Funktionelle Analyse des Shp2 Gens in der Entwicklung der Muskulatur der Maus

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

Jens Robin Schneider

aus Velbert

Mai, 2011

Die dieser Dissertation zugrunde liegende Arbeit wurde in den Jahren 2007-2011 unter Betreuung von Carmen Birchmeier am Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin ausgeführt.

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

Disputation am: 1.September 2011

Inhaltsverzeichnis

IN	INHALTSVERZEICHNIS2				
1	EIN	ILEI	TUN	IG	5
	1.1	Def	r Uf	SPRUNG DER SKELETTMUSKULATUR IN VERTEBRATEN	5
	1.2	DIF	FER	ENZIERUNG EMBRYONALER MUSKELVORLÄUFERZELLEN	7
	1.3	Pos	STN	ATALE MUSKELENTWICKLUNG	9
	1.4	DIE	Tyf	ROSIN-PHOSPHATASE SHP2	13
	1.5	Das	S SH	P2 PROTEIN UND SEINE AKTIVIERUNG	13
	1.6	DIE	Ro	LLE VON SHP2 IN DER AKTIVIERUNG VON SIGNALWEGEN	14
	1.7	DIE	Ro	LLE VON SHP2 IN DER ENTWICKLUNG	17
	1.8	ZIEI	LSET	ZUNG DIESER ARBEIT	19
2	MA	TEF	RIAL	UND METHODEN	21
	2.1	MA	TERI	AL	21
	2.	1.1	Сн	EMIKALIEN UND ENZYME	21
	2.	1.2	AN	TIKÖRPER	
	2.	1.3	MA	USSTÄMME UND TRANSGENE MAUSLINIEN	
	2.2	ME	тно	DEN	24
	2.2.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN			DLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	24
2.2.1.1		.1	ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA AUS BIOPSIEN UND		
				EMBRYONALEM GEWEBE	24
		2.2.1	.2	POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	25
	2.2.2 HISTOLOGISCHE METHODEN				
		2.2.2	2.3	HERSTELLUNG VON GEFRIERSCHNITTEN AUS EMBRYONALEM	GEWEBE28
		2.2.2	2.4	HERSTELLUNG VON GEFRIERSCHNITTEN AUS POSTNATALEM	Gewebe 29
		2.2.2	2.5	IMMUNHISTOLOGIE AUF GERFRIERSCHNITTEN	29
		2.2.2	2.6	DETEKTION VON ZELLPROLIFERATION	30
		2.2.2	2.7	DETEKTION VON APOPTOTISCHEN ZELLEN	30
		2.2.2	2.8	ISOLIERUNG UND IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG EINZELNER	
				MUSKELFASERN	30

	2.2	2.3 PROTEINBIOC	HEMISCHE METHODEN – "WESTERN BLOT"-ANALYSE	. 31
	2	2.2.3.9 SDS-Pc	DLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	31
		2.2.3.10 ELEKTRO	TRANSFER VON PROTEINEN AUF NITROZELLULOSE-	
		MEMBRA	NEN ("WESTERN BLOT")	32
		2.2.3.11 IMMUNOL	OGISCHER NACHWEIS VON PROTEINEN AUF	
		NITROZEI	LLULOSE-MEMBRANEN	32
	2.2	2.4 DOKUMENTAT	ION UND ANALYSE HISTOLOGISCHER DATEN	. 33
3	ER	GEBNISSE		. 34
	3.1	DIE REKOMBINATI	ONSEFFIZIENZ DER PAX7 ^{CRE} MAUSLINIE	34
	3.2	MIGRATION VON M	IUSKELVORLÄUFERZELLEN IN COSHP2 MUTANTEN	. 38
	3.3	KEIN OFFENSICHT	LICHEN PHÄNOTYP IN COSHP2 MUTANTEN ZUM	
		ZEITPUNKT DER G	EBURT	39
	3.4	WACHSTUMSSTÖF	RUNGEN IM VERLAUF DER ENTWICKLUNG VON	
		COSHP2 MUTANT	EN	. 40
	3.5	STÖRUNGEN IN DE	R POSTNATALEN MUSKELENTWICKLUNG VON	
		COSHP2 MUTANT	EN	. 42
	3.6	Veränderungen	IN DER SATELLITENZELLPOPULATION WÄHREND DER	
		POSTNATALEN EN	TWICKLUNG VON COSHP2 MÄUSEN	. 45
	3.7	VERÄNDERUNGEN	IN DER SATELLITENZELLPOPULATION DER	
		EPAXIALEN MUSKI	JLATUR	. 48
	3.8	VERÄNDERUNGEN	in den Myf5- und Mogenin-exprimierenden	
			IN COSHP2 MÄUSEN	. 50
	3.9	PROLIFERATION U	ND APOPTOSE MYOGENER VORLÄUFERZELLEN	. 54
	3.10	REDUKTION DER F	PROLIFERATIONSRATE DER SATELLITENZELLEN IN	
		DER COSHP2 MUT	ANTE	. 56
	3.11	REDUKTION DER F	PROLIFERATION VON MYF5- UND	
		MYOGENIN-POSIT	IVEN MYOBLASTEN	. 59
	3.12	AKTIVIERUNG DES	PI3K/AKT- UND RAS/ERK-SIGNALWEGS IN	
		DER COSHP2 MUT	ANTE	. 61

4	DIS	KUSSION	. 64		
	4.1	ENTWICKLUNGSDEFEKTE DER COSHP2 MUTANTE	. 64		
	4.2	DER EINFLUSS DER PROLIFERATION MYOGENER ZELLEN AUF DAS			
		POSTNATALE MUSKELWACHSTUM	. 65		
	4.3	DER PROGRESSIVE RÜCKGANG MYOGENER ZELLPOPULATIONEN	. 66		
	4.4	DIE AKTIVIERUNG DES RAS/ERK- UND AKT/PI3K-SIGANLWEGS	. 66		
	4.5	AKT/PI3K vs. Ras/Erk	. 68		
	4.6	SPÄTE AUSBILDUNG DES COSHP2 PHÄNOTYPS	. 69		
	4.7	SATELLITENZELLEN UND IHRE NISCHE	. 70		
	4.8	MÖGLICHE SHP2 REGULIERTE SIGNALWEGE IN DER			
		MUSKELENTWICKLUNG	. 71		
	4.9	DIE ROLLE VON SHP2 IM INTEGRIN-SIGNALWEG	. 73		
5	LIT	ERATUR	. 75		
6	ZU	SAMMENFASSUNG/ABSTRACT	. 88		
A	ANHANG9				
	Αвκΰ	JRZUNGSVERZEICHNIS	. 91		
	Danksagung				
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG9				

1 Einleitung

1.1 Der Ursprung der Skelettmuskulatur in Vertebraten

Die Skelettmuskulatur in Vertebraten hat ihren Ursprung in den Somiten. Somiten sind epitheliale Strukturen, welche aus dem paraxialem Mesoderm hervorgehen, und liegen entlang der anterior-posterioren Achse des Embryos auf beiden Seiten des Neuralrohrs. Umliegendes Gewebe induziert Sklerotom und Dermomyotom, zwei Strukturen die aus den Somiten hervorgehen (Aoyama and Asamoto, 1988; Christ et al., 1992; McMahon et al., 1998; Reshef et al., 1998). Das Sklerotom wird durch eine epithelialemesenchymale Umwandlung im ventralen Bereich des Somiten gebildet. Die so entstandenen Zellen wandern in ventraler Richtung und bilden später Rippen und Wirbel (Christ and Ordahl, 1995). Das Dermomyotom behält seine epitheliale Struktur bei. Der zentrale Bereich des Dermomyotoms bildet Muskelzellen und Zellen des Bindegewebes der Rückenhaut, während aus den lateralen Bereichen Muskelzellen und Endothelzellen entstehen (Abb.1A).

Die Entstehung des Myotoms ist ein komplexer Prozess. Nachdem sich das Dermomyotom gebildet hat, wandern Zellen vom dorsalen Ende unter das Dermomyotom. Sie stellen die mitotische Teilung ein. elongieren. differenzieren und bilden so das primäre Myotom (Denetclaw and Ordahl, 2000; Kahane et al., 1998b). Eine zweite Welle von Zellen wandert von der rostralen, caudalen und ventralen Seite des Somiten in das Myotom ein und interkaliert in die dortigen Muskelfasern (Kahane et al., 1998a) (Abb.1B). In einer dritten Welle wandern Muskelzellen von dem medialen Bereich des Dermomyotoms in das Myotom Diese behalten jedoch ihren ein. Vorläuferzellcharakter und bilden erst später Muskelzellen, oder sie generieren die Stammzellpopulation der epaxilen Muskulatur, welche in der weiteren Entwicklung aufrechterhalten wird (Ben-Yair and Kalcheim, 2005; Gros et al., 2005; Kassar-Duchossoy et al., 2005; Relaix et al., 2005) (Abb.1D).

