

# 1 Einleitung

## 1.1 Der *Met*-Rezeptor und sein Ligand *HGF/SF*

Rezeptoryrosinkinasen stellen eine evolutionär relativ junge Gruppe von membranspannenden Oberflächenrezeptoren in Metazoen dar (Hunter et al., 1992). Sie katalysieren den Transfer des  $\gamma$ -Phosphatrestes von ATP auf eine Hydroxylgruppe der Aminosäure Tyrosin. Die zellulären Funktionen von Tyrosinkinaserzeptoren sind vielfältig. Sie dienen der Zell-Zellkommunikation und vermitteln mitogene oder anti-apoptotische Signale, lenken die Zielfindung von Axonen und induzieren Zellmotilität (Review in Hunter, 1998; Schlessinger, 2000).

Viele Rezeptortyrosinkinasen stimulieren die Proliferation von Zellen, und so ist es nicht verwunderlich, daß eine Reihe von ihnen ursprünglich als Onkogene identifiziert wurden. Auch der Tyrosinkinaserzeptor *Met* wurde erstmals in einer mutierten Form als Onkogen TPR-MET beschrieben (Cooper et al., 1984; Park et al., 1986).

### 1.1.1 Struktur

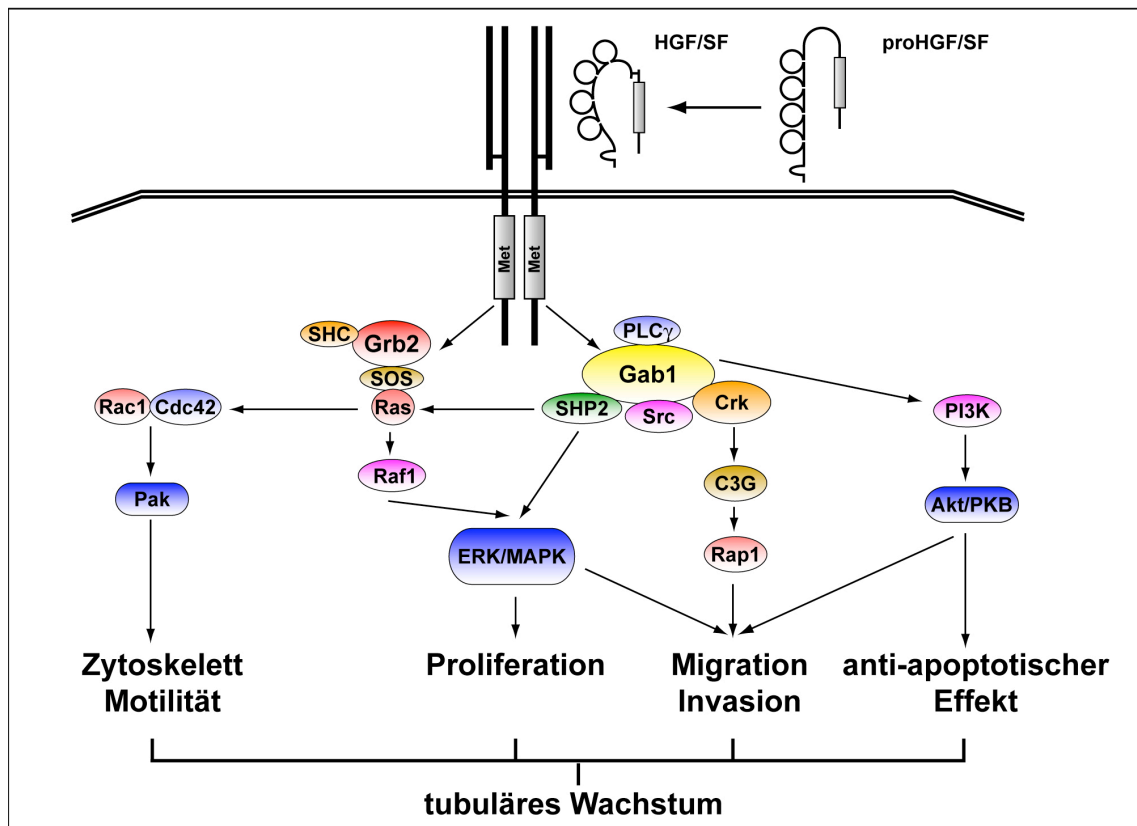
Der *Met*-Rezeptor wird als Pro-Peptid von 1436 Aminosäuren synthetisiert, das bei der Sezernierung proteolytisch in zwei Untereinheiten gespalten wird. Die beiden Untereinheiten sind durch Disulfidbrücken verbunden, wobei die kleinere  $\alpha$ -Kette extrazellulär lokalisiert ist, und die längere  $\beta$ -Kette einen extrazellulären Anteil, die Transmembrandomäne und eine cytoplasmatische Domäne umfaßt. Der zyttoplasmatische Teil des Rezeptors enthält eine Juxtamembrandomäne, die Kinasedomäne sowie einen C-terminalen Bereich mit der sogenannten *Multiple-Docking-Site*. Die *Multiple-Docking-Site* ist eine kurze Aminosäuresequenz, die die benachbarten Tyrosinreste Y1349 und Y1356 beinhaltet (Ponzetto et al., 1994). Diese Tyrosinreste werden bei Aktivierung des Rezeptors phosphoryliert und dienen als Bindungsstellen für eine Anzahl unterschiedlicher Signal- und Adaptormoleküle wie *Grb2*, *Gab1* und *SHC* (siehe Abb 1.1 sowie Kapitel 1.2; Übersicht in Furge et al., 2000). Ligand des *Met*-Rezeptors ist das sezernierte Signalmolekül *Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor (HGF/SF)*. Der Faktor wurde mehrfach in unabhängigen experimentellen Ansätzen entdeckt. Der Name "Hepatocyte Growth Factor" geht auf die Eigenschaft zurück, das Wachstum von Hepatozyten zu fördern (Miyazawa et al., 1993;

Nakamura et al., 1989; Zarnegar und Michalopoulos, 1989). Der Name "Scatter Factor" rührt von der Beobachtung, daß der Faktor Epithelzellen in Kultur dissoziiert; die Zellen nehmen eine mesenchymale Zellmorphologie an und werden motil (Gherardi et al., 1989; Stoker et al., 1987). Später konnte gezeigt werden, daß *HGF* und *SF* identisch sind (Weidner et al., 1991), und daß der Faktor an *Met* bindet (Bottaro et al., 1991).

