbung  | 33        |
| 2.2.6.8    | Elektronenmikroskopie   | 34        |
| 2.2.7      | Dokumentation histologischer Daten  | 35        |
| <b>3</b>   | <b>ERGEBNISSE</b>   | <b>36</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Derivate Lbx1-exprimierender Zellen in der Entwicklung der Maus</b>  | <b>36</b> |
| 3.1.1      | Testen der Rekombinationseffizienz der <i>Lbx1<sup>cre</sup>ki</i> - Mauslinie  | 37        |
| 3.1.2      | Lbx1-Derivate tragen zur Endothelbildung bei und ihre Delaminierung erfolgt unabhängig von Met  | 39        |
| 3.1.3      | Endothel-bildende Lbx1-Derivate migrieren nicht in die Zunge  | 42        |
| 3.1.4      | Met-unabhängige Migration von Endothel-bildenden Lbx1- Derivaten in die Niere   | 42        |
| 3.1.5      | Lbx1-Derivate sind nicht an der Bildung glatter Muskulatur beteiligt  | 46        |
| 3.1.6      | Die Zungenmuskulatur entwickelt sich aus Vorläuferzellen unterschiedlichen Ursprungs  | 48        |
| 3.1.7      | Gruppierende Katalogisierung Lbx1-abstammender Muskeln  | 50        |
| 3.1.8      | Verschiedene Bereiche braunen Fettgewebes finden ihren Ursprung in unterschiedlichen Kompartimenten des Dermomyotoms                              | 54        |
| <b>3.2</b> | <b>Die Funktion von RBP-J in der Entwicklung der hypaxialen und epaxialen Muskulatur</b>  | <b>57</b> |
| 3.2.1      | <i>Lbx1<sup>cre</sup></i> erzeugt konditionelle Mutagenese des <i>Rbp-j</i> -Gens in hypaxialen Muskelvorläuferzellen                             | 57        |
| 3.2.2      | RBP-J hat keinen Einfluß auf Migration von myogenen Vorläuferzellen   | 59        |
| 3.2.3      | Veränderte MyoD und Pax7-Expression in der Vorderextremität von E11 <i>Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup></i> - Mutanten                                    | 59        |
| 3.2.4      | Verfrühte und fortgeschrittene Differenzierung von Myoblasten in <i>Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup></i> - Embryonen                                      | 62        |
| 3.2.5      | Reduzierte Muskelgröße in <i>Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup></i> -Embryonen und Verlust von myogenen Vorläuferzellen                                     | 63        |
| 3.2.6      | Verlust aller Satellitenzellen in der Extremität von <i>Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup></i> -Mäusen  | 66        |
| 3.2.7      | RBP-J ist essentiell für den Erhalt von Pax3/Pax7- positiven Vorläuferzellen und für die Bildung von Satellitenzellen in der epaxialen Muskulatur | 68        |
| 3.2.8      | Der Verlust von <i>Hes1</i> in Muskelvorläuferzellen führt zu moderater Reduktion von Muskelgröße und Satellitenzellzahl                          | 69        |
| <b>4</b>   | <b>DISKUSSION</b>   | <b>71</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Die Funktion von Lbx1 in der Entwicklung der Maus</b>  | <b>71</b> |
| 4.1.1      | Die Beteiligung von Lbx1-Derivaten an der Bildung von Blutgefäßen   | 71        |
| 4.1.2      | Lbx1-Derivate bilden keine glatten Muskelzellen der Blutgefäße  | 73        |
| 4.1.3      | Der Einfluß von Notch auf die Schicksalsentscheidung von Endothel, Skelett- und glatten Muskelzellen.   | 74        |
| 4.1.4      | Lbx1-Zellen bilden braunes Fettgewebe   | 74        |
| 4.1.5      | Migration und Differenzierung von Endothelvorläuferzellen aus den Somiten erfolgen unabhängig von Met und Lbx1                                    | 75        |
| 4.1.6      | Lbx1-exprimierende Muskelvorläuferzellen beteiligen sich an der Bildung heterogener Muskeln   | 77        |
| <b>4.2</b> | <b>Die Funktion von RBP-J in der Entwicklung der hypaxialen und epaxialen Skelettmuskulatur</b>   | <b>82</b> |
| 4.2.1      | RBP-J inhibiert die Muskeldifferenzierung   | 83        |
| 4.2.2      | RBP-J ist für den Erhalt von Muskelvorläuferzellen und für die Bildung von Satellitenzellen erforderlich  | 84        |

|                          |           |
|--------------------------|-----------|
| <b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b> | <b>87</b> |
|--------------------------|-----------|

|                    |           |
|--------------------|-----------|
| <b>6 LITERATUR</b> | <b>90</b> |
|--------------------|-----------|

|                   |            |
|-------------------|------------|
| <b>DANKSAGUNG</b> | <b>103</b> |
|-------------------|------------|

## Abkürzungsverzeichnis

|              |  |
|--------------|--|
| Abb          | Abbildung  |
| bp           | Basenpaar  |
| $\beta$ -Gal | $\beta$ -Galaktosidase   |
| BCIP         | 5-Bromo-4-Chlor-3-Indolylphosphat                                |
| bHLH         | “basic Helix-Loop-Helix”   |
| BrdU         | 5-Bromo-2-Desoxyuridin   |
| BSA          | Bovine serum albumin   |
| cDNA         | komplementäre DNA  |
| Cre          | Cre-Rekombinase aus dem P1 Bakteriophagen                        |
| DEPC         | Diethylpyrocarbonat  |
| DIG          | Digoxigenin  |
| DMEM         | Dulbecco's Modified Eagle Medium                                 |
| DMF          | Dimethylformamid   |
| DMSO         | Dimethylsulfoxid   |
| DNA          | Desoxyribonukleinsäure   |
| dNTP         | Desoxyribonukleosidtriphosphat                                   |
| E            | Embryonalstadium   |
| EDTA         | Ethylendiamintetraessigsäure                                     |
| EGTA         | Ethylenglykoltetraessigsäure                                     |
| ES           | embryonale Stamm (-zellen)                                       |
| FCS          | Fetal calf serum   |
| FLPe         | Flipase (Rekombinationsenzym)                                    |
| FRT          | Flipase Erkennungssequenz  |
| g            | Gramm  |
| GFP          | Grün fluoreszierendes Protein                                    |
| h            | Stunde   |
| HS           | “Horse serum” Pferdeserum  |
| kb           | Kilobasenpaare   |
| l            | Liter  |
| loxP         | “Locus of Crossover in P1”                                       |
| LB           | Luria-Bertani medium or Lysogeny broth                           |
| LacZ         | codierende Sequenz der $\beta$ -Galaktosidase aus dem Lac Operon |
| M            | Molar  |
| mA           | Miliampere   |
| MDC          | Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin, Berlin-Buch         |
| min          | Minute   |
| ml           | Milliliter   |
| mM           | Millimolar   |
| $\mu$ M      | Mikromolar   |
| mRNA         | “messenger” Ribonukleinsäure                                     |
| NaAc         | Natriumazetat  |
| NBT          | Nitroblautetrazoliumchlorid                                      |
| NEN          | Blockinglösung   |
| <i>neo</i>   | Neomycin Resistenzgen  |

## Abkürzungsverzeichnis

---

|       |  |
|-------|--|
| NLS   | Nuclear localization signal "Kernlokalisierungssignal" |
| NP-40 | Nonidet-P40  |
| pA    | polyA  |
| PBS   | "Phosphate buffered saline"                            |
| PBX   | PBS mit 0.1% Triton X-100                              |
| PCR   | "Polymerase chain reaction"                            |
| PFA   | Paraformaldehyd  |
| PGK   | Phosphoglyceratkinase                                  |
| RNA   | Ribonucleic acid                                       |
| RNase | Ribonuclease   |
| SDS   | Sodiumdodecylsulfat                                    |
| SSC   | "Saline sodium citrate"                                |
| TAE   | Tris-Azetat-EDTA                                       |
| TE    | 10mM Tris Puffer mit 1 mM EDTA                         |
| Tris  | 2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol                |
| X-gal | 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-beta-D-Galaktopyranosid     |

# 1 Einleitung

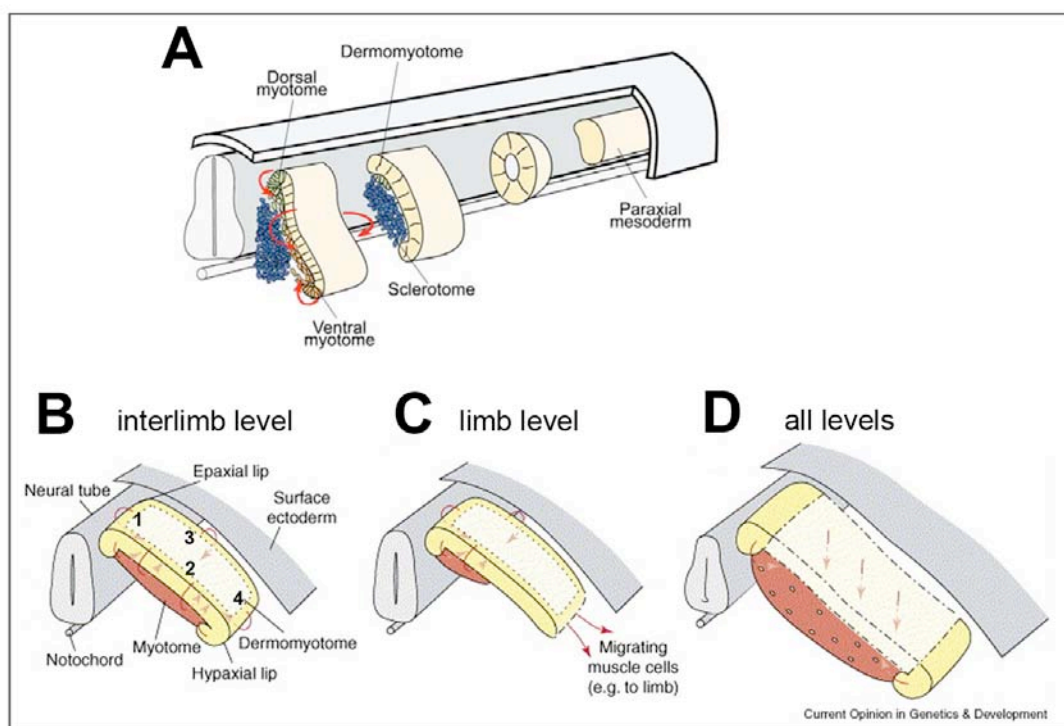
## 1.1 Die Entstehung der Skelettmuskulatur in Vertebraten

Die Skelettmuskulatur der Vertebraten wird aus den Somiten gebildet, welche als epitheliale, runde Strukturen entlang der Embryonalachse auf beiden Seiten des Neuralrohrs und des Notochords positioniert sind. Durch induktive Signale der umliegenden Gewebe entstehen die Somiten aus dem kranialen Ende des unsegmentierten, paraxialen Mesoderms, welches während der Gastrulation gebildet wird. Dadurch weist der kaudal gelegene Somite den jüngsten Entwicklungsgrad auf (Christ and Ordahl, 1995). Sie unterziehen sich sukzessiven Reifungsprozessen, die temporär einem anterior-posterioren Gradienten unterliegen (siehe Abb. 1.1A). Während der folgenden Entwicklung formen die Somiten Kompartimente und Subdomänen, aus denen unterschiedlichste Zelltypen entstehen (Christ et al., 2004; Scaal and Christ, 2004). Die ersten Kompartimente, die entstehen, sind das Sklerotom und Dermomyotom (Aoyama and Asamoto, 1988; Christ and Wilting, 1992; McMahon et al., 1998; Reshef et al., 1998). Durch eine epitheliale-mesenchymale Zellumwandlung erfolgt die Generierung der Sklerotome im ventralen Bereich der Somiten, aus denen die späteren Rippen und Wirbeln gebildet werden (Christ and Ordahl, 1995). Das dorsal gelegene Dermomyotom bewahrt unterdessen seine epitheliale Morphologie und bildet den zellulären Ursprung für die Rückenhaut und die Skelettmuskulatur. Die Spezifizierung von Muskeln im paraxialen Mesoderms wird durch Signale von Neuralrohr, Oberflächenektoderm und "Notochord-floor plate complex" (Chorda dorsalis Bodenplattenkomplex) initiiert, wie durch Transplantationsversuche im Vogelembryo gezeigt werden konnte (Borman and Yorde, 1994; Christ and Wilting, 1992; Cossu et al., 1996; Geetha-Loganathan et al., 2005; Rong et al., 1992). Verschiedene Bereiche des Dermomyotoms, welche dorsal, zentral und ventral lokalisiert sind, sind für die Bildung unterschiedlicher Muskeln verantwortlich (Denetclaw et al., 1997; Jacob et al., 1978; Kaehn et al., 1988; Kahane et al., 1998).

Die Bildung des dritten Kompartiments, epaxiales Myotom, ist ein komplexer, in drei Schritten ablaufender Prozess. Hierbei wandern Zellen vom dorsalen Bereich unter das Dermomyotom, verteilen sich bidirektional im entstehenden Myotom, beenden die Proliferation und elongieren, bis sie schließlich differenzieren (Denetclaw et al.,



1997; Kahane et al., 1998). In einen zweiten Schritt dringen Muskelvorläuferzellen vom rostralen, kaudalen und ventralen Ende des Dermomyotoms in das Myotom ein und tragen zum Muskelwachstum bei, indem sie mit schon existierenden Muskelfasern interkalieren (Abb. 1.1B). In einem dritten Schritt migrieren mitotisch aktive Muskelvorläuferzellen vom medialen Bereich des Dermomyotoms in das Myotom (Abb. 1.1D), wo sie als Ursprung für die spätere Satellitenzellpopulation verbleiben (Ben-Yair and Kalcheim, 2005; Gros et al., 2005; Kahane et al., 2001). Epaxiale Muskeln, welche die tiefe Rückenmuskulatur darstellen, entstehen aus dem so gebildeten Myotom.



**Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Somitogenese in Vertebraten** (A) Somiten segmentieren vom paraxialen Mesoderm und unterteilen sich in Sklerotom (blau) und Dermomyotom (gelb)(verändert nach Buckingham et al., 2003). (B) Zu Beginn der Myogenese (E8.0 in der Maus) delaminieren Zellen von den Enden des epithelialen Dermomyotoms. Diese Zellen (gelb) exprimieren bereits Myf5 und Mrf4 und bilden die Skelettmuskeln des frühen Myotoms (rot). Anfänglich delaminieren sie hauptsächlich vom epaxialen Ende, translozieren unter das Dermomyotom und elongieren bidirektional. Anschließend delaminieren Zellen von den übrigen Enden, erst von den kranialen und posterioren, und dann in besonderem Maße von den hypaxialen Enden. (C) Auf bestimmten axialen Ebenen delaminieren Pax-positive Zellen vom hypaxialen Ende des Dermomyotoms und migrieren, um z.B. die Muskeln der Extremitäten zu bilden. Einige dieser Zellen behalten ihren Pax-positiven Vorläufercharakter für späteres Muskelwachstum. (D) In späteren Entwicklungsstadien (E10.5 in der Maus) verliert das zentrale Dermomyotom seine epitheliale Struktur und Pax-positive Zellen (weiss) dringen in die Muskelmassen des Myotoms ein. Diese dienen als Vorläuferzellen für das nachfolgende Muskelwachstum der Rückenmuskeln (B, C, D, verändert nach Buckingham, 2006).

Die hypaxiale Skelettmuskulatur hingegen geht aus zwei verschiedenen Zellpopulationen hervor, einer migrierenden und einer nicht-migrierenden Zellpopulation, die auf verschiedenen axialen Ebenen entstehen. Die nicht migrierende Population, wird z.B. zwischen den Extremitäten gebildet. Dort elongiert das ventrale Dermomyotom als epithelialer Zellverband, delaminiert Zellen, die in das ventrale Myotom hineinwandern (siehe Abb. 1.1B), und die später die hypaxialen Interkostalmuskeln und die ventrale Thoraxmuskulatur bilden (Cinnamon et al., 1999; Denetclaw and Ordahl, 2000; Ordahl and Le Douarin, 1992).

In Somiten die sich zervikal, okzipital oder auf Höhe der Extremitätenanlagen befinden, entwickelt sich das ventrale Dermomyotom auf eine andere Weise. Durch Signale, die vom angrenzenden, lateralen Seitenplattenmesoderm und von den Extremitäten ausgehen, durchlaufen Zellen des ventro-lateralen Dermomyotoms eine epithel-mesenchymale Umwandlung und delaminieren vom Dermomyotom, um über lange Distanzen zu migrieren (siehe Abb. 1.1C). Die Zielpunkte der migrierenden, hypaxialen Vorläuferzellen sind Orte, an denen sich später Muskeln der Extremitäten, der Schultern und des Beckens, sowie des Zwerchfells, und der Zunge bilden (Chevallier et al., 1977; Christ et al., 1977).

Während der Migration behalten die Muskelvorläuferzellen ihren Vorläufercharakter, d.h. sie proliferieren und exprimieren keine Muskelspezifischen Gene. Sie differenzieren erst nach Erreichen ihres Zielorts aus, indem sie zuerst Myoblasten, und dann die langgestreckten, vielkernigen Muskelfasern bilden. Während der fötalen Entwicklung besteht ein sich entwickelndes Muskelgewebe aus verschiedenen Zelltypen: Vorläuferzellen, Myoblasten und Myotuben, wobei ein Teil der Vorläuferzellen sich erneuert, d.h. die Zellen bleiben mitotisch aktiv, und tragen in der weiteren Entwicklung zum Muskelwachstum bei (Duxson and Usson, 1989; Duxson et al., 1989; Fredette and Landmesser, 1991; Wigmore and Evans, 2002).

## **1.2 Die molekulare Kontrolle in der Entwicklung migrierender, hypaxialer Muskelvorläuferzellen**

Das Dermomyotom enthält Vorläuferzellen, die verschiedene Schicksale annehmen können. Die Entwicklung der hypaxialen Muskulatur erfolgt in mehreren Schritten

und wird auf molekularer Ebene streng kontrolliert. Die Muskelvorläuferzellen werden spezifiziert, sie delaminieren und migrieren, und differenzieren an ihren Zielorten. Diese Prozesse werden von verschiedenen Molekülen innerhalb der Vorläuferzellen, aber auch durch externe Signale der umgebenden Gewebe gesteuert. Anschließend erfolgt das Muskelwachstum, und die Etablierung einer Stammzellpopulation für regenerative Prozesse.

### **1.2.1 Die Funktion von Pax3 in der Myogenese**

Pax3, ein Säugetierhomolog des “*paired*”-Gens in *Drosophila*, kodiert für einen Transkriptionsfaktor der durch eine Paired- und eine Homöobox gekennzeichnet ist (Goulding et al., 1991). In der Maus wird *Pax3* und das eng verwandte “Paired box”-Gen *Pax7* in ähnlichen Mustern in mesodermalen und neuroektodermalen Derivaten exprimiert (Goulding et al., 1991; Kassar-Duchossoy et al., 2005; Relaix et al., 2005). Mäuse mit einer heterozygoten Mutation des *Pax3*-Gens, sogenannte “*Spotch*”-Mäuse, sind durch einen Pigmentierungsfehler charakterisiert, einem weißen Bauchfleck, der durch eine gestörte Migration von Neuralleistenzellen, die später Melanozyten bilden, zustande kommt. Homozygote *Spotch*-Embryonen haben zahlreiche neuronale Defekte, einschließlich einer Spina bifida und einer Exencephalie (Tremblay and Gruss, 1994). Zudem interferiert die *Pax3*-Mutation mit der Skelettentwicklung, die eine missgebildete Wirbelsäule, Brustkorb und Gliedmaßen zur Folge hat (Tremblay et al., 1998). Die homozygote *Pax3*-Mutation führt zur embryonalen Letalität noch vor dem Embryonaltag E16.

*Pax3* wird im unsegmentierten, paraxialen Mesoderm und im epithelialen Somiten exprimiert. Die *Pax3*-Expression wird erst auf das Dermomyotom und später auf den lateralen Bereich des Dermomyotoms beschränkt. Zellen die aus dem lateralen Dermomyotom in die Extremität auswandern behalten die Expression von *Pax3*, bis sie ihren Zielpunkt erreicht haben (Williams and Ordahl, 1994). Homozygote *Spotch*-Mäuse sind durch das Fehlen sämtlicher Extremitätenmuskeln gekennzeichnet, wodurch die Notwendigkeit der *Pax3*-Expression für die Entwicklung der migrierenden Muskelvorläuferzellen demonstriert wird (Bober et al.,

1994; Epstein et al., 1996; Franz et al., 1993; Goulding et al., 1994; Li et al., 1999; Marcelle et al., 1995; Yang et al., 1996). Ein Fehlen der migrierenden Muskelvorläuferzellen wird auch in Mäusen beobachtet, die eine Mutation im *Met*-Rezeptor tragen (Bladt et al., 1995; Dietrich et al., 1999). Durch andere Arbeiten wird *Pax3* eine Funktion als direkter Aktivator des *Met*-Gens zugeordnet (Epstein et al., 1996; Yang et al., 1996). *Met* wird ebenfalls in Muskelvorläuferzellen des lateralen Dermomyotoms exprimiert, und wird durch die Bindung seines Liganden SF/HGF aktiviert. Da in Splotch-Mäusen *Met* nicht in hypaxialen Muskelvorläuferzellen exprimiert wird, befindet sich *Pax3* in der genetischen Hierarchie höher als *Met* (siehe auch unten; (Dietrich, 1999; Epstein et al., 1996).

Auch im Abdominalbereich ist das Dermomyotom von *Pax3*-defizienten Mäusen strukturell verändert, wodurch die sich entwickelnde Rumpfmuskulatur beeinträchtigt wird. Somit ist *Pax3* auch für die Entwicklung nicht-migrierender, hypaxialer Muskeln essentiell (Bober et al., 1994; Daston et al., 1996; Goulding et al., 1994; Tremblay et al., 1998).

### 1.2.2 *Lbx1* und die Spezifizierung der hypaxialen, migrierenden Muskelvorläuferpopulation

Zellen des Dermomyotoms, die auf bestimmten axialen Ebenen als migrierende Muskelvorläuferzellpopulation spezifiziert wurden, exprimieren den Homöobox-Transkriptionsfaktor *Lbx1*. Die *Lbx1*-Expression ist in Muskelvorläuferzellen auf die migrierende Population beschränkt (Jagla et al., 1995). Das molekulare Signal, welches diese *Lbx1*-Expression kontrolliert, ist noch unbekannt.



**Abb. 1.2: *Lbx1* Expression ist beschränkt auf hypaxiale, migrierende Muskelvorläuferzellen.** Whole Mount-InSitu Hybridisierung von Muskelvorläuferzellen im E10.5 Mausembryo mit einer *Lbx1*-spezifischen Sonde. Pfeile zeigen die Migration von Muskelvorläuferzellen in die Brachialbögen und in die Vorder- und Hinterextremitäten. Eine weitere migrierende Muskelvorläuferpopulation führt zum Zwerchfell (nicht gezeigt). Größenbalken 500  $\mu\text{m}$  (adaptiert aus Birchmeier und Brohmann, 2000).

Transplantationen von Somiten in die Extremitätenebene führten zur Bildung migrierender Muskelvorläuferzellen, unabhängig vom jeweiligen Ursprung des versetzten Somiten (Chevallier et al., 1977; Lance-Jones, 1988). Demnach wird die Bildung der migrierenden Muskelvorläuferpopulation durch angrenzende, extrinsische Signale kontrolliert. Spätere Experimente zeigten jedoch, dass die Somiten bestimmter axialer Ebenen für die Expression vorselektiert sind, da eine Transplantation von Somiten aus der Extremitätenebene in die Abdominalebene die Expression von *Lbx1* nicht reprimieren konnte. Somit hängt die Spezifizierung der migrierenden Muskelvorläuferzellen auch von der axialen Identität des Somiten ab, die durch die Kombination der Hox-Gen-Expression festgelegt wird (Alvares et al., 2003).

Die Expression von *Lbx1* bleibt während der Migration der Muskelvorläuferzellen bestehen und wird erst zu Beginn der Differenzierung herunterreguliert. In *Lbx1*-defizienten Mäusen erfolgt eine korrekte Spezifizierung der migrierenden Muskelvorläuferzellen, die auch vom lateralen Dermomyotom delaminieren, jedoch nicht lateral in die Extremitäten einwandern. Einige Muskelvorläuferzellen erreichen zwar die Extremität, aber zu einem verspäteten Zeitpunkt (Brohmann et al., 2000; Gross et al., 2000; Schafer and Braun, 1999). Da Muskelvorläuferzellen in *Lbx1*-mutanten Mäusen ihr Ziel ins Zwerchfell und in die Brachialbögen finden, vermutet man, dass *Lbx1* die Expression von Genen reguliert, die für die Führungslinie dieser Zellen verantwortlich ist.

Die Untersuchung von *Plotch*-Embryonen zeigte einen Verlust der *Lbx1*-Expression in ventralen Somiten (Dietrich, 1999). Aus diesen Ergebnissen liess sich entnehmen, dass *Pax3* in der genetischen Hierarchie über der Expression von *Lbx1* steht.

### **1.2.3 Genetische Kontrolle zur Delaminierung hypaxialer Muskelvorläuferzellen durch Met und SF/HGF**

Der Tyrosinkinase-Rezeptor Met und sein Ligand "Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor" (SF/HGF) sind für die Delaminierung und Migration hypaxialer Muskelvorläuferzellen vom Dermomyotom verantwortlich. Met wird im dorso-medialen und ventralen Dermomyotom in allen Somiten während der

Embryonalentwicklung exprimiert. Im Gegensatz dazu erfolgt die Expression des Liganden SF/HGF im angrenzenden Seitenplattenmesoderm der Somiten, die migrierende Muskelvorläuferzellen entlassen (Brand-Saberi et al., 1996; Sonnenberg et al., 1993). Im Hühnerembryo erzeugt die ektopische Applikation von SF/HGF, im Bereich der Abdominalsomiten eine epithelial-mesenchymale Umwandlung und eine damit verbundene Delaminierung von Muskelvorläuferzellen aus Somiten, die in der normalen Embryonalentwicklung keine migrierenden Muskelvorläuferzellen bilden (Heymann et al., 1996). In Mäusen mit einer Deletion des *Met*- oder *SF/HGF*-Gens werden Muskelvorläuferzellen im Dermomyotom gebildet, was sich durch die Expression von *Lbx1* zeigt. Diese können sich aber nicht vom Dermomyotom ablösen und infolge dessen nicht auswandern (Bladt et al., 1995; Dietrich et al., 1999; Schmidt et al., 1995). Somit sind diese Mäuse durch das Fehlen sämtlicher Muskeln charakterisiert, die durch migrierende Zellpopulationen entstehen, d.h. Muskeln der Extremitäten, des Zwerchfells und der intrinsischen Zungenmuskulatur (Prunotto et al., 2004). Alle übrigen hypaxialen und epaxialen Muskeln sind unbeeinträchtigt von diesen Mutationen. Die homozygote Mutation von *Met* führt zudem zur frühen embryonalen Letalität (E14-E16), die vorrangig durch Entwicklungsdefekte von Leber und Plazenta verursacht wird (Schmidt et al., 1995; Uehara et al., 1995).

*Pax3* stellt einen wichtigen Regulator in der Muskelentwicklung dar. In *Pax3*-defizienten Splotch-Mäusen konnte keine Expression von *Met* im ventro-lateralen Dermomyotom detektiert werden (Daston et al., 1996; Yang et al., 1996). Diese Beobachtung korreliert mit den Ergebnissen die *Met* als direktes genetisches Zielgen von *Pax3* bestimmen (Epstein et al., 1996; Relaix et al., 2003; Yang et al., 1996).

#### **1.2.4 Migration und Proliferation von Muskelvorläuferzellen**

Die Expression von *Met*, wie auch die von *Pax3* und *Lbx1*, bleibt auch während der Migration in Muskelvorläuferzellen bestehen. Da der Ligand SF/HGF ebenfalls in der sich entwickelnden Extremität exprimiert wird, wurde dem SF/HGF eine Funktion als chemotaktischer Lockstoff zugeordnet, dem *Met* exprimierende Muskelvorläuferzellen aus dem ventralen Dermomyotom entlang seiner Spur folgen und dadurch eine frühe Musterbildung der Muskelvorläufer erzeugen (Bladt et al.,

1995; Dietrich et al., 1999; Scaal et al., 1999). Die Met Signale werden durch die Bindung von Adaptermolekülen innerhalb der Zelle weitergeleitet, die mit ihrer Src-homologen Domäne 2 (SH2-Domäne) an die Phospho-Tyrosindomäne im zytoplasmatischen Teil des aktivierten Met-Rezeptors binden. Gab1, Grb2 und Src gehören u.a. zu diesen Adaptermolekülen (Bardelli et al., 1997; Pelicci et al., 1995; Ponzetto et al., 1994). Mutationen im *Gab1*-Gen führen zu reduzierter Delaminierung und verminderter Migration von Muskelvorläuferzellen (Sachs et al., 2000). Auch der in Muskelvorläuferzellen exprimierte Chemokinrezeptor CXCR4 und sein Ligand SDF1 sind für die korrekte Migration verantwortlich. Applikation von SDF1 in die Extremität von Hühnchenembryonen dirigiert die Muskelvorläuferzellen in Richtung dieser ektopischen Quelle und inhibiert deren Differenzierung (Vasyutina et al., 2005). Zudem wurde eine genetische Interaktion zwischen CXCR4 und Gab1 gefunden.

Die Proliferation der Muskelvorläuferzellen wird durch Six1 kontrolliert. Die Proliferation ist für die Expansion der limitierten Anzahl migrierender Muskelvorläuferzellen notwendig, um genügend Ressourcen zur Muskelbildung zu Verfügung zu stellen. Im Komplex mit Eya1 und Dach aktiviert Six1 die Expression von c-Myc, einem Schlüsselmolekül der Zellzykluskontrolle. *Six1*-defiziente Mäuse zeigen eine Reduktion, *Six1;Eya1*-doppelt defiziente Mäuse gänzlich Fehlen von Extremitätenmuskeln (Li et al., 2003).

### **1.2.5 Differenzierung embryonaler Muskelvorläuferzellen und adulter Stammzellen**

Nach Beendigung ihrer Migration beginnen die hypaxialen Muskelvorläuferzellen myogene Regulationsfaktoren ("Myogenic Regulatory Factors" MRFs) zu aktivieren, die den Beginn der Differenzierung zur Skelettmuskulatur initiieren (Braun et al., 1989; Davis et al., 1987; Edmondson and Olson, 1989; Rhodes and Konieczny, 1989; Weintraub et al., 1991; Wright et al., 1989). Die MRFs gehören zur Familie der "basischen Helix-Loop-Helix"-Transkriptionsfaktoren (bHLH), und beinhalten Myf5, MyoD, Myogenin und MRF4. Mäuse mit einer Deletion des *MyoD*- oder *Myf5*-Gens zeigen keine offensichtlichen Defekte der Skelettmuskulatur (Braun et al., 1992; Rudnicki et al., 1992). Eine *Myf5;MyoD*-Doppelmutation hingegen führt zum Verlust

aller Myoblasten und den daraus entstehenden Muskelfasern. Dies zeigt, dass das Fehlen einer der beiden MRFs für die Initiierung des Differenzierungsprogramms von dem anderen MRF kompensiert werden kann. *Myogenin*-defiziente Mäuse haben keine sekundären Muskelfasern, aber normal erscheinende Myoblasten und primäre Muskelfasern (Hasty et al., 1993; Nabeshima et al., 1993; Venuti et al., 1995), was zu der Annahme führte, dass Myogenin für den Beginn der terminalen Differenzierung essentiell ist. *Mrf4*-defiziente Mäuse weisen keine markanten Muskeldefekte auf (Olson et al., 1996). In der genetischen Hierarchie der Skelettmyogenese schienen MyoD und *Mrf5* für die myogene Determinierung verantwortlich zu sein und schienen über der Expression von Myogenin und MRF4 zu stehen, die die Differenzierung und den Erhalt der Muskeln kontrollieren (Megeny and Rudnicki, 1995; Rudnicki and Jaenisch, 1995; Rudnicki et al., 1993). Im Gegensatz dazu wurde bei Untersuchungen an unterschiedlichen *Myf5*-mutanten Mäusen beobachtet, dass *Mrf4*-Expression, entgegen früherer Beobachtungen, ebenso wie *Myf5*, in der genetischen Hierarchie über MyoD steht, und in Muskelvorläuferzellen direkt myogene Differenzierung einleiten können (Kassar-Duchossoy et al., 2004). Die terminale Differenzierung von myogenen Zellen wird durch die Expression von kontraktilen Proteinen wie Desmin und "myosin heavy chain" gekennzeichnet (Sweeney et al., 1989).

Negative und positive Regulation der Myogenese wird durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst. Das markanteste Beispiel liefert die Expression von Myostatin, einem Mitglied der TGF $\beta$ -Familie, welches exzessives Muskelwachstum unterdrückt (McPherron et al., 1997), indem die Proliferation von Pax-positiven Progenitorzellen während der Embryonalentwicklung limitiert wird (Amthor et al., 2006). BMP4-Expression hält Muskelvorläuferzellen in der Extremität in einem undifferenzierten Zustand (Pourquie et al., 1996). BMP-Antagonisten wie Noggin und Chordin fördern die Differenzierung von Muskelvorläuferzellen (Amthor et al., 1999; Reshef et al., 1998; Zimmerman et al., 1996). Der Wachstumsfaktor FGF hingegen fördert die Proliferation und unterdrückt die Differenzierung der Progenitorzellen (Powell-Braxton et al., 1993).



### 1.2.6 Pax7: Generierung und Erhalt von Satellitenzellen

Satellitenzellen, die Stammzellen der adulten Muskulatur, sind charakterisiert durch ihre Position unter der Basalmembran postnataler Muskelfasern. Sie tragen effektiv zur Regeneration adulter Muskeln bei und besitzen die Fähigkeit zu Selbsterneuerung “self renewal” (Collins et al., 2005; Montarras et al., 2005). Satellitenzellen sind durch die Expression des Homöobox-Transkriptionsfaktors Pax7 charakterisiert (Seale et al., 2000), aber auch Pax3 kann in Satellitenzellen einiger Muskeln exprimiert werden (Relaix et al., 2006). Experimente an Hühnerembryonen zeigten, dass Pax3/Pax7-positive Zellen aus dem zentralen Dermomyotom das Myotom infiltrieren, wenn dieses seine epitheliale Morphologie verliert, um dort als proliferative Muskelvorläuferpopulation dem Muskelwachstum zur Verfügung zu stehen. Aus dieser Pax-positiven Population entsteht auch die Satellitenzellpopulation der prä- und postnatalen natalen Muskulatur (Gros et al., 2005; Kassam-Duchossoy et al., 2005; Relaix et al., 2005). Auch in der Extremität stammen Satellitenzellen von Pax-positiven Zellen des hypaxialen Dermomyotoms ab (Schienda et al., 2006).

Frühe Experimente ließen den Schluß zu, das die Expression von Pax7 eine essentielle Funktion in der Spezifizierung von Satellitenzellen besitzt, da in *Pax7*-defizienten Mäusen diese Zellen fehlten, und der Regenerationsprozess beeinträchtigt schien (Seale et al., 2000). In der frühen postnatalen Phase konnten jedoch Satellitenzellen auch in Abwesenheit von *Pax7* detektiert werden. Zudem schien Pax7 für Proliferation und Erhalt von Satellitenzellen verantwortlich zu sein und nicht für ihre Spezifizierung (Kuang et al., 2006; Oustanina et al., 2004). Zum Zeitpunkt der Geburt ist die Anzahl der Satellitenzellen in *Pax7*-mutanten Mäusen fast unverändert, verglichen mit Wildtyp-Tieren. Die Satellitenzellpopulation geht aber stufenweise, hauptsächlich auf Grund von Apoptose, verloren (Oustanina et al., 2004). Pax7 hat demnach eine anti-apoptotische Funktion in Satellitenzellen, für die Pax3 nicht kompensieren kann (Relaix et al., 2006). Während der Embryonalentwicklung gewährleisten Pax3 und Pax7 das Überleben von Muskelvorläuferzellen (Relaix et al., 2005).

Satellitenzellen befinden sich im Ruhezustand unter der Basalmembran der adulten Muskelfasern, bis sie durch Verletzungen aktiviert werden (Bischoff and Heintz, 1994). In der pränatalen und in der frühen postnatalen Entwicklung proliferieren Satellitenzellen, um zum Muskelwachstum beizutragen. In Folge ihrer Aktivierung

wandern sie aus und proliferieren extensiv. Die Nachkommen aktivierter Satellitenzellen, die sogenannten Myoblasten, durchlaufen mehrere Teilungen, bis der Großteil dieser Zellen Pax7 herabreguliert, Myogenin exprimiert und differenziert, indem die Zellen zu vielkernigen Muskelfasern fusionieren (Le Grand and Rudnicki, 2007). Nur eine kleine Population der Satellitenzellen hält die Pax7-Expression aufrecht und stoppt die Proliferation. Diese Pax7<sup>+</sup>;MyoD<sup>-</sup> Zellen werden als selbst-erneuernde Fraktion von Satellitenzellen postuliert (Olguin and Olwin, 2004; Zammit et al., 2004).

Mit Hilfe von *Myf5*-Reporter-mäusen konnte gezeigt werden, dass Satellitenzellen eine heterogene Mischung von Stammzellen und festgelegten Progenitorzellen ist. Stammzellen die nie *Myf5* exprimiert haben, können sich asymmetrisch in eine *Myf5*-positive, differenzierende Tochterzelle teilen und in eine *Myf5*-negative, sich selbst-erneuernde Stammzelle (Kuang et al., 2007). Die festgelegten Progenitorzellen generieren mit höherer Wahrscheinlichkeit in differenzierende Tochterzellen (Kuang et al., 2007).

### **1.3 Beteiligung der Somiten an der Angiogenese**

Die Grundstruktur der Blutgefäße (sowohl Arterien als auch Venen) besteht aus einer inneren Endothelschicht und einer äußeren, kontraktile Wand, bestehend aus Perizyten, glatten Muskelzellen und Fibrozyten. Angioblasten, die Vorläufer der Endothelzellen, finden ihren Ursprung im Eingeweidemesoderm (Splanchnic mesoderm) und ordnen sich im Zuge der frühen Vaskulogenese zu Tubuli aneinander.