Auch aus dem ventralen Bereich des Dermomyotoms entstehen Muskelvorläuferzellen. Deren Entwicklung ist von der Lage des jeweiligen Somiten abhängig. In den meisten Somiten elongiert das ventrale Dermomyotom, anschließend delaminieren die Zellen und wandern in das ventrale Myotom ein. Aus diesen Zellen gehen später die Interkostalmuskeln und die ventralen Thoraxmuskeln hervor (Abb.1B). Einen anderen Verlauf nimmt die Entwicklung in Somiten, welche sich zervikal, okzipital oder auf Höhe der Extremitätenanlagen befinden. Dort reagieren die Zellen des ventro-Dermomyotoms Signale des lateralen auf angrenzenden lateralen Seitenplattenmesoderms oder der Extremitätenanlage, vollziehen eine epitheliale-mesenchymale Umwandlung und delaminieren vom Dermomyotom (Abb.1C). Diese Zellen migrieren über große Distanz zu ihren Zielorten, wo sie die Muskeln der Extremitäten, der Schultern, des Beckens, der Zunge und des Zwerchfells bilden (Brohmann et al., 2000; Chevallier et al., 1977; Christ et al., 1977).

Bis sie ihren Zielort erreichen, behalten die migrierenden Zellen ihren Vorläufercharakter. Dort differenzieren die Zellen und fusionieren zu den primären Muskelfasern. Andere Muskelvorläuferzellen bleiben zunächst undifferenziert und mitotisch aktiv. Diese Zellen gewährleisten ein kontinuierliches Muskelwachstum. Aus ihnen entstehen Muskelfasern und die Stammzellen der postnatalen Muskulatur, die Satellitenzellen (Schienda et al., 2006).



Abb.1 Schematische Darstellung der Somitogenese in Vertebraten

(A) Somiten entstehen aus dem paraxialen Mesoderm. Sie unterteilen sich in Sklerotom (blau) und Dermomyotom (gelb). (B) Zu Beginn der Myogenese delaminieren Zellen von den Enden des Dermomyotoms. Zunächst von dem epaxialem Ende, danach auch von den anderen Seiten, insbesondere vom hypaxialen Ende. Diese Zellen exprimieren bereits Myf5 und Mrf4 (gelb) und bilden das frühe Myotom (rot). (C) In bestimmten Somiten delaminieren Pax positive Zellen vom hypaxialen Ende des Dermomyotoms und migrieren, um z.B. die Muskeln der Extremitäten zu bilden. (D) In der späteren Entwicklung verliert der zentrale Teil des Dermomyotoms seine epitheliale Struktur und Pax positive Zellen (weiß) wandern in das darunter liegende Myotom ein. Diese Zellen behalten ihren Vorläufercharakter und dienen dem späteren Muskelwachstum. Das gezeigte Schema wurde einer Publikation A: Buckingham et al., 2003, B-D: Buckingham, 2006 entnommen und verändert.

1.2 Differenzierung embryonaler Muskelvorläuferzellen

Zu dem Zeitpunkt, da die migrierenden Muskelvorläuferzellen ihr Ziel erreichen, beginnen sie mit der Expression von myogenen Regulationsfaktoren ("Myogenic Regulatory Factors" MRFs). Diese Faktoren, MyoD, Myf5 und Myogenin sind Transkriptionsfaktoren der basischen Helix-Loop-Helix (bHLH) Familie. Ihre Expression in Muskelvorläuferzellen initiiert den Beginn der Differenzierung (Braun et al., 1989; Davis et al., 1987; Edmondson and Olson, 1989; Rhodes and Konieczny, 1989; Weintraub et al., 1991; Wright et al., 1989). In Mäusen, die eine Mutation im *Myf5* Gen tragen, kann keine offensichtliche Fehlentwicklung der Skelettmuskulatur beobachtet werden (Braun et al., 1989). Bei MyoD mutanten Mäusen setzt die Myogenese der Extremitätenmuskulatur verzögert ein, verläuft dann aber normal (Kablar et al., 1999). In Mäusen, in denen sowohl MyoD als auch Myf5 mutiert ist, sind weder Myoblasten, noch die daraus entstehenden Muskelfasern vorhanden. Daraus lässt sich herleiten, dass zumindest einer dieser Transkriptionsfaktoren vorhanden seien muss, um den Verlust des anderen Transkriptionsfaktors zu kompensieren. Erst dadurch kann die Differenzierung myogener Zellen initiert werden kann. Die Mutation des Mrf4 Gens verursacht keine schweren Defekte bei der Myogenese skelettaler Muskeln (Olson et al., 1996). Jedoch konnte gezeigt werden, dass in Mäusen, welche zusätzlich zur MyoD Mutation hypomorphe Myf5 Mutationen aufweisen, die Expression von Mrf4 notwendig ist, um myogene Zellen zu determinieren (Kassar-Duchossoy et al., 2004). Aus diesem Grund müssen Mrf4 sowie MvoD und Myf5 zu den Muskel determinierenden Transkriptionsfaktoren gezählt werden. Hingegen ist Myogenin für die terminale Differenzierung notwendig (Megeney and Rudnicki, 1995; Rudnicki Terminal differenzierte and Jaenisch, 1995). myogene Zellen sind charakterisiert durch die Expression von Desmin, einem Intermediärfilament-Protein, und kontraktilen Proteine wie skelettmuskelspezifisches Myosin und Aktin (Sweeney et al., 1989).

Das Wachstum der embryonalen Muskulatur beruht auf einem Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung der Muskelvorläuferzellen (Amthor et al., 1998). Für dieses Gleichgewicht ist die Funktion des Notch-Signalwegs entscheidend. Der Verlust des Notch-Effektors RBP-J oder der Verlust des Notch-Liganden Dll1 in myogenen Zellen führt zu einer verfrühten und unkontrollierten Differenzierung der Vorläuferzellen. Dadurch kann die Population der Muskelvorläuferzellen nicht aufrechterhalten werden und das Muskelwachstum während der Embryonalentwicklung ist stark eingeschränkt (Schuster-Gossler et al., 2007; Vasyutina et al., 2007). Ferner fördern FGFs IGFs Wachstumsfaktoren wie oder die Proliferation der

8

Einleitung

Muskelvorläuferzellen und verhindern ihre Differenzierung (Amthor et al., 1999; Powell-Braxton et al., 1993). Die Expression von Myostatin reguliert das Muskelwachstum negativ, indem es die Proliferation von Muskelvorläuferzellen inhibiert (Amthor et al., 2006; McPherron et al., 1997). Für BMPs konnte gezeigt werden, dass sie die Differenzierung von Muskelzellen inhibieren (Pourquie et al., 1996). Hingegen fördern BMP-Antagonisten wie Noggin und Chordin die Differenzierung, indem sie den BMP-Signalweg inhibieren (Amthor et al., 1999; Reshef et al., 1998; Zimmerman et al., 1996).

1.3 Postnatale Muskelentwicklung

Mit der Geburt ist die Entwicklung der Skelettmuskulatur nicht abgeschlossen. In der frühen postnatalen Entwicklung wachsen die Jungtiere sehr schnell und mit ihnen ihre Muskulatur. Auch in adulten Tieren kann die Muskulatur aufgrund von Training noch wachsen. Zudem muss nach einer Verletzung die Reparatur der Muskeln gewährleistet sein. Die Zellen, die dieses Wachstum ermöglichen, haben ihren Ursprung in den Satellitenzellen. Satellitenzellen sind die Stammzellen der juvenilen und adulten Muskulatur und sind durch ihre Lage unter der Basalmembran der Muskelfaser und die Expression des Homöobox-Transkriptionsfaktors Pax7 charakterisiert (Seale et al., 2000).

Ihren Ursprung haben die Satellitenzellen des Rumpfs im zentralen Bereich des Dermomyotoms. Zu dem Zeitpunkt, wenn das zentrale Dermomyotom seinen epithelialen Charakter verliert, wandern Zellen, die bereits Pax3 und Pax7 positiv sind, in das darunterliegende Myotom ein. Zellen aus dieser Paxpositiven Population sind in allen Skelettmuskeln der späten embryonalen Entwicklung zu finden. Die meisten dieser Vorläuferzellen proliferieren und exprimieren keine muskelspezifischen Gene, sind jedoch in der Lage das myogene Programm zu starten und sich in Muskelzellen zu differenzieren. (Ben-Yair and Kalcheim, 2005; Gros et al., 2005; Kassar-Duchossoy et al.,

2005; Relaix et al., 2005; Schienda et al., 2006).