*HGF/SF* ist eines von zwei Mitgliedern der Familie der Plasminogen-ähnlichen Wachstumsfaktoren. Das andere Mitglied dieser Familie, *HGF1/MSP* (HGF-like/Macrophage stimulating protein; Han et al., 1991; Skeel et al., 1991), bindet an den Tyrosinkinase-Rezeptor *Ron* (Gaudino et al., 1994; Wang et al., 1994). Beide Wachstumsfaktoren ähneln in ihrer Struktur und der proteolytischen Aktivierung der Proteinase *Plasminogen*; sie leiten sich evolutionär von einem gemeinsamen Vorläufermolekül ab (Donate et al., 1994). *HGF/SF* wird als Pro-Peptid von 728 Aminosäuren synthetisiert und durch proteolytische Spaltung in die aktive Form überführt. Die größere N-terminale  $\alpha$ -Kette verfügt über eine Hairpin-Schleife und vier Kringel-Domänen, die  $\beta$ -Kette weist eine enzymatisch inaktive Serin-Proteinase-Domäne auf. Die beiden Ketten sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden (Lokker et al., 1992). *HGF/SF* bindet an die  $\alpha$ -Kette und die ersten 212 Aminosäuren der  $\beta$ -Kette des *Met*-Rezeptors (Gherardi et al., 2003).

Da das ungespaltene Vorläufermolekül *proHGF/SF* den Rezeptor nicht aktivieren kann, stellt die proteolytische Spaltung eine Möglichkeit zur Regulierung des Signals dar. *Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA)* und *Tissue-Plasminogen-Aktivator (tPA)* können *proHGF/SF in vitro* spalten (Mars et al., 1993). *In vivo* gelang der Nachweis eines Aktivators, der nach Gewebeschäden von Epithelzellen als Vorläufermolekül sezerniert und durch Thrombin aktiviert wird (Shimomura et al., 1993), sowie von Inhibitoren dieses Aktivators, den Kunitz-Typ Serin-Protease-Inhibitoren *HAI-I* und *II* (Kawaguchi et al., 1997). Zusammengenommen deuten diese Befunde auf eine stringente Regulierung der *HGF/SF*-Aktivität durch die Proteolyse des Pro-Peptids. Eine weitere Ebene der Regulation ergibt sich aus der Eigenschaft von *HGF/SF*, mit hoher Affinität an Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) zu binden (Rosen et al., 1989; Weidner et al., 1990). HSPG werden in den interstitiellen Raum sezerniert und sind zellmembranassoziierte Bestandteile der Extrazellulären Matrix (ECM). Das Binden von *proHGF/SF* an HSPG behindert die freie Diffusion des Faktors im Interstitium und schränkt so den Wirkradius ein .

### 1.1.2 Signaltransduktion am *Met*-Rezeptor



**Abb.1.1: Signaltransduktion am *Met*-Rezeptor**

Aktiviertes *Met* bindet direkt oder indirekt eine Vielzahl von Adaptor- und Signalmolekülen. Die aktivierten Signalwege führen zu Änderungen in Zellzyklus und Zytoskelett und resultieren in erhöhter Proliferation sowie Motilität. Die Kombination aller von *Met* aktivierten Signalwege ermöglicht das tubuläre Auswachsen von Epithelzellen. Abkürzungen: ERK/MAPK: extracellular-signal-regulated kinase/mitogen-activated kinase; Grb2: growth factor receptor bound protein 2; Gab1: Grb2-associated binding protein 1; Pak: p21-activated protein kinase; Shp2: SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 2. (nach Birchmeier et. al., 2003)

Wird *Met* durch Bindung seines Liganden *HGF/SF* aktiviert, so kommt es zunächst zur Autophosphorylierung der Tyrosinreste Y1234 und Y1235 in der Kinasedomäne des Rezeptors (Naldini et al., 1991; Rodrigues und Park, 1994). In der Folge werden auch die Tyrosinreste Y1349 und Y1356 in der *Multiple-Docking-Site* des Rezeptors phosphoryliert (Ponzetto et al., 1994). An die phosphorylierten Tyrosinreste der *Multiple-Docking-Site* können nun andere Proteine über Domänen wie SH2 (*Src Homology 2*), PTB (*Phosphotyrosine binding*) und MBD (*Met binding domain*) binden (Pelicci et al., 1995; Ponzetto et al., 1994; Weidner et al., 1996). Neben Adaptorproteinen wie *Grb2* (Ponzetto et al., 1994), *SHC* (Pelicci et al., 1995), *Gab1* (Weidner et al., 1996) und *Crk/CRKL* (Garcia-Guzman et al., 1999; Sakkab et al., 2000) werden Signalmoleküle wie *PI3K* (Graziani et al., 1991), *PLCγ* und *Src* Kinase