Auch die Somiten stellen eine wichtige Quelle zur Bildung von Angioblasten dar (Christ, 1969; Pardanaud and Dieterlen-Lievre, 1993; Pardanaud et al., 1996; Wilting et al., 1995). Transplantationsversuche von Wachtel und Hühnchen zeigten, dass alle Kompartimente des sich entwickelnden Somiten die Kapazität besitzen Endothelzellen zu bilden (Wilting et al., 1995). Entsprechend ihrer Position im Somiten, besiedeln die Angioblasten ganz bestimmte Körperbereiche: Angioblasten des dorso-medialen Bereichs migrieren vorwiegend zur dorsalen Dermis, Angioblasten vom dorso-lateralen Ende finden ihren Weg zur ventro-lateralen

Körperwand und in die Beine (Wilting et al., 1995). Auch Chimäre, die aus einer Transplantation des präsomitischen Mesoderms von der Maus in den Vogel hervorgegangen sind, zeigten vom Transplantat abstammende Blutgefäße im Rücken, in der Kardinalvene und auch in intersomitischen Gefäßen, sowie in Blutgefäßen der Extremitäten und den Nierenanlagen (Ambler et al., 2001).

Klonanalysen und Experimente mit heterozygoten *Pax3<sup>GFP</sup>*-Mäusen zeigten eine Kontribution von Pax3 Zellen aus dem Somiten zu glatten Muskelzellen (mural smooth muscle cells) und der dorsalen Aorta (Esner et al., 2006) und zeigten desweiteren einen gemeinsamen, zellulären Ursprung glatter Muskelzellen, Skelettmuskelzellen und Endothelzellen, noch vor der Aktivierung von Pax3. Die Trennung der drei Zelllinien erfolgt im epithelialen Somiten. Antagonistische Notch-Signale drängen Progenitorzellen in die Entwicklung von glatten Muskelzellen, auf Kosten der gestreiften Muskelzellen. Ebenso werden BMP-Signalen die Entscheidung über die Entwicklung von Endothelzellen versus Skelettmuskelzellen zugesprochen (Ben-Yair and Kalcheim, 2008). Demnach vermutet man separate Progenitorzellen für Endothel- und glatte Muskelbildung, deren Entwicklung verschiedenen Signalwegen unterliegen.

### **1.3.1 Die Generierung von braunen Fettgewebe aus Myoblasten**

Im Säugetier existieren zwei Arten von Fettgewebe: braunes (brown adipose tissue BAT) und weißes (white adipose tissue WAT) Fettgewebe. Die Funktion des WAT besteht in der Speicherung von chemischer Energie in Form von z.B. Triglyceriden und in der Sezernierung von Hormonen und Zytokinen (Gesta et al., 2007). BAT hingegen ist für die Umsetzung chemischer Energie unter Erzeugung von Wärme verantwortlich (Himms-Hagen, 1990; Nicholls and Locke, 1984; Rothwell and Stock, 1979). BAT bildet sich während der fötalen Embryonalentwicklung und entsteht wesentlich früher als WAT, welches sich von der Geburt an bildet und sich stetig vergrößert. Der Anteil von BAT am gesamten Fettgewebe im adulten Tier hingegen ist stark reduziert (Lean et al., 1986). Braune Fettzellen sind durch zahlreiche, eng gepackte Mitochondrien charakterisiert, die uncoupling protein-1 (UCP-1) in der inneren Mitochondrienmembran besitzen (Klingenberg, 1999).

Kürzlich berichteten Timmons et al. (Timmons et al., 2007), dass braune Fettzellen eine “myogene Signatur” besitzen und vermuteten einen gemeinsamen mesenchymalen Ursprung mit Muskelzellen, einem Gewebe, das ebenfalls Lipide zur Energieerzeugung verbrennt. Diese These wurde anhand von “lineage tracing“-Experimenten mit *Myf5<sup>cre</sup>/Rosa<sup>YFP</sup>*-Mäusen bestätigt, welche zeigten, dass BAT aber nicht WAT aus Myf5-exprimierenden Progenitorzellen entsteht (Seale et al., 2008). Zudem zeigte sich, dass die Expression des Zink-Finger-Protein PRDM16 über die Entwicklung von Myoblasten zu braunen Fettzellen entscheidet. Eine Reduktion der PRDM16-Expression führte zu einer erhöhten Anzahl myogener Zellen, während eine Überexpression von PRDM16 zur Umwandlung von Myoblasten in braune Fettzellen führte.

Zellen des zentralen Dermomyotoms, welche den Homöobox-Transkriptionsfaktor En1 exprimieren, können die dorsale Dermis, epaxiale Muskeln und interscapuläre (dorsale), braune Fettzellen bilden (Atit et al., 2006). Das Schicksal dieser Vorläuferzellen wird zu Beispiel durch kanonische Wnt-Signale bestimmt. Wenn in En1-positiven Zellen der Wnt-Signal-Überträger  $\beta$ -Catenin mutiert ist, so kommt es zum Verlust von Dermo1-exprimierenden Vorläuferzellen des dorsalen Dermomyotoms und der Dermis. Aktivierung von  $\beta$ -Catenin hingegen induziert eine Dermo1-Expression in allen En1-positiven Zellen, was zum Verlust muskelspezifischer Gen-Expression führt (Atit et al., 2006).

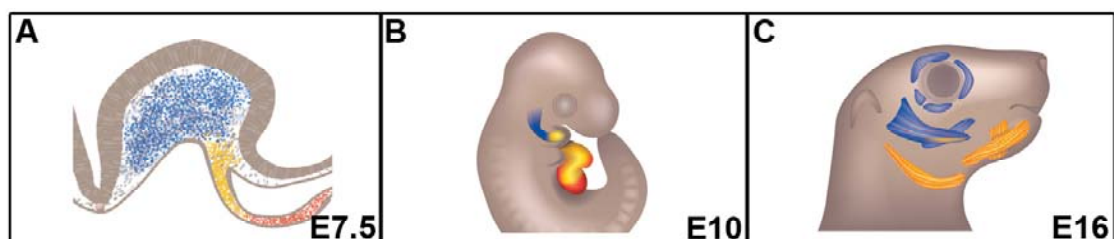
#### **1.4 Der Ursprung der Kopfmuskulatur ist das kraniale Mesoderm**

Im Gegensatz zur Skelettmuskulatur stammt die Kopfmuskulatur vom kranialen, paraxialen Mesoderm ab, welches sich anterior der Somiten befindet (Noden and Francis-West, 2006; Wachtler and Jacob, 1986) und sich beidseitig entlang des Neuralrohrs und Notochords zieht. Es unterscheidet sich vom Somiten durch fehlende Segmentierung und durch die Komposition exprimierter Gene. Gemeinsam mit kranialen Neuralleistenzellen, wandern Zellen des kranialen, paraxialen Mesoderms in die Brachialbögen ein, zwei paarige Verdickungen um den Pharynx, welche die Gesichtsstrukturen bilden (Noden, 1983; Trainor et al., 1994). Vorläuferzellen des Kopfmesoderms wandern in die Brachialbögen ein, noch bevor migrierende,

hypaxiale Muskelvorläuferzellen von den Somiten delaminieren (Psychoyos and Stern, 1996).

Kopfmuskeln werden gemäß ihrer anatomischen Position im Kopf in drei unterschiedliche Gruppen klassifiziert. Die Extraokulärmuskeln koordinieren Augenbewegung- und Rotation. Die Brachialmuskeln kontrollieren Kieferbewegung, Gesichtsausdruck, und bilden Rachen- und Kehlkopfmuskeln. Muskeln in Hals und Zunge stammen von den migrierenden Muskelvorläuferzellen der anterior gelegenen Somiten (Hammond, 1965; Hazelton, 1970; Noden and Francis-West, 2006; Tzahor, 2009).

Die Kopfmuskeln stammen von zwei unterschiedlichen, myogenen Bereichen ab, von dem kranialen, paraxialen Mesoderm (CPM) und dem epithelialen "Splanchnic" Mesoderm (SpM), welches lateral vom CPM lokalisiert ist (Nathan et al., 2008). Eine Regionalisierung beider Bereiche wird auf molekularer Expressionsebene deutlich, auch wenn keine klaren Markergrenzen zwischen CPM und SpM existieren (Tzahor, 2009). Der Großteil der vom CPM abstammenden Myoblasten tragen zum Kaumuskelkomplex bei, während die meisten SpM abstammenden Zellen die Muskeln des unteren Kieferbereichs bilden (Intermandibulärmuskeln) (Marcucio and Noden, 1999; Nathan et al., 2008; Noden et al., 1999). Isl1-positive, vom SpM abstammende Progenitorzellen, die sich in ein primäres und sekundäres Herzfeld unterteilen, sind ebenfalls für die Generierung des Herzens verantwortlich (Black, 2007; Buckingham et al., 2005; Garry and Olson, 2006; Srivastava, 2006).



**Abb.1.3: Unterschiedliche und überlappende mesodermale Bereiche bilden Herz- und Gesichtsmuskeln.** (A) Dargestellt sind die Verteilung und der Beitrag mesodermaler Kompartimente in unterschiedlichen Entwicklungsstadien des Mausembryos: kraniales, paraxiales Mesoderm (CPM, blau), mediales Eingeweidemesoderm ("splanchnic" mesoderm SpM, gelb), und laterales "Splanchnic"-Mesoderm (rot). (B) CPM und SpM Zellen tragen zu Bildung von Brachialbögen und Herz bei. Zwei Herzfelder (rot und gelb) generieren das Herz, zwei myogene Felder (gelb und blau) bilden die Kopfmuskulatur (C): CPM-Zellen (blau) und Isl1<sup>+</sup> SpM-Zellen (gelb). (verändert nach Tzahor, 2009)

Mesp1, ein zur basischen "Helix-loop-Helix"-Familie gehörender Transkriptionsfaktor, wird in mesodermalen Zellen während der frühen Gastrulation exprimiert und 7 Tage pc abrupt herabreguliert. Mit Hilfe von *Mesp1<sup>cre</sup>*-Mäusen wurde eine cre-abhängige Rekombination in Reporter-mäusen erzielt, durch die Mesp1-Derivate in Herz- und Kopfmesoderm, sowie in den vordersten Somiten markiert wurden (Dong et al., 2006; Kitajima et al., 2000; Saga et al., 1996; Saga et al., 1999). Homozygote *Mesp1*-defiziente Mäuse weisen vielseitige Anomalien in der Entwicklung des Herztubus auf (Saga et al., 1999).

## 1.5 Der Notch-Signalweg

Der Notch-Signalweg ist in der Natur hoch konserviert und übernimmt verschiedenste Funktionen in der Embryogenese und auch im adulten Zustand. Prozesse, wie der Erhalt von Vorläuferzellen, Zellschicksalsentscheidungen, Proliferation und Differenzierung in z.B. Neurogenese (de la Pompa et al., 1997; Dorsky et al., 1997; Henrique et al., 1997), Myogenese (Kopan et al., 1994; Lindsell et al., 1995; Shawber et al., 1996), oder Hämatopoese (Bigas et al., 1998; Li et al., 1998; Milner et al., 1996) werden durch Notch-Signale reguliert (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Lai, 2004; Lewis, 1998).

### 1.5.1 RBP-J und andere beteiligte Moleküle des Notch-Signalwegs

Der kanonische Notch-Signalweg wird durch die Bindung des Notch-Rezeptors (Notch1-4 im Säugetier) an seinem membranständigen Liganden (delta-like (Dll) 1,3 und 4 und Jagged 1 und 2 im Säugetier) aktiviert. Sowohl Rezeptor, als auch Ligand gehören zum Typ1 der Transmembranproteine (Logeat et al., 1998). Die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors weist EGF-ähnliche Domänen in grosser Anzahl auf, die für die Bindung des Liganden benötigt werden, während die intrazelluläre Domäne durch Ankyrin-Wiederholungen, einer PEST Domäne und mehrere Kernlokalisierungssignale charakterisiert ist (Brou, 2009). Die Affinität von Notch zu seinem Liganden wird durch unterschiedliche Glykosylierungen durch das Fringe-Protein modifiziert (Bruckner et al., 2000; Moloney et al., 2000a; Moloney et

al., 2000b). Nach der Bindung des Liganden wird der Notch-Rezeptor durch zwei aufeinander folgende, proteolytische Spaltungen aktiviert. Die erste Spaltung erfolgt extrazellulär durch Proteasen der ADAM-Familie, die zweite Abspaltung erfolgt intrazellulär durch den  $\gamma$ -Secretase-Komplex. Daraufhin transloziert die intrazelluläre Notch-Domäne “notch intracellular domain, NICD” in den Nukleus und interagiert dort direkt mit dem primären Effektor des Notch-Signals, dem Transkriptionsfaktor RBP-J (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Brou, 2009; Lai, 2004)). In Abwesenheit von Notch-Signalen befindet sich RBP-J im Komplex mit Ko-Repressoren, die aktiv die Expression von Zielgenen reprimieren (Kao et al., 1998). Die Bindung von NICD an RBP-J verdrängt die Ko-Repressoren und rekrutiert “mastermind” Ko-Aktivatoren, welche die Expression von Zielgenen initiieren. Wichtige Zielgene des Notch-Wegs sind die Hey und Hes-Gene, wie z.B. Hes1 und Hes5 (Jarriault et al., 1995; Kato et al., 1997). Zusätzlich, wurden RBP-J unabhängige Mechanismen beschrieben, die zur Notch-Signalfunktion beitragen (Shawber et al., 1996; Wilson-Rawls et al., 1999).

### **1.5.2 Der Einfluss von RBP-J/Notch auf die Somitogenese und Myogenese**

In Vertebraten wird die Segmentierung der Somiten durch eine molekulare Uhr kontrolliert, die durch oszillierende Transkription von Genen im präsomitischen Mesoderm und frühen Somiten getaktet wird. Die meisten Gene, die diesem periodisch auftretenden Prozess unterliegen, gehören dem Notch-Signalweg an (Pourquie, 1999). Zudem ist Notch schon früh im präsomitischen Mesoderm aktiv, was eine Unterteilung in anteriore und posteriore Kompartimente im späteren Somiten zur Folge hat (Hrabe de Angelis et al., 1997; Takahashi et al., 2003; Takahashi et al., 2000). Mutationen in Genen von Komponenten des Notch-Signalwegs beeinträchtigen die dynamische Expression oszillierender Gene (Pourquie, 2003; Rida et al., 2004). Null-Mutationen in *Dll1*, *Dll3*, *Notch1* und *Hes7* wiesen eine anomale, anterior-posterior-Unterteilung und inkorrekt geformte Segmentgrenzen auf (Bessho et al., 2001; Conlon et al., 1995; Hrabe de Angelis et al., 1997). Eine homozygote Deletion des *Rbp-j*-Gens, dem primären Effektor von Notch-Signalen, führte zur frühen, embryonalen Letalität, noch vor dem Embryonaltag E9.5 (Oka et al., 1995). Diese Embryonen zeigten neben schweren Wachstumsstörungen,

eine abnormale Entwicklung der Plazenta und massive Beeinträchtigungen der neuronalen Entwicklung und Somitenbildung. Auf die Morphogenese der Blastozysten und auf die Bildung der drei Keimblätter (Ektoderm, Endoderm, Mesoderm) dagegen, hat die *Rbp-j*-Deletion keinen Einfluss (Oka et al., 1995; Souilhoul et al., 2006).

Weiterhin konnte durch in vitro Versuche gezeigt werden, dass Notch-Signale die Myogenese inhibieren (Jarriault et al., 1995; Kuroda et al., 1999). RBP-J aktiviert den basischen "Helix-loop-Helix" Transkriptionsfaktor Hes1, der wiederum als Repressor für *MyoD* fungiert. Aber auch RBP-J-unabhängige Mechanismen werden als Notch-Signal-Überträger genannt (Shawber et al., 1996; Wilson-Rawls et al., 1999). Auch in der Regulation postnataler Muskelregeneration sind Notch-Signale mit einbezogen. Durch reduzierte Induktion der Delta-like1 Expression nach einer Muskelverletzung in alter Muskulatur ist die Fähigkeit der Muskulatur zur Regeneration beeinträchtigt. Ektopisch induzierte Notch-Signale wiederum stellen die regenerative Kapazität der Stammzellen, welche Aktivierung, Proliferation und Selbsterneuerung beinhalten, wieder her (Conboy et al., 2003).

## 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Zellen, die vom Somiten abstammen, wurden sowohl hinsichtlich der Position der Vorläuferzellen im Somit, als auch hinsichtlich der Position des Somiten entlang der anterioren-posterioren Achse analysiert. Die Kompartimentierung der Somiten wird durch die Expression von spezifischen Proteinen definiert. Einer dieser Faktoren, der Homöobox Transkriptionsfaktor *Lbx1*, wird im ventro-lateralen Teil des Dermomyotoms in Somiten exprimiert, die auf bestimmten, axialen Ebenen eine migrierende Population von Muskelvorläuferzellen hervorbringen.

Ziel dieser Arbeit war es, in der Maus Somitenderivate, die aus der *Lbx1*-positiven Zellpopulation entstehen, zu definieren. Der Versuchsansatz bediente sich einer genetischen Methode, des Cre/loxP-Systems, um diese Derivate zu markieren. Mit Hilfe eines Cre-Allels, das Cre unter der Kontrolle des *Lbx1*-Promotors exprimiert, wurde Rekombination in *Rosa26<sup>lacZ</sup>*-Reporterermäusen erzielt, so dass alle Derivate von



---

Lbx1-exprimierenden Zellen konstitutiv  $\beta$ -Galaktosidase exprimierten, und dadurch detektierbar wurden.

Das Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit war es, die Funktion von Notch-Signalen in der Entwicklung der Muskulatur durch konditionelle Mutagenese des *Rbp-j*-Gens zu analysieren. Da RPB-J als primärer Effektor aller Notch-Signale charakterisiert ist, sollte die Deletion eines *Rbp-j<sup>fllox/fllox</sup>*- Allels durch *Lbx1<sup>cre</sup>* die Eliminierung aller Notch-Signale in migrierenden Muskelvorläuferzellen erzielen. Eine Vielzahl von Arbeiten demonstrierten die Funktion verschiedener Notch-Signale während der Somitogenese, wobei die Funktion in der Myogenese nicht genetisch untersucht worden war. Die Wahl dieses Ansatzes ermöglichte es, die frühe embryonale Letalität zu umgehen, die mit einer konventionellen Null-Mutation von *Rbp-j* verbunden ist, und die mit einer Analyse der Myogenese in den mutanten Tieren interferiert.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Chemikalien und Enzyme**

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

#### **2.1.2 Bakterienstämme**

*Escherichia coli XL1-Blue MRF'* (Jerpseth, 1992)

#### **2.1.3 Vektoren**

pBluescript-SK II (+/-) (Sorge, 1988)

pGEM-T Easy Promega, Mannheim

#### **2.1.4 Antikörper**

Immunfluoreszenzanalysen wurden mit Hilfe der folgenden primären Antikörper durchgeführt:

| Antigen  | Wirtstier       | Verdünnung | Bezugsquelle                                   |
|--|-----------------|------------|--|
| anti-MyoD  | Kaninchen       | 1:100      | Santa Cruz Biotechnology                       |
| anti-Myf5  | Kaninchen       | 1:50       | Santa Cruz Biotechnology                       |
| anti-Laminin                                       | Kaninchen       | 1:1000     | Sigma  |
| anti-Myosin  | Maus            | 1:200      | Sigma  |
| anti-Desmin  | Kaninchen       | 1:100      | Santa Cruz Biotechnology                       |
| anti-Desmin  | Maus            | 1:200      | Sigma  |
| anti-Pax7  | Maus            | 1:10       | Hybridoma Bank, Univers. of Iowa City, IA, USA |
| anti-Hes1  | Ratte           | 1:300      | MBL, Woburn, MA                                |
| anti-PECAM   | Ratte           | 1:500      | PharMingen                                     |
| anti- $\alpha$ -smooth muscle actin FITC-gekoppelt | Maus            | 1:400      | Sigma  |
| anti-Cre   | Kaninchen       | 1:10000    | Novagen, USA                                   |
| anti-BrdU  | Ratte           | 1:200      | Abcam, UK                                      |
| anti-HoxB7   | Meerschweinchen | 1:3000     | Dinko Blazevizc, AG Carmen Birchmeier          |
| anti-Pax3  | Ratte           | 1:250      | AG Carmen Birchmeier                           |
| anti-Pax3  | Ratte           | 1:500      | M. Goulding, Salk Institute, La Jolla, CA      |
| anti-Lbx1  | Meerschweinchen | 1:10000    | (Muller et al., 2002)<br>AG Carmen Birchmeier  |
| anti- $\beta$ -Gal                                 | Kaninchen       | 1:10000    | CAPPEL   |
| anti- $\beta$ -Gal                                 | Ziege           | 1:1000     | Biogenesis                                     |
| Anti-Myogenin                                      | Kaninchen       | 1:200      | Santa Cruz Biotechnology                       |

Zur Steigerung der Signalintensität der Hes1 Antikörperfärbung wurde das Cy3-TSA Fluorescence System (PerkinElmer Life Sciences, Wellesley, MA) verwendet. SYBR green I (Molecular Probes, Eugene, OR) wurde für eine nukleäre Färbung eingesetzt.

Die verwendeten sekundären Antikörper (Dianova) sind mit Cy2, Cy3 oder Cy5 Fluoreszenz gekoppelt und werden in gelöster Form in 50% Glycerin mit einer Konzentration von 0.5 mg/ml routinemäßig in einer Verdünnung von 1:500 verwendet.

### 2.1.5 Mausstämme und transgene Mauslinien

Wildtyp Mausstämme:

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

*Lbx<sup>Cre</sup>*ki17-Mäuse:

(Dr. Hagen Wende, AG Carmen Birchmeier, MDC, Berlin) Die *Lbx1<sup>Cre</sup>* Mutation wurde durch homologe Rekombination in ES Zellen eingeführt. Die kodierende Sequenz der Cre-Rekombinase, sowie eine neomycin Kassetten mit flankierenden Frt Sequenzen, wurden an das ATG Startkodons von Exon 1 des Lbx1-Gens fusioniert. Die neo Kassetten wurde durch Verpaarung von *Lbx1<sup>CreNeo</sup>* mit der FLPe deleter Mauslinie entfernt (Sieber et al., 2007). Eine transgene Mauslinie (TG) wurde durch Pronukleus-Injektion des *Lbx1<sup>Cre</sup>*-Konstruktes generiert.

*Lbx1<sup>GFP</sup>*-Mäuse:

(Dr. Elena Vasyutina, AG Carmen Birchmeier, MDC, Berlin) In der *Lbx1<sup>GFP</sup>*-Maus wurde das Exon1 des Lbx1-Gens durch *GAP43-GFP* ersetzt, zusätzlich wurde eine Leserastermutation in das zweite Exon eingefügt. Eine Neomycin und Thymidin (tk) Kassetten wurde im Zielvektor zur Positiv- und Negativ-Selektion eingefügt, die nach transienter Cre-Expression in ES Zellen wieder entfernt wurden (Vasyutina et al., 2005).

*Pax3<sup>Cre</sup>*-Mäuse:

(Jonathan A. Epstein, University of Pennsylvania, Philadelphia): Die Pax3cre-knockin-Mauslinie wurde durch homologe Rekombination in ES Zellen generiert. Die kodierende Sequenz der Cre-Rekombinase und eine loxP flankierte PGK-neo Kassetten wurden in das erste Exon des Pax3 Gens inseriert und ersetzen somit die Pax3 kodierende Sequenz einschließlich des ATG Startkodons. Nach Durchlaufen der männlichen Keimbahn wurde die PKG-neo Kassetten aus dem gerichteten Locus entfernt (Engleka et al., 2005).

*Rbp-j<sup>lox/lox</sup>*-Mäuse:

(Tasaku Honjo, Kyoto University, Kyoto): im konditionalen *Rbp-j*-Allel flankieren loxP-Sequenzen das Exon 6 und 7 des *Rbp-j*-Lokus. ES Zellen mit loxP-flankiertem *Rbp-j*-Lokus wurden zur Herstellung chimärer Mäuse verwendet (Tanigaki et al., 2002).

*Rosa26R*-Mäuse:

(Philippe M. Soriano, Mt. Sinai School of Medicine, New York): diese *LacZ*-Reporter Mauslinie trägt unter dem konstitutiv aktiven *Rosa26*-Promotor einen Splice Akzeptor (SA), eine neomycin Kasette, die von loxP-Sequenzen flankiert wird und ein *LacZ*-Gen mit Polyadenylierung p(A). Eine dreifache Polyadenylierungssequenz wurde zusätzlich an das 3'-Ende der neo-Kasette fusioniert, um einen Transkriptionsabbruch zu garantieren (Soriano, 1999).

*Mesp1<sup>cre</sup>*-Mäuse:

(Yumiko Saga, National Institute of Genetics, Mishima, Japan). Das *Mesp1*-Gen wurde durch die kodierende Region der *Cre-Rekombinase* und einer *PKG-neo* Kasette ersetzt (Saga et al., 1999).

*Met<sup>-/-</sup>*-Mäuse:

(AG Carmen Birchmeier, MDC, Berlin) Der Zielvektor zur Mutation des *Met*-Gens ersetzt 2 kb der genomischen DNA, welches das Kodon mit dem invarianten Lysinrest einschließt, der essentiell für die Kinaseaktivität ist (Bladt et al., 1995).

*Hes1<sup>lox/lox</sup>*-Mäuse:

(Thomas Wunderlich, AG Jens Brüning Uni-Köln) Eine *Neomycin*-Kasette, Splice Akzeptor (SA) und *LacZ*-Gen wurden 3' des *Hes1*-Gens inseriert. *LoxP*-Sequenzen wurden 5' von Exon 2, und 3' der *Neomycin*-Kasette inseriert. Cre-vermittelte Rekombination führt zu Deletion von Exon2-6 und der *Neomycin*-Kasette und zur

Aktivierung des *LacZ*-Gens. *Hes1<sup>ΔΔ</sup>*-Mäuse erhält man durch Verpaarung der *Hes1<sup>fllox/fllox</sup>*-Mäuse mit *FLP deleter*-Mäusen.

*Hes5<sup>neo</sup>*-Mäuse:

(François Guillemot, NIMR, London) Im Targeting Vektor ersetzte eine *PKGneo*-Kassette Exon1 und 2 des *Hes5*-Gens, eine *PKG-TK*-Kassette wurde 3' des *Hes5*-Lokus inseriert. Homologe Rekombination in ES Zellen führte zum Verlust der *TK*-Kassette (Cau et al., 2000).

### 2.1.6 Nährmedien

Medien und Platten für Anzucht und Kultivierung der *Escherichia coli*-Stämme wurden gemäß Standard-Protokollen verwendet (Sambrook, 2001). Die Konzentration von Ampicillin in Agar und Medien betrug 100 µg/ml.

### 2.1.7 In Situ-Sonden

FoxD1            Dr. Schmidt-Ott, MDC, Berlin (Batourina et al., 2001).

Hes5             Dr. Hendrik Wildner, NIMR London

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Isolierung von Desoxyribonukleinsäuren

#### 2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten

Die Mini-Präparation von Plasmid-DNA erfolgte durch Alkalische Lyse (Birnboim and Doly, 1979). In größerem Maßstab wurde die Isolierung mit dem Plasmid-Maxi-Präparations-Kit der Firma Invitrogen durchgeführt. Die präparative Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Elektroelution (nach (McDonnell et al., 1977)) bzw. mit Hilfe des „NucleoSpin Extract II“-Kit (Macherey- Nagel; (Vogelstein and Gillespie, 1979)).

### **2.2.1.2 Isolierung genomischer DNA aus embryonalem Gewebe und Biopsien**

Die Isolierung genomischer DNA aus embryonalem Gewebe und Biopsien für PCR-Analysen erfolgte aus Gewebestücken frisch präparierter Embryonen und Ohrloch- oder Schwanzbiopsien von Mäusen. Die Gewebestücke wurden über Nacht in 50µl Ohr- /Schwanz-Lyse-Puffer (100 mM Tris pH 8,5, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,2 % SDS, 100 µg/ml Proteinase K) bei 55°C verdaut. Darauf erfolgte die Inaktivierung der Proteinase K für 10 min bei 95°C. Nach Zugabe von 300µl H<sub>2</sub>O wurde je 1µl dieser verdünnten Lösung für die Genotypisierung in einer PCR-Reaktion eingesetzt.

### **2.2.2 Restriktionshydrolyse von Desoxyribonukleinsäuren, Ligation von DNA-Fragmenten und Transformation kompetenter Bakterien**

Restriktionshydrolysen von Plasmid-DNA wurden mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen gemäß Standardmethoden durchgeführt (Kimmel and Berger, 1987; Sambrook, 2001). Bei der Ligation von DNA-Fragmenten wurden in der Regel 50ng Vektor-DNA und ein etwa dreifacher molarer Überschuss an Fragment-DNA eingesetzt. Die Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien erfolgte nach (Inoue, 1990).

### **2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al., 1985) wurde zur Genotypisierung von präparierten Maus-Embryonen bzw. Jungtieren aus der Nachzucht eingesetzt, sowie zur Klonierung verschiedener plasmidbasierter Konstrukte. Die Etablierung der verwendeten PCR-Programme erfolgte dabei in Anlehnung an Standard-PCR-Methoden (Innis, 1989). Nachfolgend sind die verwendeten Genotypisierungs-PCR-Programme inklusive der eingesetzten Primer und MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen angegeben:

## 2.2.3.1 Pax3cre-PCR:

a) MgCl<sub>2</sub>-Konzentration: 2 mM

b) Primer:

Pax3 fwd 5' -CTG CAC TCG GTG TCA CG- 3'

Pax3 rev 5' -AAG CGA GCA CAG TGC GGC- 3'

Cre 5 rev 5' -GAA ACA GCA TTG CTG TCA CTT GGT CGT GGC- 3'

c) Programm

|      |        |       |
|------|--------|-------|
| 94C° | 5 min. |       |
| 94C° | 1 min. | } 35X |
| 65C° | 1 min. |       |
| 72C° | 1 min. |       |
| 72C° | 5 min. |       |
| 4C°  | ∞      |       |

## 2.2.3.2 c-Met-PCR:

a) MgCl<sub>2</sub>-Konzentration mutant-PCR: 4 mMMgCl<sub>2</sub>-Konzentration WT-PCR: 2 mM

b) Mutante-Primer:

Neo1L 5' -CTT GCG TGC AAT CCA TCT TGT TCA ATG- 3'

Wmet5 5' -CAC TGA GCC CAG AAG AGC TAG TGG- 3'

Wildtyp-Primer:

met WT1 5' - ATA GGG CAT TTT GGC TGT GTC -3'

met WT2 5' - TAG TAG TGT CTC TGG GCA AAA TGA -3'

c) Mutante-Programm:

|      |         |       |
|------|---------|-------|
| 95C° | 45 sek. | } 35X |
| 70C° | 30 sek. |       |
| 72C° | 1 min.  |       |
| 4C°  | ∞       |       |



## Wildtyp-Programm:

|      |         |   |     |
|------|---------|---|-----|
| 95C° | 2 min.  | } | 40X |
| 96C° | 40 sek. |   |     |
| 65C° | 45 sek. |   |     |
| 72C° | 1 min.  |   |     |
| 72C° | 5 min.  |   |     |
| 4C°  | ∞       |   |     |

d) Produktlänge Mutante: 546 bp

Produktlänge Wildtyp: 773 bp

2.2.3.3 Rosa26-PCR:

a) MgCl<sub>2</sub>-Konzentration: 2 mM

b) Mutante-Primer:

R1295 5' -GCG AAG AGT TTG TCC TCA ACC-3'

R26F2 5' -AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT-3'

c) Programm:

|      |         |   |     |
|------|---------|---|-----|
| 94C° | 5 min.  | } | 36X |
| 94C° | 30 sek. |   |     |
| 60C° | 30 sek. |   |     |
| 72C° | 1 min.  |   |     |
| 72C° | 5 min.  |   |     |
| 4C°  | ∞       |   |     |

2.2.3.4 RBP-J-PCR:

a) MgCl<sub>2</sub>-Konzentration: 2 mM

b) Wildtyp-Primer:

RBP-J WT1 5'-GTTCTTAACCTGTTGGTCGGAACC-3'

RBP-J WT2 5'-GCTTGAGGCTTGATGTTCTGTATTGC-3'

Mutante-Primer:

RBP-J WT2 5'-GCTTGAGGCTTGATGTTCTGTATTGC-3'

RBP-J Neo4 5'-GCAGCGCATCGCCTTCTATC-3'

c) Programm:

|      |         |   |     |
|------|---------|---|-----|
| 94C° | 5 min.  | } | 35X |
| 94C° | 30 sek. |   |     |
| 60C° | 30 sek. |   |     |
| 72C° | 1 min.  |   |     |
| 72C° | 5 min.  |   |     |
| 4C°  | ∞       |   |     |

- d) Produktlänge Mutante: 600 bp  
 Produktlänge Wildtyp: 500 bp

#### 2.2.3.5 Lbx1<sup>GFP</sup>-PCR:

- a) MgCl<sub>2</sub>-Konzentration: 1,5 mM

- b) Primer:

GFP4 5' –GAT GCC CTT CAG CTC GAT GCG GTT CAC- 3'

GFP5 5' –CAA AGG AGG CCG CCA TGG TGT GCT GT- 3'

- c) Programm:

|      |          |   |     |
|------|----------|---|-----|
| 95C° | 2.5 min. | } | 40X |
| 95C° | 30 sek.  |   |     |
| 62C° | 30 sek.  |   |     |
| 72C° | 40 sek.  |   |     |
| 4C°  | ∞        |   |     |

- d) Produktlänge: 463 bp

#### 2.2.3.6 Hes1 flox-PCR:

- a) MgCl<sub>2</sub>-Konzentration: 1,8 mM

- b) Primer:

5Heslox 5' –CGA CAC CGG ACA AAC CAA AGA- 3'

3Heslox 5' –TAT TCT TGC CCT TCG CCT CTT C- 3'

LACrev1 5' –ATG TGC TGC AAG GCG ATT AAG TT- 3'

c) Programm:

|      |          |   |     |
|------|----------|---|-----|
| 94C° | 3 min.   | } | 36X |
| 94C° | 45 sek.  |   |     |
| 54C° | 45 sek.  |   |     |
| 72C° | 1,5 min. |   |     |
| 72C° | 10 min.  |   |     |
| 15C° | ∞        |   |     |

d) Produktlänge WildTyp: 200 bp

Produktlänge gefloxt: 300 bp

Produktlänge Δ nach Rekombination: 450 bp

### 2.2.3.7 Hes5-PCR:

a) MgCl<sub>2</sub>-Konzentration: 2mM

b) Mutante Primer:

Hes5L 5' -GCT GGG GGC CGC TGG AAG TGG- 3'

Hes5 neo4 5' -GCA GCG CAT CGC CTT CTA TC- 3'

Wildtyp Primer:

Hes5L 5' -GCT GGG GGC CGC TGG AAG TGG- 3'

Hes5U 5' -CCG CTC CGC TCC GCT CGC TAA- 3'

c) Programm:

|      |         |   |     |
|------|---------|---|-----|
| 95C° | 10 min. | } | 35X |
| 94C° | 1 min.  |   |     |
| 62C° | 1 min.  |   |     |
| 72C° | 1 min.  |   |     |
| 4C°  | ∞       |   |     |

### 2.2.3.8 Lbx1cre-PCR:

a) MgCl<sub>2</sub>-Konzentration: 3.5 mM

b) Primer:

Lbx1cre\_Type\_5'upper 5' –CGC CTT CCT CTC GCA CCG TC- 3'

Lbx1cre\_Type\_5'lower 5' –GGC AGC CCG GAC CGA C- 3'

oder

Lbx1cre\_Type\_3'upper 5' –GAT GCG GTG GGC TCT ATG GC- 3'

Lbx1cre\_Type\_3'lower 5' –ACA CTG CGT GTG GGC GAC T- 3'

c) Programm:

|      |         |   |     |
|------|---------|---|-----|
| 94C° | 4 min.  | } | 35X |
| 95C° | 20 sek. |   |     |
| 60C° | 20 sek. |   |     |
| 72C° | 40 sek. |   |     |
| 4C°  | ∞       |   |     |

### 2.2.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde vor allem zur Verifizierung von klonierten und PCR-amplifizierten Sequenzen angewandt. Sequenzierungen erfolgten nach dem Kettenabbruchverfahren (Sanger et al., 1977); modifiziert von (Tabor and Richardson, 1987) mit dem „Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing“-Kit der Firma Amersham. Neben fluoreszenzmarkierten, sequenzspezifischen Primern kamen Standard-Sequenzier-Oligonukleotide (MWG-Biotech) bei der PCR in folgendem Sequenzier-Programm zum Einsatz:

|            |       |   |     |
|------------|-------|---|-----|
| 95°C 3 min |       | } | 30x |
| 95°C       | 35 s  |   |     |
| 53°C       | 35 s  |   |     |
| 70°C       | 1 min |   |     |
| 95°C 3 min |       |   |     |

Die Reaktionen wurden auf 6 % Sequagel XR-Sequenziergelen (Biozym) in 1x TBE Laufpuffer in einem Li-Cor-Sequenzierautomaten (Model 4200, MWG-Biotech) mit den Laufparametern 1500 V, 37 mA, 50 W, 50°C analysiert.

### **2.2.5 *In vitro*-Transkription**

Synthese von Digoxigenin-markierten *in vitro*-Transkripten. Zunächst wurde die Plasmid-Matrize zur Transkriptbegrenzung mittels Restriktionshydrolyse linearisiert und danach Phenol/Chloroform-extrahiert, gefällt, gewaschen, getrocknet und in H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Synthese des *in vitro*-Transkripts fand in folgendem Ansatz für 1,5 h bei 37°C statt:

- 1µl linearisierte Plasmid-DNA (1 µg/µl)
- 2µl 10x Transkriptionspuffer (Roche)
- 2µl DIG-Labeling-Mix (Roche)
- 0,5µl RNase-Inhibitor (40U/µl, Invitrogen)
- 13,5µl DEPC-H<sub>2</sub>O
- 1µl RNA-Polymerase (20U/µl, Roche)

Das Transkript wurde entweder durch Lithiumchlorid-Fällung oder durch Verwendung des „RNeasy Cleanup“-Kits (Qiagen) aufgereinigt und in 100µl 50% Formamid/50% H<sub>2</sub>O aufgenommen.

## **2.2.6 Histologische Methoden**

### **2.2.6.1 Herstellung von Gefrierschnitten**

Präparierte Embryonen wurden in PBS gespült und anschließend in 4% PFA (in 100mM NaPO<sub>4</sub>) für eine bis maximal drei Stunden fixiert.

Das Einfrieren erfolgte in „Tissue-Tek“ (= „OCT-Compound“, Sakura) in einer Einbettform („Peel-A-Way“, Thermo Scientific) auf einer Alkohol/Trockeneis-Mischung. Immunhistologische Färbungen oder *in situ*-Hybridisierungen wurden auf Gefrierschnitten durchgeführt. Für die *in situ*-Hybridisierung auf Gefrierschnitten wurden präparierte Embryonen auch unfixiert direkt nach Spülen in PBS in „Tissue-Tek“ eingefroren. In Abhängigkeit von Gewebeart bzw. dem Embryonalstadium wurden Schnitte im Kryostaten (Microm HM560, Walldorf) bei einer Blocktemperatur zwischen -10°C und -15°C angefertigt, wobei die Schnittdicke bei 10-20µm lag. Die Schnitte wurden auf Adhäsions-Objektträger (Histobond,

Marienfeld) aufgezogen, bei 37°C getrocknet und dann feuchtigkeitsgeschützt bei -80°C eingefroren. Wie auch die gefrorenen Präparate konnten die Schnitte über mehrere Wochen bei -80°C aufbewahrt werden.