In Doppelmutanten, in denen sowohl das Pax3 als auch das Pax7 Protein fehlt, ist die Population der Muskelvorläuferzellen nicht vorhanden, diese Zellen sterben oder werden in andere Gewebe integriert (Relaix et al., 2005). Pax7 ist für die Spezifizierung der Satellitenzellen jedoch nicht notwendig. Die Anzahl der Satellitenzellen ist in *Pax7* mutanten Mäusen zum Zeitpunkt der Geburt nicht beeinträchtigt. Jedoch geht aufgrund von Apoptose die Satellitenzellpopulation in der frühen postnatalen Phase verloren (Kuang et al., 2007; Oustanina et al., 2004). Das bedeutet, dass Pax3 und Pax7 zwar redundant während der Spezifizierung von Muskelvorläuferzellen sind, Pax3 aber die anti-apoptotische Funktion von Pax7 nicht kompensieren kann (Relaix et al., 2006).

Die Satellitenzellen proliferieren im juvenilen Organismus konstitutiv und tragen durch Teilung und Differenzierung ihrer Tochterzellen, der Myoblasten, das Wachstum der Skelettmuskulatur (Shinin et al., 2006; White et al., 2010). Nach Abschluss des juvenilen Wachstums, um den 21. Tag der Mausentwicklung, sind die Satellitenzellen im Ruhezustand und postmitotisch (White et al., 2010). Sie können aber durch eine Verletzung oder durch Wachstumsimpulse aktiviert werden und treten dann wieder in den Zellzyklus ein (Bischoff and Heintz, 1994). Infolge der Aktivierung wandern die Satellitenzellen aus der Basalmembran der Muskelfasern aus und beginnen zu proliferieren. Ihre Nachkommen, die Myoblasten, sind zunächst auch mitotisch aktiv und exprimieren Muskel determinierende Transkriptionsfaktoren wie z.B. MyoD und Myf5. Der Großteil dieser Zellen stellt die Expression von Pax7 ein und wird terminal differenziert, was an der Expression von Myogenin erkennbar ist. Diese Zellen fusionieren mit vorhandenen Muskelfasern, oder bilden neue vielkernige Fasern (Le Grand and Rudnicki, 2007). Ähnlichkeiten in der postnatalen Differenzierung der Myoblasten und der Differenzierung der embryonalen Muskelvorläuferzellen sind demnach existent.

Bei der Aktivierung der Satellitenzellen und der Differenzierung ihrer Nachkommen muss darüber hinaus auch der Erhalt und die Erneuerung der Satellitenzellpopulation gewährleistet sein. Zu diesem Zweck erhält ein kleiner Teil der Nachkommen einer Satellitenzelle die Expression von Pax7 aufrecht, und stellt die Expression muskeldeterminierender Faktoren ein. Diese Zellen werden wieder postmitotisch und wandern zurück unter die Basalmembran der Muskelfasern. Auf diese Weise wird die Selbsterneuerung der Satellitenzellpopulation gewährleistet (Olguin and Olwin, 2004; Zammit et al., 2004) (Abb.2A). Der Prozess der Selbsterneuerung von Satellitenzellen bei parallel ablaufender Differenzierung ihrer Tochterzellen ist bisher nur unvollkommen verstanden. Es konnte qezeigt werden. dass eine Subpopulation Satellitenzellen existiert. nie von welche den muskeldeterminierenden Transkriptionsfaktor Myf5 exprimiert hat. Diese Zellen können sich asymmetrisch in eine Myf5 negative und eine Myf5 exprimierende Zelle teilen, wobei die Myf5 exprimierende Zelle mit höherer Wahrscheinlichkeit differenzierende Tochterzellen generiert (Kuang et al., 2007). Aufgrund Ergebnisse wird die dieser postuliert. dass Satellitenzellpopulation heterogen ist und sich in zwei Populationen aufspaltet: Eine Population von Stammzellen, welche nie Myf5 exprimiert haben, und eine weitere Population, die festgelegten Vorläuferzellen, die Myf5 exprimiert haben (Abb.2B).



Abb.2 Hypothesen zur Selbsterneuerung von Satellitenzellen.

(A) Eine sich im Ruhezustand befindende Pax7 positive Satellitenzelle (grüner Zellkern) koexprimiert MyoD (grün-roter Zellkern), wenn sie, z.B. durch Verletzung der Muskelfaser, aktiviert wird. Die meisten Nachkommen dieser Zelle stellen die Expression von Pax7 ein, behalten die Expression von MyoD aber bei (roter Zellkern). Diese Zellen differenzieren weiter und fusionieren mit der Muskelfaser. Andere Nachkommen der Satellitenzelle erhalten die Expression von Pax7 aufrecht, während die Expression von MvoD eingestellt wird (grüner Zellkern). Dies sind die selbsterneuerten Satellitenzellen. (B) Es gibt zwei Arten von Pax7 positiven Satellitenzellen die, die Myf5 zu einem Zeitpunkt ihrer Entwicklung exprimiert haben (grün-gelber Zellkern), und die, die Myf5 nie exprimiert haben (grüner Zellkern). Die Pax7 Myf5 doppelt positiven Satellitenzellen (grün-gelber Zellkern) können durch mehrere Zellzyklen, gehen bevor die Pax7 Expression stoppt (rote Zellkerne) und die Tochterzellen differenzieren. Im Gegensatz dazu können die Myf5 negativen Pax7 positiven Satelliten"stamm"zellen sich symmetrisch (grüner Zellkern) teilen, um die Stammzellpopulation aufrechtzuerhalten, oder sich asymmetrisch teilen, um Pax7 Myf5 doppelt positive Zellen (grün-gelber Zellkern) zu generieren. Ob sich die Pax7 Myf5 doppelt positiven Satellitenzellen (grün-gelber Zellkern) in Myf5 negative Pax7 positive Satelliten"stamm"zellen (grüner Zellkern) zurück entwickeln können, ist bislang nicht bekannt. Das gezeigte Schema wurde einer Publikation von Zammit, 2008 entnommen und verändert.

1.4 Die Tyrosin-Phosphatase Shp2

Die Src-homology-2 containing phosphatase 2 (Shp2) ist eine ubiguitär exprimierte zytoplasmatische Tyrosin-Phosphatase und ein Schlüsselmolekül im Signalweg vieler Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK). Dabei agiert Shp2 als ein Aktivator des Signalweges und ist unter anderem für die andauernde Aktivierung von Ras/Erk essentiell (Neel et al., 2003). Das Shp2 Protein wurde in Säugetieren Anfang der 1990 Jahre unabhängig von mehreren Arbeitsgruppen entdeckt (Adachi et al., 1992; Ahmad et al., 1993; Vogel et al., 1993). Zur gleichen Zeit wurde auch das Drosophila homolog corkscrew in einem genetischem Screen identifiziert (Perkins et al., 1992). Beim Menschen führen Keimbahn und somatische Mutationen des für Shp2 kodierenden Gens PTPN11 zu Noonan und LEOPARD Syndromen, zwei schweren multisymptomatischen Entwicklungsstörungen. Mutationen von PTPN kommen auch in verschiedenen Tumoren wie z.B. der juvenilen myelomonozytären Leukämie (JMML) vor.

1.5 Das Shp2 Protein und seine Aktivierung

Shp2 besitzt zwei N-terminale Src-homology 2-Domänen (N-SH2 und C-SH2) eine zentrale gelegene klassische Phospho-Tyrosin-Phosphatase-Domäne (PTP) und ein C-terminales Ende mit zwei Tyrosin-Phosphorylierungsstellen und prolinreichen Motiven (Übersicht in Neel et al., 2003) (Abb.3). Sowohl die SH2 als auch die PTP-Domäne sind essentiell für die Funktion von Shp2 (Araki et al., 2003). Biochemische und kristallographische Studien haben gezeigt, dass im inaktiven Shp2 Molekül die N-terminale SH2-Domäne mit der PTP-Domäne interagiert und so den Zugang für Substrate zum katalytischen Zentrum der PTP-Domäne versperrt. Bei der Aktivierung von Shp2 wird die N-terminale SH2-Domäne phosphoryliert, dadurch ändert sich ihre Konformation und die Interaktion mit der PTP-Domäne wird aufgehoben (Abb.3). Shp2 liegt

daher "offen" vor und die PTP-Domäne ist für Substrate zugänglich (Barford and Neel, 1998; Hof et al., 1998). Zu den Aktivatoren von Shp2 gehören Rezeptoren wie der PDGF- und der gp130-Rezeptor, aber auch Adapterproteine wie z.B. Gab1 (Hadari et al., 1998; Maroun et al., 2000; Rosario et al., 2007; Schaeper et al., 2000).



Abb.3 Das Shp2 Protein und dessen Aktivierung

Das Shp2 Protein besitzt zwei SH2-Domänen (N-SH2 und C-SH2), eine zentrale Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTP)-Domäne und zwei Tyrosinreste im C-Terminus (Y542 und Y580). Im Ruhezustand ist das Shp2 Protein inaktiv, da durch eine Interaktion der N-SH2 und der PTP-Domäne der Zugang zu dem katalytischen Zentrum der PTP-Domäne blockiert ist. Das Protein kann aktiviert werden, indem aktivierende Proteine an die SH2-Domänen von Shp2 binden. Diese Bindung verursacht eine Konformationsänderung der N-SH2-Domäne. Dadurch wird die autoinhibitorische Bindung der PTP-Domäne aufgehoben und Substraten der Zugang zum katalytischen Zentrum der PTP-Domäne ermöglicht. Das gezeigte Schema wurde einer Publikation von Grossmann et al., 2010 entnommen und verändert.