(Ponzetto et al., 1994), *SOS* (Graziani et al., 1993) und Phosphatasen wie *SHP2* (Fixman et al., 1996; Schaeper et al., 2000) und *DEP-1* (Palka et al., 2003) direkt oder indirekt an den Rezeptor rekrutiert (siehe Abb. 1.1). Werden die Tyrosine Y1349 und Y1356 der *Multiple-Docking-Site* mutiert, so wird der Rezeptor dadurch inaktiviert (Ponzetto et al., 1994; Sachs et al., 1996). Chimäre Rezeptoren, bei denen die *Multiple-Docking-Site* von *Met* an eine Rezeptortyrosinkinase wie zum Beispiel *Trk* fusioniert wurde, können zelluläre Effekte auslösen, die denen von *Met* entsprechen (Komada und Kitamura, 1993; Sachs et al., 1996; Weidner et al., 1993; Zhu et al., 1994). Diese Ergebnisse zeigen, daß die Signaltransduktion durch den *Met*-Rezeptor primär über die *Multiple-Docking-Site* erfolgt.

Aktivierung des *Met*-Signalwegs kann in verschiedenen Zelllinien eine Reihe unterschiedlicher Antworten hervorrufen. In vielen Zelltypen sind erhöhte Proliferation sowie anti-apoptotische Effekte zu beobachten (Übersicht in Furge et al., 2000). Manche Epithelzellen nehmen nach Stimulation mit *HGF/SF* eine mesenchymale Morphologie an und werden motil (Übersicht in Thiery, 2002). Und schließlich induziert *HGF/SF* bei bestimmten, in einer Kollagenmatrix kultivierten Epithelzellen die Ausbildung verzweigter tubulärer Strukturen (Übersicht in Rosario und Birchmeier, 2003).

Da *Met* direkt und indirekt eine große Zahl von Signalmolekülen binden kann, ist die experimentelle Zuordnung der verschiedenen zellulären Antworten zu bestimmten Signalwegen nicht einfach (Abb 1.1). Aktivierung des *ERK/MAP Kinase* Signalwegs kann über *Grb2/Ras* als auch über *Gab1/SHP2* erfolgen und ist sowohl für Proliferation als auch Zellmotilität erforderlich (Hartmann et al., 1994; Lock et al., 2000; Maroun et al., 1999a; Ponzetto et al., 1994; Ridley et al., 1995; Schaeper et al., 2000; Weidner et al., 1996). Signalübertragung durch *PI3K* ist ebenfalls für die Zellmotilität wichtig, dazu für den anti-apoptotischen Effekt von *Met*, der über *Akt/PKB* vermittelt wird (Fan et al., 2001; Potempa und Ridley, 1998; Xiao et al., 2001). Zelladhäsion und Motilität können auch durch die GTPasen *Rac1* und *Rap1* beeinflusst werden, die in die Signaltransduktionswege *Ras/Rac1/PAK-1* bzw. *Gab1/Crk/Rap1* integriert sind (Lamorte et al., 2000; Ridley et al., 1995; Royal et al., 2000; Sakkab et al., 2000). Das auch als *branching morphogenesis* bezeichnete Auswachsen von Epithelzellen in verzweigte tubuläre Strukturen *in vitro* scheint schließlich eine koordinierte Aktivierung aller oben angeführten Signalwege zu erfordern.

## 1.2 Das Adaptorprotein *Gab1*

*Gab1* ist ein Adaptorprotein und Mitglied einer Familie von Docking-Proteinen, zu der auch Insulinrezeptor-Substrat (*IRS*), FGF-Rezeptor-Substrat (*FRS-2/SNT1*) und *p62dok* gehören (Review in Liu und Rohrschneider, 2002). Es wurde erstmals aufgrund seiner Assoziation mit *Grb2* identifiziert (*Grb2-associated binding protein-1*; Holgado-Madruga et al., 1996). Später wurden mit *Gab2* und *Gab3* weitere Mitglieder der Proteinfamilie kloniert (Gu et al., 1998; Nishida et al., 1999; Wolf et al., 2002; Zhao et al., 1999). Homologe von *Gab1* finden sich mit *DOS* auch in *Drosophila* und mit *Soc1* in *Caenorhabditis elegans* (Herbst et al., 1996; Raabe et al., 1996; Schutzman et al., 2001).

Docking-Proteine wie *Gab1* fungieren als spezifische Substrate von Rezeptortyrosinkinasen. Sie besitzen eine N-terminale lipidbindende Domäne wie die PH- (*pleckstrin homology*) Domäne oder eine N-terminale Myristilisierungsdomäne, und binden über eine zentrale PTB- (*phosphotyrosine binding*) Domäne direkt an aktivierte Tyrosinkinaserezeptoren. Dazu verfügen sie über eine Anzahl von Tyrosinresten, die phosphoryliert als Bindungsstellen für die SH2-Domänen von Signalproteinen dienen (Übersicht in Liu und Rohrschneider, 2002).