### **2.2.6.2 Immunhistologie auf Gefrierschnitten**

Die Gefrierschnitte wurden für 1h bei RT in 1% Pferdeserum/PBX (PBS mit 1% TritonX-100) oder in NEN-Puffer (10% Pferdeserum, 0,5% Blocking Reagent (Roche), 0,1% TritonX-100) blockiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in Blockierungslösung über Nacht bei 4°C. Hierauf wurden die Schnitte dreimal für je 10min. mit 1% Pferdeserum/PBX gewaschen und dann für 1h mit dem sekundären Antikörper in Blockierungslösung bei RT inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in 1% Pferdeserum/PBX, zur Reduktion des unspezifischen Hintergrunds, wurden die Schnitte mit „Immu-Mount“ (Thermo Scientific) eingedeckelt.

### **2.2.6.3 Detektion von Zellproliferation**

Die Quantifizierung mitotisch aktiver Zellkerne erfolgte auf Gewebeschnitten durch mikroskopische Inspektion (siehe 2.2.7). Um die Anzahl von proliferierenden Vorläuferzellen zu bestimmen, die innerhalb von 24 Stunden zu Myoblasten determiniert wurden, wurde BrdU (= 5-Brom-2'-desoxy-Uridin) intraperitoneal in schwangere Maus-Weibchen injiziert (75µg/g Körpergewicht in 0,9% NaCl) und die Embryonen 24 Stunden später präpariert. Um die Anzahl mitotisch aktiver Progenitorzellen und Myoblasten zu bestimmen, wurde BrdU (= 5-Brom-2'-desoxy-Uridin) intraperitoneal in schwangere Maus-Weibchen injiziert (75µg/g Körpergewicht in 0,9% NaCl) und die Embryonen 1 Stunde später präpariert. Das BrdU, welches als Thymidin-Analogon nur in die DNA von Zellen inkorporiert wird, die sich in der S-Phase befinden, wurde immunhistologisch auf Embryonalschnitten mit einem anti-BrdU-Antikörper aus der Maus (Sigma) nachgewiesen und mit immunhistologischen Färbungen mit Antikörpern gegen muskel-spezifische Proteine kombiniert.

### 2.2.6.4 Detektion von Apoptose

Die Detektion von Apoptosen auf Kryoschnitten erfolgte mittels TUNEL-Färbung (Gavrieli et al., 1992). Während des TUNEL-assays werden "blunt end" DNA-Doppelstrangbrüche enzymatisch mit Fluorescein markiert. Dies erfolgt mit Hilfe des „Apop Taq, Fluorescein *in situ* Apoptosis Detection Kits“ nach den Angaben des Herstellers (Chemicon International, Billerica, MA, USA).

### 2.2.6.5 $\beta$ -Galaktosidase-Färbung

Der  $\beta$ -Galaktosidase-Nachweis wurde sowohl auf Gefrierschnitten (Hogan, 1994), als auch als Whole Mount-Färbung angewendet. Die Kryotomschnitte wurden in 0,2% Glutaraldehyd für 10 min. auf Eis postfixiert, dreimal mit PBS/20mM MgCl<sub>2</sub> gespült und dann in Detergenz-Lösung (0,1M Phosphat-Puffer pH 7,3, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% Natriumdesoxycholat, 0,02% Nonidet P-40) für 10min. inkubiert. Danach schloß sich die Färbung für 2-3h bei 37°C oder RT an (Detergenz-Lösung mit 1mg/ml X-Gal, 5mM Kaliumferricyanid, 5mM Kaliumferrocyanid). Abschließend wurden die Schnitte in PBS gewaschen, kurz in dH<sub>2</sub>O gespült, wenn notwendig gegengefärbt und eingedeckelt. Für die Färbung intakter Embryonen (Sham et al. 1993) wurden die Embryonen zunächst je nach Alter (E9,5-E12,5) für 10-30 min. in einer Lösung aus 1% PFA/0,2% Glutaraldehyd, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM EGTA in PBS bei 4°C fixiert. Darauf folgte ein dreimaliges Waschen unter Schütteln in PBS/0,2% Nonidet P-40 bei 4°C und schließlich die Färbung (5mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 5mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% Natriumdesoxycholat, 1mg/ml X-Gal in PBS) bei 37°C oder bei RT über Nacht. Die Färbung wurde durch Waschen mit 0,1% PBT abgestoppt, die Embryonen mit 4% PFA/PBS postfixiert und in PBS aufbewahrt.

### 2.2.6.6 *In situ*-Hybridisierung auf Gefrierschnitten

Die Gefrierschnitte wurden, je nach Art des Gewebes, für 10 bis 30 min. mit 4% PFA bei RT fixiert, dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für 10 min in Acetylierungs-Lösung (4ml Triethanolamin, 500 $\mu$ l konz. HCl, 750 $\mu$ l Essigsäureanhydrid in 250 $\mu$ l H<sub>2</sub>O) acetyliert. Nach erneutem dreimaligen Waschen in

PBS erfolgte die Prähybridisierung in Hybridisierungspuffer (50% entionisiertes Formamid, 5x Denhardts, 5x SSC, 150µg/ml denaturierte Lachsspermien-DNA, 150µg/ml Hefe-tRNA) für 2 h bei RT. Deckgläser wurden durch „Sigmacote“ (Antihafsilan, Sigma) silanisiert und anschließend zweimal kurz in 100% Ethanol gespült. Vor Beginn der Hybridisierung wurde die DIG-markierte Sonde (siehe 2.2.5) für 5 min bei 80°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und auf etwa 100-200ng/150µl in Hybridisierungspuffer verdünnt. Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 70°C in einer Feuchtkammer mit einem Kammerpuffer aus 50% Formamid und 5x SSC durchgeführt. Darauf wurden die Deckgläser durch 5 min Waschen in 5x SSC bei RT abgeschwemmt und die Präparate in 0,2x SSC bei 70°C für 60 min. gewaschen. Nach erneutem kurzem Waschen in 0,2x SSC bei RT wurden die Objektträger in B1-Puffer (0,1M Tris pH 7,5, 0,15M NaCl) überführt und 5 min. inkubiert. Es folgte ein Blockierungsschritt mit 10% Ziegen Serum in B1-Puffer für 60 min. Die Inkubation mit dem anti-DIG-Antikörper (in 10% Ziegen Serum/B1) erfolgte über Nacht bei 4°C. Danach wurden die Objektträger dreifach für je 10 min mit B1-Puffer gewaschen und kurz in NTMT (0,1M Tris pH 9,5, 0,1M NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Tween-20) inkubiert, bevor sie in die Färbelösung (3,5µl NBT und BCIP/1ml NTMT) transferiert wurden. Die Farbreaktion erfolgte bei 4-37°C und wurde durch Waschen in H<sub>2</sub>O gestoppt. Anschließend wurden die Präparate mit „Immu-Mount“ eingedeckelt.

### 2.2.6.7 Lipidspezifische Färbung

Die Färbemethode mit Öl-löslichen Farbstoffen basiert auf der hohen Löslichkeit und Absorptionfähigkeit von Fettfarbstoffen wie Oil Red O (Sigma), durch hydrophobe, ungesättigte Triglyceride, Cholesterolester und Fettsäuren. Die Färbung von hydrophoben Lipiden durch lipidlösliche Farbstoffe ereignet sich nur, wenn Lipide sich nahe ihres Schmelzpunktes befinden, daher steigert sich die Färbeintensität mit zunehmender Färbetemperatur. Oil Red O wurde in 100%-igem 1,2-Propanediol anfänglich in kleinem, dann in sukzessiv ansteigendem Volumen, zu einer 0.5% Lösung gelöst. Das Lösen erfolgte unter ständigem Rühren und durch langsames Erhitzen der Lösung bis auf 95-100°C. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Oil Red O Lösung durch ein Whatman Papierfilter filtriert und anschließend bei 60°C gelagert. Kryogewebeschnitte wurde nach 30 min. Trocknen



für 5-10 min. in eiskaltem 10%-igen Formalin fixiert, drei mal in destilliertem H<sub>2</sub>O gewaschen, und 2-3 min. an der Luft getrocknet. Darauf folgend wurden die Schnitte in 100%-igem 1,2-Propanediol für 5 min. vorinkubiert, und anschließend in vorgewärmter Oil Red O Färbelösung bei 60C° im Ofen für 10-20 min gefärbt. Unspezifische Färbung wurde erst durch 5-minütige Inkubation in 85%-igem 1,2-Propanediol, dann in destillierten H<sub>2</sub>O entfernt. Anschließend wurden die Präparate mit „Immu-Mount“ (Shandon, Frankfurt) eingedeckelt.

### **2.2.6.8 Elektronenmikroskopie**

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Extremitätenmuskulatur von E18 Embryonen wurden von Dr. Bettina Erdmann (MDC, Berlin) durchgeführt.

Für die Vorbehandlung des Gewebes wurden E18 Embryonen mit 4% PFA perfundiert und anschließend über Nacht weiterhin in 2.5% Glutaraldehyd postfixiert. Darauf folgten zwei Waschstreite von 30 min. in frisch angesetztem 0,1M Phosphatpuffer (0,2M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O für 0,2M Phosphatpuffer). Anschließend erfolgte die Osmierung des Gewebes mit 1% Osmiumtetroxid (OsO<sub>4</sub>) in 0,1M Phosphatpuffer, pH 7,5 für drei Stunden bei Raumtemperatur. Dadurch wurde das Gewebe stabilisiert und gleichzeitig das Gewebes durch einen Osmiumdioxid-Niederschlags gefärbt, der eine hohe sekundäre Elektronenemission kreierte. Nach erneuten, zweimaligen Waschen mit 0,1M Phosphatpuffer für jeweils 30 min., erfolgte eine Entwässerung der Gewebeproben in einer aufsteigenden Alkoholreihe: 15 min. 30% Ethanol bei 4C°; 2 x 30 min. 50% Ethanol bei 4C°; 70% Ethanol bei 4C° über Nacht; 30 min. 70% Ethanol 4C°; 2 x 30 min. 90% Ethanol bei 4C°; 2 x 30 min. 100% Ethanol bei 4C°. Danach erfolgte die Inkubation in Propylenoxid 2x 30 min. bei Raumtemperatur, dann je 2x 30 min. in einen Propylenoxid/Epon-Gemisch im Verhältnis 1:1 und 1:2. Daraufhin wurde das Gewebe in reinem Epon (Poly/Bed 812 (Polysciences, Warrington, PA) DDSA, NMA, DmP-30) über Nacht inkubiert und schließlich in Flacheinbettungen in frischem Epon eingebettet, welches bei 60C° polymerisiert.

### **2.2.7 Dokumentation histologischer Daten**

Die Dokumentation histologischer Daten erfolgte mittels Licht- oder Fluoreszenzmikroskopie. Die Lichtmikroskopie und die Fluoreszenzmikroskopie von großen, immunhistologisch gefärbten Schnitten erfolgte an einem inversen, digitalen Mikroskop (Keyence). Whole Mount Aufnahmen wurden an einem binokulären Stereomikroskop (Leica) durchgeführt, ausgestattet mit Kamera (AxioCam HRc, Zeiss) und der Axiovision AC Software Version 4.5 (Zeiss). Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte an einem *Laser-Scanning*-Mikroskop (LSM 5 Pascal, Zeiss) mit der LSM 5 Pascal Software Version 3.2 (Zeiss).

### 3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil dieser Arbeit ist in zwei Bereiche unterteilt. In dem ersten Teil beschäftigte ich mich mit klassischen “lineage tracing”-Experimenten und zeigte Derivate von Zellen, die von Transkriptionsfaktor Lbx1-exprimierenden Zellen aus dem Somiten abstammen. Im zweiten Teil der Ergebnisse widmete ich mich der Funktion des Transkriptionsfaktors RBP-J in der Entwicklung der epaxialen und hypaxialen Muskulatur der Maus.

#### 3.1 Derivate Lbx1-exprimierender Zellen in der Entwicklung der Maus

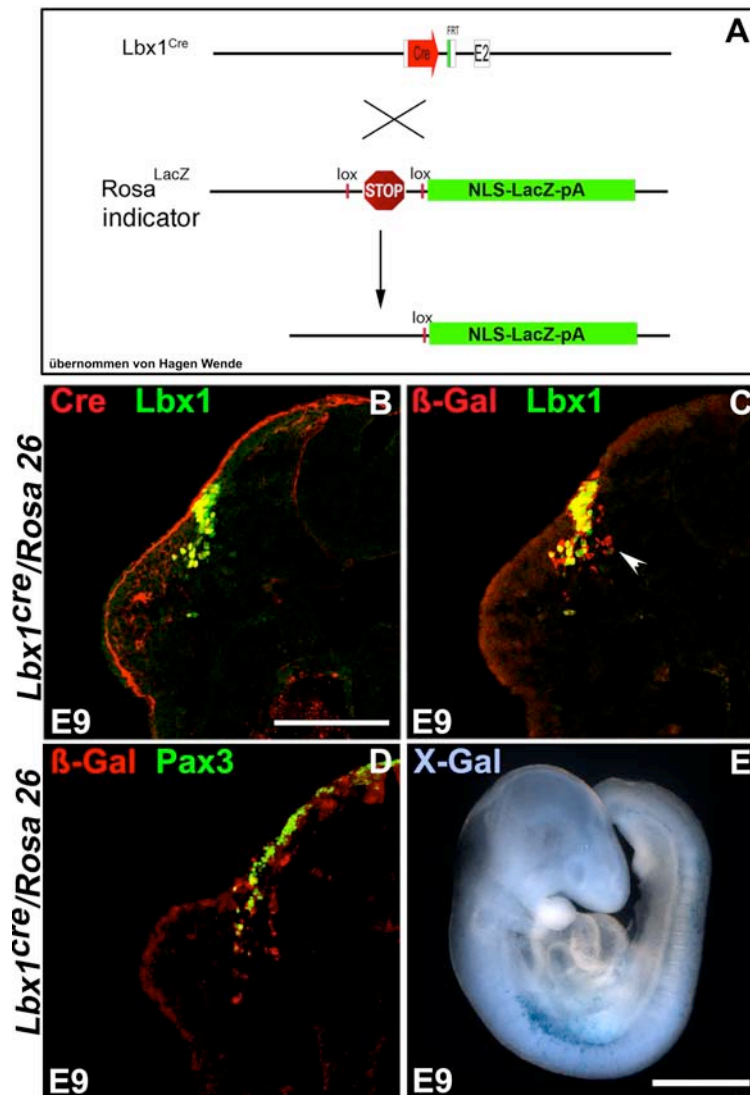
Der Homöobox-Transkriptionsfaktor Lbx1 der Maus wurde als homologes Gen zum Drosophila “*Lady bird*”-Gen identifiziert (Jagla et al., 1995). Neben der Expression von Lbx1 im Rückenmark und im Rhombenzephalon, sind migrierende Muskelvorläuferzellen aus dem hypaxialen Dermomyotom durch die Expression von Lbx1 markiert. Diese Muskelvorläuferzellen bilden eine migrierende Zellpopulation, die die Muskulatur der Extremitäten und des Schultergürtels, des Zwerchfells und der Zunge generieren (Dietrich et al., 1999; Dietrich et al., 1998; Jagla et al., 1995). Es blieb jedoch noch ungeklärt, ob weitere Muskeln oder andere Zelltypen aus dieser Lbx1-exprimierenden Zellpopulation abstammen.

Dr. Hagen Wende konstruierte eine transgene und eine “knock-in”-Mauslinie, in denen die Cre-Rekombinase des Cre-LoxP-Systems unter der Kontrolle des *Lbx1*-Promotors exprimiert wird, und die im folgenden als *Lbx1<sup>cre</sup>TG* und *Lbx1<sup>cre</sup>ki* bezeichnet werden. Für die Ermittlung von Derivaten Lbx1-exprimierender Zellen verwendete ich die *Lbx1<sup>cre</sup>ki*-Mauslinie.

### 3.1.1 Testen der Rekombinationseffizienz der *Lbx1<sup>cre</sup>ki*- Mauslinie

Um *Lbx1*-Derivate während der embryonalen Entwicklung zu verfolgen, als auch die Expression der Cre-Rekombinase und die Effizienz der Rekombination zu testen, habe ich die *Lbx1<sup>cre</sup>ki*-Maus mit der Indikatorlinie *Rosa26<sup>lacZ</sup>* (*Rosa26*) (Soriano, 1999) verpaart. Diese Indikatorlinie trägt im *Rosa26*-Lokus ein *LacZ*-Gen, welches für  $\beta$ -Galaktosidase kodiert, und dem eine gefloxtete *Neomycin*-Kassette vorgeschaltet ist, der eine dreifache Polyadenylierungs-Sequenz folgt und die als Stopkassette fungiert. Durch die Aktivierung des *Lbx1*-Promotors kommt es zur Expression der *Cre-Rekombinase* und zur Entfernung der gefloxteten *Neomycin*-Kassette mit der nachgeschalteten Polyadenylierungs-Sequenz im *Rosa26*-Lokus, was zur konstitutiven Expression der  $\beta$ -Galaktosidase in Zellen, die Cre exprimieren, und in deren Tochterzellen führt. Dadurch wird  $\beta$ -Galaktosidase selbst nach Inaktivierung des *Lbx1*-Promotors in Tochterzellen, die das rekombinierte Allele ererbt haben, exprimiert (siehe Abb. 3.1.A). Somit können alle Tochterzellen *Lbx1*-exprimierender Zellen detektiert werden, die im folgenden als *Lbx1*-Derivate bezeichnet werden.

Mittels einer "Whole Mount" X-Gal-Färbung konnte ich eine Expression des Transkriptionsfaktors *Lbx1* in frühen Embryonen am Tag E9 der Embryogenese im ventro-lateralen Teil des Dermomyotoms beobachten (Abb. 3.1 E). Zu diesem Zeitpunkt sind noch keine Anlagen für die Hinterextremitäten entwickelt und eine *Lbx1*-Expression bleibt auf dieser axialen Ebene noch aus. Desweiteren konnte zu diesem Zeitpunkt noch keine Delaminierung bzw. Migration von hypaxialen Muskelvorläuferzellen in die Anlagen der Vorderextremität bzw. Brachialbogen beobachtet werden. Anhand von Immunfluoreszenzfärbungen auf transversal geschnittenen E9 *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*-Embryonen, wurde die *Lbx1*-Expression und die Rekombinationseffizienz genauer untersucht. Abb. 3.1.B zeigt eine Ko-Lokalisation von *Lbx1* und der Cre-Rekombinase im ventralen Teil des Dermomyotoms. Die Ko-Lokalisation von *Lbx1*- und  $\beta$ -Gal in Abb. 3.1.C zeigt eine extrem hohe, evt. vollständige, Rekombination des *Rosa26*-Lokus in *Lbx1*-exprimierenden Zellen im ventralen Dermomyotom. Die ventrale Position dieser  $\beta$ -Gal positiven Zellen wird durch eine zusätzliche Färbung mit Pax3-Antikörpern deutlich, welche das gesamte Dermomyotom markieren (Abb. 3.1.D).



### Abb. 3.1: Lbx1 Expression und Cre-induzierte Rekombination im ventralen Dermomyotom.

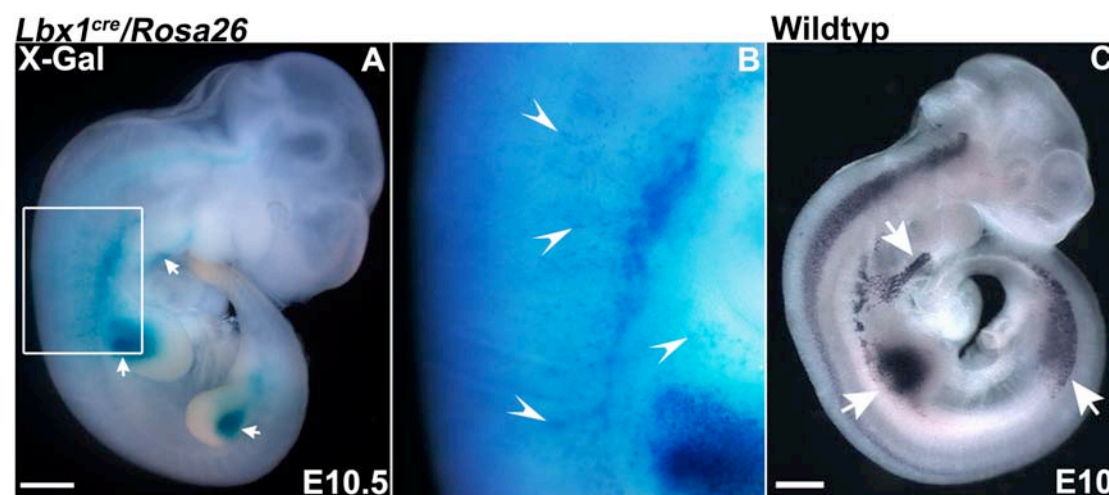
(A) Schematische Darstellung des *Lbx1<sup>cre</sup>ki*-Lokus und des *Rosa26<sup>lacZ</sup>*-Lokus, vor und nach Cre-induzierter Rekombination. Die Cre-Rekombinase (rot) wurde an das ATG Startkodon von *Lbx1* fusioniert und ersetzt die *Lbx1* kodierende Sequenz (weiß). Der *Rosa26<sup>lacZ</sup>*-Lokus enthält ein Gen, das für  $\beta$ -Galaktosidase (grün) kodiert. Diesem Gen vorgeschaltet befindet sich eine *Neomycin*-Kassette mit darauf folgender Polyadenylierungssequenz die als Stop-Kassette fungieren, und die von zwei loxP-Basenabfolgen flankiert werden. Nach Cre-induzierter Rekombination erfolgt die Exzision der *Neomycin*- und der Polyadenylierungssequenz, was zur konstitutiven Expression der  $\beta$ -

Galaktosidase führt. (E) Whole Mount X-Gal-Färbung eines E9 *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*-Embryos zeigt Lbx1-Derivate im ventralen Dermomyotom. Immunfluoreszenzanalysen auf Transversalschnitten von E9 *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*- Embryonen zeigt Ko-Färbung (gelb) von (B) Lbx1 (grün) und Cre (rot), sowie Lbx1 (grün) und  $\beta$ -Gal (rot) (C). Zusätzlich zeigten sich Lbx1-negative  $\beta$ -Gal positive Lbx1-Derivate (rot) (C, Pfeilkopf). Die ventrale Position von Lbx1-Derivaten wird durch Pax3-Expression (grün) deutlich (D), welche das gesamte Dermomyotom markiert. Größenmaßstab B,C,D 200 $\mu$ m, E 500 $\mu$ m.

In der Abb. 3.1C sind neben doppelt positiven Zellen auch  $Lbx1^{neg};\beta\text{-Gal}^{pos}$ -Zellen zu beobachten (Pfeilkopf). Diese Zellen haben wahrscheinlich, nach anfänglicher Expression von Lbx1, dieses Gen wieder herab reguliert. Muskelvorläuferzellen halten die Lbx1-Expression während ihrer Migration aufrecht und beenden diese erst an ihrem Zielpunkt, zu Beginn ihrer Differenzierung. Demnach repräsentieren diese Zellen wahrscheinlich keine Muskelvorläuferzellen.

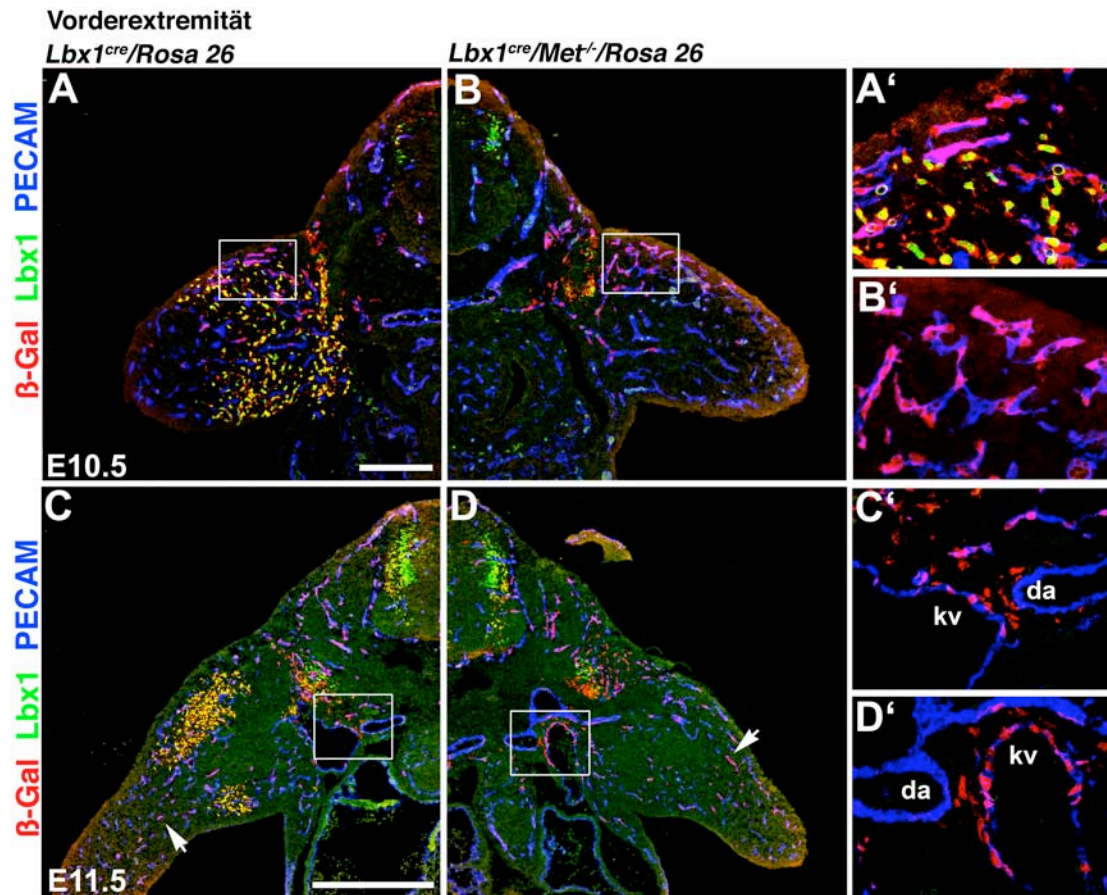
### 3.1.2 Lbx1-Derivate tragen zur Endothelbildung bei und ihre Delaminierung erfolgt unabhängig von Met

Um die Population der Lbx1-Derivate weiter beobachten zu können, und um ihr Zellschicksal zu verfolgen, habe ich weitere Färbungen von Embryonen an den Tagen E10.5 und E11.5 durchgeführt. Die X-Gal-Färbung an einem E10.5 *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*-Embryo in der Abb. 3.2A zeigt myogene Lbx1-Derivate im ventralen Dermomyotom von okkzipital gelegenen Somiten und in Somiten auf axialer Höhe der Extremitäten, sowie in den Extremitätenanlagen (Pfeil) und in einem migrierenden Zellstrom in die Brachialbögen (Pfeil), als auch in neuronalen Zellen des Rückenmarks. Diese Zellen sind durch den Erhalt der Lbx1-Expression in diesem Entwicklungsstadium charakterisiert, wie anhand einer In Situ-Hybridisierung mit Lbx1-spezifischen Sonden beobachtet werden kann (Abb. 3.2C). Wie zusätzlich in der Abb. 3.2A und B deutlich wird, ist schon an einer Whole Mount X-Gal-Färbung eine deutliche Expansion von Lbx1-Derivaten zu erkennen, die sich in ihrer Lokalisierung, Morphologie und Verbreitung von Lbx1-Derivaten unterscheiden, die ein myogenes Schicksal übernehmen. Diese Zellen zeigen ein verstreutes Muster, das sich sowohl in die entstehende Vorderextremität, als auch nach dorsal erstreckt (Abb. 3.2B).



**Abb.3.2: Whole Mount X-Gal-Färbung eines E10.5 *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*-Embryos.** (A)  $\beta$ -Gal positive Lbx1-Derivate (blau) sind erkennbar im Zentralnervensystem, in migrierenden myogenen Zellen (Pfeile) der Extremitäten und der Zunge und in Zellen mit verstreutem Muster (B, Pfeilköpfe). Eingerahmter Bereich in (A) ist vergrößert dargestellt in (B). (C) In Situ- Hybridisierung eines E10 Wildtypembryos mit Lbx1-spezifischen Sonden (entnommen aus Birchmeier und Brohmann, 2000) Größenbalken A,C 500 $\mu$ m.

In einer Reihe von Publikationen wurde der Beitrag der Somiten zur Endothelentwicklung der Blutgefäße nachgewiesen (Christ, 1969; Pardanaud and Dieterlen-Lievre, 1993; Pardanaud et al., 1996; Wilting et al., 1995). Meine Annahme, daß Lbx1-Derivate (Lbx1 negative,  $\beta$ -Gal positive Zellen) zur Endothelbildung beitragen, konnte ich mittels Immunfluoreszenzfärbungen an Transversalschnitten von E10.5 und E11.5 *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*-Embryonen bestätigen.



**Abb. 3.3: Delaminierung endothelialer Lbx1-Derivate vom Somiten erfolgt unabhängig von Met.** Detektion von myogenen Lbx1-Derivaten in Immunfluoreszenzanalysen auf transversalen Kryoschnitten mittels  $\beta$ -Gal (rot) und Lbx1 (grün)-Antikörper, und Visualisierung von endothelialen Lbx1-Derivaten durch  $\beta$ -Gal (rot) und PECAM (blau)-Antikörpern im E10.5 (A) und E11.5 (C) *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*-Embryonen. Detaildarstellung von eingerahmten Bereichen in (A') und (C'). Immunfluoreszenzfärbung mit  $\beta$ -Gal (rot), Lbx1 (grün) und PECAM (blau)-Antikörpern auf Transversalschnitten von E10.5 (B) und E11.5 (D) *Lbx1<sup>cre</sup>/Met<sup>-/-</sup>/Rosa26*-Embryonen. Die myogene, Lbx1-positive,  $\beta$ -Gal-positive Zellpopulation ist abwesend und somit Met-abhängig, die endotheliale Lbx1-negative,  $\beta$ -Gal positive, PECAM positive Zellpopulation ist anwesend und entwickelt sich Met-unabhängig. Endotheliale Lbx1-Derivate migrieren weite Distanzen bis in laterale Bereiche der Extremitäten (Pfeil) und in das Rückenmark umschließende Bereiche. Detaildarstellung von eingerahmten Bereichen aus (B) und (D) in (B') und (D'). Kontribution von Lbx1-Derivaten zur Kardinalvene kv (C'+D'). Keine Kontribution von Lbx1-Derivaten zur dorsalen Aorta, da. Größenbalken C+D 500 $\mu$ m, A+B 200  $\mu$ m.

Wie in Abb. 3.3A und C zu sehen ist, kann ich eine myogene Lbx1-positive,  $\beta$ -Gal-positive Population und eine nicht-myogene  $\beta$ -Gal-positive, Lbx1-negative Zellpopulation unterscheiden, wobei die Letztere den Endothelmarker PECAM (CD31) ko-exprimiert. Diese Population, wie im E11.5 *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*-Embryo schon zu erkennen ist (Abb. 3.3C), ist sehr ausgeprägt in distalen Bereichen der Vorderextremität lokalisiert, wie auch in Bereichen, die das Rückenmark umschließen, im späteren Schultergürtel und in der Kardinalvene (Abb.3.3C'). In der dorsalen Aorta konnten keine, oder nur sporadisch Lbx1-Derivate detektiert werden. In späteren Entwicklungsstadien wurden endotheliale Lbx1-Derivate auch in epaxialen Muskeln offensichtlich, sowie in größeren Blutgefäßen, wie der inneren Halsschlagader (Karotis) (Daten nicht gezeigt).

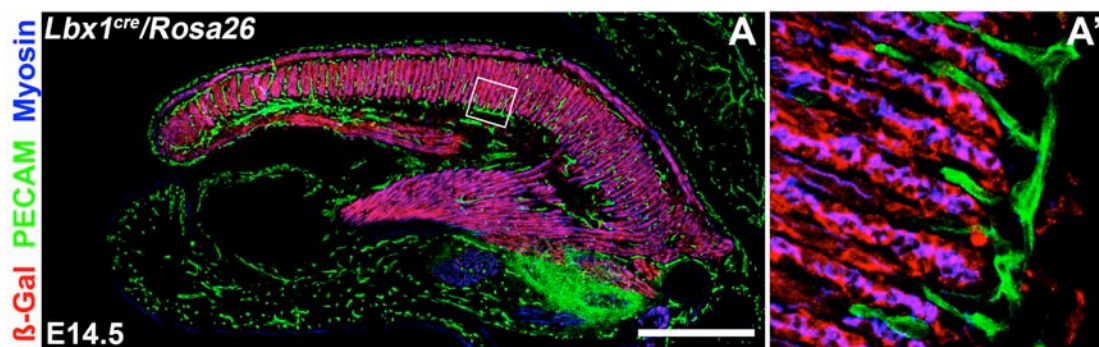
Für die Delaminierung migrierender Muskelvorläuferzellen vom ventro-lateralen Ende der Somiten hat der Tyrosinkinase-Rezeptor Met eine essenzielle Bedeutung. In *Met*-defizienten Mäusen erfolgt keine Delaminierung dieser Zellen, und Muskeln, die aus der migrierenden Population gebildet werden, fehlen gänzlich (Bladt et al., 1995; Dietrich, 1999; Dietrich et al., 1999; Schmidt et al., 1995). Um die Frage zu klären, ob die Delaminierung der Lbx1-Derivate, die zur Endothelbildung beitragen, ebenfalls von Met-Signalen abhängt, habe ich homozygote *Met*-Mutanten mit einem genetischen *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*-Hintergrund (bezeichnet als *Lbx1<sup>cre</sup>/Met<sup>-/-</sup>/Rosa26*) mittels Immunfluoreszenzfärbungen analysiert. Wie aus den Abb.3.3B und D zu entnehmen ist, sind Lbx1; $\beta$ -Gal doppelt-positive Zellen der migrierenden, myogenen Vorläuferpopulation in der Vorderextremität abwesend. Einfach  $\beta$ -Gal-positive Lbx1-Derivate, die den Endothelmarker PECAM ko-exprimieren, sind hingegen vorhanden. In der Abb.3.3D und D' zeigt sich ebenfalls, dass die *Met*-Mutation keinen Einfluss auf die Verteilung, Anzahl und Lokalisierung von endothelialen Lbx1-Derivaten hat.

Die Expression von Lbx1 in jungen, neuronalen Zellen des dorsalen Rückenmarks kann erstmals im Entwicklungsstadium E10 der Maus beobachtet werden (Jagla et al., 1995; Lee et al., 1998; Liem et al., 1997). Die geringe Ko-Expression von Lbx1 und  $\beta$ -Gal in neuronalen Zellen des Rückenmarks von *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*-Mäusen, die in Abb.3.3C und D zu beobachten ist, ist demnach auf eine zeitliche Komponente zurückzuführen: Rekombination in diesen Zellen beginnt erst zu diesem Zeitpunkt.



### 3.1.3 Endothel-bildende Lbx1-Derivate migrieren nicht in die Zunge

Endothel-bildende Lbx1-Derivate migrierten weite Distanzen, bis in distale Bereiche der Extremitäten, wie in Abb. 3.3C (Pfeil) zu erkennen ist. Sie bewegten sich desweiteren zwischen den migrierenden Muskelvorläuferzellen fort (Abb.3.3A). Da myogene Progenitorzellen ebenfalls von den okzipitalen Somiten in die Brachialbögen migrieren, habe ich anhand von Immunfluoreszenzanalysen der Zunge von *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*-Embryonen am Tag E14 untersucht, ob Lbx1-Derivate auch in der Zunge zur Endothelbildung beitragen.

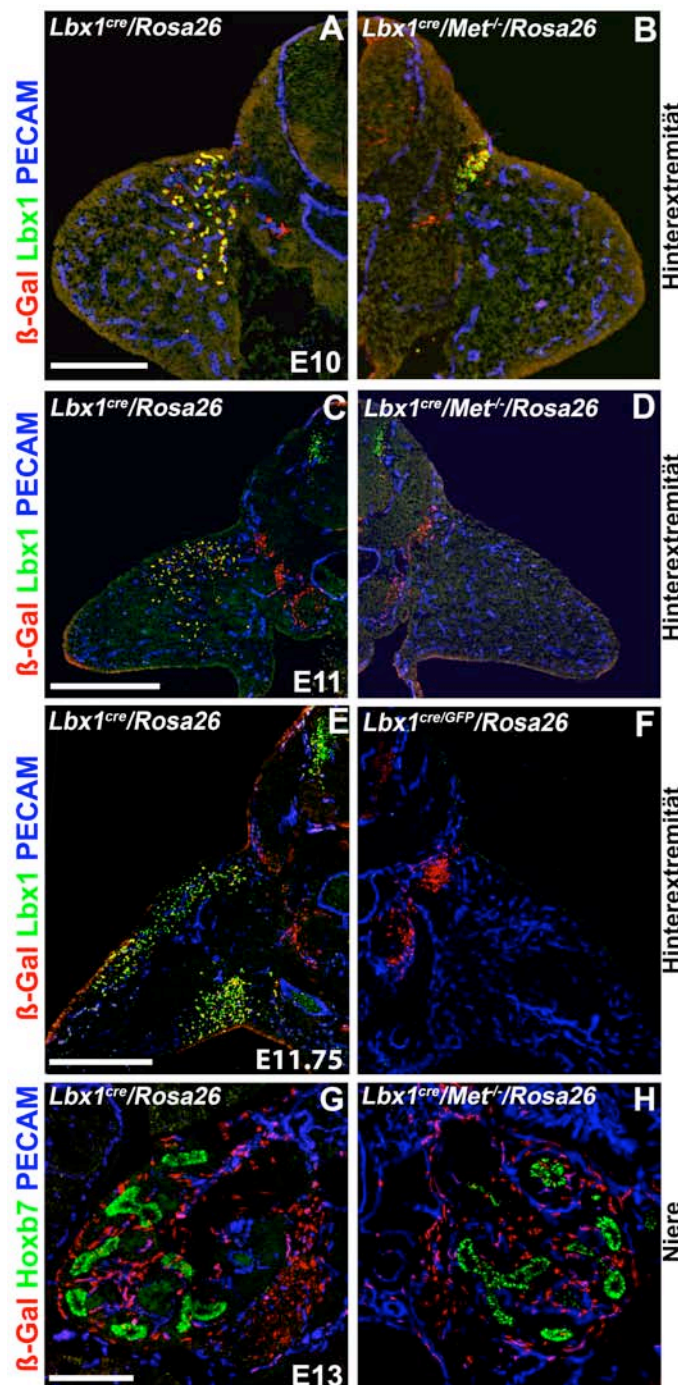


**Abb. 3.4: Keine Beteiligung von Lbx1-Derivaten zur Endothelentwicklung in der Zunge.** Immunfluoreszenzanalysen auf Sagittalschnitten der Zunge von E14.5 *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*-Embryonen mit  $\beta$ -Gal (rot), Myosin (blau) und PECAM- (grün) Antikörpern. Ko-Färbung von  $\beta$ -Gal und Myosin ist zu beobachten, aber nicht von  $\beta$ -Gal und PECAM. Detaildarstellung (A') des eingerahmten Bereichs aus (A). Größenmaßstab A 500 $\mu$ m.