1.6 Die Rolle von Shp2 in der Aktivierung von Signalwegen

In den Signalwegen der meisten Rezeptor-Tyrosinkinasen wird Shp2 für eine vollständige Aktivierung des Ras/Erk-Signals benötigt. Ein Beispiel für einen Ras/Erk-Signalweg ist in Abb.4 dargestellt (vgl. auch Schlessinger, 2000). In wenigen Fällen, wie z.B. nach IGF-1 Zugabe in Fibroblasten, wird bei einem Verlust von Shp2 der Ras/Erk-Signalweg nicht aktiviert (Van Vactor et al., 1998). In den meisten Fällen jedoch ist die anfängliche Aktivierung des Ras/Erk-Signalwegs bei Verlust der Shp2 Funktion normal, die andauernde Aktivierung des Signalwegs hingegen eingeschränkt (Feng, 1999; O'Reilly et al., 2000).



Eine Funktion von Shp2 in der Aktivierung des Ras/Erk-Signalwegs konnte in diversen Zelltypen aller drei Keimblätter festgestellt werden. Dabei wurden verschiedene Mechanismen beobachtet, auf welche Art Shp2 die Aktivität des Signalwegs beeinflusst. Diese sind abhängig von der untersuchten RTK und dem untersuchten Zelltyp.

Eine Hypothese zur Funktion von Shp2 als positiver Regulator des Ras/Erk-Signalwegs ist, dass Shp2 als Adapterprotein für den Grb2/Sos Komplex dient. Der PDGF-Rezeptor kann Shp2 phosphorylieren und dadurch eine Bindestelle für Grb2 bilden. Da Shp2 direkt an den aktivierten PDGF-Rezeptor binden kann, ist es möglich das Shp2 an der Rekrutierung von Grb2/Sos an den Rezeptor und somit an die Membran beteiligt ist. Auf diese Weise könnte Shp2 eine Funktion bei der Aktivierung von Ras ausüben (Bennett et al., 1994).

Sprouty ist ein genereller Inhibitor der RTK-Signalwege, und in Säugetieren sind vier Sprouty Gene vorhanden (Mason et al., 2006). Wird Sprouty durch einen aktivierten FGF-Rezeptor phosphoryliert, kann es Grb2 binden. Dadurch kann der Grb2/Sos Komplex nicht mehr an die Membran rekrutiert

werden und Ras aktivieren (Hanafusa et al., 2002). Shp2 wiederum kann Sprouty direkt dephosphorylieren und so den Komplex mit Grb2/Sos zerstören und damit die Aktivierung des Signalwegs gewährleisten (Jarvis et al., 2006; Tefft et al., 2005; Tefft et al., 2002).

Ein weiterer negativer Regulator des MAPK-Signalweges ist das GTPase aktivierende Protein p120-RasGAP. Dieses Protein kann mit seinen zwei SH2-Domänen an aktivierte RTK oder Adapterproteine wie z.B. Gab1 binden. Dort kann es die Aktivierung von Ras verhindern. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Shp2 in der Lage ist, Bindestellen von RasGAP an verschiedenen RTKs und Gab1 zu dephosphorylieren (Agazie and Hayman, 2003; Bard-Chapeau et al., 2006; Cleghon et al., 1998; Herbst et al., 1996; Montagner et al., 2005; Schulze et al., 2005; Zhang et al., 2002). Shp2 ist einen Komplex mit Gab1 einzugehen. auch in der Lage, Diese Komplexbildung ist in einigen Fällen essentiell für die Gab1 Funktion (Koyama et al., 2008) (Schaeper et al., 2007). Des Weiteren kann Shp2 die Aktivität von Src-Kinasen regulieren. Src-Kinasen sind Aktivatoren von Ras, und sind inaktiv wenn sie auf Tyrosin 416 phosphoryliert sind. Shp2 ist in der Lage, die Src-Kinasen indirekt zu aktivieren, indem es Csk, einen Inhibitor dieser Kinasen, inaktiviert (Cunnick et al., 2002; Peng and Cartwright, 1995; Ren et al., 2004; Shi et al., 2000; Yang et al., 2006; Zhang et al., 2004) (Abb.5).

Zudem hat Shp2 eine Funktion im JAK/Stat-Signalweg (Übersicht in Qu, 2002). In diesem Signalweg kann Shp2 als Repressor agieren, indem es entweder das Stat Protein dephosphoryliert, oder die Aktivität der in der Signalkette übergeordneten Jak-Kinasen verändert (Ali et al., 2003; Chen et al., 2003; Wu et al., 2002). Shp2 kann aber auch einen aktivierenden Effekt auf Stat5 in Milchdrüsen-Epithelzellen *in vitro* und *in vivo* ausüben (Berchtold et al., 1998; Chughtai et al., 2002; Ke et al., 2006).

Darüber hinaus sind Funktionen von Shp2 bei der Aktivierung des Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-(PI3K)/Akt-Signalwegs (Ivins Zito et al., 2004; Zhang et al., 2004), dem fokalem-adhesions-Kinase(FAK)-Signalwegs (Oh

16

et al., 1999; Yu et al., 1998), dem JNK-, NFAT- und NF-κB-Signalwegen (Shi et al., 1998; Uhlen et al., 2006; You et al., 2001), sowie bei der Aktivierung von GTPasen der Rho Familie beschrieben (Kontaridis et al., 2004; Schoenwaelder et al., 2000) (Abb.5).



Abb.5 Übersicht der von Shp2 regulierten Signalwege

Hauptsächlich ist Shp2 an der Regulierung von Signalwegen beteiligt, die durch aktivierte Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) ausgelöst werden, beteiligt. Dabei spielt der Ras/Erk-Signalweg die wichtigste Rolle. Shp2 kann Ras/Erk auf verschieden Weisen aktivieren: Dephosphorylierung von RasGAP Bindestellen an Rezeptoren und Adapterproteinen, Inhibierung des negativen Ras/Erk Regulators Sprouty durch Dephosphorylierung, außerdem durch Modulation der Src-Aktivität direkt durch Dephosphorylierung oder indirekt durch negative Regulation des Src-Inhibitors Csk. Des Weiteren reguliert Shp2 PI3K, FAK, RhoA und den NFAT-Signalwege, die den Cytokin-Rezeptoren nachgeschaltet sind, Einfluss nehmen. (Aktivierung - Pfeile, Inhibierung - Kreise, aktivierend und inhibierend - Vierecke, direkte Interaktion - durchgehende Linien, indirekte Interaktion - gepunktete Linien) Das gezeigte Schema wurde einer Publikation von Grossmann et al., 2010 entnommen und verändert.

1.7 Die Rolle von Shp2 in der Entwicklung

Shp2 hat bei der Entwicklung vieler Organe und Zellen eine wichtige Funktion. Shp2 null-mutante Embryonen sterben in einem sehr frühen Entwicklungsstadium. In Blastozysten, die homozygot mutant für Shp2 sind, sterben die Zellen des Embryoblasten noch vor der Gastrulation (Yang et al., 2006). In der Entwicklung der T-Zellen im Thymus kontrolliert Shp2 die Differenzierung und Proliferation (Nguyen et al., 2006). Bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems kontrolliert Shp2 die Balance zwischen Neurogenese und Giliogenese, reguliert die Proliferation und Selbsterneuerung von neuronalen Vorläuferzellen und hat eine Funktion bei der Entwicklung des Zerebellums (Übersicht in Grossmann et al., 2010). In der Entwicklung der Schwann'schen Zellen ist Shp2 für deren Proliferation und für die ihre korrekte Terminaldiffernzierung Migration. und (Myelinisierung) notwendig (Grossmann et al., 2009; Nakamura et al., 2009a; Nakamura et al., 2009b). Ferner hat Shp2 eine Funktion bei der Entwicklung der Leber, der Schilddrüse und der Milchdrüsen-Epithelzellen (Übersicht in Grossmann et al., 2010).

Bei der Entwicklung des Herzens, hat Shp2 eine Funktion in allen drei Zelltypen, die an der Herzentwicklung beteiligt sind, den Herzmuskelzellen, den Endothelzellen und den von den Neuralleistenzellen abstammenden Zellen. In den Herzendothelzellen ist Shp2 für die Regulation der Proliferation und Apoptose durch den Ras/Erk-Signalweg notwendig (Krenz et al., 2008). Der Verlust von Shp2 in den Zellen des Herzens, welche von den Neuralleistenzellen abstammen, führt dazu, dass sich die Pulmonalarterie und die Aorta nicht trennen. Der Grund dafür ist eine gestörte Migration der Herzneuralleistenzellen. Dieser Phänotyp konnte durch Inhibition des Ras/Erk-Signalwegs kopiert werden; dies deutet darauf hin, dass SHP2 auch hier über den Ras/Erk-Signalweg operiert (Newbern et al., 2008). Wird Shp2 konditionell mittels der muskelspezifischen Cre-Linien MHC^{cre} oder Mck^{cre} in den Herzmuskelzellen ausgeschaltet, zeigen sich Störungen in der Entwicklung der Herzscheidewand, Störungen in der Herzmuskelverdichtung, abnormale Morphologie der Herzmuskelzellen und deren Insulin reguliertem Metabolismus (Kontaridis et al., 2008; Nakamura et al., 2007; Princen et al., 2009).