Die Interaktion von *Gab1* mit *Met* wurde erstmals in einem Hefe-Zwei-Hybrid-Experiment nachgewiesen (Weidner et al., 1996). *Gab1* bindet dabei mit einer einzigartigen Phosphotyrosin-Bindungsdomäne, der MBD (*Met binding domain*; (Lock et al., 2000; Schaeper et al., 2000) an Y1349 und Y1356 des aktivierten *Met*-Rezeptors; auch eine indirekte Bindung über *Grb2* ist möglich (Lock et al., 2002; Nguyen et al., 1997; Weidner et al., 1996). Im Gegensatz zur Interaktion von *Gab1* mit anderen Rezeptortyrosinkinasen wie dem EGF-Rezeptor oder dem Insulinrezeptor führt die Bindung an *Met* zu einer langanhaltenden Phosphorylierung des Proteins (Maroun et al., 1999b). Phosphoryliertes *Gab1* bindet eine Reihe von Signalmolekülen über deren SH2- und PTB-Domänen, darunter *PI3K*, *PLC $\gamma$* , *Crk/CRKL* und *SHP2* (Garcia-Guzman et al., 1999; Sakkab et al., 2000). Mutationsexperimente zeigten, daß die Interaktion mit der Proteintyrosinphosphatase *SHP2* essentiell für tubuläres Wachstum von Epithelzellen *in vitro* ist (Maroun et al., 2000; Schaeper et al., 2000). *SHP2* wird durch Bindung an *Gab1* aktiviert und an die Plasmamembran rekrutiert. Aktivierung von *SHP2* führt zu einer lang andauernden Stimulierung des *PI3K*- und des *ERK/MAP-Kinase* Signalweges (Maroun et al., 2000; Shi et al., 1998; Wu et al., 2001). Wird diese kontinuierliche

Aktivierung des Signalweges durch Mutation von *SHP2* bzw. der SHP2-Bindestelle von *Gab1* verhindert, dann findet auch kein *HGF/SF*-induziertes tubuläres Wachstum von MDCK-Zellen *in vitro* statt.

### 1.3 Das *Met*-Signalsystem in der Embryonalentwicklung und im adultem Organismus

*Met* und sein Ligand *HGF/SF* werden während der Embryonalentwicklung der Maus von verschiedenen Geweben exprimiert, so zum Beispiel in Plazenta und Leber. Dabei wird *Met* in Epithelzellen gebildet, während *HGF/SF* von benachbarten mesenchymalen Zelltypen sezerniert wird (Sonnenberg et al., 1993a). Dieses Expressionsmuster legt einen parakrinen Wirkmechanismus bei der Bildung epithelialer Organe nahe. Auch im adulten Organismus werden *HGF/SF* und sein Rezeptor exprimiert, zum Beispiel in der Leber und im Zentralen Nervensystem (Achim et al., 1997; Jung et al., 1994; Thewke und Seeds, 1999; Yang und Park, 1995).

Gezielte Mutationen von *Met* und *HGF/SF* in der Maus halfen, die Funktion des Signalsystems während der Embryonalentwicklung aufzuklären. Nullmutanten von *Met* oder *HGF/SF* sterben zwischen dem embryonalen Tag E12,5 und E16,5 aufgrund eines Defektes in der Ausbildung der plazentalen Labyrinthenschicht. Da der Embryo über die Plazenta mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt wird, führt eine Fehlentwicklung dieses Gewebes zur Unterversorgung und damit zum Absterben des Embryos. Zudem ist die Leber homozygot mutanter Embryonen signifikant kleiner als die der Kontrolltiere, und die Analyse von chimären Tieren zeigte, daß *Met*<sup>-/-</sup> ES Zellen nicht zur Leber beitragen (Bladt et al., 1995; Schmidt et al., 1995; Uehara et al., 1995).

Eine unerwartete Rolle von *Met* wurde bei der Analyse der Skelettmuskulatur entdeckt. In Nullmutanten von *Met* bzw. *HGF/SF* fehlen alle Muskelgruppen, die aus migrierenden Vorläuferzellen hervorgehen. Diese Zellen wandern aus dem Dermomyotom in die Extremitätenanlagen, in das Zwerchfell und die Zunge und bilden dort Muskulatur aus (zur Muskelentwicklung siehe Abschnitt 1.5). In *Met*-mutanten Tieren unterbleibt die Delamination der Vorläuferzellen vom Dermomyotom, die Zellen wandern nicht in die Extremitätenanlage ein (Bladt et al., 1995). Transgene Mäuse, bei denen die Tyrosinreste Y1349 und Y1356 der *Multiple-Docking-Site* mutiert wurden, zeigen einen ähnlichen Phänotyp (Maina et al., 1996). Die Überexpression von *HGF/SF* in der Maus hingegen resultiert in der ektopischen Bildung von Skelettmuskzellen im

Rückenmark, die wahrscheinlich auf eine aberrante Wanderung der Vorläuferzellen zurückzuführen ist (Takayama et al., 1996). Zusätzlich wurde in diesen transgenen Tieren auch eine abnormale Wanderung von Melanozytenvorläuferzellen nachgewiesen. Nullmutationen von *Gabl*, dem Adaptormolekül im Signalübertragungsweg des *Met*-Rezeptors, zeigen Phänotypen, die denen der *Met*-mutanten Tiere ähneln (Itoh et al., 2000; Sachs et al., 2000). Homozygot mutante Tiere sterben zwischen Tag E13.5 und E18.5 der Embryonalentwicklung aufgrund eines Defektes in der Labyrinthschicht der Plazenta. Im Gegensatz zu den *Met*-Nullmutanten delaminieren in *Gabl*-Mutanten die migrierenden Muskelvorläuferzellen vom Dermomyotom. Die Einwanderung dieser Zellen in die Extremitätenanlage ist allerdings stark beeinträchtigt. So sind in der Vorderextremität fast keine extensorischen Muskeln zu finden, und die Flexoren sind weniger stark ausgebildet. Auch die Muskeln der hinteren Extremität sind in ihrer Entwicklung gestört, und der Zwerchfellmuskel fehlt völlig.