Wie in Abb.3.4 zu erkennen ist, sind  $\beta$ -Gal-positive Zellen nur an der Bildung der Zungenmuskulatur beteiligt, wie anhand der Ko-Expression von  $\beta$ -Gal und dem späten Skelettmuskelmarker Myosin zu erkennen ist. Ko-Färbung von  $\beta$ -Gal mit dem Endothelmarker PECAM ist nicht vorhanden. Daraus war zu schließen, dass keine Migration von endothelialen Lbx1-Derivaten in die Zunge stattfindet.

### 3.1.4 Met-unabhängige Migration von Endothel-bildenden Lbx1-Derivaten in die Niere

Um zu analysieren, ob auch auf Ebene der Hinterextremität Lbx1-Derivate zu beobachten sind, die zur Endothelentwicklung der Blutgefäße beitragen, habe ich auch hier Immunfluoreszenzfärbungen an *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*- und an *Met*-mutanten Embryonen durchgeführt.



**Abb. 3.5: Endothelbildende Lbx1-Derivate delaminieren unabhängig von Met und migrieren in die Niere.**

Immunfluoreszenzfärbungen auf Transversalschnitten von E10.5 (A) und E11.5 (C+E) *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*- Embryonen, E10.5 (B) und E11.5 (D) *Lbx1<sup>cre</sup>/Met<sup>-/-</sup>/Rosa26*- und E11.5 *Lbx1<sup>cre</sup>/GFP/Rosa26*-Embryonen auf der Ebene der Hinterextremitäten, mit  $\beta$ -Gal- (rot), Lbx1- (grün) und PECAM- (blau) Antikörpern. Lbx1-negative,  $\beta$ -Gal-positive Zellen migrieren ventral in die sich entwickelnde Niere (A-F), Muskelvorläuferzellen fehlen in den Extremitäten von Met-defizienten (B+D) und Lbx1-defizienten (F) Embryonen. Longitudinalschnitte der Niere von E13 *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*- (G) und *Lbx1<sup>cre</sup>/Met<sup>-/-</sup>/Rosa26*-Embryonen, gefärbt mit  $\beta$ -Gal- (rot), Hoxb7- (grün) und PECAM- (blau) Antikörpern.  $\beta$ -Gal-positive Zellen sind gleichmäßig in der Niere verteilt und sind teilweise mit dem Endothelmarker PECAM ko-lokalisiert.  $\beta$ -Gal-positive Zellen akkumulieren desweiteren neben der Niere. Hoxb7 markiert die Epithelien der Nephrone. Größenmaßstab A+B 200 $\mu$ m, C+D 500 $\mu$ m, E+F 500 $\mu$ m, G+H 200 $\mu$ m.

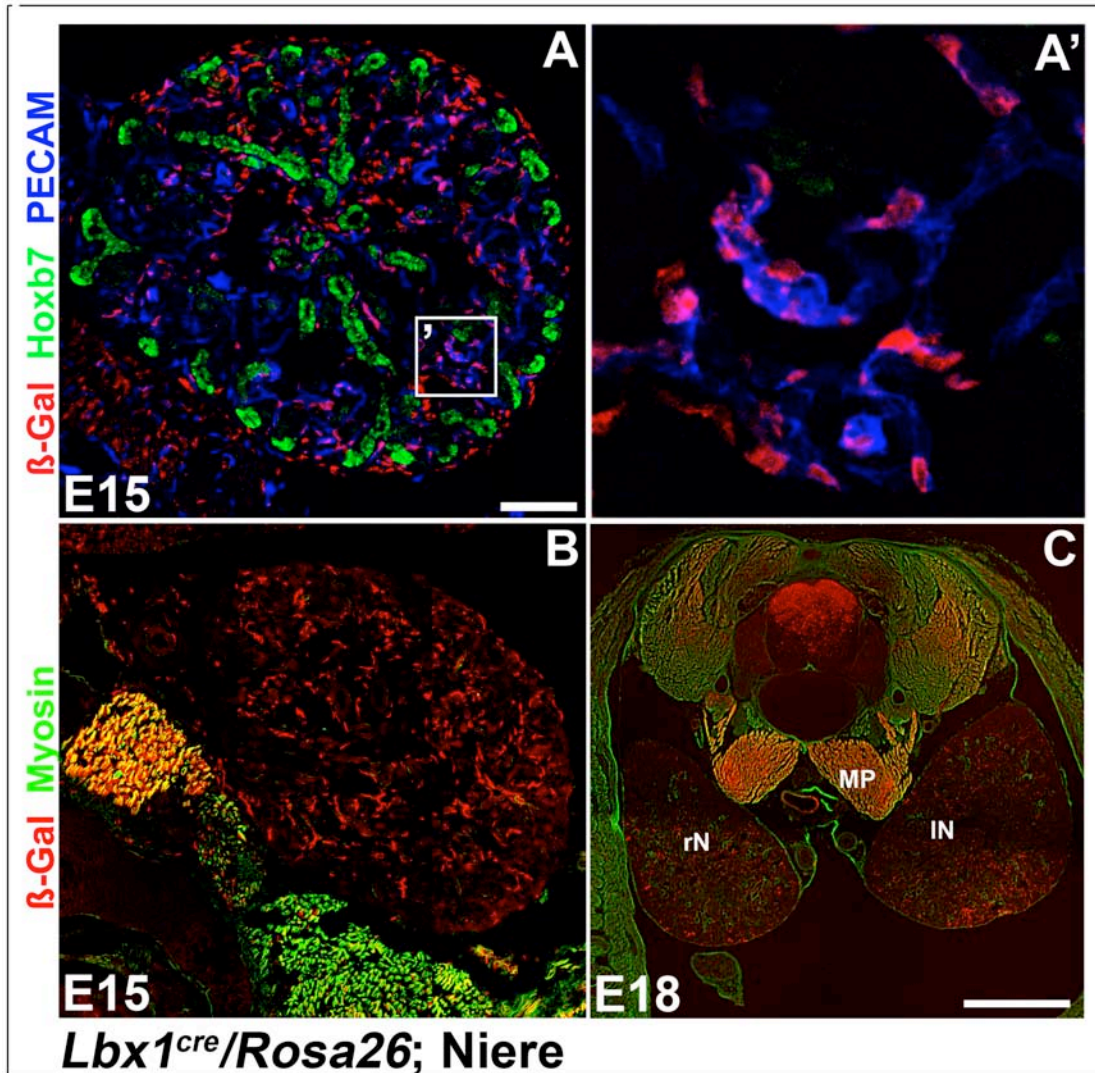
Überraschenderweise zeigte sich schon in E10.5 Embryonen (Abb.3.5.A), dass Lbx1-negative Lbx1-Tochterzellen, nicht wie auf der Ebene der Vorderextremität, dorsal migrieren, sondern in ventrale Richtung. Am Embryonaltag E11.5 (Abb. 3.5C) war zu erkennen, dass diese Zellen einen migrierenden Strom in die sich entwickelnde Niere bilden. Eine Einwanderung dieser Zellen in die Hinterextremität, wie ich es in der Vorderextremität beobachten konnte, war hier nicht zu erkennen. Im Gegensatz dazu,

migrieren Lbx1-positive;  $\beta$ -Gal-positive Muskelvorläuferzellen, wie zu erwarten, in die Hinterextremität hinein. Die Abb.3.5B und D zeigen, dass auch auf Ebene der Hinterextremität die Delaminierung von Lbx1-negativen;  $\beta$ -Gal-positiven Zellen vom Dermomyotom erfolgt, ohne dass Met-Signale darauf Einfluß nehmen. Myogene Vorläuferzellen hingegen sind nicht in der Lage sich vom Dermomyotom abzuspalten.

Weiterhin habe ich anhand von *Lbx1*-defizienten Embryonen (Abb.3.5F) untersucht, ob die Expression von *Lbx1* im ventralen Dermomyotom einen Einfluß auf die Spezifizierung Endothel-bildender Lbx1-Derivate nimmt. Migration und Anzahl dieser Zellen verhalten sich jedoch wie in Kontrolltieren (Abb. 3.5E). Die Mutation von *Lbx1* beeinflusst jedoch, wie bekannt, die Migration und Verteilung der Muskelvorläuferzellen (Brohmann et al., 2000).

In der Abb. 3.5G und H zeigen sich in der Niere von E13 *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*- und *Lbx1<sup>cre</sup>/Met<sup>-</sup>/Rosa26*-Embryonen mittels  $\beta$ -Gal-Antikörper eine ähnliche Anzahl und Verteilung von Lbx1-negativen Lbx1-Derivaten, die zum großen Teil auch hier mit dem Endothelmarker PECAM ko-lokalisiert sind. *Hoxb7* markiert die Epithelzellen der Nephrone und Glomeruli in der Niere. Desweiteren ist eine Akkumulation von  $\beta$ -Gal-positiven Zellen zu erkennen, die sich scheinbar neben der sich entwickelnden Niere befindet.

Bei näherer Betrachtung der Niere von E15 und E18.5 *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*-Embryonen werden zwei Fakten offensichtlich: Erwartungsgemäß, äquivalent zu den Beobachtungen auf der Ebene der Vorderextremität, eine hohe Beteiligung von Lbx1-Derivaten zum Endothel der Blutgefäße in der Niere, wie durch Ko-expression von  $\beta$ -Gal und PECAM in Abb. 3.6 A und A' zu sehen ist.



**Abb. 3.6: Beteiligung von Lbx1-Derivaten an der Bildung von Endothelien in der Niere und an der Bildung des Muskulus psoas major.** Immunfluoreszenzaufnahmen der longitudinal geschnittenen Niere von E15 *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*-Embryonen mit  $\beta$ -Gal- (rot), Hoxb7- (grün) und PECAM- (blau) Antikörpern (A), sowie  $\beta$ -Gal- (rot) und Myosin- (grün) Antikörpern (B). Ko-Färbung von  $\beta$ -Gal und PECAM zeigt eine Beteiligung von Lbx1-Derivaten an der Bildung der Endothelien in der Niere (A). Detaildarstellung des eingerahmten Bereichs (A'). Ko-Färbung von  $\beta$ -Gal und Myosin (B) zeigt Lbx1-Derivate im differenzierten Muskel. Transversalschnitte eines E18 *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*-Embryos und Färbung mit  $\beta$ -Gal- (rot) und Myosin- (grün) Antikörpern (C) ermöglichen die Bestimmung dieses Muskels als Muskulus psoas major. MP, Muskulus Psoas; lN, linke Niere; rN, rechte Niere. Größenmaßstab A+B 200 $\mu$ m, C 1000 $\mu$ m.

Zusätzlich zeigte sich, dass die Akkumulation von  $\beta$ -Gal-positiven Zellen, die neben der Niere lokalisiert waren, in Muskelgewebe ausdifferenziert sind. Dies ist aus der Abb.3.6B zu entnehmen, in der eine Ko-Färbung von  $\beta$ -Gal-positiven Zellen mit Myosin-Antikörpern auf längs geschnittener Niere zu sehen ist. Analysen am Entwicklungstag E13 zeigten sowohl in *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26-*, als auch in *Lbx1<sup>cre</sup>/Met<sup>-/-</sup>*

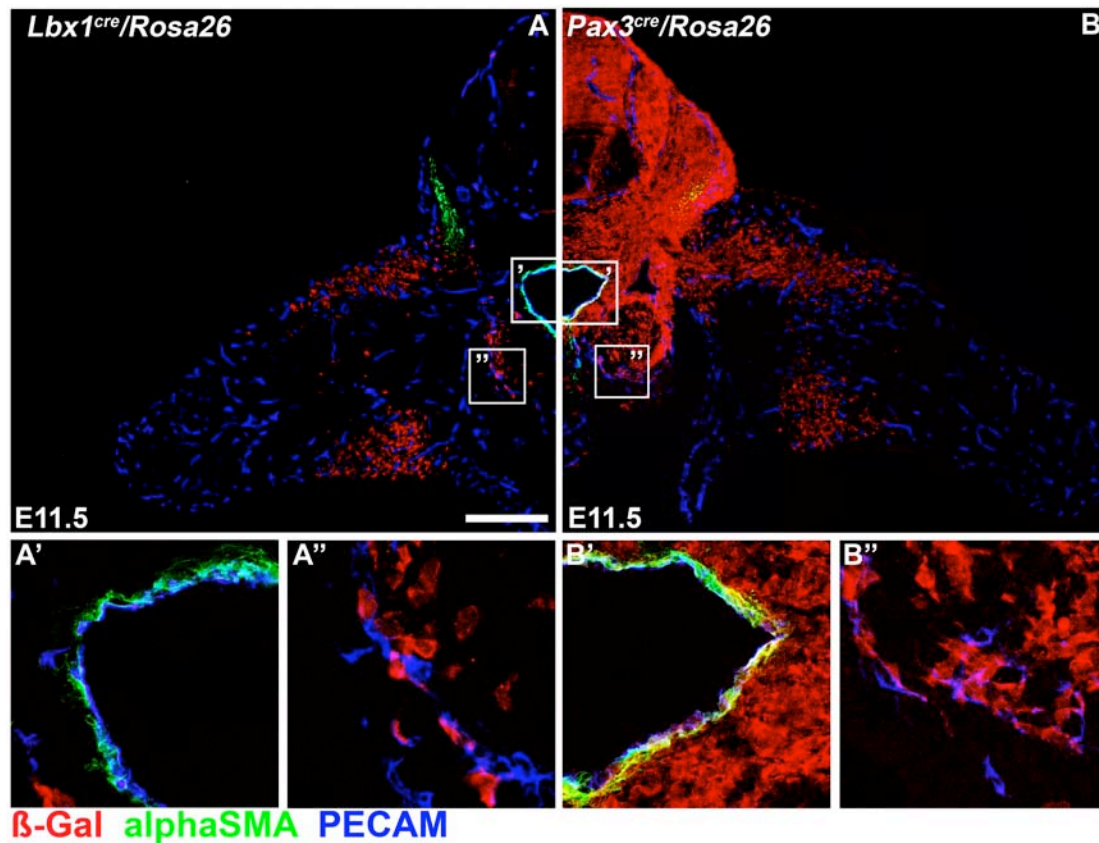
/Rosa26-Tieren das Einwandern von Lbx1-Derivaten in dort differenziertes Muskelgewebe. Die Abb.3.6C stellt einen auf Nierenhöhe, transversal geschnittenen E18 *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*-Embryo dar. Diese Schnittweise erleichtert eine bessere Zuordnung von Organen im Kontext zueinander und ermöglichte die Bestimmung des  $\beta$ -Gal-positiven Muskels als Musculus psoas major.

### **3.1.5 Lbx1-Derivate sind nicht an der Bildung glatter Muskulatur beteiligt**

Es wurde publiziert, daß Pax3-Derivate aus dem Somiten an der Bildung der glatten Muskulatur der dorsalen Aorta beteiligt sind (Esner et al., 2006). Deshalb wollte ich überprüfen, ob Lbx1-Derivate ebenfalls glatte Muskelzellen in der dorsalen Aorta bilden können.

Eine Analyse von *Pax3<sup>cre</sup>/Rosa26*-Embryonen am Tag E11.5 ermöglichte mir, alle Pax3-Derivate aufgrund konstitutiver Expression von  $\beta$ -Galaktosidase zu verfolgen, wie ich dies schon auf analoge Weise für die Lbx1-Derivate zeigte (siehe oben). Besonderes Interesse legte ich hier auf die Beobachtung von Pax3-Derivaten in der dorsalen Aorta, dargestellt auf axialer Ebene der Hinterextremität (Abb. 3.7). Durch die Ko-Expression von alpha Smooth Muscle Actin- ( $\alpha$ SMA) und PECAM- mit  $\beta$ -Galaktosidase konnte eine große Beteiligung von Pax3-Derivaten an der Bildung von Endothel- und glatten Muskelzellen in der dorsalen Aorta bestätigt werden (siehe Abb. 3.7B und Abb.3.7B' und B'' zur Detailansicht).

Im Gegensatz dazu konnten in *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*-Embryonen, wie in Abb. 3.7A (Detailansicht siehe Abb.3.7A') zu beobachten ist, keine Lbx1-Derivate in glatten Muskelzellen beobachtet werden. Lbx1-abstammende Zellen im Endothel der dorsalen Aorta wurden nur sehr selten beobachtet. Auch in der Niere konnte ich lediglich eine Beteiligung von Lbx1-Derivaten an der Endothelzellbildung, aber nicht an der Bildung von glatter Muskulatur beobachten (Abb.3.7A'').



**Abb. 3.7: Keine Beteiligung von Lbx1-Derivaten zu glatten Muskelzellen der dorsalen Aorta.** Pax3-Derivate sind mit glatten Muskelzellen und Endothelzellen der dorsalen Aorta (B,B') ko-exprimiert, gezeigt durch Immunfluoreszenzfärbungen mit β-Gal- (rot), αSMA- (grün) und PECAM- (blau) Antikörpern auf Transversalschnitten eines E11 *Pax3<sup>cre</sup>/Rosa26*-Embryos (B) auf achsialer Ebene der Hinterextremität. (B'') zeigt eine hohe Beteiligung von Pax3-Derivaten an der Bildung der Niere. Immunfluoreszenzfärbung auf Transversalschnitten eines *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*-Embryos (A) zeigt keine Kontribution von Lbx1-Derivaten zur Dorsalen Aorta (A'). Beteiligung von Derivaten Lbx1-exprimierender Zellen zur Endothelbildung ist in der Niere zu beobachten (A''). Größenmaßstab A+B 250µm.

Da gezeigt wurde, dass im Hühnchen Notch-Signale Einfluß auf die Schicksalsentscheidung zwischen glatten- und Skelettmuskelzellen nehmen (Ben-Yair and Kalchauer, 2008), wurde dieser Aspekt von Elena Vasytina auch in der Maus mit Hilfe von *Lbx1<sup>Cre</sup>/RBP-J<sup>lox/lox</sup>/Rosa26*- und *Pax3<sup>Cre</sup>/RBP-J<sup>lox/lox</sup>/Rosa26*- Mäusen am Tag E11 untersucht. Eine Quantifizierung von Endothelzellen bzw. glatten Muskelzellen im Vergleich zu Vorläuferzellen der Skelettmuskulatur zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und *Rbp-j*-defizienten Mäusen (unpublizierte Daten Dr. Elena Vasytina).

### 3.1.6 Die Zungenmuskulatur entwickelt sich aus Vorläuferzellen unterschiedlichen Ursprungs

Die gesamte, axiale Skelettmuskulatur der Vertebraten entwickelt sich aus dem Dermomyotom der Somiten (Christ and Ordahl, 1995). Die Kopfmuskeln hingegen finden ihren Ursprung im unsegmentierten, kranialen, paraxialen Mesoderm (Wachtler and Jacob, 1986). Eine Ausnahme stellt die Zunge dar, die aus einer Population von Muskelvorläuferzellen entsteht, die von den okzipitalen Somiten in die Brachialbögen einwandert (Christ and Ordahl, 1995). Wie die myogenen Vorläuferzellen der Extremitäten, exprimieren sie ebenfalls den Homöobox-Transkriptionsfaktor Lbx1.

In der Abb. 3.8A wurde ein Sagittalschnitt der Zunge eines E13 *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*-Embryos immunhistologisch gefärbt. Durch die Ko-Expression von  $\beta$ -Gal und Myosin wurde die Entstehung der Zungenmuskeln aus Lbx1-abstammenden Zellen bestätigt. In dieser Abbildung sind ein Teil der extrinsischen und intrinsischen Muskeln der Zunge als  $\beta$ -Gal-positive Muskeln zu erkennen: der Genioglossus, Musculus Verticalis linguae, musculus longitudinalis superior. In *Met*-defizienten Mäusen wird das Fehlen dieser Muskeln erwartet, da die wandernden Muskelvorläuferzellen in *Met*-Mutanten gehindert werden, vom ventro-lateralen Ende des Dermomyotoms zu delaminieren. Erstaunlicherweise werden Teile des Genioglossus und des Musculus Verticalis in *Met*-defizienten Tieren gebildet, wie in Abb. 3.8B zu erkennen ist. Zellen, die von Lbx1-exprimierenden Zellen abstammen ( $\beta$ -Gal-positive), sind erwartungsgemäß nicht zu beobachten. Diese Beobachtung deutet auf einen weiteren Ursprung von myogenen Vorläuferzellen hin, die zur Bildung dieser Zungenmuskeln beitragen. Um das Mitwirken Lbx1-negativer Bereiche der Somiten an der Zungenmuskelentwicklung zu analysieren, habe ich den Beitrag von Pax3-Derivaten an der Zungenmuskulatur in E13 *Pax3<sup>cre</sup>/Rosa26*-Embryonen untersucht. In Abb. 3.8C zeigt sich ein großer Anteil von Pax3-Derivaten in der Muskulatur der Zunge. Dies war zu erwarten, da die Muskelvorläuferzellen, die in die Zunge migrieren, Lbx1 und Pax3 ko-exprimieren. Eine Ko-Lokalisation von Pax3-Derivaten und den verbleibenden Muskeln in den *Met*-defizienten *Pax3<sup>Cre</sup>/Rosa26*-Mäusen war nicht zu beobachten (Abb. 3.8D). Diese Ergebnisse bestätigen, dass die proximalen Zungenmuskeln in *Met*-mutanten Mäusen nicht aus den Somiten stammen.

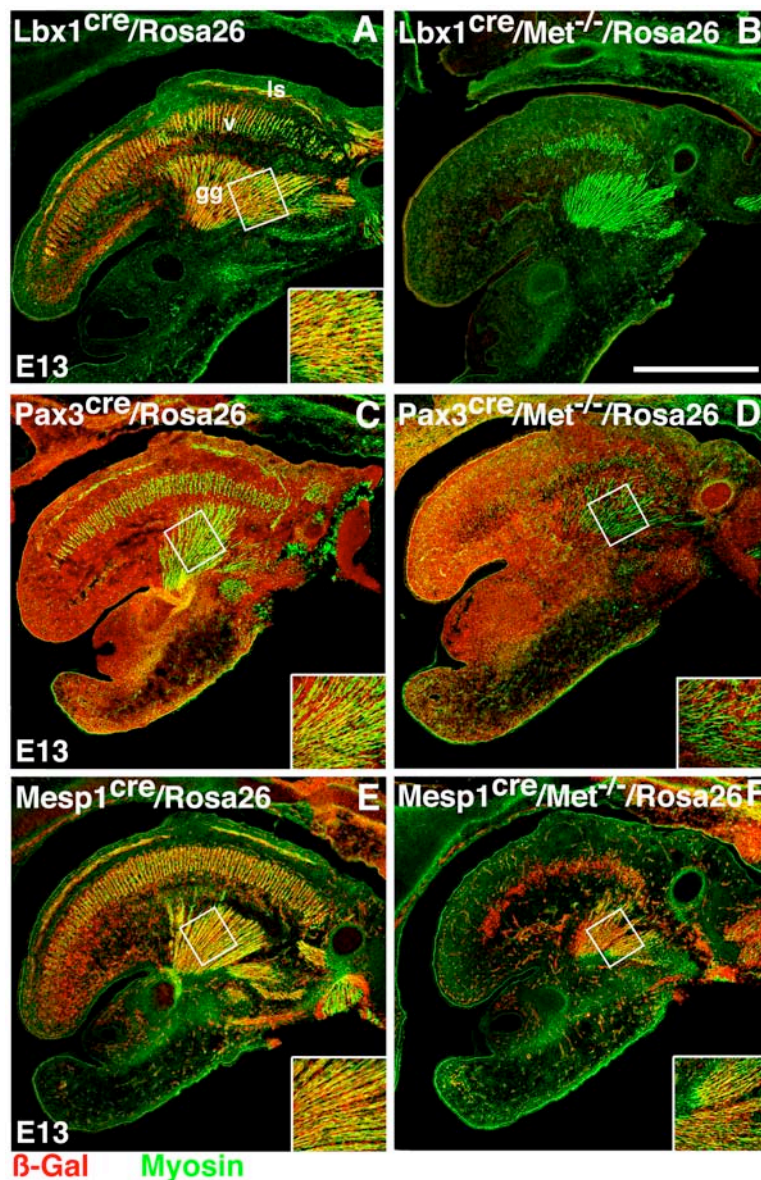


Abb. 3.8: Die Zungenmuskeln sind dualen Ursprungs: sie bestehen aus myogenen Vorläuferzellen der Somiten und des kranialen, paraxialen Mesoderms. Abgebildet sind Immunfluoreszenzanalysen von Sagittalaufnahmen der Zunge, inkubiert mit  $\beta$ -Gal- (rot) und Myosin- (grün) Antikörpern. Ein E13  $Lbx1^{Cre}/Rosa26$ -Embryo (A) zeigt die Bildung der Zungenmuskeln durch  $Lbx1$ -Derivate anhand der Ko-Färbung von  $\beta$ -Gal und Myosin. Es ist keine Kontribution von  $Lbx1$ -Derivaten an der Zunge von E13  $Lbx1^{Cre}/Met^{-}/Rosa26$ -Embryonen (B) zu verzeichnen. Es sind verbleibende, größenreduzierte, Zungenmuskeln in der  $Met$ -Mutante zu beobachten (B,D,F). In E13  $Pax3^{Cre}/Rosa26$ -Embryonen (C) sind  $Pax3$ -Derivate u.a. an der Bildung der Zungenmuskulatur beteiligt. In

der entsprechenden  $Met$ -Mutante (D) ist keine  $\beta$ -Gal-Expression in den verbleibenden Zungenmuskeln zu erkennen. Durch Ko-Expression von  $\beta$ -Gal und Myosin ist ein offensichtlicher Beitrag von  $Mesp1$ -Derivaten an der Entwicklung der Zungenmuskeln in E13  $Mesp1^{Cre}/Rosa26$ -Embryonen (E) und ebenfalls in verbleibenden Muskeln von  $Mesp1^{Cre}/Met^{-}/Rosa26$ -Embryonen (F) zu beobachten. Bildeinschübe sind Detailvergrößerungen aus den jeweils eingerahmten Bereichen (A,C,D,E,F). gg, Genioglossus; v, Musculus verticalis linguae; ls, Musculus longitudinalis superior. Größenmaßstab A-F 500 $\mu$ m.

Dennoch sind in  $Pax3^{Cre}/Rosa26$ - und  $Pax3^{Cre}/Met^{-}/Rosa26$ -Mäusen eine massive Anzahl von  $Pax3$ -Derivaten in der Zunge und im Kiefer zu beobachten. Diese könnten von Neuralleistenzellen im Kopf abstammen, die ebenfalls durch die Expression von  $Pax3$  charakterisiert sind, und die unter anderem die Bildung der Knorpel Elemente und Bindegewebe im Kiefer übernehmen.



Um eine Beteiligung von myogenen Vorläuferzellen aus dem kranialen, paraxialen Mesoderm an der Entwicklung der Zungenmuskeln zu analysieren, wurden auf die selbe Weise E13 *Mesp1<sup>Cre</sup>/Rosa26*-Embryonen untersucht. *Mesp1*-Expression ist im kranialen, paraxialen Mesoderm und in den am weitesten anterior gelegenen Somiten zu finden. Die Abb. 3.8E beweist durch die Ko-Expression von  $\beta$ -Gal und Myosin, dass myogene Vorläuferzellen des Kopfmesoderms zu Bildung der Zungenmuskulatur beitragen.  $\beta$ -Gal positive *Mesp1*-Derivate zeigen sich zudem auch in den größenreduzierten, proximalen Zungenmuskeln von *Met*-mutanten Embryonen (siehe Abb. 3.8F). Dadurch konnte ich demonstrieren, dass sich die Zungenmuskeln aus myogenen Vorläuferzellen des paraxialen Kopfmesoderms und der okzipitalen Somiten zusammensetzen.

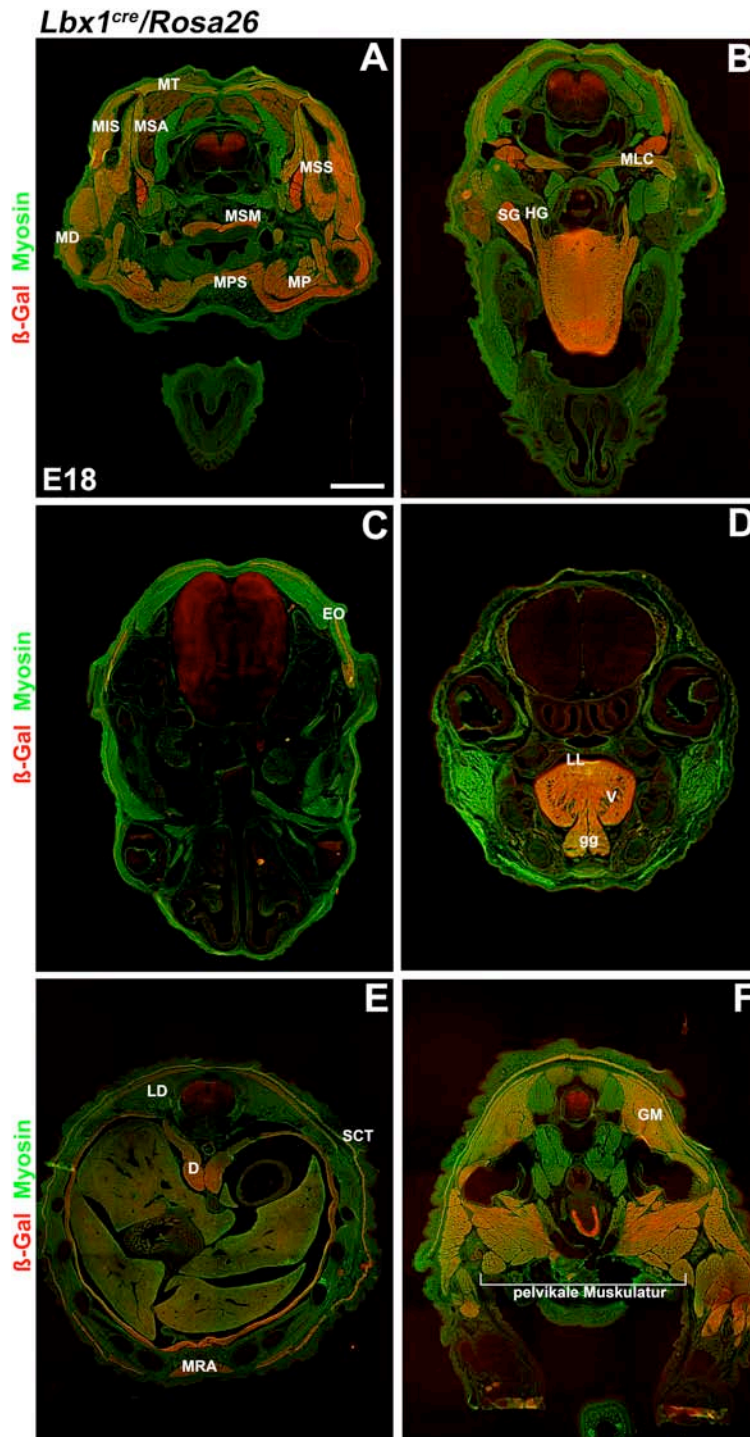
### 3.1.7 Gruppierende Katalogisierung *Lbx1*-abstammender Muskeln

In zahlreichen Publikationen wurden Muskeln migrierender, hypaxialer Vorläuferzellen durch das Fehlen dieser Muskeln in *Met*-Mutanten definiert. Partielle Kontribution kann jedoch auf diese Weise nicht immer erfasst werden. Weiterhin wurden hypaxiale Muskeln durch Huhn-Wachtel-Transplantationsexperimente bestimmt, in denen Transplantatgrenzen jedoch individuell gesetzt wurden. Daher habe ich die von *Lbx1*-exprimierenden Vorläuferzellen abstammenden Muskelanteile an Transversal- und Coronalschnitten von E18 *Lbx1<sup>Cre</sup>/Rosa26*-Embryonen mittels Immunfluoreszenz-Analyse untersucht.

Färbungen des unteren Rumpfes der Maus zeigten die Abstammung aller Muskeln in den Hinterextremitäten aus der *Lbx1*-abstammenden Zellpopulation. Weiterhin wurden perineale Muskeln (Beckenbodenmuskulatur) durch  $\beta$ -Galaktosidase-Expression gekennzeichnet, (darunter der levator ani, levator cloacae, sphincter ani externus, sphincter circular, transverse cloacae). Zusätzlich wurde der Gluteus maximus und Gluteus medius durch  $\beta$ -Galaktosidase-Antikörper visualisiert (Abb. 3.9 F), ebenso wie der zuvor genannte Musculus psoas major.

Deutliche Färbung im gesamten Rumpf zeigte der Musculus subcutaneous trunci, der Musculus latissimus dorsi, der Diaphragmamuskel und der Musculus rectus abdominis (Abb. 3.9 E). Andere Muskeln der Abdominalwand zeigten keine  $\beta$ -Galaktosidase-Expression. Weiterhin waren sämtliche Muskeln der

Vorderextremitäten (Daten nicht gezeigt), einschließlich der Muskeln des Schultergürtels (Abb. 3.9A)  $\beta$ -Galaktosidase-positiv. Von *Lbx1*-exprimierenden Vorläuferzellen abstammende Muskeln werden in der Tabelle 3.1 aufgelistet.



**Abb. 3.9: Muskeln *Lbx1*-abstammender Zellen.**

Immunfluoreszenzanalysen mit  $\beta$ -Gal- (rot) und Myosin- (grün) Antikörpern auf Transversal- (A,B,C,E, F) und Coronschnitten (D) von E18 *Lbx1<sup>Cre</sup>/Rosa26*-Embryonen (A-F). Gg Musculus genioglossus, LL Musculus longitudinalis linguae, HG Musculus hyoglossus, SG Musculus styloglossus, V Musculus verticalis, EO Musculus epicranii occipitalis, MT Musculus trapezius, MIS Musculus infraspinus, MSA Musculus serratus anterior, MD Musculus deltoideus, MPS Musculus pectoralis superficialis, LC Musculus longus capitis, MSS Musculus subscapularis, MSM Musculus sterno mastoideus (Halsmuskel), MP Musculus pectoralis major, MRA Musculus rectus abdominis, D Diaphragma, LD Musculus latissimus dorsi, SCT Muskulus subcutaneous trunki, MG Muskulus gluteus maximus. Größenmaßstab A-F 1000 $\mu$ m.

Wie zuvor beschrieben werden sowohl intrinsische wie extrinsische Muskeln der Zunge von *Lbx1*-abstammenden Zellen gebildet. Darunter fallen unter anderem: Musculus genioglossus, Musculus longitudinalis linguae, Musculus hyoglossus,

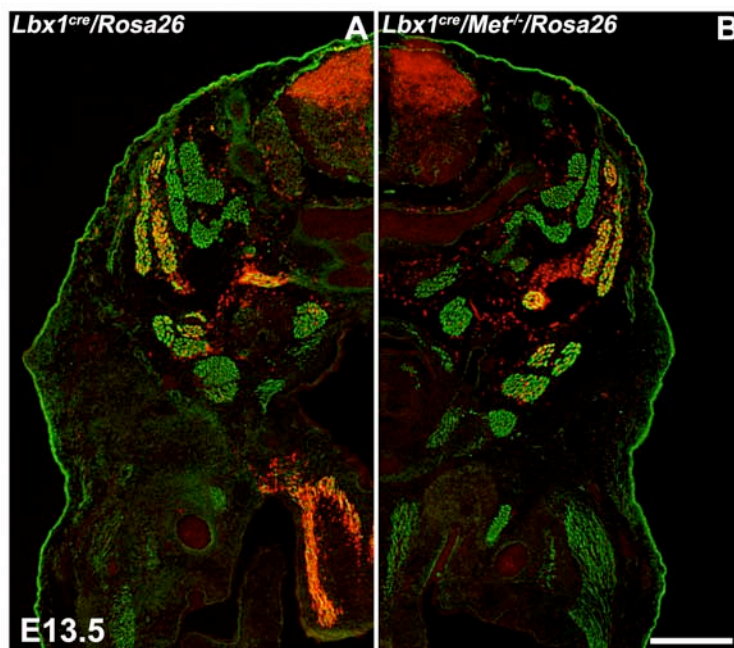
## Musculus styloglossus und Musculus verticalis.

|   |   |
|---|---|
| <b>Kopf</b>                                   | Musculus genioglossus<br>Musculus longitudinalis linguae<br>Musculus hyoglossus<br>Musculus styloglossus<br>Musculus verticalis<br>Musculus epicranius Occipitalis<br>Musculus geniohyoid<br>Musculus transversus linguae   |
| <b>Hals</b>                                   | Musculus sterno Mastoideus<br>Musculus longus capitis   |
| <b>Vorderextremität und Schultergürtels</b>   | Musculus trapezius (cervical/thoracic components)<br>Musculus infraspinus<br>Musculus teres minor und major<br>Musculus serratus Anterior<br>Musculus deltoideus<br>Musculus pectoralis superficialis<br>Musculus pectoralis profundus<br>Musculus subscapularis<br>Musculus supraspinatus<br>Musculus pectoralis Major<br>Musculus anconeus<br>Musculus biceps brachii<br>Musculus brachialis<br>Musculus triceps brachii<br>Musculus extensor carpi radialis<br>Musculus pronator teres<br>Musculus brachioradialis<br>Musculus flexor carpi radialis<br>Musculus extensor digitorum<br>Musculus extensor digit minimi<br>Musculus extensor carpi ulnaris<br>Musculus flexor carpi ulnaris<br>Musculus abductor pollicis longus<br>Musculus extensor pollicis brevis<br>Musculus extensor retinaculum |
| <b>Rumpf</b>                                  | Musculus latissimus dorsi<br>Musculus subcutaneous trunci<br>Diaphragma<br>Musculus rectus abdominis  |
| <b>Hinterextremität und perineale Muskeln</b> | Musculus iliopsoas<br>Musculus pectineus<br>Musculus adductor Longus<br>Musculus adductor magnus<br>Musculus gracilis<br>Musculus sartorius<br>Musculus rectus femoris<br>Musculus tensor faciae latae<br>Musculus vastus lateralis<br>Musculus vastus medialis<br>Musculus gastrocnemius<br>Musculus soleus<br>Musculus flexor digitorum longus<br>Musculus tibialis anterior<br>Musculus gluteus maximus<br>Musculus gluteus medius<br>Musculus levator ani<br>Musculus levator cloacae<br>Musculus sphincter ani externus<br>Musculus sphincter circular<br>Musculus transverse cloacae  |

Tab.3.1. Muskelgruppen, die einen Beitrag von Lbx1-abstammenden Zellen zeigen

Die Kopfmuskeln hingegen werden nicht von *Lbx1*-exprimierenden Muskelvorläuferzellen gebildet. Sie entwickeln sich aus dem kranialen, paraxialen Mesoderm (Noden and Francis-West, 2006; Wachtler and Jacob, 1986). Eine Ausnahme bildeten die oben genannten Zungenmuskeln und zusätzlich der *Musculus epicranii occipitalis*, der am Hinterkopf lokalisiert ist (siehe Abb. 3.9 C).