In einer weiteren Studie wurde dieselbe Mck^{cre} Linie benutz, um die Funktion von Shp2 bei der Entwicklung der Skelettmuskulatur zu untersuchen. Bei dieser Studie konnte gezeigt werden, dass durch den Verlust von Shp2 die Größe der Muskelfasern insgesamt und die Anzahl der langsamen Muskelfasern leicht reduziert ist. Auch wurde in vitro die Cre-Rekombinase in Shp2^{flox} Myoblasten transfiziert. In diesen Myoblasten ist die Fusion zu vielkernigen Muskelfasern Aufgrund eines inhibierten NFAT-Signalweges gestört (Fornaro et al., 2006). Eine weitere in vitro Studie zur Funktion von Shp2 in der Muskelentwicklung weist darauf hin, dass ein Komplex aus Shp2 und Gab1 notwendig ist, um die IGF induzierte myogene Differenzierung zu inhibieren. Wird das Gab1 Protein so verändert, dass es einen Komplex mit Shp2 nicht mehr eingehen kann oder wird die katalytische Aktivität der Phosphatase-Domäne von Shp2 beeinträchtigt, beginnen die Myoblasten in Anwesenheit von IGF schnell mit der Differenzierung. Diese Reaktion ist abhängig vom Ras/Erk-Signalweg (Koyama et al., 2008). Der gleiche Komplex ist auch während der embryonalen Entwicklung bei der Migration der Muskelvorläuferzellen in die Extremitätenanlagen erforderlich. Kann dieser Komplex nicht gebildet werden, erreichen signifikant weniaer Muskelvorläuferzellen die Anlagen der Extremitäten (Schaeper et al., 2007). Jedoch wurde in keiner dieser Studien zur Funktion von Shp2 bei der Entwicklung der Skelettmuskulatur, ein Effekt auf die allgemeine postnatale Muskelentwicklung oder auf den Erhalt der Satellitenzellpopulation beobachtet.

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Shp2 ist für die Delamination und Migration der Muskelvorläuferzellen essentiell. Shp2 wird auch in adulten Stammzellen der Muskulatur, den Satellitenzellen exprimiert. Darüber hinaus reagieren diese Zellen auf den Wachstumsfaktor HGF, der über den c-Met-Rezeptor und Shp2-Signale vermittelt. Aus diesem Grund untersuchte ich, ob Shp2 auch eine Funktion in den Satellitenzellen ausübt. Dazu analysierte ich die phänotypische Veränderung der Muskulatur, die durch eine Pax7^{Cre}-vermittelte Mutation von Shp2 hervorgerufen wurde. Ich konnte zeigen, dass diese Mutation die Delamination myogener Vorläuferzellen nicht beeinträchtigt, sie interferiert

jedoch mit der postnatalen Entwicklung von Satellitenzellen. Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Identifikation der Signalwege, welche während der Muskelentwicklung durch Shp2 reguliert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Alle Chemikalien, Enzyme, Oligonukleotide und Antikörper stammen, sofern nicht speziell vermerkt, von folgenden Unternehmen: Ambion (Austin, USA), Amersham- Pharmacia (Freiburg), GE Healthcare (Freiburg), Biotez (Berlin), Biozym (Hess. Oldendorf), Dianova (Hamburg), Invitek (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 Antikörper

Immunfluoreszenzanalysen und Western-Blots wurden mit folgenden Antikörpern durchgeführt:

Antigen	Wirtstier	Verd. IF	Verd. WB	Bezugsquelle
anti-AKT	Kaninchen		1:1000	Cell Signaling
anti-BrdU	Ratte	1:300		Abcam, UK
anti-Collagen IV	Ziege	1:200		Millipore
anti-Desmin	Ziege	1:500		R&D Systems
anti-Erk1/2	Maus		1:3000	Cell Signaling
anti-Laminin	Kaninchen	1:1000		Sigma
anti-Lbx1	Meer- schweinchen	1:10000		AG C. Birchmeier (Müller et al., 2002)
anti-Myf5	Kaninchen	1:50		Santa Cruz Biotechnology
anti-MyoD	Kaninchen	1:100		Santa Cruz Biotechnology
anti-Myogenin	Kaninchen	1:200		Santa Cruz Biotechnology
anti-pAKT	Maus		1:1500	Cell Signaling
anti-Pax7	Maus	1:1000		Hybridoma Bank, IA, USA
anti-pErk1/2	Maus		1:3000	Sigma
anti-Shp2	Kaninchen	1:500	1:2000	Santa Cruz Biotechnology
anti-BAktin	Kaninchen		1:1000	Cell Signaling
anti-BGal	Kaninchen	1:10000		CAPPEL

Die verwendeten sekundären Antikörper (Dianova) sind mit Cy2, Cy3 oder Cy5 Fluoreszenz bzw. HRP gekoppelt und werden in gelöster Form in 50% Glycerin mit einer Konzentration von 0.5 mg/ml routinemäßig in einer Verdünnung von 1:500 (HRP 1:2000) verwendet.

2.1.3 Mausstämme und transgene Mauslinien

Wildtyp Mausstämme:

C57BI/6J-Inzucht und CD1-Auszucht Mauslinien stammten aus eigener Zucht bzw. wurden von Charles River (Sulzfeld) bezogen.

Shp2^{flox/flox}-Mäuse:

(Dr. Katja Grossmann, Dr. Hagen Wende, AG Carmen Birchmeier, AG Walter Birchmeier, MDC Berlin) Die *Shp2^{flox}* Mutation wurde durch homologe Rekombination in ES Zellen eingeführt. Eine loxP Sequenz wurde 5' von Exon 3, die andere loxP Sequenz und eine Neomycin Kassette mit flankierenden frt Sequenzen 3' von Exon 4 der genomischen DNA Sequenz von *Shp2* eingeführt. Die *neo* Kassette wurde durch Verpaarung von *Shp2^{floxneo}* mit der FLPe deleter Mauslinie entfernt. Cre vermittelte Rekombination führt außerdem zu einer "frameshift" Mutation. Der exprimierte Proteinrest besteht aus 45 N-terminalen Aminosäuren von Shp2 und zwei zusätzlichen Aminosäuren und ist nicht funktionell (Grossmann et al., 2009).

Pax7^{Cre}- Mäuse:

(Dr. Charles Keller, Howard Hughes Medical institute and Department of Human Genetics, University of Utah, Salt Lake City, Utah, USA) Eine *ires-Cre-FRT-Neo-FRT* Kassette wurde durch homologe Rekombination bei ES Zellen in die 3'UTR des Pax7 Gens eingeführt. Die *neo* Kassette wurde durch Verpaarung von *Shp2^{floxneo}* mit der FLPe deleter Mauslinie entfernt.

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* Kassette, 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*-Kassette fusioniert, um einen Transkriptionsabbruch zu garantieren (Soriano, 1999).

P110*-Mäuse:

(Lakshmi Srinivasan, Klaus Rajewsky, Children's Hospital, and Immune Disease Institute, Harvard Medical School, Boston, MA, USA) Diese Mäuse

exprimieren nach Rekombination eine konstitutiv aktivierte Form von P110 α . P110 α ist die katalytische Untereinheit der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K). Um diese Mäuse zu erzeugen wurde eine loxP flankierte *neoR-stop* Kassette in den Rosa26 Lokus kloniert. Dann die P110* cDNA, eine *frt* flankierte *IRES-eGFP* Kassette und eine Polyadenylierungssequenz eingefügt. B6 ES Zellen (Artemis) wurden transfiziert, kultiviert und selektiert wie zuvor für Bruce 4 ES Zellen beschrieben (Sasaki et al., 2006).

MEK1DD-Mäuse:

(Lakshmi Srinivasan, Klaus Rajewsky, Children's Hospital, and Immune Disease Institute, Harvard Medical School, Boston, MA, USA) Diese Mäuse exprimieren nach Rekombination eine konstitutiv aktivierte Form von MEK1. MEK1 ist die Kinase, die im Ras/Erk-Signalweg Erk direkt aktiviert. MEK1DD wurde in den Rosa Lokus integriert. Dort wird es nach Cre-vermittelter Exzision einer Stopp Kassette exprimiert.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Biopsien und embryonalem Gewebe

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 mindestens 1h in 50µl Ohr-/Schwanz-Lyse-Puffer (100mM Tris pH8,5, 200mM NaCl, 5mM EDTA, 0,2% SDS, 100µg/ml Proteinase K) bei 55°C verdaut. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Proteinase K für 10min bei 95°C. Nach Zugabe von 300µl H₂O wurde je 1µl dieser verdünnten Lösung für die Genotypisierung in einer PCR-Reaktion eingesetzt.