*Met* und *HGF/SF* werden auch im embryonalen und adulten peripheren und zentralen Nervensystem exprimiert (Achim et al., 1997; Sonnenberg et al., 1993b; Thewke und Seeds, 1999). *HGF/SF* kann *in vitro* als chemoattraktives Agens für die Axone von Motoneuronen wirken (Caton et al., 2000; Ebens et al., 1996; Yamamoto et al., 1997). Andere Arbeiten zeigten, daß *HGF/SF* bei der Entwicklung des sympathischen Nervensystems und von sensorischen Neuronen in der Haut von Extremitäten und Körperwand beteiligt ist (Maina et al., 1998; Maina et al., 1997). Eine hypomorphe Mutante des *Met*-Rezeptors in der Maus zeigt Defekte in der Entwicklung des Cerebellum, vermutlich aufgrund reduzierter Proliferation von Körnerzellen (Ieraci et al., 2002).

#### **1.4 Met und HGF/SF in menschlichen Erkrankungen**

Der Tyrosinkinase-Rezeptor *Met* wurde ursprünglich als TPR-MET Onkogen in einem *in vitro* Transfektions/Transformations-Assay identifiziert (Cooper et al., 1984). TPR-MET entstand durch ein chromosomales Rearrangement, bei dem der C-terminale Teil von *Met* (Chromosom 7 in *H. sapiens*) an den N-terminalen Teil des Transkriptionsfaktors TPR (Chromosom 1) fusionierte (Park et al., 1986). Das resultierende cytoplasmatische Fusionsprotein enthält die Leucin-Zipper-Domäne von *TPR* und die Kinasedomäne von *Met*. Aufgrund der über die Leucin-Zipper-Domäne

vermittelten Dimerisierung und damit Aktivierung der Kinasedomäne ist TPR-MET konstitutiv aktiv und wirkt *in vitro* und *in vivo* als Onkogen (Rodrigues und Park, 1993). In der Folge wurde eine Deregulierung von *Met* und *HGF/SF* in einer Vielzahl unterschiedlicher Tumore gefunden, so in Sarkomen, Karzinomen des Darms, der Leber oder der Niere (Übersicht in Danilkovitch-Miagkova und Zbar, 2002; Maulik et al., 2002). Neben Überexpression von *Met* konnten auch spontane oder vererbte Punktmutationen identifiziert werden, z.B. beim Papillären Nierenkarzinom (Schmidt et al., 1997). Verschiedenen Studien haben einen Zusammenhang zwischen Überexpression von *Met* im Tumorgewebe und einer schlechten Krankheitsprognose aufgezeigt, z.B. bei Brustkrebs (Beviglia et al., 1997; Kang et al., 2003). Eine Inhibition des *Met*-Signalsystems in Tumoren wäre somit von großem therapeutischen Interesse.

Der *Met*-Ligand *HGF/SF* könnte dagegen bei Erkrankungen von Leber und Niere therapeutisch genutzt werden (Fujiwara et al., 1993; Kawaida et al., 1994). *HGF/SF* stimuliert das Wachstum von Epithelzellen der Leber und der Niere und fördert die Regeneration dieser Organe. Zu Therapie Zwecken in den Blutstrom injiziertes exogenes *HGF/SF* zirkuliert aber schon nach wenigen Minuten nicht mehr. Dies ist auf die Bindung von *HGF/SF* an Heparin zurückzuführen, das in hoher Konzentration in der extrazellulären Matrix und auf Zelloberflächen vorhanden ist. Es werden deshalb Anstrengungen unternommen, durch gentechnische Modifizierung therapeutisch wirksamere Varianten von *HGF/SF* zu erzeugen, die nicht mehr an Heparin binden (Hartmann et al., 1998).

Seit einigen Jahren wird auch die mögliche Beteiligung von *HGF/SF* und *Met* an kardiovaskulären Erkrankungen diskutiert. *Met* und sein Ligand werden während der Embryonalentwicklung in Vorläuferzellen des Myokard exprimiert (Rappolee et al., 1996). In Patienten konnte nachgewiesen werden, daß *HGF/SF* und *Met* nach einem myokardialen Infarkt verstärkt im Myokard in der Nähe des geschädigten Bereiches exprimiert werden (Sato et al., 2001). Mehrere Studien deuten darauf hin, daß *HGF/SF* möglicherweise eine zytoprotektive Rolle nach dem myokardialen Infarkt übernimmt (Kitta et al., 2001; Nakamura et al., 2000; Ueda et al., 2001). Eine konditionelle Nullmutante von *Met* im Herzen könnte hier bei der Aufklärung des Wirkmechanismus hilfreich sein, und mittelbar vielleicht zur Entwicklung neuer Therapieformen beitragen.