Um zwischen Muskeln unterscheiden zu können, die aus migrierenden und nicht-migrierenden Muskelvorläuferzellen des hypaxialen, *Lbx1*-exprimierenden Dermomyotoms gebildet werden, habe ich *Lbx1<sup>Cre</sup>/Rosa26*- mit *Lbx1<sup>Cre</sup>/Met<sup>-/-</sup>/Rosa26*-Embryonen am Tag E13.5 miteinander verglichen. Aufgrund der frühen, embryonalen Letalität von *Met*-Mutanten wurden Embryonen am Tag E13.5 untersucht.



**Abb.3.10: Bildung von Halsmuskeln durch nicht-migrierende, *Lbx1*-exprimierende Muskelvorläuferzellen.**

Immunohistochemieanalysen auf Transversalschnitten des Hals- und Kieferbereichs von E13.5 Embryonen des Genotyps *Lbx1<sup>Cre</sup>/Rosa26* (A) und *Lbx1<sup>Cre</sup>/Met<sup>-/-</sup>/Rosa26* (B). Myosin-Antikörper (grün) markieren differenzierte Muskelgruppen,  $\beta$ -Gal-Antikörper (rot) *Lbx1*-Derivate, die u.a. im *Musculus sternocleidomastoideus* (außen) und *Musculus splenius capitis*

(innen) in *Lbx1<sup>Cre</sup>/Rosa26*- und *Lbx1<sup>Cre</sup>/Met<sup>-/-</sup>/Rosa26*-Embryonen ko-lokalisiert sind. Größenmaßstab 500 $\mu$ m.

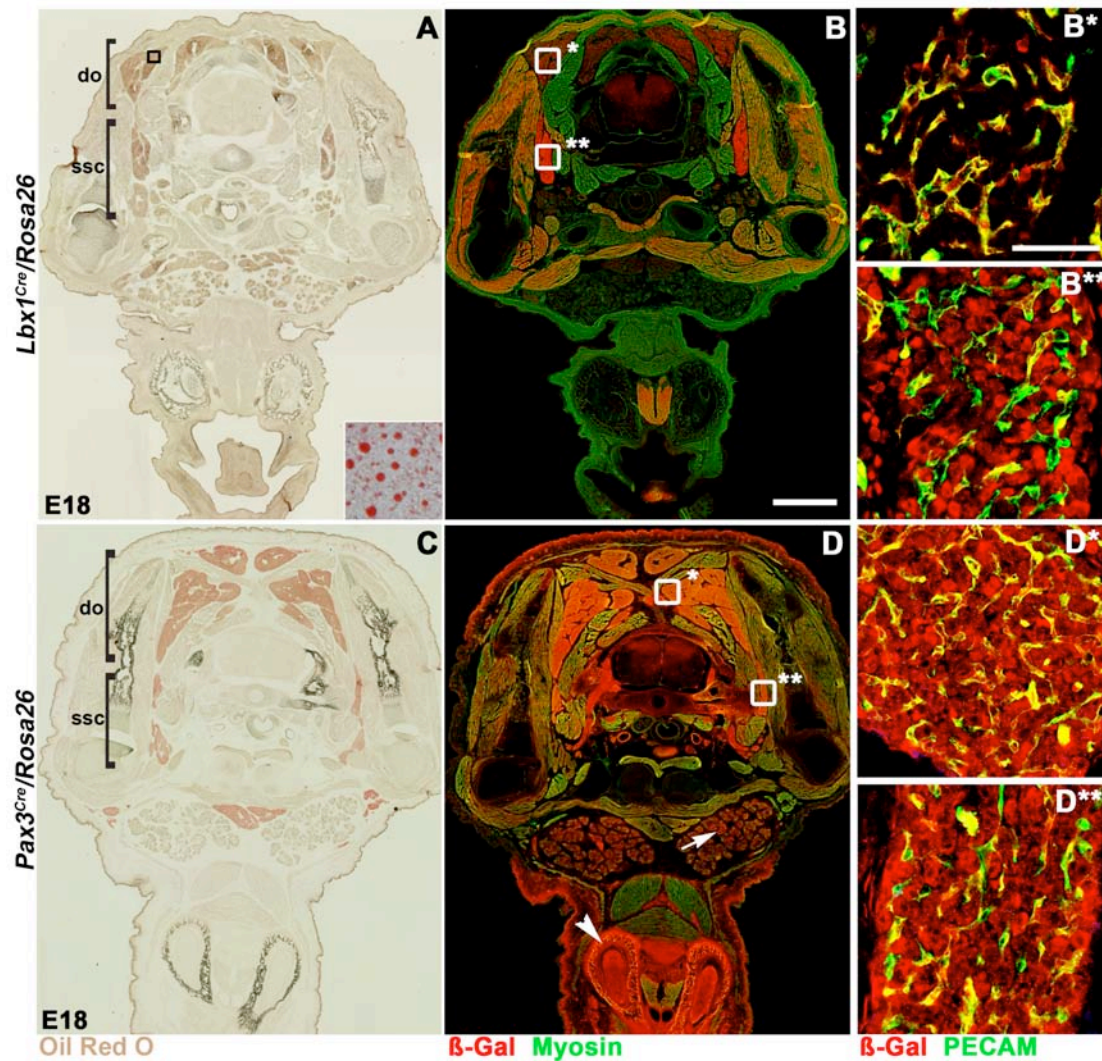
Immunhistologische Färbungen von Transversalschnitten der E13.5 *Lbx1<sup>Cre</sup>/Rosa26*-Mäuse zeigten durch die Expression von  $\beta$ -Galaktosidase die Herkunft der Extremitäten-, Schulter- und Halsmuskeln aus dem *Lbx1*-exprimierenden, ventralen Dermomyotom. In den *Met*-Mutanten wird das Fehlen der Extremitätenmuskeln offensichtlich. Einige Muskeln der Schulter- und Halsregion sind sowohl in *Lbx1<sup>Cre</sup>/Rosa26*-Embryonen als auch in den entsprechenden *Met*-Mutanten durch  $\beta$ -Galaktosidase-Expression gekennzeichnet, sind jedoch in ihrer Größe leicht reduziert

(Abb. 3.10). Dies weist darauf hin, dass auch nicht-migrierende, Lbx1-exprimierende Muskelvorläuferzellen in ventro-lateralen Bereichen des Dermomyotoms einiger Somiten für die Bildung spezifischer Muskelgruppen in Hals und Schulter (z.B. musculus sternocleidomastoideus (außen) musculus splenius capitis (innen)) beitragen.

### **3.1.8 Verschiedene Bereiche braunen Fettgewebes finden ihren Ursprung in unterschiedlichen Kompartimenten des Dermomyotoms**

In Abb. 3.11 A+B ist auf Schulter- und Halsebene der transversal geschnittenen E18 *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*-Embryonen  $\beta$ -Galaktosidase-positives (Abb.3.11B eingerahmte Bereiche) Gewebe sichtbar, das nicht den Skelettmuskelmarker Myosin exprimiert. Die Morphologie und Lokalisierung dieses Gewebes zeigten, dass es sich hierbei vermutlich um Fettgewebe handelte. Im Säugetier existieren zwei Arten von Fettgewebe, das braune und das weiße Fettgewebe. Während weißes Fett sich hauptsächlich postnatal entwickelt, bildet sich das braune Fettgewebe in ausgeprägter Form schon während der Embryonalentwicklung. Zusätzlich unterscheiden sich braunes und weißes Fett morphologisch voneinander. Die Zellen des braunen Fettgewebes sind kleiner als die des weißen. Zudem enthält braunes Gewebe mehr Blutgefäße und ist besser innerviert.

Zwei segmentielle Transversalschnitte wurden für Färbungen verwendet: ein Schnitt wurde mit  $\beta$ -Gal- und Myosin-Antikörpern inkubiert (Abb.3.11B), der zweite Schnitt wurde einem "Oil Red O stain" (Abb.3.11A) unterzogen, welches die Fetttröpfchen im Fettgewebe anfärbt (Bildeinschub A). Die Antikörperfärbung zeigte, wie schon zuvor beobachtet,  $\beta$ -Galaktosidase-positives Gewebe, welches kein Myosin exprimiert. Die Oil Red O Färbung des nachfolgenden Schnittes bestätigte, dass es sich dabei um Fettgewebe handelte. Dieses Gewebe war an mehreren Orten innerhalb des zentralen Thorax und Nacken verteilt, die ich als dorsal (do) und subscapular (ssc) beschreiben möchte.



**Abb. 3.11: Lbx1-Derivate bilden subscapuläres, Pax3-Derivate subscapuläres und dorsales braunes Fettgewebe.** Immunfluoreszenzanalysen mit  $\beta$ -Gal- (rot) und Myosin- (grün) Antikörpern auf Transversalschnitten von E18 *Lbx1<sup>Cre</sup>/Rosa26*-Embryonen (B).  $\beta$ -Gal-positive, Myosin-negative Gewebe (B, eingerahmte Bereiche) werden als Fettgewebe (braun) mittels Oil Red O stain auf parallelem Kryoschnitt identifiziert (A). Einteilung des Fettgewebes in dorsale (do) und subscapuläre (ssc) Bereiche. Einschub zeigt eine Vergrößerung aus eingerahmten, Oil Red O gefärbten Fettgewebe (A). Detaildarstellung eingerahmter Bereiche in (B) zeigen dorsales (Rahmen B\*) und subscapuläres (Rahmen B\*\*) Fett. (B\*) zeigt Ko-Lokalisation von Lbx1-Derivaten mit Endothelzellen mittels  $\beta$ -Gal- (rot) und PECAM- (grün) Antikörper im dorsalen Fettgewebe. In (B\*\*) wird die Herkunft der braunen, subscapulären Fettzellen von somitischen, Lbx1-exprimierenden Zellen beobachtet. Weitere Lbx1-Derivate (rot) sind mit Endothelzellen (PECAM, grün) ko-lokalisiert. Immunfluoreszenzanalysen auf Transversalschnitten von E18 *Pax3<sup>Cre</sup>/Rosa26*-Embryonen zeigen Pax3-Derivate mittels  $\beta$ -Gal- (rot) Antikörper und Skelettmuskelgewebe mittels Myosin- (grün) Antikörper (D).  $\beta$ -Gal-positives, Myosin-negatives Gewebe (eingerahmte Bereiche) wurde durch eine Oil Red O-Färbung eines parallelen Kryoschnitts (C) als Fettgewebe identifiziert. Analog zu (A) wird das Fettgewebe in dorsale (do) und subscapuläre (ssc) Bereiche unterteilt. Detailvergrößerungen eingerahmter Bereiche in (D), zeigen dorsales (D\*) und subscapuläres (D\*\*) Fettgewebe, durch  $\beta$ -Gal- (rot) und PECAM- (grün) Antikörper gefärbt. Es wird eine Ko-Lokalisation von  $\beta$ -Gal-positiven Zellen und PECAM-positiven Endothelzellen beobachtet (D\*+D\*\*). Pax3-Derivate (rot) bilden zudem braune Fettzellen in dorsalen (D\*) und subscapulären (D\*\*) Fettgeweben. Pax3-Derivate tragen desweiteren zu Knorpel- und Bindegewebe (D, Pfeilkopf) und zur Submandibulardrüse (D,

Pfeil) bei. Größenbalken B\*, B\*\*, D\*, D\*\* 50µm, A, B, C, D 1mm.

Die Immunfluoreszenzanalyse der Abb. 3.11B, zeigt Unterschiede in der Signalintensität von  $\beta$ -Galaktosidase-positiven Fraktionen des Fettgewebes. Durch einen Rahmen markiert, wurden dorsales (\*) und subscapuläres (\*\*) Fett detailliert dargestellt. Die Vergrößerungen dieser Bereiche zeigten, dass im dorsalen Fettgewebe (Abb.3.11B\*) Lbx1-Derivate zahlreiche Endothelzellen bildeten, wie anhand der Ko-Expression mit PECAM demonstriert werden konnte. Im kompakt gefärbten, subscapulären Gewebe (Abb.3.11B\*\*) waren neben vielen Endothelien auch die Fettzellen durch  $\beta$ -Galaktosidase markiert. Um unspezifische Antikörperbindung auszuschließen, wurden Parallelschnitte X-Gal gefärbt, die die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase im subscapulären Fett bestätigten (Daten nicht gezeigt).

Transversalschnitte von E18 *Pax3<sup>cre</sup>/Rosa26*-Embryonen zeigten ebenfalls dorsale und subscapuläre  $\beta$ -Galaktosidase-positive Fettgewebe (siehe Abb. 3.11 C+D). Im Gegensatz zu Lbx1-Derivaten, wurden Pax3-Derivate in Endothelien und in braunen Fettzellen sowohl im subscapulären, als auch im dorsalen Fettgewebe registriert (siehe Abb. 3.11D\*+D\*\*). Immunreaktivität von  $\beta$ -Gal-Antikörpern war in der dorsalen Dermis und im gesamten Knorpel- und Bindegewebe zu finden, da Pax3 ebenfalls in Neuralleistenzellen exprimiert wird. Pax3-Derivate waren auch in der Submandibulardrüse zu finden (Abb. 3.11D, Pfeil). Dort handelte es sich aber weder um Endothelzellen noch um glatte Muskelzellen.

Zusammenfassend zeigten diese Daten, dass der ventrale, Lbx1-exprimierende Teil des Dermomyotoms subscapuläre, braune Fettzellen bildet und desweiteren die Endothelien, die sowohl subscapuläres als auch dorsales, braunes Fettgewebe infiltrieren. Das gesamte Dermomyotom hingegen bildet braune Fettzellen und Endothelien des dorsalen und des subscapulären Fetts. Somit werden spezifische Bereiche von braunem Fett und Endothelien aus definierten Kompartimenten des Dermomyotoms generiert.

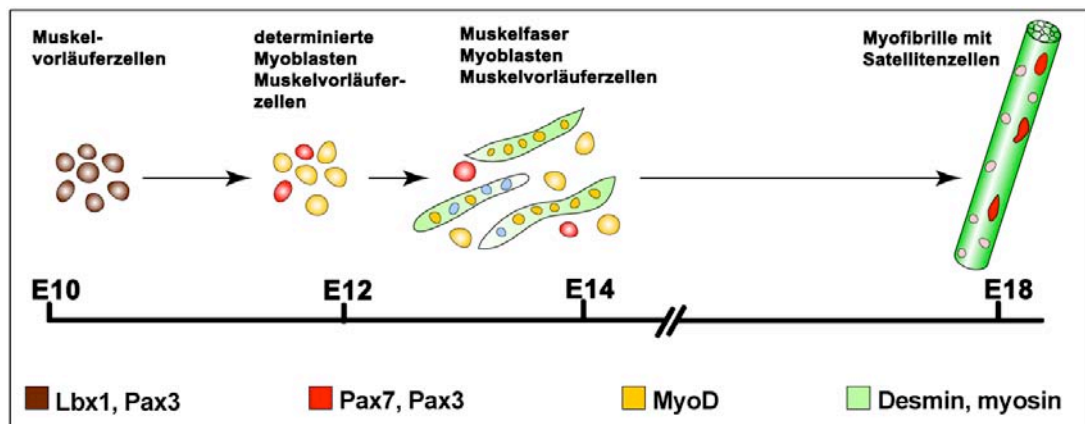
### **3.2 Die Funktion von RBP-J in der Entwicklung der hypaxialen und epaxialen Muskulatur**

Der zweite Teil meiner Dissertation befasst sich mit der Funktion des Transkriptionsfaktors RBP-J in der Entwicklung der hypaxialen Muskulatur. In diesem Projektteil sind einige Ergebnisse in Zusammenarbeit mit Dr. Elena Vasyutina entstanden. Diese Ergebnisse wurden gemeinsam publiziert (Vasyutina et al., 2007).

#### **3.2.1 *Lbx1<sup>cre</sup>* erzeugt konditionelle Mutagenese des *Rbp-j*-Gens in hypaxialen Muskelvorläuferzellen**

Während der Embryonalentwicklung wird die Differenzierung der Lbx1-positiven, Pax3-positiven Muskelvorläuferzellen durch die Aktivierung von myogenen Determinierungsfaktoren wie Myf5 und MyoD initiiert. Durch die Expression dieser Faktoren wandeln sich die Vorläuferzellen in Myoblasten um (Arnold and Braun, 2000; Buckingham, 2001; Parker et al., 2003). Daraufhin beginnen einkernige Myoblasten muskelspezifische Gene zu exprimieren (Desmin, Myosin) und fusionieren zu vielkernigen Muskelfasern, den Grundeinheiten des maturen Muskels. Während in den meisten Muskelvorläuferzellen die Differenzierung eingeleitet wurde, bleibt eine kleine Population von Pax7 exprimierenden Vorläuferzellen während der gesamten Entwicklung erhalten. In der Extremität geht diese aus der Pax3 exprimierenden Population hervor. Diese Population besitzt das Potential zur myogenen Differenzierung und aus ihr geht die spätere Satellitenzellpopulation der adulten Muskulatur hervor (Gros et al., 2005; Kassam-Duchossoy et al., 2005; Relaix et al., 2005). Welcher molekulare Mechanismus den Erhalt dieser Population von Vorläuferzellen sicherstellt war zu Beginn meiner Arbeit unklar.



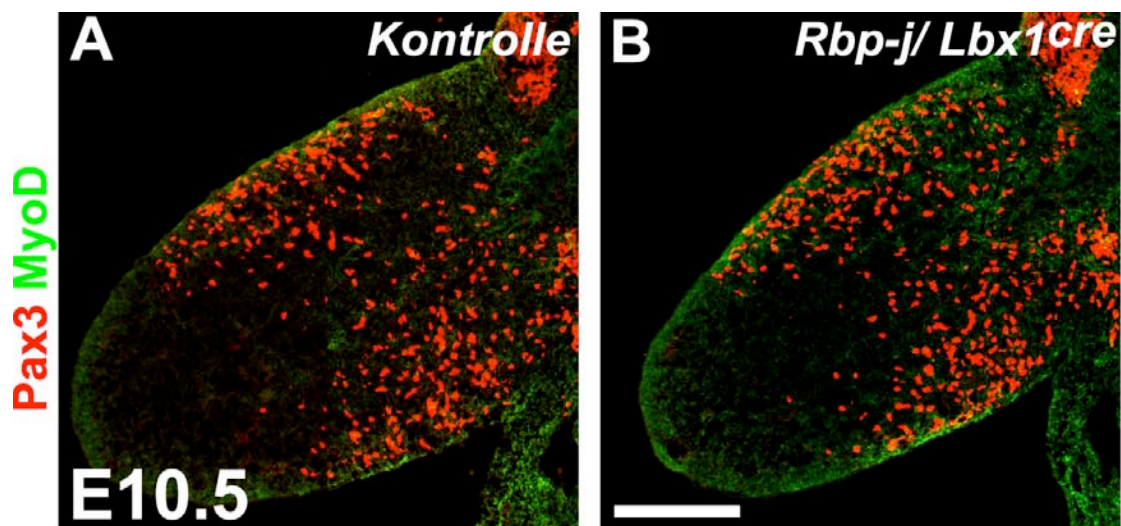


**Abb.3.12: Schematische Darstellung der Muskeldifferenzierung.** Die Expression von Transkriptionsfaktoren und muskelspezifischen Genen in der Muskelentwicklung sind farblich markiert (verändert nach Vasyutina et al., 2007).

Ein Signalweg, der möglicherweise eine Rolle spielt, ist der Notch-Signalweg, da Notch in vielen Geweben über Differenzierung, Proliferation und Erhalt von Vorläuferzellen entscheidet (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Lai, 2004; Lewis, 1998). Im Säugetier existieren vier Notch-Rezeptoren und mind. fünf Liganden, die zum Teil in redundanter Weise exprimiert werden. Da der Transkriptionsfaktor RBP-J der hauptsächliche Effektor des Notch-Signals ist, können durch seine Inaktivierung die Weiterleitung aller Notch-Signale (mit eventuell redundanter Funktion) untersucht werden. Da *Rbp-j* Knock-out Mäuse durch eine frühe, embryonale Letalität (E9) (de la Pompa et al., 1997) gekennzeichnet sind, sollte in diesem Projekt *Rbp-j* nur in migrierenden Muskelvorläuferzellen der hypaxialen Muskulatur inaktiviert werden. Hierzu verwendete ich eine transgene Mauslinie, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des *Lbx1*-Promotors exprimiert. Um die Eignung dieser Mauslinie zu prüfen, verpaarte ich sie zunächst mit der Reporterlinie *Rosa26<sup>lacZ</sup>*. Durch X-Gal-Färbung und durch Detektion mit  $\beta$ -Gal- Antikörpern zeigte sich, dass die *Lbx1<sup>Cre</sup>*-TG-Maus effiziente Rekombination in migrierenden Muskelvorläuferzellen der Extremitäten und der Brachialbögen erzeugt (Daten nicht gezeigt). Eine unvollständige Rekombination in myogenen Vorläuferzellen die in das Zwerchfell migrieren wurde bei nachfolgenden Versuchen festgestellt. Die *Lbx1<sup>Cre</sup>*-TG-Mauslinie war also geeignet, um *Rbp-j* in migrierenden Muskelvorläuferzellen der hypaxialen Muskulatur zu inaktivieren. Das *Rbp-j*-Allel, in dem essentielle, kodierende Exons durch loxP-Sequenzen flankiert sind, wurde uns von Prof. Tasuku Honjo zu Verfügung gestellt (Tanigaki et al., 2002). Eine embryonale Letalität konnte in *Rbp-j<sup>lox/lox</sup>/Lbx1<sup>Cre</sup>*-Tieren nicht beobachtet werden

### 3.2.2 RBP-J hat keinen Einfluß auf die Migration von myogenen Vorläuferzellen

Die *Rbp-j<sup>flox/flox</sup>/Lbx1<sup>cre</sup>TG*-Mäuse werde ich im folgenden als *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Mutante bezeichnen. Die *Rbp-j*-Deletion in Muskelvorläuferzellen der Vorderextremität zeigte keine Einwirkung auf die Migrationsfähigkeit dieser Zellen. Anzahl und Verteilung von Pax3 oder Lbx1 exprimierenden myogenen Progenitorzellen in der Vorderextremität in *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Mäusen am Embryonaltag E10.5 ist ähnlich denen in Kontroll-Mäusen (Abb. 3.13A,B, Daten nicht gezeigt). Zu diesem Zeitpunkt werden Muskeldeterminierungsfaktoren wie MyoD noch nicht exprimiert (Abb. 3.13. A+B).

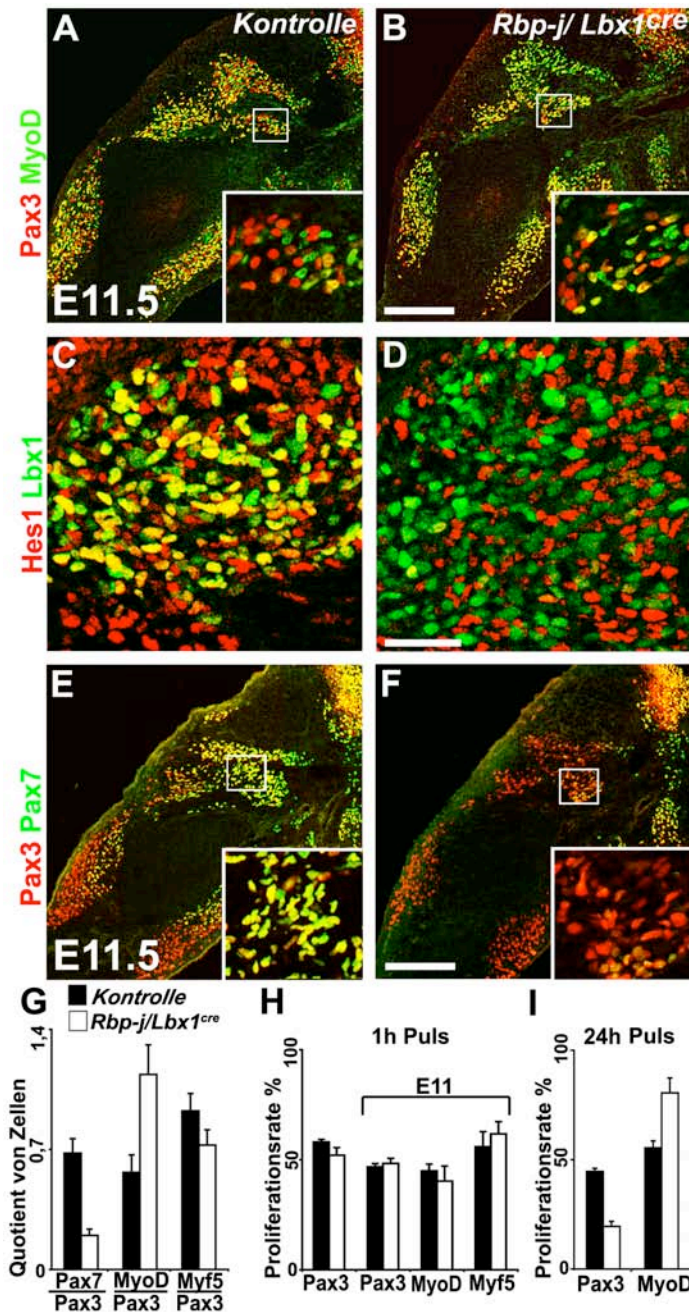


**Abb. 3.13: Migration von myogenen Vorläuferzellen in die Vorderextremität von *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Mäusen.** Immunfluoreszenzanalyse von myogenen Vorläuferzellen von E10.5 Kontroll- (A) und *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Embryonen (B) auf Longitudinalansichten der Vorderextremität mit Pax3- (rot) und MyoD- (grün) Antikörpern. Die Anzahl und Verteilung von myogenen Vorläuferzellen in Mutante und Kontrolle sind vergleichbar. Zu diesem Zeitpunkt wird MyoD noch nicht exprimiert. Größenskala 200µm.

### 3.2.3 Veränderte MyoD- und Pax7-Expression in der Vorderextremität von E11 *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Mutanten

In den nachfolgenden Experimenten wurden die Folgen der *Rbp-j*-Mutation auf spätere Entwicklungsstadien untersucht. Am Embryonaltag E11.5 wurde in der Mehrheit aller Muskelvorläuferzellen der Vorderextremität von Kontrolltieren Pax3

exprimiert (Abb. 3.14 A). Fast alle dieser Pax3-positiven Muskelvorläuferzellen koexprimierten den Transkriptionsfaktor Lbx1 (Daten nicht gezeigt). Auch in *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Embryonen waren Pax3-exprimierende Vorläuferzellen (die Lbx1 koexprimieren) vorhanden, ihre Anzahl war jedoch reduziert (Abb. 3.14 B).



**Abb. 3.14: Veränderung der Proteinexpression in der Vorderextremität von *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Mäusen am Tag E11.5 der Embryonalentwicklung.** Myogene Zellen werden mittels Immunfluoreszenzfärbungen auf Längsschnitten der Vorderextremität von E11.5 *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*- und Kontrollmäusen mit Pax3- (rot) und MyoD- (grün) Antikörpern (A+B), Hes1- (rot) und Lbx1- (grün) (C+D), sowie Pax3- (rot) und Pax7- (grün) Antikörpern analysiert. Vergrößerungen der gerahmten Bereiche werden als Bildeinschub rechts unten gezeigt (A,B,E,F). Beobachtet wird eine erhöhte Expression von MyoD und eine stark reduzierte Expression von Pax7 in *Rbp-j*-defizienten Muskelvorläuferzellen. Myogene Zellen der proximalen Vorderextremität werden mittels Hes1- (rot) und Lbx1- (grün) Antikörper in konditionalen *Rbp-j*-Mutanten und Kontrollmäusen analysiert (C+D). Es zeigt sich eine starke Reduktion der Hes1-Expression in Muskelvorläuferzellen. (G) Das Verhältnis von Pax7/Pax3, MyoD/Pax3 und Myf5/Pax3 wurde E11.5 quantifiziert. (H) Der Proliferationsindex wurde mittels BrdU-Markierung an E10.5 und E11.5 Tieren ermittelt; dargestellt ist der prozentuale Anteil von Pax3+, MyoD+ und Myf5+ Zellen, die 1h nach BrdU-Applikation markiert sind. (I) Die prozentualen Anteile von Pax3+ und MyoD+-Zellen, die BrdU inkorporiert haben, wurden 24h nach BrdU-Gabe analysiert. Die BrdU-Applikation erfolgte am Tag E10.5. Größenbalken A+B und E+F 200µm, C+D 50µm.

Zum Zeitpunkt E11.5 konnten viele Zellen in Kontroll-Embryonen beobachtet

werden, die bereits den Muskeldeterminierungsfaktors MyoD exprimierten. Ein großer Anteil MyoD-exprimierender Vorläuferzellen ko-exprimierte Pax3 (Abb. 3.14 A).

In *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Mäusen waren deutlich mehr MyoD-positive Myoblasten als in Kontrolltieren zu beobachten (Abb. 3.14 A+B). Das Verhältnis von MyoD-Zellen gegenüber Pax3-positiven Zellen war um fast 100% erhöht (Quantifizierung in Abb. 3.14 G). Demnach hatten zu viele Progenitorzellen die Differenzierung durch Expression von MyoD eingeleitet. Das Verhältnis von Myf5 zu Pax3-positiven Zellen zeigte hingegen keine signifikante Veränderung (Abb. 3.14 G). Das Proliferationsverhalten von Pax3, MyoD oder Myf5-positiven Myoblasten am Tag E10.5 und E11.5 war unverändert zwischen Kontroll- und *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Mäusen. Dies zeigte sich durch einstündige Inkorporation von BrdU in das Genom sich teilender Zellen, und durch das Auszählen der dadurch markierten Zellen (Abb. 3.14 H). Desweiteren konnte durch TUNEL-Färbung keine Veränderung im Apoptoseverhalten in der sich entwickelnden Vorderextremität am Tag E11.5 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz dazu zeigte jedoch ein "Pulse-Chase"-Experiment, bei dem wir E11.5 Embryonen analysierten, denen 24 Stunden zuvor BrdU appliziert wurde, dass ein sehr viel größerer Anteil von BrdU-positiven Zellen (80%) in *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Embryonen MyoD exprimierte, als in Kontroll-Embryonen (55%). Zusätzlich war der Anteil der BrdU-positiven Pax3 exprimierenden Zellen (20%) in *Rbp-j*-mutanten Embryonen im Vergleich zu Kontroll-Embryonen (45%) reduziert (Abb. 3.14 I). Demnach verschob sich in konditionellen *Rbp-j*-defizienten Embryonen das Gleichgewicht proliferierender Vorläuferzellen, die am Tag E10.5 mit BrdU markiert wurden, zu Zellen, welche den Differenzierungsprozess durch die Expression von MyoD eingeleitet hatten. Gleichzeitig kam es zur Reduktion der Pax3-exprimierenden Zellen, also der Muskelvorläuferzellen.

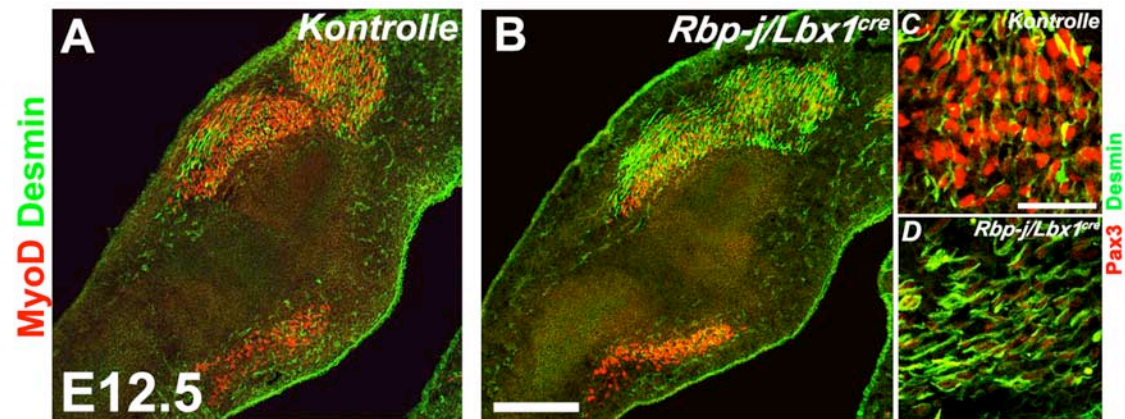
In Kontroll-Embryonen wurde anhand von Immunfluoreszenzanalysen die Expression von *Hes1* in myogenen und mesenchymalen Zellen der Extremität am Entwicklungstag E11.5 untersucht (Abb. 3.14 C). *Hes1* ist als direktes Zielgen von RBP-J bekannt, dessen Expression durch den Notch-Signalweg induziert wird. In Kontroll-Tieren wurde eine breite Ko-Expression von *Hes1* mit *Lbx1* beobachtet. Die Mutation von *Rbp-j* in Muskelvorläuferzellen führte zu einem massiven Verlust von

Hes1 in Lbx1-positiven Zellen (Abb. 3.14 D). Dadurch wurde bestätigt, dass *Rbp-j* effizient mutiert worden war.

In den Extremitäten von Kontroll-Tieren waren viele Pax3-positive Muskelvorläuferzellen, insbesondere in der proximalen Extremität zu beobachten, die den Transkriptionsfaktor Pax7 ko-exprimierten (Abb. 3.14 E). Aus dieser Zellpopulation entstehen die Muskelvorläuferzellen für die weitere, fötale Embryonalentwicklung und die Satellitenzellen der postnatalen und adulten Muskulatur. Pax7-Zellen waren in *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Embryonen in ihrer Anzahl extrem reduziert, und auch die Pax7-Expressionsstärke war stark vermindert (Abb. 3.14 F). Auch in späteren Stadien war die Pax7 Expression stark reduziert. Dies könnte bedeuten, das RBP-J bei der Kontrolle der Pax7-Expression beteiligt ist.

### **3.2.4 Verfrühte und fortgeschrittene Differenzierung von Myoblasten in *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Embryonen**

In der frühen Differenzierungsphase exprimieren Myoblasten bereits das Intermediärfilamentprotein Desmin. Am Tag E11.5 konnte weder in *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Mutanten noch in Kontroll-Embryonen Desmin detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Am Embryonaltag E12.5 setzte die Desmin-Expression bei Kontrolltieren ein. In *Rbp-j*-mutanten Embryonen war zum gleichen Zeitpunkt bereits eine stärkere und breitere Expression von Desmin zu beobachten (Abb. 3.15 A+B). Zu diesem Zeitpunkt zeigten *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-mutante Tiere zudem eine ausgeprägte Reduktion der MyoD-exprimierenden Myoblasten in der Extremität (Abb. 3.15B) verglichen mit Kontrolltieren. Auch Pax3-positiv Muskelvorläuferzellen waren zu diesem Zeitpunkt in *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Embryonen stark reduziert (Abb.3.15C,D).

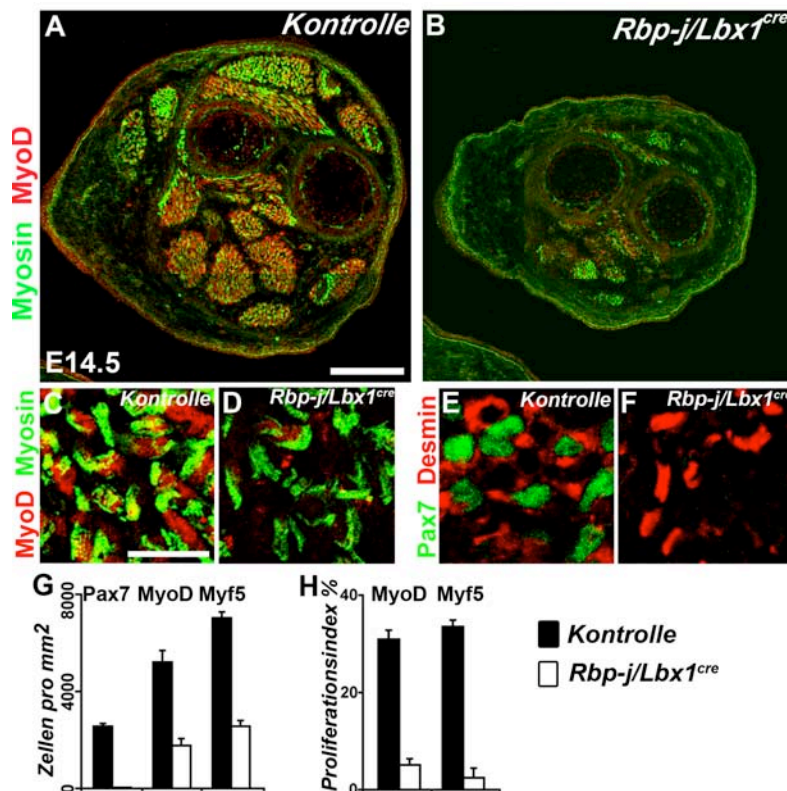


**Abb. 3.15 Vermehrte Expression des Differenzierungsmarkers Desmin in *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Mäusen.** Immunfluoreszenzfärbungen auf Längsschnitten der Vorderextremität von Kontroll- (A) und *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Embryonen (B) am Tag E12.5 zeigen eine reduzierte Anzahl MyoD- (rot) exprimierender Myoblasten, begleitet von einer ausgeprägteren Expression von Desmin (grün). (C+D) Immunfluoreszenzfärbungen der Muskelmassen von Kontroll- (C) und *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Embryonen (D) mit Pax3- (rot) und Desmin- (grün) Antikörpern: Pax3-positive Muskelvorläuferzellen sind in *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Embryonen reduziert (D). Größenskala A+B 200µm, C+D 50µm.

Aus diesen und den oben gezeigten Ergebnissen ist zu schließen, dass in *Rbp-j*-mutanten Embryonen am Tag E11.5 die Differenzierung von Muskelvorläuferzellen zu breit eingeleitet wurde und somit E12.5 eine fortgeschrittenere und ausgeprägtere myogene Differenzierung festgestellt werden konnte. Parallel zu dieser frühzeitigen Differenzierung verschwanden die Pax3-exprimierenden Muskelvorläuferzellen, da sie wahrscheinlich verfrüht aufgebraucht wurden.