2.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al., 1985) wurde zur Genotypisierung von präparierten Maus-Embryonen bzw. Jungtieren aus der Nachzucht eingesetzt. Die Etablierung der verwendeten PCR-Programme erfolgte dabei in Anlehnung an Standard-PCR-Methoden. Nachfolgend sind die verwendeten Genotypisierungs-PCR-Programme inklusive der eingesetzten Primer und MgCl2-Konzentrationen angegeben:

Pax7^{cre}-PCR:

a) MgCl₂ Konzentration: 2,5mM

b) Mutante-Primer:

CK172: 5'- GGA TAG TGA AAC AGG GGC AA -3'

CK256: 5'- TCG GCC TTC TTC TAG GTT CTG CTC -3'

Produktgröße: 340bp

Wildtyp-Primer:

CK118: 5'- GCT CTG GAT ACA CCT GAG TCT - 3'

CK256: 5'- TCG GCC TTC TTC TAG GTT CTG CTC -3'

Produktgröße: 465bp

c) Programm:

95 C° 5 min.

95 C° 30 sek.

58 C° 30 sek.

32X

72 C° 50 sek.

72 $C^\circ\,$ 7 min.

4 C° ∞

Shp2^{flox}-PCR:

a) MgCl₂ Konzentration: 1,25mM

b) Primer:

Shp2-Fw: 5'- ATG ACT CCT GAA GCC CAT TG-3'

Shp2-Rev: 5'- TTC CCA TCA CCT CAG ACT CC-3'

Produktgröße Wildtyp: 220bp

Mutant: 350bp

- c) Programm:
- 95 C° 2 min.
- 95 C° 40 sek.
- 60 C° 30 sek.
- 72 C° 30 sek.
- 72 C° 5 min.
- 4 C° ∞

Rosa26-PCR:

a) MgCl₂ Konzentration: 2mM

b) Mutante-Primer:

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

40X

36X

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

- c) Programm:
- 94 C° 5 min.
- 94 C° 30 sek.
- 60 C° 30 sek.
- 72 C° 1 min.
- 72 C° 5 min.
- 4 C° ∞

MEK1-PCR:

- a) MgCl₂ Konzentration: 2mM
- b) Mutante-Primer:
- MEK1-Fw: 5'-GTC AAT GAG CCT CCT CCA AA-3'
- MEK1-Rev: 5'- GCA ATA TGG TGG AAA ATA AC-3'
- Produktgröße: 420bp
- c) Programm:
- 94 C° 5 min.
- 94 C° 30 sek.
- 55 C° 30 sek.

34X

72 C° 1 min.

4 C° ∞

PI3K-PCR:

٦)	MaCL	Konzontration.	2mM
a)	iviyoi2	NUNZEI III allun.	۲IIIVI ک

b) Mutante-Primer

PI3K-Fw: 5'- TTC AAT GAT GCT TGG CTC TG-3'

PI3K-Rev: 5'- GCA ATA TGG TGG AAA ATA AC-3'

Produktgröße: 442bp

c) Programm:

- 94 C° 2 min.
- 94 C° 30 sek.
- 58 C° 30 sek.

34X

- 72 C° 30 sek.
- 72 C° 2 min.

4 C° ∞

2.2.2 Histologische Methoden

2.2.2.3 Herstellung von Gefrierschnitten aus embryonalem Gewebe

Präparierte Embryonen wurden in PBS gespült und anschließend in 4% PFA (in 100mM NaPO₄) für eine bis maximal drei Stunden fixiert. Danach wurden die Embryonen in PBS gewaschen und anschließend über Nacht in 20% Saccharose (in PBS) inkubiert. Das Einfrieren erfolgte in "Tissue-Tek" (= "OCT-Compound", Sakura) in einer Einbettform ("Peel-A-Way", Thermo Scientific) auf einer Alkohol-Trockeneis-Mischung. 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 12µm lag. Die Schnitte wurden auf Adhäsionsobjektträgern (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.

2.2.2.4 Herstellung von Gefrierschnitten aus postnatalem Gewebe

Präparierte Extremitäten von postnatalen Mäusen wurden unfixiert in "Tissue-Tek" (= "OCT-Compound", Sakura) in einer Einbettform ("Peel-A-Way", Thermo Scientific) eingefroren, indem sie in flüssigen Stickstoff getaucht wurden. 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 12µm 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.

2.2.2.5 Immunhistologie auf Gerfrierschnitten

Die Gefrierschnitte wurden nach dem Auftauen mit NEN-Puffer (10% Pferdeserum, 0,5% Blocking Reagent (Roche), 0,1% TritonX-100) blockiert. Bei Schnitten von unfixiertem Gewebe, wurden diese zuvor in Zamboni Reagenz (2% PFA, 6,5% gesättigte Lösung der Pikrinsäure; in 100mM NaPO₄) für 10min fixiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in Blockierungslösung (3% Pferdeserum, 0,3% BSA in PBX) über Nacht bei 4°C. Bei Verwendung des anti-Pax7 Antikörpers wurden die Schnitte nach dem Auftauen für 20min in Vektor-Puffer (Antigen unmasking solution, citric acid based, Vector Labs H-3300) bei 80°C inkubiert. Nach dem primären Antikörper wurden die Schnitte dreimal für je 10min. mit PBX

gewaschen und dann für 1h mit dem sekundären Antikörper in Blockierungslösung bei RT inkubiert. Nach wiederholtem Waschen in PBX wurden die Schnitte mit "Immu-Mount" (Thermo Scientific) eingedeckelt.

2.2.2.6 Detektion von Zellproliferation

Die Quantifizierung mitotisch aktiver Zellkerne erfolgte auf Gewebeschnitten durch mikroskopische Inspektion (siehe auch 2.2.4). Um die Anzahl mitotisch aktiver Progenitorzellen und Myoblasten zu bestimmen, wurde BrdU (= 5-Brom-2'-desoxy-Uridin) intraperitoneal in schwangere Mausweibchen oder in Jungtiere injiziert (75µg/g Körpergewicht in 0,9% NaCl). Die Embryonen bzw. die Jungtiere 2h später präpariert. Das BrdU, welches als Thymidin-Analog ausschließlich in die DNA von Zellen inkorporiert wurde, 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 muskelspezifische Proteine kombiniert.

2.2.2.7 Detektion von apoptotischen Zellen

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

2.2.2.8 Isolierung und Immunfluoreszenzfärbung einzelner Muskelfasern

Der Extensor Carpi Radialis Longus (ECRL) Muskel wurde unbeschädigt aus Jungtieren präpariert und für 2-3h bei 37°C in Zellkulturmedium (DMEM, 2% L-Glut., 1% Pen/Strep) mit 0,3mg/ml Collagenase NB4 (Sigma) verdaut. Anschließend wurde der verdaute Muskel und der Überstand in eine mit Zellkulturmedium gefüllte Kulturschale überführt, die zuvor mit 5% BSA gespült wurde, um die Adhäsion der Fasern zu verhindern. Dort wurden die Muskelfasern durch Aufsaugen in eine Glaspipette vereinzelt. Nach Absaugen der kontrahierten Fasern und der Bruchstücke wurden die Fasern in eine zweite und anschließend in eine dritte Kulturschale mit Zellkulturmedium überführt. Zum Fixieren wurden die Fasern in ein 2ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und für 3min nicht bewegt, um die Fasern absinken zu lassen und anschließend das Zellkulturmedium entfernt zu können. Fixiert wurden die Fasern in 4% PFA für 10 min, danach dreimal in PBS +0,025%Tween gewaschen. Zum Färben wurden die Fasern für 1h bei Raumtemperatur 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 (3% Pferdeserum, 0.3% BSA in PBX) üN bei 4°C. Nach dem primären Antikörper wurden die Schnitte dreimal für je 10min mit PBX gewaschen und dann für 1h mit dem sekundären Antikörper in Blockierungslösung bei RT inkubiert. Nach mehrfachen Waschen in PBX wurden die Schnitte mit Vectashield mounting medium (H-1000) (VECTOR LABORATORIES, INC., Burlingame, CA, USA) auf Adhäsionsobjektträger (Histobond, Marienfeld) eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden – "Western Blot"-Analyse

2.2.3.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach Molekulargewichten wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese angewendet (Laemmli, 1970). Die dazu verwendeten Gele bestehen aus einem Sammelgel, in dem die Proteine fokussiert werden, und einem Trenngel zur Trennung der Proteine nach Molekulargewicht. Diese Gele (12% Acrylamid, 1,5mm Dicke) wurden vor Beginn des Experiments in einer Mini-Gel hergestellt. Apparatur (Protean З, Biorad) Die aufzutrennenden Proteinlösungen wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 4x SDS-PAGE-

Ladepuffer versetzt und für 5min bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 4°C in einer mit kaltem SDS- Laufpuffer gefüllten Elektrophorese-Kammer (Protean 3, Biorad) bei einer konstanten Spannung von 75V. Sobald die Lauffront die Grenze zwischen Sammel- und Trenngel überschritten hatte, wurde die Spannung auf 140V erhöht. Als Größenstandard diente die "Protein Ladder Plus" (Fermentas).