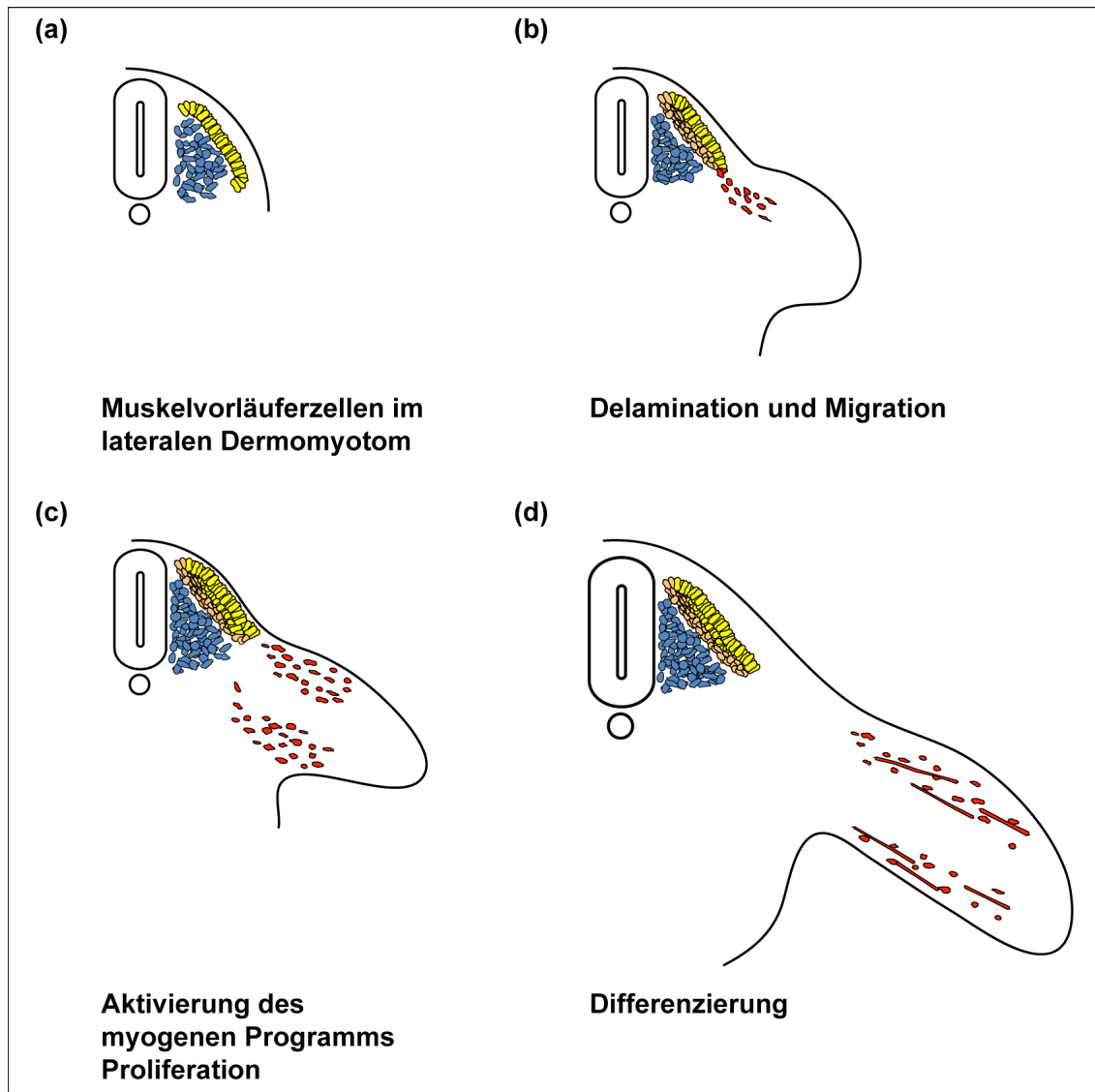


### 1.5 Entwicklung der Skelettmuskulatur in Wirbeltieren

Die Skelettmuskulatur höherer Wirbeltiere kann nach ihrem Ursprung in drei Gruppen eingeteilt werden: die Muskulatur des Kopfes, die epaxiale und die hypaxiale Körpermuskulatur (Christ und Ordahl, 1995; Noden, 1983). Die Muskulatur des Kopfes wird aus Zellen des Kopfmesoderms geformt. Die Körpermuskulatur hingegen wird von Dermomyotomen gebildet, die aus den Somiten hervorgehen.

Die Somiten entstehen aus dem paraxialen Mesoderm und liegen als segmentierte, paarig angelegte epitheliale Strukturen neben dem Neuralrohr. Signale aus dem Neuralrohr und dem umgebenden Gewebe führen zu einer Differenzierung der Somiten. Die dorsale Hälfte eines Somiten wird unter dem Einfluß von Signalmolekülen der *Wnt* Familie zum epithelialen Dermomyotom (Goulding und Paquette, 1994; Kiefer und Hauschka, 2001), die ventrale Hälfte differenziert zum Sklerotom (Borycki und Emerson, 2000; Fan und Tessier-Lavigne, 1994; Johnson et al., 1994; McMahon et al., 1998); siehe Abb. 1.2).

Während der weiteren Embryonalentwicklung bildet der dorsale Anteil des Dermomyotoms das Myotom aus, aus dem Teile der Muskulatur des Rückens gebildet werden (Abb. 1.2b). Das laterale Dermomyotom bildet hypaxiale Skelettmuskulatur. Dabei wird die Muskulatur der ventralen Körperwand aus nicht-migrierenden Zellen des lateralen Dermomyotoms gebildet (Cinnamon et al., 1999). Die Muskulatur der Extremitäten, des Zwerchfells und der Zunge leitet sich dagegen aus einer Population von migrierenden Zellen ab (Ordahl und Le Douarin, 1992). Die Vorläufer der Extremitätenmuskulatur lösen sich auf der Höhe der Extremitätenknospen von der lateralen Kante des Dermomyotoms ab und wandern in die Extremität ein (Abb. 1.2b). In den Extremitäten aggregieren diese Vorläuferzellen zu dorsalen und ventralen Muskelmassen (Christ et al., 1977); Abb. 1.2c). Diese Aggregate enthalten an ihrer Oberfläche proliferierende, *Pax3* und *Myf5* exprimierende Vorläuferzellen und eine innere Schicht von *MyoD* exprimierenden, differenzierenden Myoblasten (Patel et al., 2002). Nach einer Phase der Proliferation beginnen die Muskelvorläuferzellen zu differenzieren und zu primären Muskelfasern zu fusionieren (Stockdale und Holtzer, 1961); Abb. 1.2d).