### 3.2.5 Reduzierte Muskelgröße in *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Embryonen und Verlust von myogenen Vorläuferzellen

MyoD und Myf5 fungieren zu Beginn der Myogenese als Determinierungsfaktoren, deren Expression herabreguliert wird, wenn Myoblasten zu Muskelfasern fusionieren. Zu diesem Zeitpunkt setzt die Synthese von muskelspezifischen Proteinen ein, wie zum Beispiel dem skelettmuskel-spezifischen Motorprotein Myosin, das u.a. für die Kontraktibilität der Muskeln verantwortlich ist. Myosin-Expression war in allen Muskelgruppen der Vorderextremität von Kontroll- sowie *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Embryonen am Tag E14.5 zu beobachten (Abb. 3.16A+B), was auf einen normal fortgeschrittenen Differenzierungsprozess hindeutete. Jedoch waren die Muskeln der *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Mutanten extrem in ihrer Größe reduziert (Abb. 3.16 B).



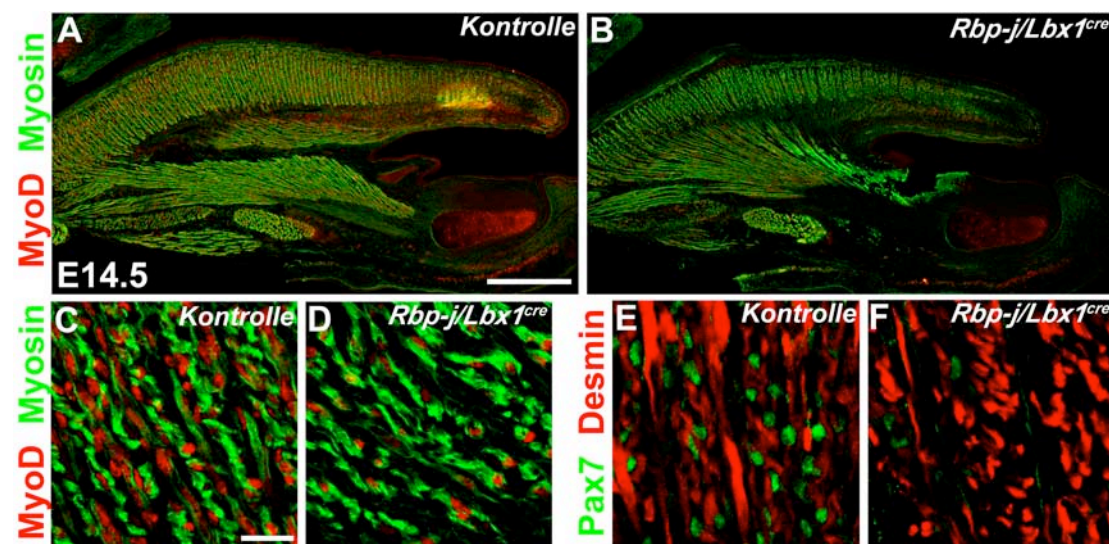
**Abb. 3.16: Differenzierte Muskelgruppen in *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Embryonen sind in ihrer Größe reduziert und enthalten keine Pax7-positiven Zellen.** Immunfluoreszenzfärbungen zeigen differenzierte Muskeln auf Transversalschnitten der unteren Vorderextremität von E14.5 *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*- (B,D,F) und Kontroll-Embryonen (A,C,E) mit Myosin- (grün) und MyoD- (rot) Antikörpern (A,B,C,D), sowie Desmin- (rot) und Pax7- (grün) Antikörpern (E,F). (G) zeigt die Quantifizierung von Pax7+, MyoD+ und Myf5+ Zellen pro mm<sup>2</sup>

in E14.5 *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*- und Kontroll-Embryonen. (H) zeigt den Anteil proliferierender MyoD+ und Myf5+ Zellen die 1h nach Injektion BrdU inkorporiert haben. Quantifiziert wurden Querschnitte der unteren Extremität von E14.5 *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*- und Kontroll-Embryonen. Größenmaßstab A+B 250µm, C, D, E, F 20µm.

Während der gesamten Embryonalphase sind MyoD-positive Zellen im Muskel von Kontroll-Mäusen vorhanden. Sie sind mitotisch aktiv und sind für die zweite Welle der Muskelbildung essentiell, in der sie zu Sekundärfasern der Muskeln differenzieren (Ross et al. 1987; Buckingham, 2003). MyoD-exprimierende Myoblasten waren in den Muskeln der unteren Vorderextremität von E14.5 Kontrolltieren in großer Zahl vorhanden (Abb. 3.16 A, C). In *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>* Mäusen hingegen, waren in diesem Entwicklungsstadium MyoD-positive Myoblasten stark dezimiert (Abb. 3.16 B+D; Quantifizierung Abb. 3.16 G). Ebenso waren Myf5-positive Myoblasten nur in stark reduzierter Zahl vorhanden (Quantifizierung Abb. 3.16 G). Die Proliferationsfähigkeit dieser Myoblasten wurde anhand des BrdU-Einbaus, eine Stunde nach der Injektion, ermittelt. Während sich in Kontrolltieren etwa 40% aller Myoblasten teilten, war die Proliferation von MyoD- und Myf5-positiven Myoblasten in *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Mäusen am Tag E14.5 beinahe zum Erliegen gekommen (Abb. 3.16 H).

Darüber hinaus, fehlten Vorläuferzellen gänzlich in *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Mäusen am Tag E14.5. Zum Beispiel konnten in *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Mäusen am Tag E14.5 keine Pax7-

positiven Vorläuferzellen detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurden in Kontroll-Embryonen zahlreiche Vorläuferzellen anhand ihrer Pax7-Expression identifiziert (Abb. 3.16 E+F). Die Marker Lbx1 und Pax3 der Progenitorzellen in den Embryonalstadien E10-E12.5 werden am Tag E14.5 in *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*- und in Kontroll-Tieren nicht mehr exprimiert.



**Abb. 3.17: Reduktion der Zungenmuskeln in *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Mäusen durch den Verlust mitotisch aktiver Myoblasten und Vorläuferzellen.** Sagittale Kryoschnitte der Zunge von E14.5 Kontroll- und *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Mäusen wurden für Immunfluoreszenzanalysen mit Myosin- (grün) und MyoD- (rot) (A, B, C, D), sowie Pax7-(grün) und Desmin- (rot) (E+F) Antikörpern gefärbt. Die Anzahl der MyoD+ Myoblasten ist in *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Embryonen reduziert (D), Pax7+ Vorläuferzellen fehlen vollständig (F). Größenmaßstab (A+B) 500µm, (C, D, E, F) 25µm.

Da Lbx1-exprimierende Muskelvorläuferzellen von den okzipital lokalisierten Somiten in die Brachialbögen migrieren, um dort die Muskulatur der Zunge zu bilden, waren auch in der Zunge von konditionellen *Rbp-j*-Mutanten eine Reduktion der intrinsischen Zungenmuskeln zu beobachten (Abb. 3.17 A+B). Vergleichbar zur Vorderextremität, war in *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Embryonen am Entwicklungstag E14.5 eine reduzierte Anzahl von MyoD-positiven und Myf5-positiven Myoblasten zu registrieren, und desweiteren eine extreme Abnahme der mitotischen Aktivität dieser verbleibenden Myoblasten (Abb. 3.17 C+D, Daten nicht gezeigt). Pax7-exprimierende Vorläuferzellen, die in Kontrolltieren zahlreich vorhanden waren, fehlten ebenfalls (Abb. 3.17, E+F). Diese phänotypischen Beobachtungen konnten in der beschriebenen Ausprägung hauptsächlich im distalen Zungenmuskel verzeichnet werden. Da die Zungenmuskulatur aus zwei unterschiedlichen Ursprüngen gebildet

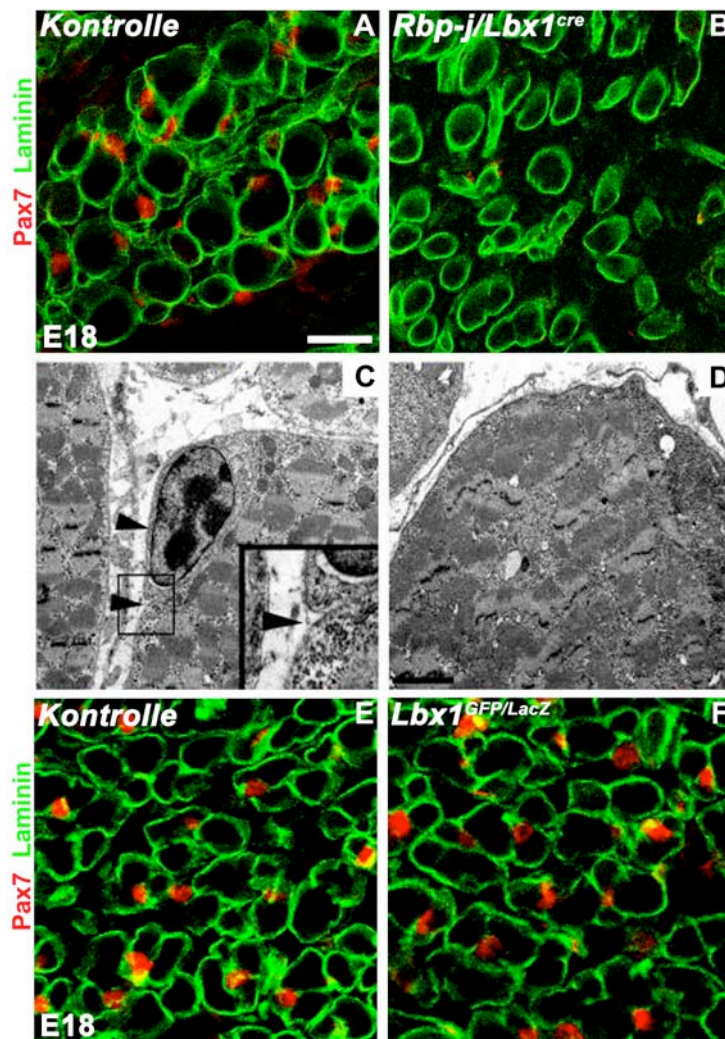


wird (siehe 3.1.6), war der proximale Teil der Zungenmuskeln nicht so stark von der  $Lbx1^{cre}$ -induzierten  $Rbp-j$ -Mutation betroffen. Die Schlussfolgerung aus diesen Ergebnissen ist, dass die Differenzierung migrierender Muskelvorläuferzellen zu Muskelfasern zum richtigen Zeitpunkt (E14.5) eingesetzt hat, dass aber Vorläuferzellen nicht aufrecht erhalten wurden, die in der normalen Entwicklung kontinuierlich Myoblasten bilden. Diese fehlten deshalb für das Muskelwachstum in  $Rbp-j$ -mutanten Tieren.

### **3.2.6 Verlust aller Satellitenzellen in der Extremität von $Rbp-j/Lbx1^{cre}$ -Mäusen**

In der späteren Embryonalentwicklung ist die Muskelfaser von einer Basallamina umgeben, die u.a. durch das sezernierte Glykoprotein Laminin charakterisiert ist. Mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen von Laminin konnte der Durchmesser der einzelnen Muskelfasern der Vorderextremitäten bei Kontroll- und  $Rbp-j/Lbx1^{cre}$ -Embryonen am Tag E18.5 ermittelt und miteinander verglichen werden. Die Muskeln der Extremitäten von konditionellen  $Rbp-j$ -mutanten Mäusen waren zu diesem Zeitpunkt in ihrer Größe schon extrem reduziert. Der Durchmesser der Muskelfasern von konditionellen  $Rbp-j$ -mutanten Tieren unterschied sich allerdings nicht von dem der Kontrolltiere. Die Faserdichte hingegen war deutlich reduziert (Abb. 3.18 A+B).

Im späten Embryonalstadium enthält der Muskel bereits Satellitenzellen. Satellitenzellen sind für das weitere Muskelwachstum und für die Muskelregeneration essentiell. Sie sind durch ihre Position unter der Basallamina und durch die Expression von Pax7 charakterisiert. Zahlreiche Satellitenzellen, etwa 25% aller Zellkerne, wurden durch ihre Pax7-Expression in Kontrolltieren am Tag E18.5 nachgewiesen. In  $Rbp-j/Lbx1^{cre}$ -Embryonen hingegen fehlten Pax7-positive Satellitenzellen (Abb. 3.18 A+B). Auch in isolierten Muskelfasern  $Rbp-j$ -defizienter Muskeln konnten keine Pax7-positiven Satellitenzellen beobachtet werden. Zusätzlich wurden die Muskeln der Vorderextremitäten von E18.5  $Rbp-j/Lbx1^{cre}$ - und Kontroll-Mäusen elektronenmikroskopisch analysiert (Abb. 3.18 C+D angefertigt von Dr. Bettina Erdmann). Diese bestätigten ebenso den vollständigen Verlust aller Satellitenzellen in konditionellen  $Rbp-j$ -Mutanten (Abb. 3.18 D).



**Abb. 3.18: Satellitenzellen fehlen in der Extremität von *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Mäusen.**

Immunfluoreszenzanalysen eines distal gelegenen Muskels der transversal geschnittenen Vorderextremität von E18.5 Kontroll- (A) und *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Mäusen (B) mit Laminin (grün) und Pax7 (rot) Antikörpern. *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Tiere zeichnen sich durch Verlust aller Pax7-positiven Satellitenzellen und durch eine reduzierte Faserdichte aus.

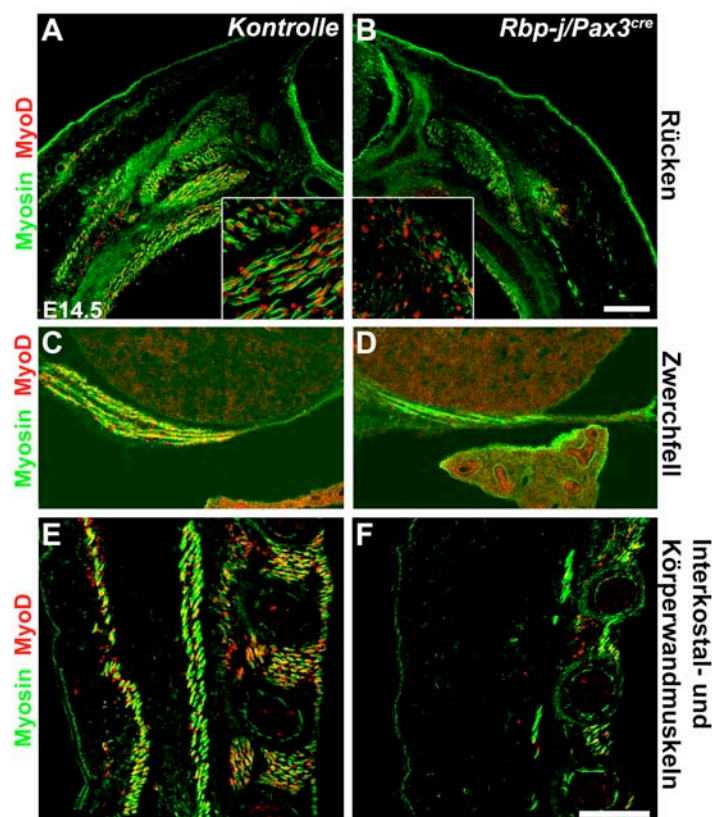
Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Extremitätenmuskeln von E18.5 Kontroll- (C) und *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*- (D) Mäusen. Satellitenzellen sind zwischen der Plasmamembran der Muskelfaser und der Basallamina in Kontrollmäusen lokalisiert (C). In *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Mäusen wurden keine Satellitenzellen detektiert (D). Immunfluoreszenzanalysen auf Transversalschnitten der distalen Vorderextremität von E18.5 Kontroll-

Mäusen (E) und *Lbx1*-defizienten Mäusen (F) mit Laminin- (grün) und Pax7- (rot) Antikörpern. Die kleineren Muskelgruppen der *Lbx1*-Mutante, die aus einem Migrationsdefizit der Vorläuferzellen entstehen, enthalten Pax7-positive Satellitenzellen. Größenmaßstab A,B,E,F 20μm, K+L 2μm.

Um abzuklären, ob eine verkleinerte Muskulatur dazu führt, dass Vorläuferzellen, vielleicht in einem kompensatorischen Prozess, depletiert werden und deshalb in kleinen Muskeln keine Vorläuferzellen mehr vorhanden sind die Satellitenzellen bilden können, wurden *Lbx1*-mutante Tiere untersucht. *Lbx1<sup>GFP/LacZ</sup>*-Tiere weisen einen Migrationsdefekt der Muskelvorläuferzellen auf. Aus diesem Migrationsdefekt resultieren in ihrer Größe reduzierte Muskelgruppen, da nur eine geringe Anzahl von myogenen Vorläuferzellen ihr Ziel erreichen (Brohmann et al., 2000). Trotz dieses Defizits in der Muskelentwicklung waren in distalen Muskeln der Vorderextremität von *Lbx1*-Mutanten Tieren Satellitenzellen mit den verbleibenden Muskelfasern assoziiert (Abb. 3.18 E+F).

### 3.2.7 RBP-J ist essentiell für den Erhalt von Pax3/Pax7- positiven Vorläuferzellen und für die Bildung von Satellitenzellen in der epaxialen Muskulatur

Als nächstes sollte die Analyse auf die epaxiale Muskulatur ausgeweitet werden, die aus nicht-migrierenden Vorläuferzellen hervorgeht. Um die Auswirkungen der *Rbp-j*-Deletion in diesen Zellen studieren zu können, wurden *Pax3<sup>cre</sup>*-Mäuse (Engleka et al., 2005) verwendet, um eine *Rbp-j*-Mutation in alle Muskelvorläuferzellen des gesamten Dermomyotoms einzuführen. Diese Mäuse werden im folgenden als *Rbp-j/Pax3<sup>cre</sup>*-Mäuse bezeichnet.



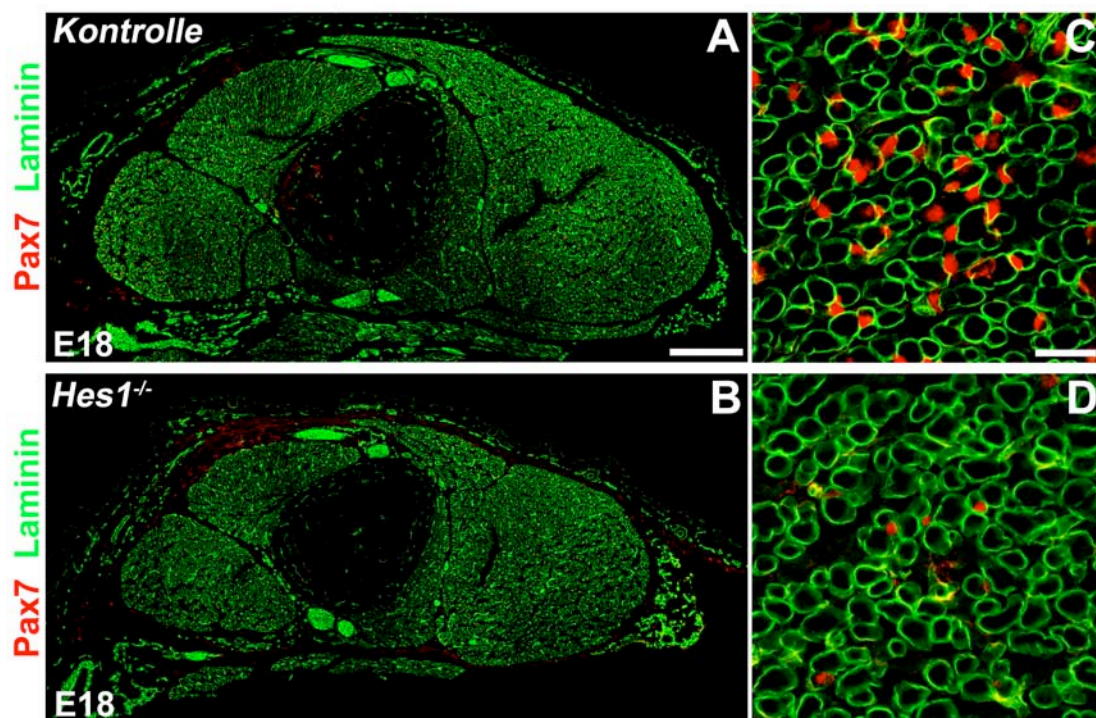
**Abb. 3.19: Der Verlust von *Rbp-j* in epaxialen Muskelvorläuferzellen führt zu reduzierter Muskelgröße und zu reduzierter Anzahl von Myoblasten.** Immunfluoreszenzfärbung mit Myosin- (grün) und MyoD- (rot) Antikörpern auf Rücken (A+B), Zwerchfell (C+D) und Interkostalmuskelschnitten (E+F) von E14.5 Kontroll- (A,C,E) und *Rbp-j/Pax3<sup>cre</sup>*-Embryonen (B,D,F). Alle Muskeln der *Rbp-j/Pax3<sup>cre</sup>*-Mäuse zeigen anhand der Myosin-Färbung eine Reduktion ihrer Größe und eine Reduktion in der Anzahl von assoziierten, MyoD+ Myoblasten. Körperwandmuskeln sind in *Rbp-j/Pax3<sup>cre</sup>*-Mäusen kaum noch vorhanden (F). (A+B) Bildeinschübe zeigen Detailvergrößerungen der Rückenmuskeln. Größenmassstab A+B 200µm, C-F 200µm.

Die Untersuchung der Rücken-, Interkostal- und Zwerchfell-Muskeln von E14.5 *Rbp-j/Pax3<sup>cre</sup>*-Embryonen zeigte, dass diese Muskeln zwar vorhanden waren (Abb. 3.19 B, D, F), aber ihre Größe stark dezimiert und die Zahl der mitotisch aktiven Myoblasten und der Pax3-positiven Muskelvorläuferzellen stark reduziert waren. Wie zu erwarten zeigte sich E18.5 der Verlust aller Satellitenzellen in den entsprechenden

Muskelgruppen der *Rbp-j/Pax3<sup>cre</sup>*-Embryonen. Die Muskeln der Extremitäten von *Rbp-j/Pax3<sup>cre</sup>*-Embryonen zeigten ein ähnliches Erscheinungsbild wie in *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Mäusen. Aus diesen Beobachtungen war zu schließen, dass RBP-J auch in der epaxialen Muskulatur für den Erhalt von Vorläuferzellen verantwortlich ist.

### 3.2.8 Der Verlust von *Hes1* in Muskelvorläuferzellen führt zu moderater Reduktion von Muskelgröße und Satellitenzellzahl

*Hes1* ist als direktes Zielgen von RBP-J bekannt, und wird nach Aktivierung des Notch-Signalwegs exprimiert. Ich habe zunächst mit Hilfe von *Hes1*-defizienten Mäusen überprüft, ob sich der Phänotyp der *Rbp-j*-Mutation in Muskelvorläuferzellen auch in *Hes1*-mutanten Mäusen widerspiegelt.



**Abb. 3.20: Verminderung von Satellitenzellanzahl durch den Verlust von *Hes1*.** Immunfluoreszenzanalysen auf Transversalschnitten der oberen Vorderextremität von E18.5 Kontroll- (A und C) und *Hes1*<sup>-/-</sup> (B und D) Mäusen mit Laminin- (grün) und Pax7- (rot) Antikörpern. Die Muskeln der *Hes1*<sup>-/-</sup>-Mäuse (B) sind im Vergleich zu Kontrolltieren (A) geringfügig verkleinert. (C+D) Detailvergrößerung des Muskels zeigt eine intensive Reduktion der Pax7-positiven Satellitenzellanzahl in *Hes1*<sup>-/-</sup> Mäusen (D) im Vergleich zu Kontrolltieren (C). Größenmaßstab A+B 250µm, C+D 25µm.

Am Tag E18.5 waren die Muskeln der oberen Vorderextremität von *Hes1*-defizienten Mäusen etwas kleiner als in Kontrolltieren (Abb. 3.20 A und B). Die Anzahl der Pax7-positiven Satellitenzellen war hingegen in *Hes1*-defizienten Tieren auf 30-40% der Anzahl in Kontrolltieren reduziert (Abb. 3.20 C und D).

*Hes5* ist *Hes1* nah verwandt, beide Genen können durch Notch-Signale induziert werden, und beide scheinen ähnliche Funktionen auszuüben, d.h. auf redundante Art und Weise wirken. Ich untersuchte deshalb, ob in *Hes1/Hes5*-doppelmutanten Mäusen eine Verstärkung des *Hes1*-mutanten Phänotyps zu beobachten ist. Für diese Analyse wurden *Pax3<sup>cre</sup>/Hes1<sup>flox/flox</sup>/Hes5<sup>-/-</sup>*-Tiere (bezeichnet als *Pax3<sup>cre</sup>/Hes1/Hes5*-Mutante) untersucht. Der Vergleich der Vorderextremität von *Pax3<sup>cre</sup>/Hes1/Hes5*-Mäusen zu *Pax3<sup>cre</sup>/Hes1*-Mäusen zeigte jedoch keine Unterschiede der Satellitenzellanzahl bzw. der Muskelgröße. Auch in der Gegenüberstellung von E18.5 Kontroll-Mäusen und *Hes5*-defizienten Mäusen konnte ich keine Variation in Satellitenzellzahl oder Entwicklung der Muskeln feststellen. Zusätzlich konnte mittels *in situ* Hybridisierung auf Schnitten von *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Embryonen gezeigt werden, daß die *Hes5*-Expression in den Muskeln der Vorderextremität am Tag E13.5 unabhängig von RBP-J ist. Aus den obigen Beobachtungen schließe ich, dass *Hes5* keine kompensierenden Auswirkungen auf den Verlust von *Hes1* hat, und nicht an der Kontrolle der Differenzierung von Muskelvorläuferzellen beteiligt ist.

## 4 Diskussion

### 4.1 Die Funktion von *Lbx1* in der Entwicklung der Maus

Während der Embryonalentwicklung wird der Homöobox-Transkriptionsfaktor *Lbx1* in migrierenden, hypaxialen Muskelvorläuferzellen und in postmitotischen Nervenzellen des dorsalen Rückenmarks exprimiert (Dietrich et al., 1998; Jagla et al., 1995; Mennerich et al., 1998). Bevor hypaxiale Muskelvorläuferzellen ihre Migration in die Extremitäten, Zunge und Zwerchfell beginnen, befinden diese sich im ventralen Ende des Dermomyotoms. Dort wird auch die Expression von *Lbx1* initiiert. Ob alle *Lbx1*-exprimierenden Zellen Muskelvorläuferzellen sind, oder ob sie auch zu anderen Zelltypen beitragen können, wurde durch genetische 'lineage tracing' Experimente analysiert. Dafür wurden Mäuse generiert, die das *Lbx1<sup>cre</sup>ki*-Allel und das *Rosa26<sup>lacZ</sup>*-Reportertragen tragen. In *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*-Mäusen führt eine Cre-vermittelte Rekombination im *Rosa26<sup>lacZ</sup>*-Lokus zu einer konstitutiven  $\beta$ -Galaktosidase-Expression in den *Lbx1*-exprimierenden Zellen. Da das rekombinierte Allel an die Tochterzellen vererbt wird, exprimieren auch diese  $\beta$ -Galaktosidase. Die so detektierbaren Derivate *Lbx1*-exprimierender Zellen werden im folgenden als *Lbx1*-Derivate bezeichnet. Anders als in transgenen Cre-Mauslinien wird durch die Einfügung der Cre-Rekombinase in den endogenen *Lbx1*-Lokus eine ektope Expression der Cre-Rekombinase, und damit das Auftreten falsch-positiver *Lbx1*-Derivate, unwahrscheinlich.

#### 4.1.1 Die Beteiligung von *Lbx1*-Derivaten an der Bildung von Blutgefäßen

Blutgefäße, welche Arterien und Venen umfassen, bestehen aus Endothelzellen, welche das Innere der Blutgefäße auskleiden, und aus einer äußeren Wand, die aus glatten Muskelzellen, Perizyten und Fibrozyten besteht. Angioblasten sind die Vorläuferzellen der Endothelzellen, und richten sich während der Embryonalentwicklung im Zuge der Vaskulogenese zu Bändern aus, die zu Röhren umgeformt werden und somit ein Lumen erzeugen (Christ et al., 2007). Diese Angioblasten finden ihren Ursprung im Seitenplattenmesoderm. Zusätzlich wurden aber auch die Somiten und das paraxiale Mesoderm als wichtige Ursprungsquelle für

Angioblasten identifiziert (Esner et al., 2006). Der Zeitpunkt, zu dem die verschiedenen Zellschicksale im Somite festgelegt werden, ist allerdings unklar. In *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*-Mäusen habe ich eine große Anzahl von  $\beta$ -Galaktosidase-exprimierenden Endothelzellen identifizieren können. Diese wurden schon in frühen Entwicklungsstadien der Maus (E10 und E11), in unterschiedlichen Bereichen vorgefunden. Endotheliale *Lbx1*-Derivate besiedelten dorsale Bereiche des Körpers, und wurden im Rückenmark, in dem das Rückenmark umgebende Gewebe (perineuraler vaskulärer Plexus), in der Schultergürtelregion und in der Niere vorgefunden. In den Vorderextremitäten waren sie sogar distal nachweisbar. In späteren Entwicklungsstadien (E18) wurden *Lbx1*-Derivate zusätzlich in einem Netzwerk von Endothelzellen im dorsal und subscapular gelegenen, braunen Fettgewebe beobachtet. Insgesamt besiedeln endotheliale *Lbx1*-Derivate den gesamten Thorax bis in den Hals. In der Zunge waren sie jedoch nicht nachweisbar. Zahlreiche, in der Vergangenheit durchgeführte Transplantationsexperimente (Ambler et al., 2001; Wilting et al., 1995) belegten, dass alle Kompartimente des reifenden Somiten die Kapazität besitzen, Endothelzellen zu bilden. Der VEGFR-2 Rezeptor (Quek1 in der Wachtel, Flk-1 in der Maus), welcher Angioblasten und Endothelzellen im Hühnchen identifiziert, wurde im lateralen Bereich des reifenden Somiten, sowohl im Dermomyotom, als auch im Sklerotom exprimiert (Wilting and Becker, 2006; Wilting et al., 2003). Die VEGFR-2-Expression im Somiten ist abhängig von BMP4-Signalen, die vom intermediären und vom Seitenplattenmesoderm abgesondert werden (Nimmagadda et al., 2005; Nimmagadda et al., 2004). Diese Zellen sollten den endothelialen Vorläuferzellen im Somiten entsprechen, die später in die Peripherie emigrieren.

Abhängig von der Position ihrer Vorläuferzellen im Somite besiedelten Endothelzellen bestimmte Körperregionen. Durch Transplantation von spezifischen Somitenbereichen konnte gezeigt werden, dass der dorso-mediale Quadrant des Somiten vorzugsweise Endothelien der Rückendermis und der Flügelknospe hervorbringt (Wilting et al., 1995). Die ventrale Somitenhälfte bildete insbesondere Zellen, die sich in ventro-lateralen Gefäßen wie der Kardinalvene, oder in Endothelien des Mesonephros integrierten. Die Blutgefäße, die bei diesen Experimenten aus dem Somiten abstammend definiert wurden, befinden sich in den Körperregionen, in denen auch Endothelzellen beobachtet wurden, die aus *Lbx1*-

positiven Zellen abstammen. Demnach bildete die Lbx1-exprimierende Zellpopulation aus dem ventro-lateralen Dermomyotom Endothelien, welche Körperbereiche besiedeln, die aus den dorsalen und ventralen Somiten des Hühnchens abstammen sollen. Die Transplantationsexperimente wurden in Stadien, in denen der Somit noch unreifer war, ausgeführt. Dies könnte diese Diskrepanz erklären. Allerdings sind Transplantationsmethoden auch wegen der manuellen Manipulation variabel. Es kann erwartet werden, dass genetische 'lineage tracing'-Experimente reproduzierbarer und verlässlicher sind.

#### **4.1.2 Lbx1-Derivate bilden keine glatten Muskelzellen der Blutgefäße**

In Zellkulturexperimenten wurde gezeigt, dass VEGFR-2-positive Zellen des lateralen Somiten sowohl Endothelzellen, als auch glatte Muskelzellen bilden können (Ema et al., 2003; Yamashita et al., 2000). Wenn sie in Vogelembryonen injiziert wurden, bildeten VEGFR-2-positive Zellen auch in vivo beide Zelltypen, (Yamashita et al., 2000). Im Gegensatz dazu zeigten Versuche an Mäusen, die den LacZ-Reporter unter der Kontrolle des *flk-1*-Promotors trugen, dass Flk-1-positive Zellen ausschließlich zu Endothelzellen, hämatopoetischen Zellen und zu einer Teilmenge von Skelettmuskelzellen beitragen, aber nicht zu glatten Muskelzellen (Motoike et al., 2003). Auch Kardon et al. zeigten 2002 (Kardon et al., 2002) durch die Infektion von Retroviren in den Hühnchenembryo, dass Endothelzellen und Skelettmuskelzellen von einer gemeinsamen Vorläuferzelle im hypaxialen Dermomyotom abstammen. Retrospektive Klonanalysen und Studien an *Pax3<sup>GFP/+</sup>*-Mäusen zeigten allerdings, dass Endothel- und glatte Muskelzellen und Zellen des Myotoms einen gemeinsamen Ursprung besitzen (Esner et al., 2006). Diese Beobachtungen konnte ich anhand von *Pax3<sup>cre</sup>/Rosa26*-Embryonen in meiner Arbeit bestätigen. Derivate von Pax3-exprimierenden Zellen konnte ich sowohl in Endothelzellen, Skelettmuskelzellen, als auch in glatten Muskelzellen der dorsalen Aorta beobachten. Lbx1-Derivate in Mäusen hingegen trugen nicht zu glatten Muskelzellen der dorsalen Aorta oder der Kardinalvene bei. Nur sehr sporadisch konnte ich einzelne Lbx1-Derivate im Endothel der dorsalen Aorta beobachten. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass sowohl das räumliche, als auch das zeitliche Expressionsmuster von Lbx1 und Pax3 deutlich



unterschiedlich sind. Pax3cre wird schon früh, noch vor der Segmentierung des paraxialen Mesoderms exprimiert, und markiert somit eine zeitlich frühere und auch umfassendere Zellpopulation als diejenige, die von Lbx1cre markiert wird

#### **4.1.3 Der Einfluß von Notch auf die Schicksalsentscheidung von Endothel, Skelett- und glatten Muskelzellen.**

Ben-Yair und Kalcheim analysierten 2008 den Mechanismus, welcher die Diversifikation der drei Zelltypen (Endothelzellen, Skelettmuskelzellen, glatte Muskelzellen) reguliert. Durch fokale GFP Transfektion wurde der laterale Teil des Dermomyotoms im Hühnchen als ergiebigste Quelle für Endothel- und glatte Muskelzellen definiert (Ben-Yair and Kalcheim, 2008). Eine Überexpression von Notch in dieser Region führte statt der Bildung von Skelettmuskelzellen zur Bildung von glatten Muskelzellen. Überexpression von Numb im Somiten des Hühnchen führte zu einer Zunahme von Skelettmuskelzellen, während Überexpression von Numb im Somiten der Maus zu einer Zunahme von Muskelvorläuferzellen im Myotom führt (Jory et al., 2009). Ob Numb in diesen Experimenten endogene Notch-Aktivität reduziert, oder andere Signalwege beeinflusst, blieb unklar. Quantitative Analysen an *Lbx1<sup>cre</sup>/RBP-J<sup>lox/lox</sup>/Rosa26* und *Pax3<sup>cre</sup>/RBP-J<sup>lox/lox</sup>/Rosa26*-Mäusen am Embryonaltag E11 in unserem Labor zeigten keine signifikant veränderte Differenzierung von Progenitorzellen, und diese bildeten in unveränderter Zahl Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Skelettmuskelzellen (mündliche Mitteilung Dr. Elena Vasyutina). Weitere Experimente sind nötig, um diese unterschiedlichen Resultate weiter zu erhellen.

#### **4.1.4 Lbx1-Zellen bilden braunes Fettgewebe**

Im späteren Entwicklungsstadium der Maus beobachtete ich eine Beteiligung von Lbx1-Zellen an der Bildung von braunem Fettgewebe. Für ein besseres Verständnis unterteilte ich die verschiedenen Fettbereiche in dorsales-, und subscapuläres-Fettgewebe. Dorsale Fettgewebe erstreckten sich im oberen Thorax bis zum Kopf auf

dorsaler und lateraler Seite des Rückenmarks. Subscapular beschreibt ein kleineres braunes Fettreservoir, das unter dem Schulterblatt lokalisiert ist.

Lbx1-Derivate trugen zur Bildung von Endothelien in dorsalen und subscapulärem Fettgewebe bei. Zudem generierten Lbx1-positive Zellen auch die eigentlichen Fettzellen des subscapulären braunen Fettgewebes. Im Vergleich dazu, waren Pax3-Derivate an Endothel- und Fettzellbildung sowohl von subscapulärem, als auch von dorsalem, braunem Fettgewebe beteiligt. Diese Ergebnisse unterstreichen erneut eine Regionalisierung des Dermomyotoms, und zeigen, dass Somite und ventrales Dermomyotome unterschiedliche Zelltypen generieren. Braune Fettzellen gehen aus einer Myf5-exprimierenden Vorläuferzelle hervor, der man ein rein myogenes Schicksal zugeordnet hatte (Seale et al., 2008). Inaktivierung des Transkriptionsfaktor PRDM16 in Zellkultur führte dazu, dass statt braunen Fettzellen Skelettmuskelzellen gebildet wurden. Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass subscapulär positioniertes Fettgewebe von Lbx1-exprimierenden Zellen abstammt, die später Myf5 exprimierten. Dorsal gelegenes Fettgewebe dagegen entwickelt sich aus Zellen, die in anderen Regionen des Somiten lokalisiert waren. Ob die Trennung der beiden Zellschicksale (Skelettmuskel und braunes Fett) noch im Dermomyotom erfolgt, oder erst nach der Delaminierung in migrierenden Muskelvorläuferzellen, ist unbekannt.