2.2.3.10 Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen ("Western Blot")

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das SDS-Polyacrylamid-Gel aus der Apparatur entnommen und für 5min in 1x Transferpuffer äquilibriert. Anschließend erfolgte der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (Schleicher & Schuell) bei einer konstanten Spannung von 20V über Nacht bei 4°C. Dazu wurde eine "Tank Blot"-Apparatur (Mini Trans-Blot electrophoretic Transfer Cell, Biorad) mit kaltem Transferpuffer verwendet. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran entnommen, zweimal kurz mit H₂O gespült und dann entweder getrocknet und aufbewahrt oder direkt für den immunologischen Nachweis von Proteinen eingesetzt.

2.2.3.11 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert. Getrocknete Membranen wurden dafür für 5min in H₂O rehydriert. Danach wurde die Membran bei RT für 2h in Blockierungslösung (5% Milchpulver oder 5% BSA in PBS-T) inkubiert. Nach zweimaligem Spülen mit PBS-T wurde die Membran mit 3ml PBS-T, das die Primärantikörper enthielt, in Plastikfolie eingeschweißt und üN bei 4°C rotiert. Nach drei einstündigen Waschschritten mit PBS-T wurde die Membran mit in PBS-T verdünnten, HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern für 2h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3x für 1h mit PBS-T gewaschen und der Detektion der gebundenen Antikörper unterzogen. Dafür wurde das Enhanced Chemiluminescence-Kit (Amersham Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben verwendet. ECL-Signale wurden mit Hilfe des Chemismart 5100-Systems (Vilber Lourmat) aufgezeichnet. Sollten auf derselben Membran weitere Proteine nachgewiesen werden, so wurden die gebundenen Antikörper durch 30-minütige Inkubation mit Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific) entfernt. Anschließend wurde die Membran mehrfach ausgiebig mit PBS-T gewaschen. Vor dem immunologischen Nachweis weiterer Proteine wurden erneut unspezifische Bindungsstellen blockiert.

2.2.4 Dokumentation und Analyse histologischer Daten

Die Dokumentation histologischer Daten erfolgte an einem *Laser-scanning*-Mikroskop (LSM700 Pascal, Zeiss) mit der ZEN2009 Software (Zeiss).

Für die Berechnung der Fläche der Muskelfasern im Querschnitt, wurden die Innenflächen der Muskelfasern auf Immunfluoreszenzbildern mit Photoshop CS3/5 extended (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) markiert und eingefärbt. Anschließend wurden auf den so entstandenen Bildern die Flächen mittels der Software ImageJ (National Institute of Health, USA) berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Die Rekombinationseffizienz der Pax7^{Cre} Mauslinie

Das Shp2 Protein ist eine ubiquitär exprimierte zytoplasmatische Tyrosin-Phosphatase und ein Schlüsselmolekül im Signalweg vieler Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK). Shp2 wurde in Säugetieren Anfang der 1990er Jahre unabhängig von mehreren Arbeitsgruppen entdeckt (Adachi et al., 1992; Ahmad et al., 1993; Vogel et al., 1993). Da Shp2 Nullmutanten in der Regel noch vor der Gastrulation sterben, ist eine Analyse der Shp2 Funktion in der fötalen und postnatalen Muskelentwicklung nur durch eine konditionelle Mutation von Shp2 möglich. In der Arbeitsgruppe von Walter Birchmeier (MDC) generierte Katja Grossmann eine solche Shp2^{flox}-Maus, die für die vorliegende Arbeit genutzt wurde. In dieser Maus werden die Exone 3 und 4 von loxP Sequenzen flankiert. Cre-vermittelte Rekombination führt zu einer Verschiebung des Leserasters (frameshift-Mutation), so dass nur ein nicht funktioneller N-terminaler Proteinrest von 45 Aminosäuren exprimiert wird (Grossmann et al., 2009) (Abb.6).



Abb.6 Das Shp2^{flox} Allel

Im flox-Allel wurde eine loxP-Sequenz 5' von Exon 3, die andere loxP Sequenz 3' von Exon 4 (rote Pfeilspitzen) in die genomischen DNA-Sequenz von Shp2 eingeführt. Nach Crevermittelter Rekombination wird nur ein 45 Aminosäuren langer Proteinrest exprimiert, der nicht funktionell ist. Das gezeigte Schema wurde einer Publikation von Grossmann et al., 2009 entnommen und verändert.

Zur Rekombination des Shp2^{flox}-Allels wurden Pax7^{Cre}-Mäuse benutzt. Diese "knock in" Mäuse wurden von Charles Keller am Howard Hughes Medical Institute and Department of Human Genetics der University of Utah (Salt Lake City, Utah, USA) hergestellt. Die Cre-vermittelte Rekombination in diesen Mäusen beginnt am Tag E10 und findet sich in allen Bereichen, die eine Pax7-Expression zeigen (Abb.7A). Dies beinhaltet auch das Dermomyotom, aus denen im späteren Verlauf der Entwicklung die hypaxialen und epaxialen Muskeln hervorgehen (Keller et al., 2004).

Meine eigenen Untersuchungen von Pax7^{Cre}; Rosa^{lacZ} Mäusen zeigten, dass am Tag E18 die Muskeln der Extremitäten und die tiefe Rückenmuskulatur β-Galactosidase-positiv waren und darum eine Rekombination des Rosa 26 Lokus in Muskelvorläuferzellen stattgefunden hatte (Abb.7B).

In konditionellen Mutanten mit dem Genotyp Pax7^{Cre/+}; Shp2^{flox/flox} (im folgenden coShp2 Mutanten genannt) war am Tag E12 das Shp2 Protein noch in Muskelzellen vorhanden. Als Kontrollen für dieses und alle weiteren Experimente dienten Mäuse mit dem Genotyp Pax7^{+/+}; Shp2^{+/flox}. Das vorhanden sein von Shp2 in der coShp2 Mutante zum Zeitpunkt E12 wurde durch immunhistologische Analysen, d.h. Doppelfärbung mit Antikörpern gegen Shp2 und Desmin, gezeigt (Abb.7D). Hingegen war ab dem Zeitpunkt E14 in Muskelzellen, die positiv für Desmin oder Pax7 waren, keine Doppelfärbung mit dem Shp2 Antikörper nachzuweisen (Abb.7E). Dies bedeutet, dass in diesen Zellen kein Shp2 Protein mehr vorhanden war und die Cre-vermittelte Rekombination des Shp2 Lokus stattgefunden hat. Dies konnte auch auf proteinbiochemischem Weg gezeigt werden. Für den "Western Blot" gegen Shp2 wurde Proteinlysat aus den Extensor Carpi Radialis Longus (ECRL) Muskeln von je drei coShp2 Mutanten oder Kontrolltieren zum Zeitpunkt P0 gewonnen wurde. Dieser "Western Blot" zeigte eine sehr deutliche Reduktion des Shp2 Proteins in den coShp2 Mutanten (Abb.7C). Ein vollkommener Verlust des Proteins durfte nicht erwartet werden, da im Muskelgewebe auch nicht myogene Zellen wie z.B.
Endothel oder Bindegewebe, vorhanden waren. In diesen Zellen wurde Pax7 und daher auch die Cre-Rekombinase nicht exprimiert. Daher wurde in diesen Zellen der Shp2 Lokus nicht rekombiniert.



Abb.7 Rekombination des Rosa und Shp2 Lokus in der Pax7^{Cre} Linie

(A,B) Rekombination des Rosa 26 Lokus in Pax7^{Cre} Mäusen. (A) X-Gal Färbung in E10 Embryo. Rekombination hat in den Somiten (weißer Pfeilkopf), im Neuralrohr (schwarzer Pfeilkopf), dem Mesenzephalon (mb) und dem Zungenbeinbogen (mx) stattgefunden. Das gezeigte Bild wurde einer Publikation, der Erstbeschreibung des Pax7^{Cre} Allels (Keller et al., 2004), entnommen. (B) Immunfluoreszenz mit β-Gal Antikörper. Eine Färbung war in allen Muskelgruppen der oberen Vorderextremität eines E18 Embryos zu erkennen. (C) Western Blot Analyse zum Zeitpunkt P0 von Proteinlysat aus ECRL Muskel. Im Lysat von coShp2 Mäusen war weniger Shp2 Protein vorhanden. β-Actin diente als Ladekontrolle. (D,E) Immunfluoreszenzfärbungen in Pax7^{Cre} Shp2^{fl/fl} Mäusen. (D) Bei E12 Föten der coShp2 Mutante konnte Shp2 in Desmin positiven Zellen der vorderen Extremitäten nachgewiesen werden. (E) In E14 coShp2 Föten fand sich kein Shp2 Protein in Desmin- oder Pax7-positiven Zellen. In Kontrolltieren war Shp2 ubiquitär vorhanden.