**Abb.1.2: Entwicklung der Extremitätenmuskulatur bei Säugern**

**(a)** Muskelvorläuferzellen im lateralen Dermomyotom (gelb) und Sklerotom (blau) der brachialen Somiten **(b)** Zellen aus dem Dermomyotom differenzieren zum Myotom (rosa). Muskelvorläuferzellen (rot) delaminieren auf Höhe der Extremitäten von der lateralen Kante des Dermomyotoms und wandern in die Extremität ein **(c)** Die Muskelvorläuferzellen aktivieren myogene Transkriptionsfaktoren und beginnen zu proliferieren **(d)** Die Vorläuferzellen differenzieren zu Myoblasten, die schließlich zu Muskelfasern fusionieren (nach Duprez 2002).

Der oben beschriebene Prozeß der Entwicklung hypaxialer Muskulatur aus migratorischen Vorläuferzellen ist komplex und wird von einer Anzahl externer und zelleigener Signale gesteuert. Für die Bildung der Muskelvorläuferzellen im ventrolateralen Dermomyotom ist der Transkriptionsfaktor *Pax3* essentiell. *Pax3* gehört zur Familie der Pax-Transkriptionsfaktoren, die durch eine Paired- und eine Homöobox charakterisiert sind (Goulding et al., 1991). Der Transkriptionsfaktor wird zunächst im gesamten Somiten, später nur im Dermomyotom und verstärkt an der ventrolateralen Dermomyotomkante exprimiert (Bober et al., 1994; Goulding et al., 1994; Williams und

Ordahl, 1994). Natürlich vorkommende mutante Allele von *Pax3* wurden in der *plotch* Maus gefunden und ermöglichten es, die Funktion dieses Gens in der Entwicklung hypaxialer Muskelvorläuferzellen zu analysieren (Epstein et al., 1991; Franz et al., 1993). In *Pax3*-mutanten Mäusen ist die Zahl der Muskelvorläuferzellen im Dermomyotom durch erhöhte Apoptose vermindert. Eine Auswanderung der Muskelvorläuferzellen in die Extremitätenanlagen findet nicht statt, so daß die Extremitäten- und Zwerchfellmuskulatur vollständig fehlt (Bober et al., 1994; Daston et al., 1996; Goulding et al., 1994; Tremblay et al., 1998). Die Expression von *Met* im Dermomyotom von *plotch* Mäusen ist reduziert (Yang et al., 1996). Es konnte auch gezeigt werden, daß die Expression von *Pax3* und *Met* im ventrolateralen Dermomyotom überlappt, und daß der *Met*-Promotor Bindungsstellen für *Pax3* enthält (Epstein et al., 1996). Substitution von *Pax3* mit *Pax7* durch *knock-in* Mutagenese in der Maus resultiert in einer gestörten Entwicklung der Extremitätenmuskulatur. Dieser Phänotyp wird auf eine unzureichende Aktivierung des *Met*-Gens zurückgeführt (Relaix et al., 2004). Es existieren also starke Hinweise darauf, daß *Pax3* direkt oder indirekt die Expression von *Met* in migrierenden Vorläuferzellen kontrolliert. In Mäusen mit Nullmutationen der Gene von *Met* und *HGF/SF* ist die Bildung der Muskelvorläuferzellen im Dermomyotom nicht gestört. Die Zellen wandern jedoch nicht aus, so daß die Muskulatur der Extremitäten, des Zwerchfells und bestimmte Zungenmuskeln fehlen (Bladt et al., 1995; Dietrich et al., 1999).

Eine weitere Ebene in der genetischen Kontrolle der Migration von Muskelvorläuferzellen konnte in dem Transkriptionsfaktor *Lbx1* identifiziert werden. *Lbx1* ist ein Säuger-Homolog von Homöobox-Transkriptionsfaktoren der *ladybird* Familie aus *Drosophila* (Jagla et al., 1995). Es wird während der Embryonalentwicklung der Maus in migrierenden hypaxialen Muskelvorläuferzellen exprimiert (Dietrich et al., 1998; Jagla et al., 1995). Nullmutationen von *Lbx1* in der Maus zeigten, daß die Migration der hypaxialen Muskelvorläuferzellen beeinträchtigt ist (Brohmann et al., 2000; Gross et al., 2000; Schafer und Braun, 1999). Die Zellen delaminieren zwar vom Dermomyotom, ihre Migration an die Zielorte ist jedoch gestört. Sie scheinen bestimmte Signale, die ihre Wanderung steuern, nicht zu erkennen oder nicht korrekt zu interpretieren. Der Transkriptionsfaktor *Lbx1* reguliert deshalb vermutlich Gene, die für die Zielfindung von Muskelvorläuferzellen wichtig sind (Birchmeier und Brohmann, 2000).

Ein Signalsystem, das nicht nur die Delamination der Muskelvorläuferzellen vom Dermomyotom, sondern auch ihre Wanderung oder Zielfindung steuern könnte, ist der bereits erwähnte *Met*-Rezeptor und sein Ligand *HGF/SF*. *HGF/SF* wird von mesenchymalen Zellen entlang der Migrationsroute gebildet und kann somit auf die *Met* exprimierenden Muskelvorläuferzellen auch während der Wanderung wirken (Dietrich et al., 1999). Das durch den *Met* Rezeptor empfangene Signal wird in den Zellen unter anderem von *Gab1* weitergeleitet, dem oben beschriebenen Adaptorprotein mit vielfältigen intrazellulären Interaktionspartnern.