#### **4.1.5 Migration und Differenzierung von Endothelvorläuferzellen aus den Somiten erfolgen unabhängig von Met und Lbx1**

Hypaxiale, migrierende Muskelvorläuferzellen wandern von bestimmten axialen Niveaus (okzipital, cervical und auf Höhe der Extremitätenanlagen) zu ihren Zielorten, wo sie zu Muskelzellen differenzieren (Christ and Ordahl, 1995). Die Delaminierung dieser Zellen hängt von der Aktivierung des Tyrosinkinase-Rezeptors Met durch seinem Liganden "Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor" (SF/HGF) ab. In *Met*- und *SF/HGF*-mutanten Mäusen werden Muskelvorläuferzellen zwar korrekt gebildet, sie können aber nicht vom epithelialen Dermomyotom delaminieren. Deshalb fehlen in diesen Tieren die Extremitäten-, Zwerchfell- und Zungenmuskulatur (Bladt et al., 1995). In *Lbx1<sup>cre</sup>/Met<sup>-/-</sup>/Rosa26*-Embryonen

verbleiben myogene Vorläuferzellen wie erwartet im Dermomyotom, jedoch erfolgt die Migration der *Lbx1*-abstammenden Zellen, die zur Bildung von Endothelien beitragen. Weder die Anzahl, noch die Verteilung von Endothelzellen wird durch die *Met*-Mutation beeinflusst. Transplantationsexperimente von Wachtel ins Hühnchen zeigten, dass Endothelzellen auch aus Somiten abstammen, die zwischen den Extremitätenanlagen lokalisiert sind. In der Nähe solcher Somiten kann keine SF/HGF Expression beobachtet werden, und diese Somiten bilden keine wandernden Muskelvorläuferzellen (Christ et al., 1979; Dietrich et al., 1999; Wilting et al., 1995). Desweiteren beobachtete ich, dass die Auswanderung der *Lbx1*-positiven Zellen, die Endothelien generieren, zeitlich vor der Delaminierung der Muskelvorläuferzellen abläuft, d.h. Endothelvorläufer wandern am Tag 9 der Embryonalentwicklung aus, während Muskelvorläuferzellen etwa am Tag 10 auswandern. Ob ein spezifisches Signal die Delaminierung der Endothelvorläuferzellen kontrolliert, ist unbekannt. Meine Beobachtungen lassen jedoch vermuten, dass das Endothelzell-Schicksal schon im hypaxialen Dermomyotom determiniert wurde, d.h. bevor die endothelialen Vorläuferzellen auswanderten.

Schon zu Beginn ihrer Migration haben die *Lbx1*-Derivate, die später Endothelzellen bilden werden, die Expression von *Lbx1* wieder herunterreguliert. Dies könnte für die Wegleitung dieser Zellen von Bedeutung sein. In *Lbx1*-defizienten Mäusen werden hypaxiale Muskelvorläuferzellen im ventro-lateralen Ende des Dermomyotoms gebildet und sie delaminieren. Die Migration zu ihren Zielorten ist jedoch stark beeinträchtigt (Brohmann et al., 2000). *Lbx1* induziert die Expression des Chemokinrezeptors *CXCR4*, welcher u.a. für die Wegfindung der migrierenden, hypaxialen Muskelvorläuferzellen verantwortlich ist (Vasyutina et al., 2005). Die homozygote Mutation von *Lbx1* zeigte keine Veränderung der nicht-myogenen *Lbx1*-Derivate. Ich vermute daher, dass Endothel-bildende *Lbx1*-Derivate ihre *Lbx1* Expression abschalten, um nicht auf myogenen Pfad missgeleitet zu werden. Aus diesem Grund scheint *Lbx1* weder für die Spezifizierung noch für die Migration und Wegfindung für endotheliale *Lbx1*-Derivate von Bedeutung zu sein.

#### **4.1.6 Lbx1-exprimierende Muskelvorläuferzellen beteiligen sich an der Bildung heterogener Muskeln**

In dieser Arbeit wurde mittels *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*-Mäusen nachgeprüft, welche Muskeln von hypaxialen, Lbx1-exprimierenden Muskelvorläuferzellen abstammen, bzw. welche Muskeln unter Beteiligung von hypaxialen, Lbx1-exprimierenden Muskelvorläuferzellen gebildet werden. Zahlreiche Publikationen beschäftigten sich bisher mit der Bestimmung des Ursprungs hypaxialer Muskeln, und bedienten sich unterschiedlichster Versuchsansätze. Die genetische Manipulation, die alle Lbx1-Derivate des ventro-lateralen Dermomyotoms  $\beta$ -Galaktosidase exprimieren lässt, erlaubte es, hypaxiale Muskeln mittels  $\beta$ -Galaktosidase- und Myosin-Antikörpern immunhistochemisch zu detektieren. Die Muskeln der Extremitäten, des Schultergürtels, des Diaphragmas, sowie intrinsische, als auch extrinsische Zungenmuskeln zeigten ihre Abstammung von hypaxialen Lbx1-exprimierenden Muskelvorläuferzellen durch die Expression von  $\beta$ -Galaktosidase. Desweiteren beteiligen sich Lbx1-Derivate an der Bildung der Beckenboden- und Halsmuskulatur.

##### Die Hinterextremitäten- und Beckenbodenmuskulatur:

Durch Wachtel-Hühnchen Transplantationsexperimente und durch retrovirale Markierung von somitischen Zellen wurde gezeigt, dass sowohl im Hühnchen, als auch in der Maus die Beckenbodenmuskulatur von den gleichen Somiten (30-34) abstammt, die auch die Muskulatur der Hinterextremität bilden (Valasek et al., 2005). Muskelvorläuferzellen migrieren hier zuerst von den Somiten in die Hinterextremität, von wo aus sie sich anschließend zum Genitaltuberkel erstrecken. Diese Muskeln fehlen in *Met*-defizienten Mäusen (Valasek et al., 2005). Dieser Mechanismus wurde als "In-Out mechanism" bezeichnet. In dieser Arbeit wurde die Bildung der Beckenbodenmuskulatur durch Lbx1-abstammende Vorläuferzellen anhand der Analysen von *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*-Mäusen bestätigt. Zudem wurden weiterhin Lbx1-abstammende Zellen bei der Bildung des Musculus gluteus maximus in posterior gelegenen Rumpf beobachtet. Eine Beteiligung von hypaxialen Muskelvorläuferzellen zum Musculus gluteus maximus war zuvor nicht ermittelt worden. Die genetische Markierung Lbx1-positiver Muskeln ist eine sensitive Methode und ist in der Lage, auch eine geringe Beteiligung von Lbx1-Derivaten in einem bestimmten Muskel zu detektieren.

Desweiteren wurde bei der Analyse von *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*-Tieren ein großer Beitrag von Lbx1-abstammenden Zellen im Musculus psoas major registriert. Dieser Muskel stellt die Verbindung zwischen Oberschenkelknochen (Femur) und unteren Wirbeln dar. Am Entwicklungstag E13.5 wurde sowohl in *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*- als auch in *Lbx1<sup>cre</sup>/Met<sup>-</sup>/Rosa26*- Embryonen eine geringe Akkumulation von Lbx1-Derivaten angrenzend an die Niere registriert, die einen schon differenzierenden Muskel infiltrierten. Erst in späteren Stadien offenbarte sich ein vermehrter Beitrag von  $\beta$ -Galaktosidase-positiven Zellen zum Musculus psoas major. Der Musculus psoas major könnte demnach aus einer Population von Zellen abstammen, die spät und Met-unabhängig migriert.

#### Die Muskeln des zentralen Torso:

Im Torso offenbarte die Expression von  $\beta$ -Galaktosidase die Herkunft von Diaphragma, Musculus rectus abdominis, Musculus latissimus dorsi und Muskulus subcutaneous trunci aus dem Lbx1-exprimierenden Dermomyotom. Die Interkostalmuskeln und weitere Muskeln der Abdominalwand (Musculus obliquus internus und externus, Musculus transversus abdominis) in *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*-Embryonen jedoch zeigten keine Beteiligung von Lbx1-abstammenden Zellen. Die Muskeln der Abdominalwand wurden mittels Wachtel-Hühnchen-Transplantationsexperimenten in den späten 70er Jahren (neben den Muskeln der Extremitäten, der Zunge und des Zwerchfells) als Derivate des ventralen Teils des Dermomyotoms entdeckt (Chevallier et al., 1977; Christ et al., 1977; Christ et al., 1983; Grim, 1970; Jacob et al., 1978; Jacob et al., 1979; Noden, 1983; Ordahl and Le Douarin, 1992). Bei Untersuchungen an *Pax3*-defizienten Mäusen, welche u.a. durch das Fehlen migrierender Muskelvorläuferzellen charakterisiert sind, beobachtete man das Fehlen des Diaphragmas, des Musculus rectus abdominis, des Musculus latissimus dorsi und des Muskulus subcutaneous trunci (Tremblay et al., 1998). Aufgrund dieser Experimente und der hier gezeigten Expression von  $\beta$ -Galaktosidase in *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*-Tieren wurde die Herkunft dieser Muskeln aus dem hypaxialen, Lbx1-exprimierenden Dermomyotom bestätigt. Weiterhin schienen diese Muskeln alle von migrierenden, Lbx1-positiven Zellen abzustammen, da auch in E13 *Lbx1<sup>cre</sup>/Met<sup>-</sup>/Rosa26*-Embryonen diese Muskeln fehlten (nicht gezeigte Daten).

Die Muskeln des Schultergürtels und der Vorderextremität:

Zeitweise wurde angenommen, dass *Lbx1* ausschließlich in migrierenden Muskelvorläuferzellen exprimiert wird und für ihre Spezifizierung in eine migrierende Zellpopulation verantwortlich ist (Dietrich et al., 1998). Weitere Ergebnisse zeigten jedoch, dass das ventro-laterale Dermomyotom einiger Somiten zu der Entstehung sowohl von migrierenden, als auch nicht-migrierenden Progenitorzellen beiträgt, und *Lbx1*-Signale nicht ausreichen, um zwischen den beiden Populationen zu unterscheiden (Rees et al., 2003). Die von mir durchgeführten Experimente, wie auch zahlreiche Ergebnisse zuvor (Chevallier et al., 1977; Christ et al., 1977; Christ et al., 1983; Dietrich et al., 1998; Grim, 1970; Jacob et al., 1978; Jacob et al., 1979; Noden, 1983; Ordahl and Le Douarin, 1992), demonstrierten die Entstehung der Extremitätenmuskulatur aus der migrierenden *Lbx1*-positiven Muskelvorläuferpopulation und deren Kontribution zu der Bildung der Muskulatur des Schultergürtels (Prunotto et al., 2004; Tremblay et al., 1998). Evans et al. diskutierten über einen möglichen "In-Out mechanism" von Myoblasten, wie es der Fall bei der Beckenbodenmuskulatur ist, auch bei der Entstehung der Muskulatur des Schultergürtels (Evans et al., 2006). Umstritten blieb die Tatsache, dass einige proximal positionierte Schultergürtelmuskeln in *Pax3* oder *Met*-Mutanten gebildet wurden (Prunotto et al., 2004; Tremblay et al., 1998), in denen keine Muskelvorläuferzellen migrieren. Die Größe dieser Muskeln (*Musculus anterior serratus*, *supra-* und *infra-spinatus*) war jedoch reduziert. Dies würde auf einen dualen Ursprung dieser Muskeln hinweisen, von migrierenden und nicht-migrierenden Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurden *Lbx1*-abstammende Zellen in der Muskulatur der Extremitäten und des Schultergürtels in E13 *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*-Embryonen identifiziert. Der direkte Vergleich mit E13 *Lbx1<sup>cre</sup>/Met<sup>-/-</sup>/Rosa26*-Embryonen bestätigte die Präsenz *Lbx1*-abstammender Zellen in einigen Muskeln des Schultergürtels und des Halses auch in diesen *Met*-mutanten Tieren. Die Extremitätenmuskulatur und auch einige andere Schultermuskeln hingegen waren in diesen Tieren abwesend. Daraus ist zu schließen, dass sowohl migrierende, als auch nicht-migrierende Muskelvorläuferzellen aus dem *Lbx1*-exprimierenden, ventro-lateralen Dermomyotom die Entstehung bestimmter Schultermuskeln ermöglichen. Es ist nicht auszuschließen, dass auch eine dritte Komponente, aus dem epaxialen oder aus dem ventralen Dermomyotom *Lbx1*-negativer Somiten bei der Entstehung dieser Muskeln involviert ist. Vor allem zeigten diese Experimente, dass nicht alle *Lbx1*-

positiven myogenen Vorläuferzellen migrieren.

#### Die Muskeln des Kopfs und des Halses:

Die Muskeln des Kopfs werden von Muskelvorläuferzellen des kranialen, paraxialen Mesoderms gebildet (Christ and Ordahl, 1995; Couly et al., 1993; Noden, 1983). Dies beobachtete man auch in "Lineage tracing"-Experimenten mit *Mesp1<sup>cre</sup>/Rosa26*-Mäusen (Yoshida et al., 2008). *Mesp1* wird im primären Mesenchym angeschaltet und wird daraufhin im kranialen Mesenchym und in den anterior gelegenen Somiten exprimiert, bevor *Mesp1*-Derivate u.a. ein myogenes Zellschicksal verfolgen und die Kopfmuskeln generieren. Die Zungenmuskulatur (intrinsische und extrinsische Larynx- und Glossale Muskeln) jedoch stammt von migrierenden Muskelvorläuferzellen der zervikalen und okzipitalen Somiten (Somiten 1-6) ab (Christ and Ordahl, 1995; Huang et al., 1999; Noden, 1983). In dieser Arbeit wurde die Entstehung der Zunge etwas näher betrachtet und es wurde ein bisher unbeobachteter, dualer Ursprung der Zungenmuskulatur erkannt. Im Vergleich von *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*- und *Lbx1<sup>cre</sup>/Met<sup>-/-</sup>/Rosa26*-Embryonen (E13) bemerkte ich, dass größenreduzierte Muskeln in der proximalen Zunge in Mäusen trotz der *Met*-Defizienz zurückblieben. *Lbx1*-positive Muskelvorläuferzellen und distale Muskeln in der Zunge fehlten aber gänzlich. Auch andere Teile des Somiten, wie ich anhand von *Pax3<sup>cre</sup>/Rosa26*-Embryonen sehen konnte, waren nicht an der Bildung dieser restlichen Zungenmuskulatur beteiligt. Auch Prunotto et al. (Prunotto et al., 2004) fanden bei ihren Analysen von *Met*-hypomorphen Mutanten verbleibende, verkümmerte Muskeln in der proximalen Zunge. Als Grund für diese Beobachtung vermutete sie, dass ein Teil der somitischen Zellen nur geringe Mengen von *Met*-Signalen benötigen, um zu wandern. Von mir durchgeführte Experimente an *Mesp1<sup>cre</sup>/Rosa26*-Embryonen in dieser Arbeit hingegen demonstrierten die Herkunft der verbleibenden Muskeln in *Met*-Nullmutanten aus dem kranialen, paraxialen Mesoderm. Dadurch konnte ich den dualen Ursprung und eine heterogene Komposition der Zungenmuskulatur beweisen. Alle übrigen Kopfmuskeln, abgesehen von einer Ausnahme, waren  $\beta$ -Galaktosidase-negativ in *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*-Mäusen. Nur an der Entstehung des *Musculus epicranii occipitalis*, der sich vom Hals cranial erstreckt, partizipierten *Lbx1*-Derivate. Im Vogelembryo fand man die Expression von *Lbx1* in einer Region des kranialen Mesoderms, von dem aus Vorläuferzellen für die Bildung des *Musculus rectus lateralis*, den caudal gelegenen Extraocularmuskel,

hervorgehen (Mootosamy and Dietrich, 2002). In der Maus wird Lbx1 in diesen Muskeln nicht exprimiert.



## **4.2 Die Funktion von RBP-J in der Entwicklung der hypaxialen und epaxialen Skelettmuskulatur**

Die gesamte Skelettmuskulatur im Säugetier entwickelt sich aus einer kleinen Zellpopulation, die aus den Somiten abstammt. Die Entstehung der Muskulatur, die einen großen Anteil der Körpermasse ausmacht, setzt geregelte Proliferations- und Differenzierungsprozesse der somitischen Zellpopulation voraus. Dafür muss ein Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung der Muskelvorläuferzellen bestehen, um das Muskelwachstum und den Erhalt von myogenen Vorläuferzellen zu gewährleisten. Während der ganzen fötalen und postnatalen Entwicklung kann in dem entstehenden Muskel eine Mixtur von Zellen beobachtet werden: Pax3+/Pax7+ Vorläuferzellen, MyoD+ und/oder Myf5+ Myoblasten, und Myotuben, die Skelettmuskel-spezifisches Myosin exprimieren. Pax3+/Pax7+ Vorläuferzellen bilden während dieser Zeit kontinuierlich MyoD+/Myf5+ Myoblasten, die zum Muskelwachstum beitragen.

Bisher wurden verschiedene Wachstumsfaktoren ermittelt, welche die Proliferation von Muskelvorläuferzellen fördern und den Differenzierungsprozess verzögern. Darunter fallen u.a. BMP-Signale, die vom Oberflächen-Ektoderm sezerniert werden, und für den Erhalt proliferierender Muskelvorläuferzellen des epaxialen Dermomyotoms verantwortlich sind (Amthor et al., 1998), sowie auch der Wnt-Antagonist Sfrp-2, der den Erhalt Pax3 exprimierender, proliferierender Progenitorzellen unterstützt (Anakwe et al., 2003), während Wnt-Signale die Differenzierung vorantreiben.

Die Induktion des Notch-Signalweges in Zellkultur-Experimenten ergab erste Hinweise auf eine inhibierende Wirkung von Notch bezüglich myogener Differenzierung (Kopan et al., 1994; Kuroda et al., 1999; Lindsell et al., 1995). Ektopische Aktivierung von Notch führte auch im Hühnchen zu einer verspäteten Differenzierung von Myoblasten (Delfini et al., 2000; Hirsinger et al., 2001). Auch in primären Satellitenzellkulturen, die aus postnatalen Tieren gewonnen wurden, induzierten Notch-Signale die Expansion myogener Progenitorzellen (Conboy and Rando, 2002). Die Aktivierung von Notch-Signalen soll die regenerativen

Eigenschaften adulter Muskeln fördern: Notch soll Muskelstammzellen aktivieren und ihre Proliferation und ihre Fähigkeit, sich selbst zu erneuern, anregen (Conboy et al., 2005).

Um die Funktion von Notch in hypaxialen Muskelvorläuferzellen während der Embryonalentwicklung zu untersuchen, verwendeten wir das Cre/loxP-System. Es werden verschiedene Notch-Rezeptoren in Muskelvorläuferzellen exprimiert, während nur ein Faktor, RBP-J, die transkriptionelle Antwort der Rezeptoren vermittelt. Die Mutation von *Rbp-j* sollte es also ermöglichen, alle transkriptionellen Konsequenzen des Notch Signals zu eliminieren. Die Null-Mutation von *Rbp-j* führt zu einer frühen, embryonalen Letalität, noch vor dem Embryonaltag E10 (Oka et al., 1995) und verhindert somit die Untersuchung der sich entwickelnden Muskeln während der Embryogenese. Die Verwendung der *Lbx1<sup>cre</sup>*-Mauslinie erlaubte uns, eine Mutation in das loxP flankierende *Rbp-j*-Gen in hypaxialen Muskelvorläuferzellen einzuführen. Für eine *Rbp-j*-Mutation in epaxialen Vorläuferzellen verwendeten wir die *Pax3<sup>cre</sup>*-Linie.

#### **4.2.1 RBP-J inhibiert die Muskeldifferenzierung**

Die myogene Differenzierung beginnt mit der Expression von myogenen Determinierungsfaktoren wie MyoD und Myf5, wodurch Muskelvorläuferzellen zu Myoblasten determiniert werden. Myogene Determinierungsfaktoren werden sowohl in proliferierenden, als auch in postmitotischen Myoblasten exprimiert. Die ersten MyoD-positiven Myoblasten erscheinen am Tag E11, MyoD-positive Myoblasten werden aber auch in späteren Stadien noch gebildet. Desmin-Expression hingegen erfolgt erstmals etwa um einen Tag zeitlich versetzt, und wird in differenzierenden Myoblasten und in Muskelfasern beobachtet.

Im Vergleich zu Kontrolltieren fanden wir in *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Embryonen ausgeprägte Veränderungen in der Differenzierung. Der klarste Effekt der *Rbp-j*-Mutation in frühen Entwicklungsstadien war die zu breite Expression von MyoD. Etwas später wurde erstmals Desmin exprimiert. Auch Desmin-exprimierende Myoblasten erschienen in den Extremitäten von *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Mäusen zum richtigen Zeitpunkt,

aber auch diese in erhöhter Anzahl. Dies deutete daraufhin, dass die erhöhte Expression von MyoD dazu führt, dass myogene Differenzierung zu breit einsetzt. Der basische Helix-loop-Helix Transkriptionsfaktor *Hes1* wurde als Zielgen von RBP-J identifiziert, dessen Transkription nach Aktivierung des Notch-Rezeptors induziert wird (Jarriault et al., 1995; Kuroda et al., 1999). *Hes1* ist als Repressor des *MyoD*-Gens bekannt (Jarriault et al., 1995; Kopan et al., 1994; Kuroda et al., 1999; Nye et al., 1994; Sasai et al., 1992). Muskelvorläuferzellen in *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Embryonen wiesen einen deutlichen Verlust der *Hes1*-Expression auf, die im Zusammenhang mit einer verringerten Reprimierung der MyoD-Expression in der frühen Determinierungsphase zu stehen schien. Der Verlust der *MyoD*-Reprimierung war wiederum an eine erhöhte, myogene Differenzierung in *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Tieren gekoppelt.

#### **4.2.2 RBP-J ist für den Erhalt von Muskelvorläuferzellen und für die Bildung von Satellitenzellen erforderlich**

Neben einer verfrühten, myogenen Differenzierung in *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Embryonen wurde der rapide Verlust myogener Muskelvorläuferzellen offensichtlich. Muskelvorläuferzellen sind durch ihre proliferativen Fähigkeiten gekennzeichnet, und gewährleisten die Amplifizierung myogener Zellen, die ein Wachstum der sich bildenden Muskeln über einen längeren Zeitraum ermöglichen. Muskelvorläuferzellen in der Extremität exprimieren vom Tag E10 bis E12.5 die Transkriptionsfaktoren Pax3 und Lbx1. In *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Mäusen wurden Pax3- und Lbx1-positive Muskelvorläuferzellen zum richtigen Zeitpunkt in der frühen Entwicklung in normaler Anzahl und Verteilung vorgefunden. Durch die verfrühte Differenzierung war die Anzahl der Muskelvorläuferzellen schon früh reduziert. Dadurch konnten in späten Entwicklungsstadien weniger Myoblasten produziert werden. Die frühe Depletion der myogenen Vorläuferzellen erklärt damit die Reduktion der Größe des Muskelgewebes in konditionellen *Rbp-j*-Mutanten.

Myogene Vorläuferzellen bilden kurz vor der Geburt Satellitenzellen, die auch in der postnatalen Muskulatur als Stammzellen aufrechterhalten werden. Satellitenzellen sind ab dem Embryonalstadium E16/E17 durch ihre Position zwischen Muskelfaser

und Basalmembran charakterisiert. *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Embryonen waren durch die Abwesenheit der Satellitenzellen charakterisiert, wie immunhistologische Färbungen und elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten. Die frühe Depletion der Vorläuferzellen führte also dazu, dass keine Satellitenzellen gebildet wurden.

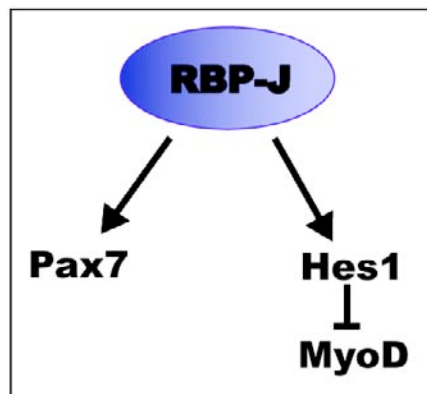
Auch in *Lbx1*-defizienten Mäusen ist die Bildung von nur kleinen Muskelgruppen beschrieben, die aus einem Migrationsdefizit von Muskelvorläuferzellen zu ihren Zielorten resultieren (Brohmann et al., 2000). In *Lbx1*-mutanten Embryonen konnten wir jedoch Satellitenzellen in den Restmuskeln der Extremitäten beobachten. Dies bedeutet, dass ein kleiner Muskel nicht zur einer Depletion der Vorläuferzellen führt und dadurch die Bildung von Satellitenzellen verhindert.

Die Reduktion von Progenitorzellen gibt jedoch keine Erklärung für den massiven Verlust der Pax7-Expression in *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Mäusen am Tag E11.5. Speziell beobachtete ich eine starke Reduktion der Pax7-Expression, obwohl zu diesem Zeitpunkt noch Pax3-positive oder Lbx1-positive Zellen vorhanden waren. Dies könnte auf eine direkte Funktion von RBP-J in der Kontrolle der Pax7-Expression hinweisen.

Parallel zu unserer Arbeit, wurde der Phänotyp einer hypomorphen Delta like1 (Dll1)-Maus beschrieben. Hier wurde ebenfalls eine beschleunigte Differenzierung beobachtet, mit der eine Depletion der Muskelvorläuferzellen einherging (Schuster-Gossler et al., 2007). Auch in anderen Organen, wie im Pankreas, Darm und im Nervensystem wurde gezeigt, dass Notch-Signale für den Erhalt von Vorläuferzellen essenziell sind (Edlund, 2002; Petersen et al., 2006; Radtke and Clevers, 2005). RBP-J ist der hauptsächliche Effektor von Notch-Signalen (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Jarriault et al., 1995; Kato et al., 1997), auch wenn in einigen in vitro-Versuchen, z.B. in C2C12-Zellen, RBP-J-unabhängige Mechanismen beschrieben wurden (Nofziger et al., 1999; Shawber et al., 1996). In neuronalen Vorläuferzellen induziert aktiviertes RBP-J die Expression von *Hes1* und *Hes5*, die wiederum pro-neuronale Gene reprimieren und somit den Erhalt von Vorläuferzellen gewährleisten. Ähnliche Funktionen waren auch für den RBP-J/Notch-Weg in Muskelvorläuferzellen zu erkennen, in denen RBP-J durch die transkriptionelle Aktivierung von *Hes1* die Expression von *MyoD* reprimiert. Die Untersuchung *Hes1*-defizienter Mäuse zeigte

jedoch einen weit milderen Phänotyp als den in konditionellen *Rbp-j*-Mutanten in späten Embryonalstadien. Ich beobachtete eine nur geringe Verkleinerung der Muskeln. Zudem war die Pax7-Expression in frühen Stadien nicht verändert. Die Anzahl der Satellitenzellen war aber in einem sehr grossen Ausmass beeinträchtigt, denn ich beobachtete eine Reduktion der Pax7-exprimierenden Satellitenzellen um 70% im Vergleich zu Kontrolltieren. Demnach ist die Aktivierung des *Hes1*-Gens nicht der einzige Mechanismus über den RBP-J-Signale übertragen werden, um die Integrität der Muskelentwicklung zu gewährleisten.

*Hes1* ist nicht der einzige bHLH Faktor, dessen Expression durch RBP-J kontrolliert wird. Ich untersuchte deshalb das nah-verwandte *Hes5*-Gen, das eine ähnliche, redundante Funktion ausübt. *Hes5*-defiziente Mäuse hingegen zeigten keine Veränderung in der Entwicklung der Muskulatur, und in einer *Hes1/Hes5*-Doppelmutante wurden im Muskel ebenfalls keine intensiveren Auswirkungen des *Hes1*-mutanten Phänotyps beobachtet. Daher scheint *Hes5* keine Funktion bei der Muskelentwicklung auszuüben.



**Abb.4.1: RBP-J-vermittelte Notch-Signale kontrollieren die Expression von Pax7 und Hes1.** Schematische Darstellung der transkriptionellen Kontrolle von RBP-J auf die Pax7- und die Hes1-Expression. Hes1-vermittelte Reprimierung von *MyoD* gewährleistet den Erhalt von Vorläuferzellen. Die Pax7-Expression scheint durch RBP-J aktiviert zu werden und dient der Aufrechterhaltung von Satellitenzellen in der postnatalen Entwicklung.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass Notch-Signale, die durch RBP-J vermittelt werden, essenziell für die Aufrechterhaltung der myogenen Vorläuferzellen im Embryo sind. Diese Funktion scheint durch eine Repression von *MyoD* gewährleistet zu werden, die wenigstens zum Teil durch Hes1 vermittelt wird. Darüber hinaus übernimmt RBP-J andere wichtige Funktionen in der Entwicklung der myogenen Vorläuferzellen, und scheint die Expression von Pax7 zu kontrollieren. Pax7 ist essenziell für die Aufrechterhaltung von Satellitenzellen in der postnatalen Periode. Die Kontrolle der Pax7-Expression kann also als eine wichtige Funktion für die Bildung von adulten Muskelstammzellen betrachtet werden.

## 5 Zusammenfassung

Das Homöobox-Gen *Lbx1* wird in Zellen des ventro-lateralen Dermomyotoms in Somiten exprimiert, die nach ihrer Delaminierung eine migrierende Muskelvorläuferpopulation bilden, um die Muskeln der Extremitäten, des Zwerchfells und der Zunge zu generieren. Um alle Derivate *Lbx1*-exprimierender Zellen zu detektieren, verwendete ich *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26*-Mäuse, in denen *Lbx1*-Tochterzellen durch Cre vermittelte Rekombination konstitutiv  $\beta$ -Galaktosidase synthetisieren.

Ich konnte Tochterzellen des *Lbx1*-exprimierenden Dermomyotoms in Ko-Lokalisation mit Endothelzellen in weiten Bereichen des Körpers, u.a. in der Niere, darstellen. Zudem zeigte ich, dass *Lbx1*-Tochterzellen Teile des braunen Fettgewebes bilden. Bei der Analyse von *Lbx1<sup>cre</sup>/Met<sup>-/-</sup>/Rosa26*-Embryonen beobachtete ich, dass endotheliale Derivate *Lbx1*-exprimierender Zellen unabhängig von Met-SF/HGF-Signalen vom ventro-lateralen Dermomyotom delaminieren können. Die Muskelvorläuferzellen hingegen verbleiben ohne Met-Signale im Dermomyotom. Die Untersuchung dieser Embryonen zeigte weiterhin, dass proximale Muskeln der Zunge auch in Abwesenheit von Met vorhanden sind, und demnach nicht von migrierenden Muskelvorläuferzellen aus den okzipital lokalisierten Somiten der Embryonalachse gebildet werden. Durch die Analyse von *Mesp1<sup>cre</sup>/Met<sup>-/-</sup>/Rosa26*-Embryonen konnte ich zeigen, dass diese residualen Muskeln ihren Ursprung im kranialen, paraxialen Mesoderm haben, und die Zungenmuskulatur somit einen dualen Ursprung besitzt.

Im zweiten Teil meiner Promotionsarbeit habe ich in der Maus die Funktion von RBP-J, dem hauptsächlichen Effektormolekül des Notch-Signalwegs, in Muskelvorläuferzellen untersucht. Die konditionelle Deletion von *Rbp-j* in *Rbp-j/Lbx1<sup>cre</sup>*-Embryonen führte zu einer gesteigerten Differenzierung von Muskelvorläuferzellen schon am Entwicklungstag E11.5, was zu einem raschen Verlust der Muskelvorläuferpopulation führte. Diese frühe Depletion der Vorläuferzellen resultierte in einer Größenreduktion der Muskelgruppen. Besonders auffallend war der Verlust aller Satellitenzellen in den Muskeln der mutanten Tiere. Satellitenzellen werden von Muskelvorläuferzellen in der perinatalen Periode gebildet. Da Vorläuferzellen zu diesem Zeitpunkt bereits depletiert waren, konnten sie nicht gebildet werden. Zusätzlich wurde *Pax7* in den Vorläuferzellen der *Rbp-j*-mutanten Embryonen nicht korrekt exprimiert. Zusammengefasst zeigen diese

Ergebnisse, dass RBP-J eine essenzielle Funktion für den Erhalt von myogenen Vorläuferzellen und für die Bildung von Satellitenzellen ausübt.

## Summary

The homeobox gene *Lbx1* is expressed in the ventro-lateral lip of the dermomyotome that delaminates a migrating muscle precursor population known to generate muscles of the extremities, the diaphragm and the tongue. Using genetic lineage tracing, i.e. *Lbx1<sup>cre</sup>/Rosa26* mice, I was able to trace all descendants of *Lbx1* expressing cells due to their constitutive expression of  $\beta$ -galactosidase. Daughter cells of the *Lbx1* expressing dermomyotome were found to generate endothelia at many sites in the embryo, for example in the kidney. Analyzing *Lbx1<sup>cre</sup>/Met<sup>-/-</sup>/Rosa26* embryos, I detected endothelial *Lbx1*-descendants even in the absence of *Met*. Thus, future endothelial cells delaminate and migrate independently of *Met*-SF/HGF-signals, whereas delamination of myogenic precursor cells requires *Met*. I also found that *Lbx1* descendants generate specific brown fat tissue at particular locations in the embryo. My analysis revealed that residual tongue muscle is present even in the absence of *Met*, i.e. in the absence of somitic cells. *Mesp1<sup>cre</sup>/Met<sup>-/-</sup>/Rosa26* animals allowed me to trace muscle progenitor cells that generate these residual muscle groups in *Met* mutants to the cranial paraxial mesoderm. These results demonstrate a dual origin of tongue muscle, and show that cells from the somites and the cranial paraxial mesoderm contribute to this particular head muscle.

In the second part of my work I analyzed the function of RBP-J, the main transcriptional mediator of Notch signals, in the developing muscle. The conditional deletion of *Rbp-j* in *Rbp-j<sup>flox/flox</sup>/Lbx1<sup>cre</sup>* embryos resulted in broad and early myogenic differentiation, which was accompanied by a depletion of the myogenic precursor pool. This resulted in the formation of small muscles. Due to the absence of myogenic progenitors, satellite cells were not generated in the *Rbp-j* mutants. Taken together the results reveal an essential function of RBP-J in the maintenance of muscle progenitor cells by suppressing myogenic differentiation.



## 6 Literatur

- Alvares, L. E., Schubert, F. R., Thorpe, C., Mootosamy, R. C., Cheng, L., Parkyn, G., Lumsden, A. and Dietrich, S.** (2003). Intrinsic, Hox-dependent cues determine the fate of skeletal muscle precursors. *Dev Cell* **5**, 379-90.
- Ambler, C. A., Nowicki, J. L., Burke, A. C. and Bautch, V. L.** (2001). Assembly of trunk and limb blood vessels involves extensive migration and vasculogenesis of somite-derived angioblasts. *Dev Biol* **234**, 352-64.
- Amthor, H., Christ, B. and Patel, K.** (1999). A molecular mechanism enabling continuous embryonic muscle growth - a balance between proliferation and differentiation. *Development* **126**, 1041-53.
- Amthor, H., Christ, B., Weil, M. and Patel, K.** (1998). The importance of timing differentiation during limb muscle development. *Curr Biol* **8**, 642-52.
- Amthor, H., Otto, A., Macharia, R., McKinnell, I. and Patel, K.** (2006). Myostatin imposes reversible quiescence on embryonic muscle precursors. *Dev Dyn* **235**, 672-80.
- Anakwe, K., Robson, L., Hadley, J., Buxton, P., Church, V., Allen, S., Hartmann, C., Harfe, B., Nohno, T., Brown, A. M. et al.** (2003). Wnt signalling regulates myogenic differentiation in the developing avian wing. *Development* **130**, 3503-14.
- Aoyama, H. and Asamoto, K.** (1988). Determination of somite cells: independence of cell differentiation and morphogenesis. *Development* **104**, 15-28.
- Arnold, H. H. and Braun, T.** (2000). Genetics of muscle determination and development. *Curr Top Dev Biol* **48**, 129-64.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. and Lake, R. J.** (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**, 770-6.
- Atit, R., Sgaier, S. K., Mohamed, O. A., Taketo, M. M., Dufort, D., Joyner, A. L., Niswander, L. and Conlon, R. A.** (2006). Beta-catenin activation is necessary and sufficient to specify the dorsal dermal fate in the mouse. *Dev Biol* **296**, 164-76.
- Bardelli, A., Longati, P., Gramaglia, D., Stella, M. C. and Comoglio, P. M.** (1997). Gab1 coupling to the HGF/Met receptor multifunctional docking site requires binding of Grb2 and correlates with the transforming potential. *Oncogene* **15**, 3103-11.
- Batourina, E., Gim, S., Bello, N., Shy, M., Clagett-Dame, M., Srinivas, S., Costantini, F. and Mendelsohn, C.** (2001). Vitamin A controls epithelial/mesenchymal interactions through Ret expression. *Nat Genet* **27**, 74-8.
- Ben-Yair, R. and Kalcheim, C.** (2005). Lineage analysis of the avian dermomyotome sheet reveals the existence of single cells with both dermal and muscle progenitor fates. *Development* **132**, 689-701.
- Ben-Yair, R. and Kalcheim, C.** (2008). Notch and bone morphogenetic protein differentially act on dermomyotome cells to generate endothelium, smooth, and striated muscle. *J Cell Biol* **180**, 607-18.
- Bessho, Y., Sakata, R., Komatsu, S., Shiota, K., Yamada, S. and Kageyama, R.** (2001). Dynamic expression and essential functions of Hes7 in somite segmentation. *Genes Dev* **15**, 2642-7.

- Bigas, A., Martin, D. I. and Milner, L. A.** (1998). Notch1 and Notch2 inhibit myeloid differentiation in response to different cytokines. *Mol Cell Biol* **18**, 2324-33.
- Birnboim, H. C. and Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-23.
- Bischoff, R. and Heintz, C.** (1994). Enhancement of skeletal muscle regeneration. *Dev Dyn* **201**, 41-54.
- Black, B. L.** (2007). Transcriptional pathways in second heart field development. *Semin Cell Dev Biol* **18**, 67-76.
- Bladt, F., Riethmacher, D., Isenmann, S., Aguzzi, A. and Birchmeier, C.** (1995). Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* **376**, 768-71.
- Bober, E., Franz, T., Arnold, H. H., Gruss, P. and Tremblay, P.** (1994). Pax-3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells. *Development* **120**, 603-12.
- Borman, W. H. and Yorde, D. E.** (1994). Barrier inhibition of a temporal neuraxial influence on early chick somitic myogenesis. *Dev Dyn* **200**, 68-78.
- Brand-Saberi, B., Muller, T. S., Wilting, J., Christ, B. and Birchmeier, C.** (1996). Scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF) induces emigration of myogenic cells at interlimb level in vivo. *Dev Biol* **179**, 303-8.
- Braun, T., Buschhausen-Denker, G., Bober, E., Tannich, E. and Arnold, H. H.** (1989). A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *Embo J* **8**, 701-9.
- Braun, T., Rudnicki, M. A., Arnold, H. H. and Jaenisch, R.** (1992). Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell* **71**, 369-82.
- Brohmann, H., Jagla, K. and Birchmeier, C.** (2000). The role of Lbx1 in migration of muscle precursor cells. *Development* **127**, 437-45.
- Brou, C.** (2009). Intracellular trafficking of Notch receptors and ligands. *Exp Cell Res* **315**, 1549-55.
- Bruckner, K., Perez, L., Clausen, H. and Cohen, S.** (2000). Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature* **406**, 411-5.
- Buckingham, M.** (2001). Skeletal muscle formation in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 440-8.
- Buckingham, M., Meilhac, S. and Zaffran, S.** (2005). Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet* **6**, 826-35.
- Cau, E., Gradwohl, G., Casarosa, S., Kageyama, R. and Guillemot, F.** (2000). Hes genes regulate sequential stages of neurogenesis in the olfactory epithelium. *Development* **127**, 2323-32.
- Chevallier, A., Kieny, M. and Mauger, A.** (1977). Limb-somite relationship: origin of the limb musculature. *J Embryol Exp Morphol* **41**, 245-58.
- Christ, B.** (1969). [Chondrogenesis in the vertebral rudiment. Experimental studies of chick embryo]. *Z Anat Entwicklungsgesch* **129**, 177-94.
- Christ, B., Huang, R. and Scaal, M.** (2004). Formation and differentiation of the avian sclerotome. *Anat Embryol (Berl)* **208**, 333-50.
- Christ, B., Huang, R. and Scaal, M.** (2007). Amniote somite derivatives. *Dev Dyn* **236**, 2382-96.
- Christ, B., Jacob, H. J. and Jacob, M.** (1977). Experimental analysis of the origin of the wing musculature in avian embryos. *Anat Embryol (Berl)* **150**, 171-86.