Sind die migrierenden Muskelvorläuferzellen schließlich an ihren Zielorten in den Extremitäten angekommen, so muß ihre Differenzierung zu Myoblasten initiiert werden. Dies geschieht durch die Expression von Genen der MRF Familie, *basic-helix-loop-helix* (bHLH) Transkriptionsfaktoren, zu denen *Myf5*, *MyoD*, *Myogenin* und *MRF4* gehören (Ott et al., 1991; Pownall und Emerson, 1992; Sassoon, 1993; eine Übersicht findet sich in Arnold und Braun, 2000). Da die Überexpression von *Myf5* und *MyoD* *in vitro* eine Vielzahl von Zelltypen zu Muskelzellen differenzieren kann, werden sie auch als Muskeldeterminierungsfaktoren bezeichnet (Choi et al., 1990; Weintraub et al., 1989).

Ein wichtiger Aspekt bei der Muskelbildung in der embryonalen Extremität ist die Balance zwischen Proliferation und Differenzierung der myogenen Vorläuferzellen. Da nur eine begrenzte Zahl von Muskelvorläuferzellen in die Extremitäten einwandert, müssen sie dort durch Zellteilung vermehrt werden, um ausreichend Muskelmasse bilden zu können. Die Proliferation der Muskelvorläuferzellen durch eine Vielzahl von Signalen wie *Fibroblast-Growth-Factors*, *Bone-Morphogenic-Proteins*, *Myostatin*, *Noggin* oder *Twist* reguliert (Übersicht in Patel et al., 2002). Für *HGF/SF* konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, daß es die Vorläuferzellen in einem proliferierenden und undifferenzierten Zustand erhält (Scaal et al., 1999).

## 1.6 Konditionelles Gene-Targeting

In den letzten Jahren wurden Techniken entwickelt, die mit Hilfe von DNA-Rekombinasen die gewebespezifische Mutation von Genen *in vivo* ermöglichen (Review in Branda und Dymecki, 2004).

Die DNA-Rekombinase Cre ist ein Enzym des *E.coli*-Phagen P1. Der Phage zirkularisiert mit Hilfe von Cre seine DNA für die Verpackung in den Phagenkopf

(Sternberg et al., 1981). Cre erkennt kurze DNA-Sequenzen von 34 Nukleotiden, die sog. loxP Sequenzen, und zirkularisiert DNA, die sich zwischen zwei solcher Sequenzen befindet. LoxP Sequenzen sind bis auf 8 Basenpaare in der Mitte palindromisch aufgebaut; diese 8 Basenpaare geben der loxP Sequenz eine Orientierung, die per Konvention durch einen Pfeil dargestellt wird. Sind zwei benachbarte loxP Sequenzen gleich orientiert, so wird die Cre-Rekombinase die DNA zwischen ihnen ausschneiden und zirkularisieren. Sind die loxP Sequenzen jedoch entgegengesetzt orientiert, so wird die DNA zwischen ihnen nicht ausgeschnitten, sondern invertiert (Abremski et al., 1983; Hoess und Abremski, 1985).

Zunächst wurde Cre dazu eingesetzt, in kultivierten Säugerzellen gezielt einen von loxP Elementen flankierten Sequenzabschnitt aus einer DNA-Sequenz herauszuschneiden (Sauer und Henderson, 1988). Im nächsten Schritt wurde diese Technik auf ganze Organismen übertragen, und damit die Technik der "konditionellen Mutagenese" im Modellorganismus Maus geschaffen (Gu et al., 1994; Orban et al., 1992). Bei der konditionellen Mutagenese werden durch homologe Rekombination und ES Zelltechnologie zwei loxP Sequenzen in das Genom der Maus eingebracht, die essentielle Bereiche des Zielgens flankieren. Wird nun in einem bestimmten Gewebe Cre exprimiert, so werden diese Abschnitte aus dem genomischen Locus entfernt, und das Gen damit gezielt in diesem Gewebe inaktiviert. Durch die Wahl eines geeigneten Cre-Transgens läßt sich das Zielgen spezifisch in gewünschten Geweben und Organen mutieren. Mit dem Einsatz induzierbarer Promotoren kann man zusätzlich auch den Zeitpunkt bestimmen, zu dem Cre exprimiert werden soll (Kellendonk et al., 1996; Kuhn et al., 1995).

Mit Hilfe der konditionellen Mutagenese ist es so möglich geworden, die häufig bestehende embryonale Letalität von konventionellen Nullallelen zu umgehen. Für den *Met*-Rezeptor würde dies zum Beispiel bedeuten, das konditionelle Nullallel durch Verwendung geeigneter Cre-Transgene gezielt im Gehirn oder in der Leber zu inaktivieren, in der Plazenta jedoch intakt zu lassen.

## 1.7 Ziel der vorliegenden Arbeit

Die Nullmutation von *Met* in der Maus hat wertvolle Informationen über die Rolle dieses Tyrosinkinase-Rezeptors in der Embryonalentwicklung erbracht (Bladt et al., 1995). Die embryonale Letalität der Mutation verhinderte jedoch eine Analyse des *Met-HGF/SF* Signalsystems im adulten Organismus. Durch Etablierung eines konditionellen Nullallels mittels ES Zell-Technologie und Cre/loxP System sollte diese Beschränkung überwunden werden. Zudem sollte ein ZNS-spezifisches Transgen in der Maus etabliert werden, um die Funktion von *Met* im Zentralen Nervensystem zu studieren.

Durch die Kombination von Nullallelen von *Met* und *Gab1* sollte darüber hinaus versucht werden, die Rolle von *Met* in der Wanderung von Muskelvorläuferzellen aus dem Dermomyotom an ihre Zielorte in Extremitäten, Zwerchfell und Zunge weiter zu charakterisieren. Von Interesse war hier besonders die Frage, ob *Met* nach der Delamination der Muskelvorläuferzellen vom Dermomyotom weitere Funktionen bei der Wanderung oder Zielfindung dieser Zellen übernimmt.