- Christ, B., Jacob, H. J. and Jacob, M.** (1979). Differentiating abilities of avian somatopleural mesoderm. *Experientia* **35**, 1376-8.
- Christ, B., Jacob, M. and Jacob, H. J.** (1983). On the origin and development of the ventrolateral abdominal muscles in the avian embryo. An experimental and ultrastructural study. *Anat Embryol (Berl)* **166**, 87-101.
- Christ, B. and Ordahl, C. P.** (1995). Early stages of chick somite development. *Anat Embryol (Berl)* **191**, 381-96.
- Christ, B. and Wilting, J.** (1992). From somites to vertebral column. *Ann Anat* **174**, 23-32.
- Cinnamon, Y., Kahane, N. and Kalcheim, C.** (1999). Characterization of the early development of specific hypaxial muscles from the ventrolateral myotome. *Development* **126**, 4305-15.
- Collins, C. A., Olsen, I., Zammit, P. S., Heslop, L., Petrie, A., Partridge, T. A. and Morgan, J. E.** (2005). Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* **122**, 289-301.
- Conboy, I. M., Conboy, M. J., Smythe, G. M. and Rando, T. A.** (2003). Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science* **302**, 1575-7.
- Conboy, I. M., Conboy, M. J., Wagers, A. J., Girma, E. R., Weissman, I. L. and Rando, T. A.** (2005). Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* **433**, 760-4.
- Conboy, I. M. and Rando, T. A.** (2002). The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev Cell* **3**, 397-409.
- Conlon, R. A., Reaume, A. G. and Rossant, J.** (1995). Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development* **121**, 1533-45.
- Cossu, G., Kelly, R., Tajbakhsh, S., Di Donna, S., Vivarelli, E. and Buckingham, M.** (1996). Activation of different myogenic pathways: myf-5 is induced by the neural tube and MyoD by the dorsal ectoderm in mouse paraxial mesoderm. *Development* **122**, 429-37.
- Couly, G. F., Coltey, P. M. and Le Douarin, N. M.** (1993). The triple origin of skull in higher vertebrates: a study in quail-chick chimeras. *Development* **117**, 409-29.
- Daston, G., Lamar, E., Olivier, M. and Goulding, M.** (1996). Pax-3 is necessary for migration but not differentiation of limb muscle precursors in the mouse. *Development* **122**, 1017-27.
- Davis, R. L., Weintraub, H. and Lassar, A. B.** (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51**, 987-1000.
- de la Pompa, J. L., Wakeham, A., Correia, K. M., Samper, E., Brown, S., Aguilera, R. J., Nakano, T., Honjo, T., Mak, T. W., Rossant, J. et al.** (1997). Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development* **124**, 1139-48.
- Delfini, M. C., Hirsinger, E., Pourquie, O. and Duprez, D.** (2000). Delta 1-activated notch inhibits muscle differentiation without affecting Myf5 and Pax3 expression in chick limb myogenesis. *Development* **127**, 5213-24.
- Denetclaw, W. F., Jr., Christ, B. and Ordahl, C. P.** (1997). Location and growth of epaxial myotome precursor cells. *Development* **124**, 1601-10.
- Denetclaw, W. F. and Ordahl, C. P.** (2000). The growth of the dermomyotome and formation of early myotome lineages in thoracolumbar somites of chicken embryos. *Development* **127**, 893-905.

- Dietrich, S.** (1999). Regulation of hypaxial muscle development. *Cell Tissue Res* **296**, 175-82.
- Dietrich, S., Abou-Rebyeh, F., Brohmann, H., Blatt, F., Sonnenberg-Riethmacher, E., Yamaai, T., Lumsden, A., Brand-Saberi, B. and Birchmeier, C.** (1999). The role of SF/HGF and c-Met in the development of skeletal muscle. *Development* **126**, 1621-9.
- Dietrich, S., Schubert, F. R., Healy, C., Sharpe, P. T. and Lumsden, A.** (1998). Specification of the hypaxial musculature. *Development* **125**, 2235-49.
- Dorsky, R. I., Chang, W. S., Rapaport, D. H. and Harris, W. A.** (1997). Regulation of neuronal diversity in the *Xenopus* retina by Delta signalling. *Nature* **385**, 67-70.
- Duxson, M. J. and Usson, Y.** (1989). Cellular insertion of primary and secondary myotubes in embryonic rat muscles. *Development* **107**, 243-51.
- Duxson, M. J., Usson, Y. and Harris, A. J.** (1989). The origin of secondary myotubes in mammalian skeletal muscles: ultrastructural studies. *Development* **107**, 743-50.
- Edlund, H.** (2002). Pancreatic organogenesis--developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat Rev Genet* **3**, 524-32.
- Edmondson, D. G. and Olson, E. N.** (1989). A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes Dev* **3**, 628-40.
- Ema, M., Faloon, P., Zhang, W. J., Hirashima, M., Reid, T., Stanford, W. L., Orkin, S., Choi, K. and Rossant, J.** (2003). Combinatorial effects of Flk1 and Tall on vascular and hematopoietic development in the mouse. *Genes Dev* **17**, 380-93.
- Engleka, K. A., Gitler, A. D., Zhang, M., Zhou, D. D., High, F. A. and Epstein, J. A.** (2005). Insertion of Cre into the Pax3 locus creates a new allele of Splotch and identifies unexpected Pax3 derivatives. *Dev Biol* **280**, 396-406.
- Epstein, J. A., Shapiro, D. N., Cheng, J., Lam, P. Y. and Maas, R. L.** (1996). Pax3 modulates expression of the c-Met receptor during limb muscle development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4213-8.
- Esner, M., Meilhac, S. M., Relaix, F., Nicolas, J. F., Cossu, G. and Buckingham, M. E.** (2006). Smooth muscle of the dorsal aorta shares a common clonal origin with skeletal muscle of the myotome. *Development* **133**, 737-49.
- Evans, D. J., Valasek, P., Schmidt, C. and Patel, K.** (2006). Skeletal muscle translocation in vertebrates. *Anat Embryol (Berl)* **211 Suppl 1**, 43-50.
- Franz, T., Kothary, R., Surani, M. A., Halata, Z. and Grim, M.** (1993). The Splotch mutation interferes with muscle development in the limbs. *Anat Embryol (Berl)* **187**, 153-60.
- Fredette, B. J. and Landmesser, L. T.** (1991). Relationship of primary and secondary myogenesis to fiber type development in embryonic chick muscle. *Dev Biol* **143**, 1-18.
- Garry, D. J. and Olson, E. N.** (2006). A common progenitor at the heart of development. *Cell* **127**, 1101-4.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S. A.** (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* **119**, 493-501.
- Geetha-Loganathan, P., Nimmagadda, S., Prols, F., Patel, K., Scal, M., Huang, R. and Christ, B.** (2005). Ectodermal Wnt-6 promotes Myf5-dependent avian limb myogenesis. *Dev Biol* **288**, 221-33.

- Gesta, S., Tseng, Y. H. and Kahn, C. R.** (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* **131**, 242-56.
- Goulding, M., Lumsden, A. and Paquette, A. J.** (1994). Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. *Development* **120**, 957-71.
- Goulding, M. D., Chalepakis, G., Deutsch, U., Erselius, J. R. and Gruss, P.** (1991). Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *Embo J* **10**, 1135-47.
- Grim, M.** (1970). Differentiation of myoblasts and the relationship between somites and the wing bud of the chick embryo. *Z Anat Entwicklungsgesch* **132**, 260-71.
- Gros, J., Manceau, M., Thome, V. and Marcelle, C.** (2005). A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *Nature* **435**, 954-8.
- Gross, M. K., Moran-Rivard, L., Velasquez, T., Nakatsu, M. N., Jagla, K. and Goulding, M.** (2000). Lbx1 is required for muscle precursor migration along a lateral pathway into the limb. *Development* **127**, 413-24.
- Hammond, W. S.** (1965). Origin of Hypoglossal Muscles in the Chick Embryo. *Anat Rec* **151**, 547-57.
- Hasty, P., Bradley, A., Morris, J. H., Edmondson, D. G., Venuti, J. M., Olson, E. N. and Klein, W. H.** (1993). Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* **364**, 501-6.
- Hazelton, R. D.** (1970). A radioautographic analysis of the migration and fate of cells derived from the occipital somites in the chick embryo with specific reference to the development of the hypoglossal musculature. *J Embryol Exp Morphol* **24**, 455-66.
- Henrique, D., Hirsinger, E., Adam, J., Le Roux, I., Pourquie, O., Ish-Horowicz, D. and Lewis, J.** (1997). Maintenance of neuroepithelial progenitor cells by Delta-Notch signalling in the embryonic chick retina. *Curr Biol* **7**, 661-70.
- Heymann, S., Koudrova, M., Arnold, H., Koster, M. and Braun, T.** (1996). Regulation and function of SF/HGF during migration of limb muscle precursor cells in chicken. *Dev Biol* **180**, 566-78.
- Himms-Hagen, J.** (1990). Brown adipose tissue thermogenesis: interdisciplinary studies. *Faseb J* **4**, 2890-8.
- Hirsinger, E., Malapert, P., Dubrulle, J., Delfini, M. C., Duprez, D., Henrique, D., Ish-Horowicz, D. and Pourquie, O.** (2001). Notch signalling acts in postmitotic avian myogenic cells to control MyoD activation. *Development* **128**, 107-16.
- Hogan, B., Beddington, R., Constantini, F., Lacy, E.** (1994). Manipulating The Mouse Embryo - A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 11803-2500, USA.*
- Hrabe de Angelis, M., McIntyre, J., 2nd and Gossler, A.** (1997). Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue DII1. *Nature* **386**, 717-21.
- Huang, R., Zhi, Q., Izipisua-Belmonte, J. C., Christ, B. and Patel, K.** (1999). Origin and development of the avian tongue muscles. *Anat Embryol (Berl)* **200**, 137-52.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H. und Sninsky, J. J.** (1989). PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications. *Academic Press, San Diego, CA, USA.*
- Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H.** (1990). High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* **96**, 23-8.

- Jacob, M., Christ, B. and Jacob, H. J.** (1978). On the migration of myogenic stem cells into the prospective wing region of chick embryos. A scanning and transmission electron microscope study. *Anat Embryol (Berl)* **153**, 179-93.
- Jacob, M., Christ, B. and Jacob, H. J.** (1979). The migration of myogenic cells from the somites into the leg region of avian embryos. An ultrastructural study. *Anat Embryol (Berl)* **157**, 291-309.
- Jagla, K., Dolle, P., Mattei, M. G., Jagla, T., Schuhbaur, B., Dretzen, G., Bellard, F. and Bellard, M.** (1995). Mouse Lbx1 and human LBX1 define a novel mammalian homeobox gene family related to the Drosophila lady bird genes. *Mech Dev* **53**, 345-56.
- Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E. H., Kopan, R. and Israel, A.** (1995). Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* **377**, 355-8.
- Jerpseth, B., Greener, A., Short, J. M., Viola, J. und Kretz, P.** (1992). XL1-Blue MRF' E. coli cells: McrA-, McrCB-, McrF-, Mrr-, HsdR- derivative of XL1-Blue cells. *Stratagies* **5**, 81-83.
- Jory, A., Le Roux, I., Gayraud-Morel, B., Rocheteau, P., Cohen-Tannoudji, M., Cumano, A. and Tajbakhsh, S.** (2009). Numb Promotes an Increase in Skeletal Muscle Progenitor Cells in the Embryonic Somite. *Stem Cells*.
- Kaehn, K., Jacob, H. J., Christ, B., Hinrichsen, K. and Poelmann, R. E.** (1988). The onset of myotome formation in the chick. *Anat Embryol (Berl)* **177**, 191-201.
- Kahane, N., Cinnamon, Y., Bachelet, I. and Kalcheim, C.** (2001). The third wave of myotome colonization by mitotically competent progenitors: regulating the balance between differentiation and proliferation during muscle development. *Development* **128**, 2187-98.
- Kahane, N., Cinnamon, Y. and Kalcheim, C.** (1998). The cellular mechanism by which the dermomyotome contributes to the second wave of myotome development. *Development* **125**, 4259-71.
- Kao, H. Y., Ordentlich, P., Koyano-Nakagawa, N., Tang, Z., Downes, M., Kintner, C. R., Evans, R. M. and Kadesch, T.** (1998). A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes Dev* **12**, 2269-77.
- Kardon, G., Campbell, J. K. and Tabin, C. J.** (2002). Local extrinsic signals determine muscle and endothelial cell fate and patterning in the vertebrate limb. *Dev Cell* **3**, 533-45.
- Kassar-Duchossoy, L., Gayraud-Morel, B., Gomes, D., Rocancourt, D., Buckingham, M., Shinin, V. and Tajbakhsh, S.** (2004). Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. *Nature* **431**, 466-71.
- Kassar-Duchossoy, L., Giacone, E., Gayraud-Morel, B., Jory, A., Gomes, D. and Tajbakhsh, S.** (2005). Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes Dev* **19**, 1426-31.
- Kato, H., Taniguchi, Y., Kurooka, H., Minoguchi, S., Sakai, T., Nomura-Okazaki, S., Tamura, K. and Honjo, T.** (1997). Involvement of RBP-J in biological functions of mouse Notch1 and its derivatives. *Development* **124**, 4133-41.
- Kimmel, A. R. and Berger, S. L.** (1987). Preparation of cDNA and the generation of cDNA libraries: overview. *Methods Enzymol* **152**, 307-16.
- Klingenberg, M.** (1999). Uncoupling protein--a useful energy dissipator. *J Bioenerg Biomembr* **31**, 419-30.

- Kopan, R., Nye, J. S. and Weintraub, H.** (1994). The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD. *Development* **120**, 2385-96.
- Kuang, S., Charge, S. B., Seale, P., Huh, M. and Rudnicki, M. A.** (2006). Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. *J Cell Biol* **172**, 103-13.
- Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F. and Rudnicki, M. A.** (2007). Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell* **129**, 999-1010.
- Kuroda, K., Tani, S., Tamura, K., Minoguchi, S., Kurooka, H. and Honjo, T.** (1999). Delta-induced Notch signaling mediated by RBP-J inhibits MyoD expression and myogenesis. *J Biol Chem* **274**, 7238-44.
- Lai, E. C.** (2004). Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* **131**, 965-73.
- Lance-Jones, C.** (1988). The somitic level of origin of embryonic chick hindlimb muscles. *Dev Biol* **126**, 394-407.
- Le Grand, F. and Rudnicki, M. A.** (2007). Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 628-33.
- Lean, M. E., James, W. P., Jennings, G. and Trayhurn, P.** (1986). Brown adipose tissue uncoupling protein content in human infants, children and adults. *Clin Sci (Lond)* **71**, 291-7.
- Lee, K. J., Mendelsohn, M. and Jessell, T. M.** (1998). Neuronal patterning by BMPs: a requirement for GDF7 in the generation of a discrete class of commissural interneurons in the mouse spinal cord. *Genes Dev* **12**, 3394-407.
- Lewis, J.** (1998). Notch signalling and the control of cell fate choices in vertebrates. *Semin Cell Dev Biol* **9**, 583-9.
- Li, J., Liu, K. C., Jin, F., Lu, M. M. and Epstein, J. A.** (1999). Transgenic rescue of congenital heart disease and spina bifida in Splotch mice. *Development* **126**, 2495-503.
- Li, L., Milner, L. A., Deng, Y., Iwata, M., Banta, A., Graf, L., Marcovina, S., Friedman, C., Trask, B. J., Hood, L. et al.** (1998). The human homolog of rat Jagged1 expressed by marrow stroma inhibits differentiation of 32D cells through interaction with Notch1. *Immunity* **8**, 43-55.
- Li, X., Oghi, K. A., Zhang, J., Kronen, A., Bush, K. T., Glass, C. K., Nigam, S. K., Aggarwal, A. K., Maas, R., Rose, D. W. et al.** (2003). Eya protein phosphatase activity regulates Six1-Dach-Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis. *Nature* **426**, 247-54.
- Liem, K. F., Jr., Tremml, G. and Jessell, T. M.** (1997). A role for the roof plate and its resident TGFbeta-related proteins in neuronal patterning in the dorsal spinal cord. *Cell* **91**, 127-38.
- Lindsell, C. E., Shawber, C. J., Boulter, J. and Weinmaster, G.** (1995). Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1. *Cell* **80**, 909-17.
- Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N. G. and Israel, A.** (1998). The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8108-12.
- Marcelle, C., Wolf, J. and Bronner-Fraser, M.** (1995). The in vivo expression of the FGF receptor FREK mRNA in avian myoblasts suggests a role in muscle growth and differentiation. *Dev Biol* **172**, 100-14.
- Marcucio, R. S. and Noden, D. M.** (1999). Myotube heterogeneity in developing chick craniofacial skeletal muscles. *Dev Dyn* **214**, 178-94.

- McDonell, M. W., Simon, M. N. and Studier, F. W.** (1977). Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol* **110**, 119-46.
- McMahon, J. A., Takada, S., Zimmerman, L. B., Fan, C. M., Harland, R. M. and McMahon, A. P.** (1998). Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev* **12**, 1438-52.
- McPherron, A. C., Lawler, A. M. and Lee, S. J.** (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* **387**, 83-90.
- Megeney, L. A. and Rudnicki, M. A.** (1995). Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem Cell Biol* **73**, 723-32.
- Mennerich, D., Schafer, K. and Braun, T.** (1998). Pax-3 is necessary but not sufficient for *lhx1* expression in myogenic precursor cells of the limb. *Mech Dev* **73**, 147-58.
- Milner, L. A., Bigas, A., Kopan, R., Brashem-Stein, C., Bernstein, I. D. and Martin, D. I.** (1996). Inhibition of granulocytic differentiation by mNotch1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13014-9.
- Moloney, D. J., Panin, V. M., Johnston, S. H., Chen, J., Shao, L., Wilson, R., Wang, Y., Stanley, P., Irvine, K. D., Haltiwanger, R. S. et al.** (2000a). Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature* **406**, 369-75.
- Moloney, D. J., Shair, L. H., Lu, F. M., Xia, J., Locke, R., Matta, K. L. and Haltiwanger, R. S.** (2000b). Mammalian Notch1 is modified with two unusual forms of O-linked glycosylation found on epidermal growth factor-like modules. *J Biol Chem* **275**, 9604-11.
- Montarras, D., Morgan, J., Collins, C., Relaix, F., Zaffran, S., Cumano, A., Partridge, T. and Buckingham, M.** (2005). Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science* **309**, 2064-7.
- Mootosamy, R. C. and Dietrich, S.** (2002). Distinct regulatory cascades for head and trunk myogenesis. *Development* **129**, 573-83.
- Motoike, T., Markham, D. W., Rossant, J. and Sato, T. N.** (2003). Evidence for novel fate of Flk1+ progenitor: contribution to muscle lineage. *Genesis* **35**, 153-9.
- Muller, T., Brohmann, H., Pierani, A., Heppenstall, P. A., Lewin, G. R., Jessell, T. M. and Birchmeier, C.** (2002). The homeodomain factor *lhx1* distinguishes two major programs of neuronal differentiation in the dorsal spinal cord. *Neuron* **34**, 551-62.
- Nabeshima, Y., Hanaoka, K., Hayasaka, M., Esumi, E., Li, S., Nonaka, I. and Nabeshima, Y.** (1993). Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature* **364**, 532-5.
- Nathan, E., Monovich, A., Tirosh-Finkel, L., Harrelson, Z., Rousso, T., Rinon, A., Harel, I., Evans, S. M. and Tzahor, E.** (2008). The contribution of *Islet1*-expressing splanchnic mesoderm cells to distinct branchiomic muscles reveals significant heterogeneity in head muscle development. *Development* **135**, 647-57.
- Nicholls, D. G. and Locke, R. M.** (1984). Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev* **64**, 1-64.
- Nimmagadda, S., Geetha Loganathan, P., Huang, R., Scaal, M., Schmidt, C. and Christ, B.** (2005). BMP4 and noggin control embryonic blood vessel formation by antagonistic regulation of VEGFR-2 (*Quek1*) expression. *Dev Biol* **280**, 100-10.



- Nimmagadda, S., Loganathan, P. G., Wilting, J., Christ, B. and Huang, R.** (2004). Expression pattern of VEGFR-2 (Quek1) during quail development. *Anat Embryol (Berl)* **208**, 219-24.
- Noden, D. M.** (1983). The role of the neural crest in patterning of avian cranial skeletal, connective, and muscle tissues. *Dev Biol* **96**, 144-65.
- Noden, D. M. and Francis-West, P.** (2006). The differentiation and morphogenesis of craniofacial muscles. *Dev Dyn* **235**, 1194-218.
- Noden, D. M., Marcucio, R., Borycki, A. G. and Emerson, C. P., Jr.** (1999). Differentiation of avian craniofacial muscles: I. Patterns of early regulatory gene expression and myosin heavy chain synthesis. *Dev Dyn* **216**, 96-112.
- Nofziger, D., Miyamoto, A., Lyons, K. M. and Weinmaster, G.** (1999). Notch signaling imposes two distinct blocks in the differentiation of C2C12 myoblasts. *Development* **126**, 1689-702.
- Nye, J. S., Kopan, R. and Axel, R.** (1994). An activated Notch suppresses neurogenesis and myogenesis but not gliogenesis in mammalian cells. *Development* **120**, 2421-30.
- Oka, C., Nakano, T., Wakeham, A., de la Pompa, J. L., Mori, C., Sakai, T., Okazaki, S., Kawaichi, M., Shiota, K., Mak, T. W. et al.** (1995). Disruption of the mouse RBP-J kappa gene results in early embryonic death. *Development* **121**, 3291-301.
- Olguin, H. C. and Olwin, B. B.** (2004). Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal. *Dev Biol* **275**, 375-88.
- Olson, E. N., Arnold, H. H., Rigby, P. W. and Wold, B. J.** (1996). Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4. *Cell* **85**, 1-4.
- Ordahl, C. P. and Le Douarin, N. M.** (1992). Two myogenic lineages within the developing somite. *Development* **114**, 339-53.
- Oustanina, S., Hause, G. and Braun, T.** (2004). Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. *Embo J* **23**, 3430-9.
- Pardanaud, L. and Dieterlen-Lievre, F.** (1993). Emergence of endothelial and hemopoietic cells in the avian embryo. *Anat Embryol (Berl)* **187**, 107-14.
- Pardanaud, L., Luton, D., Prigent, M., Bourcheix, L. M., Catala, M. and Dieterlen-Lievre, F.** (1996). Two distinct endothelial lineages in ontogeny, one of them related to hemopoiesis. *Development* **122**, 1363-71.
- Parker, M. H., Seale, P. and Rudnicki, M. A.** (2003). Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nat Rev Genet* **4**, 497-507.
- Pelicci, G., Giordano, S., Zhen, Z., Salcini, A. E., Lanfrancone, L., Bardelli, A., Panayotou, G., Waterfield, M. D., Ponzetto, C., Pelicci, P. G. et al.** (1995). The motogenic and mitogenic responses to HGF are amplified by the Shc adaptor protein. *Oncogene* **10**, 1631-8.
- Petersen, P. H., Tang, H., Zou, K. and Zhong, W.** (2006). The enigma of the numb-Notch relationship during mammalian embryogenesis. *Dev Neurosci* **28**, 156-68.
- Ponzetto, C., Bardelli, A., Zhen, Z., Maina, F., dalla Zonca, P., Giordano, S., Graziani, A., Panayotou, G. and Comoglio, P. M.** (1994). A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* **77**, 261-71.
- Pourquie, O.** (1999). Notch around the clock. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 559-65.

- Pourquie, O.** (2003). The segmentation clock: converting embryonic time into spatial pattern. *Science* **301**, 328-30.
- Pourquie, O., Fan, C. M., Coltey, M., Hirsinger, E., Watanabe, Y., Breant, C., Francis-West, P., Brickell, P., Tessier-Lavigne, M. and Le Douarin, N. M.** (1996). Lateral and axial signals involved in avian somite patterning: a role for BMP4. *Cell* **84**, 461-71.
- Powell-Braxton, L., Hollingshead, P., Warburton, C., Dowd, M., Pitts-Meek, S., Dalton, D., Gillett, N. and Stewart, T. A.** (1993). IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes Dev* **7**, 2609-17.
- Prunotto, C., Crepaldi, T., Forni, P. E., Ieraci, A., Kelly, R. G., Tajbakhsh, S., Buckingham, M. and Ponzetto, C.** (2004). Analysis of Mlc-lacZ Met mutants highlights the essential function of Met for migratory precursors of hypaxial muscles and reveals a role for Met in the development of hyoid arch-derived facial muscles. *Dev Dyn* **231**, 582-91.
- Psychoyos, D. and Stern, C. D.** (1996). Fates and migratory routes of primitive streak cells in the chick embryo. *Development* **122**, 1523-34.
- Radtke, F. and Clevers, H.** (2005). Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* **307**, 1904-9.
- Rees, E., Young, R. D. and Evans, D. J.** (2003). Spatial and temporal contribution of somitic myoblasts to avian hind limb muscles. *Dev Biol* **253**, 264-78.
- Relaix, F., Montarras, D., Zaffran, S., Gayraud-Morel, B., Rocancourt, D., Tajbakhsh, S., Mansouri, A., Cumano, A. and Buckingham, M.** (2006). Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J Cell Biol* **172**, 91-102.
- Relaix, F., Polimeni, M., Rocancourt, D., Ponzetto, C., Schafer, B. W. and Buckingham, M.** (2003). The transcriptional activator PAX3-FKHR rescues the defects of Pax3 mutant mice but induces a myogenic gain-of-function phenotype with ligand-independent activation of Met signaling in vivo. *Genes Dev* **17**, 2950-65.
- Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A. and Buckingham, M.** (2005). A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* **435**, 948-53.
- Reshef, R., Maroto, M. and Lassar, A. B.** (1998). Regulation of dorsal somitic cell fates: BMPs and Noggin control the timing and pattern of myogenic regulator expression. *Genes Dev* **12**, 290-303.
- Rhodes, S. J. and Konieczny, S. F.** (1989). Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev* **3**, 2050-61.
- Rida, P. C., Le Minh, N. and Jiang, Y. J.** (2004). A Notch feeling of somite segmentation and beyond. *Dev Biol* **265**, 2-22.
- Rong, P. M., Teillet, M. A., Ziller, C. and Le Douarin, N. M.** (1992). The neural tube/notochord complex is necessary for vertebral but not limb and body wall striated muscle differentiation. *Development* **115**, 657-72.
- Rothwell, N. J. and Stock, M. J.** (1979). A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature* **281**, 31-5.
- Rudnicki, M. A., Braun, T., Hinuma, S. and Jaenisch, R.** (1992). Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell* **71**, 383-90.
- Rudnicki, M. A. and Jaenisch, R.** (1995). The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis. *Bioessays* **17**, 203-9.

- Rudnicki, M. A., Schnegelsberg, P. N., Stead, R. H., Braun, T., Arnold, H. H. and Jaenisch, R. (1993). MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* **75**, 1351-9.
- Sachs, M., Brohmann, H., Zechner, D., Muller, T., Hulsken, J., Walther, I., Schaeper, U., Birchmeier, C. and Birchmeier, W. (2000). Essential role of Gab1 for signaling by the c-Met receptor in vivo. *J Cell Biol* **150**, 1375-84.
- Saga, Y., Miyagawa-Tomita, S., Takagi, A., Kitajima, S., Miyazaki, J. and Inoue, T. (1999). MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development* **126**, 3437-47.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-4.
- Sambrook, J. u. R., D. W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor, New York, USA*.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.
- Sasai, Y., Kageyama, R., Tagawa, Y., Shigemoto, R. and Nakanishi, S. (1992). Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to Drosophila hairy and Enhancer of split. *Genes Dev* **6**, 2620-34.
- Scaal, M., Bonafede, A., Dathe, V., Sachs, M., Cann, G., Christ, B. and Brand-Saberi, B. (1999). SF/HGF is a mediator between limb patterning and muscle development. *Development* **126**, 4885-93.
- Scaal, M. and Christ, B. (2004). Formation and differentiation of the avian dermomyotome. *Anat Embryol (Berl)* **208**, 411-24.
- Schafer, K. and Braun, T. (1999). Early specification of limb muscle precursor cells by the homeobox gene Lbx1h. *Nat Genet* **23**, 213-6.
- Schienda, J., Engleka, K. A., Jun, S., Hansen, M. S., Epstein, J. A., Tabin, C. J., Kunkel, L. M. and Kardon, G. (2006). Somitic origin of limb muscle satellite and side population cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 945-50.
- Schmidt, C., Bladt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschiesche, W., Sharpe, M., Gherardi, E. and Birchmeier, C. (1995). Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* **373**, 699-702.
- Schuster-Gossler, K., Cordes, R. and Gossler, A. (2007). Premature myogenic differentiation and depletion of progenitor cells cause severe muscle hypotrophy in Delta1 mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 537-42.
- Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scime, A., Devarakonda, S., Conroe, H. M., Erdjument-Bromage, H. et al. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* **454**, 961-7.
- Seale, P., Sabourin, L. A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P. and Rudnicki, M. A. (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* **102**, 777-86.
- Shawber, C., Nofziger, D., Hsieh, J. J., Lindsell, C., Bogler, O., Hayward, D. and Weinmaster, G. (1996). Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway. *Development* **122**, 3765-73.
- Sieber, M. A., Storm, R., Martinez-de-la-Torre, M., Muller, T., Wende, H., Reuter, K., Vasyutina, E. and Birchmeier, C. (2007). Lbx1 acts as a selector gene in the fate determination of somatosensory and viscerosensory relay neurons in the hindbrain. *J Neurosci* **27**, 4902-9.

- Sonnenberg, E., Meyer, D., Weidner, K. M. and Birchmeier, C.** (1993). Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. *J Cell Biol* **123**, 223-35.
- Sorge, J. A.** (1988). Bacteriophage lambda cloning vectors. *Biotechnology* **10**, 43-60.
- Soriano, P.** (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* **21**, 70-1.
- Souilhol, C., Cormier, S., Tanigaki, K., Babinet, C. and Cohen-Tannoudji, M.** (2006). RBP-Jkappa-dependent notch signaling is dispensable for mouse early embryonic development. *Mol Cell Biol* **26**, 4769-74.
- Srivastava, D.** (2006). Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis. *Cell* **126**, 1037-48.
- Sweeney, L. J., Kennedy, J. M., Zak, R., Kokjohn, K. and Kelley, S. W.** (1989). Evidence for expression of a common myosin heavy chain phenotype in future fast and slow skeletal muscle during initial stages of avian embryogenesis. *Dev Biol* **133**, 361-74.
- Tabor, S. and Richardson, C. C.** (1987). DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 4767-71.
- Takahashi, Y., Inoue, T., Gossler, A. and Saga, Y.** (2003). Feedback loops comprising Dll1, Dll3 and Mesp2, and differential involvement of Psen1 are essential for rostrocaudal patterning of somites. *Development* **130**, 4259-68.
- Takahashi, Y., Koizumi, K., Takagi, A., Kitajima, S., Inoue, T., Koseki, H. and Saga, Y.** (2000). Mesp2 initiates somite segmentation through the Notch signalling pathway. *Nat Genet* **25**, 390-6.
- Tanigaki, K., Han, H., Yamamoto, N., Tashiro, K., Ikegawa, M., Kuroda, K., Suzuki, A., Nakano, T. and Honjo, T.** (2002). Notch-RBP-J signaling is involved in cell fate determination of marginal zone B cells. *Nat Immunol* **3**, 443-50.
- Timmons, J. A., Wennmalm, K., Larsson, O., Walden, T. B., Lassmann, T., Petrovic, N., Hamilton, D. L., Gimeno, R. E., Wahlestedt, C., Baar, K. et al.** (2007). Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4401-6.
- Trainor, P. A., Tan, S. S. and Tam, P. P.** (1994). Cranial paraxial mesoderm: regionalisation of cell fate and impact on craniofacial development in mouse embryos. *Development* **120**, 2397-408.
- Tremblay, P., Dietrich, S., Mericskay, M., Schubert, F. R., Li, Z. and Paulin, D.** (1998). A crucial role for Pax3 in the development of the hypaxial musculature and the long-range migration of muscle precursors. *Dev Biol* **203**, 49-61.
- Tremblay, P. and Gruss, P.** (1994). Pax: genes for mice and men. *Pharmacol Ther* **61**, 205-26.
- Tzahor, E.** (2009). Heart and craniofacial muscle development: a new developmental theme of distinct myogenic fields. *Dev Biol* **327**, 273-9.
- Uehara, Y., Minowa, O., Mori, C., Shiota, K., Kuno, J., Noda, T. and Kitamura, N.** (1995). Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* **373**, 702-5.
- Valasek, P., Evans, D. J., Maina, F., Grim, M. and Patel, K.** (2005). A dual fate of the hindlimb muscle mass: cloacal/perineal musculature develops from leg muscle cells. *Development* **132**, 447-58.

- Vasyutina, E., Lenhard, D. C., Wende, H., Erdmann, B., Epstein, J. A. and Birchmeier, C. (2007). RBP-J (Rbpsiuh) is essential to maintain muscle progenitor cells and to generate satellite cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4443-8.
- Vasyutina, E., Stebler, J., Brand-Saberi, B., Schulz, S., Raz, E. and Birchmeier, C. (2005). CXCR4 and Gab1 cooperate to control the development of migrating muscle progenitor cells. *Genes Dev* **19**, 2187-98.
- Venuti, J. M., Morris, J. H., Vivian, J. L., Olson, E. N. and Klein, W. H. (1995). Myogenin is required for late but not early aspects of myogenesis during mouse development. *J Cell Biol* **128**, 563-76.
- Vogelstein, B. and Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 615-9.
- Wachtler, F. and Jacob, M. (1986). Origin and development of the cranial skeletal muscles. *Bibl Anat*, 24-46.
- Weintraub, H., Dwarki, V. J., Verma, I., Davis, R., Hollenberg, S., Snider, L., Lassar, A. and Tapscott, S. J. (1991). Muscle-specific transcriptional activation by MyoD. *Genes Dev* **5**, 1377-86.
- Wigmore, P. M. and Evans, D. J. (2002). Molecular and cellular mechanisms involved in the generation of fiber diversity during myogenesis. *Int Rev Cytol* **216**, 175-232.
- Williams, B. A. and Ordahl, C. P. (1994). Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification. *Development* **120**, 785-96.
- Wilson-Rawls, J., Molkentin, J. D., Black, B. L. and Olson, E. N. (1999). Activated notch inhibits myogenic activity of the MADS-Box transcription factor myocyte enhancer factor 2C. *Mol Cell Biol* **19**, 2853-62.
- Wilting, J. and Becker, J. (2006). Two endothelial cell lines derived from the somite. *Anat Embryol (Berl)* **211 Suppl 1**, 57-63.
- Wilting, J., Brand-Saberi, B., Huang, R., Zhi, Q., Kontges, G., Ordahl, C. P. and Christ, B. (1995). Angiogenic potential of the avian somite. *Dev Dyn* **202**, 165-71.
- Wilting, J., Christ, B., Yuan, L. and Eichmann, A. (2003). Cellular and molecular mechanisms of embryonic haemangiogenesis and lymphangiogenesis. *Naturwissenschaften* **90**, 433-48.
- Wright, W. E., Sassoon, D. A. and Lin, V. K. (1989). Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* **56**, 607-17.
- Yamashita, J., Itoh, H., Hirashima, M., Ogawa, M., Nishikawa, S., Yurugi, T., Naito, M., Nakao, K. and Nishikawa, S. (2000). Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* **408**, 92-6.
- Yang, X. M., Vogan, K., Gros, P. and Park, M. (1996). Expression of the met receptor tyrosine kinase in muscle progenitor cells in somites and limbs is absent in Splotch mice. *Development* **122**, 2163-71.
- Yoshida, T., Vivatbutsiri, P., Morriss-Kay, G., Saga, Y. and Iseki, S. (2008). Cell lineage in mammalian craniofacial mesenchyme. *Mech Dev* **125**, 797-808.
- Zammit, P. S., Golding, J. P., Nagata, Y., Hudon, V., Partridge, T. A. and Beauchamp, J. R. (2004). Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J Cell Biol* **166**, 347-57.
- Zimmerman, L. B., De Jesus-Escobar, J. M. and Harland, R. M. (1996). The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* **86**, 599-606.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Carmen Birchmeier für die Betreuung, ihre stete Diskussionsbereitschaft und Ratschläge, die diese Arbeit begleitet haben.

Bei Fritz Rathjen bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Desweiteren möchte ich mich sehr bei Jochen Welcker und Thomas Müller für die Diskussion meiner Ergebnisse und für Ratschläge bedanken.

Bei Elena Vasyutina bedanke ich mich für die Hilfe bei der Präparation von Geweben, und für die Zusammenarbeit im RBP-J-Projekt.

Ein großer Dank geht an Michael Strehle, Thomas Müller und Hagen Wende für die Korrektur dieser Dissertation.

Außerdem danke ich Petra Stallerow, Claudia Päseler, Ina Lauterbach, Bettina Barby, Carola Griffel und Karin Gottschling für die ausgezeichnete technische Assistenz.

Ein ganz besonderer Dank geht an alle anderen Mitglieder des Labors für die nette Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit, aber auch für gesellige Abende außerhalb des Labors.

Folgenden Wissenschaftlern danke ich dafür, dass sie mir Mauslinien zur Verfügung gestellt haben: Philippe Soriano (*Rosa26*), Jonathan A. Epstein (*Pax3<sup>cre</sup>*), Tasuku Honjo (*Rbp-j<sup>flox/flox</sup>*), Yumiko Saga (*Mesp1<sup>cre</sup>*), Jens Brüning (*Hes1<sup>flox/flox</sup>*), Francois Guillemot (*Hes5<sup>-/-</sup>*), Hagen Wende (*Lbx1<sup>cre</sup>*).

**Erklärung**

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

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

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt.

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

Diana Lenhard