3.2 Migration von Muskelvorläuferzellen in coShp2 Mutanten

Die Muskeln der Extremitäten haben ihren Ursprung in Zellen des hypaxialen Teils des Somiten. Um in die Anlagen der Extremitäten zu gelangen, müssen diese Zellen über eine lange Strecke migrieren. Diese Migration beginnt am Tag E10. Die migrierenden Zellen konnten detektiert werden, da sie den Transkriptionsfaktor Lbx1 exprimierten. Die Bindung von Gab1 an Shp2 ist essentiell für die Migration der myogenen Vorläuferzellen. In Mäusen, in denen die Bindestelle von Shp2 am Gab1 Protein mutiert wurde, erreichen weniger Muskelvorläuferzellen die Anlagen der Extremitäten (Schaeper et al., 2007). Des Weiteren konnte E. Vasyutina in bisher nicht veröffentlichten Ergebnissen zeigen, dass eine konditionelle Mutation von Shp2 durch ein Pax3^{Cre} Allel zu schweren Defiziten in der Migration von myogenen Vorläuferzellen führte.

In den von mir untersuchten coShp2 Mutanten war die Migration der Muskelvorläuferzellen in die Extremitäten nicht beeinträchtigt. Die Anzahl und die Verteilung der Lbx1-positiven Zellen in der Extremität war in coShp2 und Kontrolltieren vergleichbar (Abb.8).



Abb.8 Die Migration der Muskelvorläuferzellen war in coShp2 Mäusen nicht beeinträchtigt

Immunfluoreszenz mit Lbx1 Antikörper auf Vorderextremitäten von E11 Embryonen. Sowohl die Anzahl und die Verteilung der Lbx1-positiven Zellen waren in coShp2 Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht verändert.

3.3 Kein offensichtlichen Phänotyp in coShp2 Mutanten zum Zeitpunkt der Geburt

Die coShp2 mutanten Tiere waren nach der Geburt in der Lage zu atmen und Nahrung aufzunehmen, und zeigten keinen offensichtlichen Phänotyp (Abb.9A). coShp2 mutante Tiere waren gleich groß und besaßen das gleiche Gewicht wie die Kontrolltiere. Sowohl Mutanten als auch Kontrolltiere hatten gemessen von der Spitze der Schnauze bis zum Schwanzansatz eine Länge von etwa 3cm und wogen im Durchschnitt 1,7g (Abb.9B).



Abb.9 coShp2 Mutanten zeigten keinen offensichtlichen Phänotyp zum Zeitpunkt P0 (A) Zum Zeitpunkt P0 zeigten die coShp2 Mutanten keinen äußeren Phänotyp. (Maßstab 1cm) (B) Auch in der Größe (3cm, $n \ge 5$, gemessen von Schnauze bis Schwanzansatz) und Gewicht (1,7g, $n \ge 7$) unterschieden sich die Mutanten nicht von den Kontrolltieren.

3.4 Wachstumsstörungen im Verlauf der Entwicklung von coShp2 Mutanten

Die coShp2 Mutanten zeigten zunächst keinen Phänotyp, jedoch kam es postnatal zu Störungen in der Entwicklung (Abb.10A). Am Tag P7 waren coShp2 Mäuse bereits deutlich kleiner als die Kontrolltiere. Zu diesem Zeitpunkt wogen die Kontrolltiere etwa 5g, die coShp2 Mäuse waren mit nur etwa 3q siqnifikant leichter (p<0.001) (Abb.10B). In der Länge unterschieden sich die Kontrolltiere und die coShp2 Mutanten um 0,5 cm (Kontrolltiere etwa 4,8 cm, coShp2 etwa 4,3cm). Auch dieser Unterschied war signifikant (Abb.10C). Zwei (p<0,05) Wochen nach der Geburt waren die Größenunterschiede zwischen coShp2 Mutanten und Kontrolltieren noch deutlicher. Während die Kontrolltiere innerhalb einer Woche auf 6cm gewachsen waren, konnte bei der coShp2 Mutante kein Längenwachstum festgestellt werden. Die Mutanten waren auch 2 Wochen nach der Geburt noch immer 4,3cm (Abb.10C). Dieser Unterschied war signifikant (p<0,001).

Auch die Differenz im Gewicht der Tiere war am Tag P14stärker ausgeprägt. Mit 9,1g waren die Kontrolltiere zwei Wochen nach der Geburt signifikant schwerer als die coShp2 Mutanten mit etwa 3,6g (p<0,001) (Abb.10b).

Neben den Unterschieden in Größe und Gewicht der Tiere zeigten die coShp2 Mäuse auch eine veränderte Motilität. Am Tag P7 bewegen sich die coShp2 Tiere weniger intensiv als die Kontrolltiere. Zudem entwickeln die coShp2 Mutanten eine verkrümmte Wirbelsäule (Skoliose), wodurch die Tiere am Tag P14 einen ausgeprägten Buckel aufwiesen. Aufgrund der ausgeprägten postnatalen Entwicklungsstörung habe ich coShp2 Tiere nur bis zum Zeitpunkt P14 untersucht, und alle Tiere zu diesem Zeitpunkt getötet.



Abb.10 Wachstumsstörungen im Verlauf der Entwicklung von coShp2 Mutanten

(A) Bei P0 Tieren war kein Größenunterschied zwischen Kontroll- und coShp2 Mäusen ersichtlich. P7 waren coShp2 Tiere bereits kleiner als Kontrolltiere. Bei P14 Tieren war der Größenunterschied noch ausgeprägter. (Maßstab 1cm) (B) Gewicht von Kontrolltieren und coShp2 Mutanten. Unterschiede im Gewicht P7 und P14 waren höchst signifikant (P7: p<0,001, $n \ge 8$; P14 p<0,001, $n \ge 15$). (C) Länge von Kontrolltieren und coShp2 Mutanten (gemessen von Schnauze bis Schwanzansatz). Unterschiede in der Länge P7 und P14 waren signifikant (P7: p<0,05, $n \ge 5$; P14: p<0,001, $n \ge 12$).

3.5 Störungen in der postnatalen Muskelentwicklung von coShp2 Mutanten

Die postnatale Entwicklung der Skelettmuskulatur in coShp2 Mutanten wies beträchtliche Störungen auf. Eine Färbung für das muskelspezifische Protein Desmin zeigte, dass in coShp2 Föten zum Zeitpunkt E18 die Lage und Größe der verschiedenen Muskeln in der unteren Vorderextremität kaum verändert war. Im Laufe der postnatalen Entwicklung blieb das Muskelwachstum in coShp2 Mutanten jedoch stark zurück. Dies führte dazu, dass zum Zeitpunkt P14 die verschiedenen Muskeln bei den coShp2 Mutanten zwar vorhanden, jedoch wesentlich kleiner als die der Kontrolltiere waren (Abb.11A).

Vermindertes Muskelwachstum zeigte sich auch in der Entwicklung der Muskelfasern selbst. Um deren Wachstum zu bestimmen, wurden einzelne Muskelfasern aus dem ECRL-Muskel von Kontrolltieren und coShp2 Mäusen an verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung isoliert. Anschließend wurden die Muskelfasern gefärbt und die Zellkerne von intakten Fasern auf Immunfluoreszenzaufnahmen ausgezählt. Dabei zeigte sich, dass bereits zum Zeitpunkt P0 die Anzahl der Zellkerne pro Muskelfaser in coShp2 Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren leicht, jedoch signifikant (p<0,05) verringert war. Zu diesem Zeitpunkt besaß eine ECRL-Muskelfaser von Kontrolltieren im Durchschnitt 64 Zellkerne, eine coShp2 Faser nur 53. Im weiteren Verlauf der Entwicklung nahm die Zahl der Zellkerne pro Muskelfaser in Kontrolltieren rapide zu, wohingegen in den coShp2 Mutanten kaum eine Zunahme der Kerne pro Faser zu verzeichnen war. So hatte zum Zeitpunkt P7 eine ECRL-Muskelfaser der Kontrolltiere im Durchschnitt 118 Zellkerne, eine coShp2 Muskelfaser hingegen nur 64 (p<0,01). Bis zum Zeitpunkt P14 fand in der coShp2 Mutante kaum eine Zunahme der Kerne pro Faser statt (67), wobei in den Kontrolltieren die Zahl der Kerne pro Muskelfaser auf 144 anstieg (Abb.11B). Auch dieser Unterschied war signifikant (p<0,001).

Eine Analyse des Querschnitts von ECRL-Muskelfasern zeigte, dass kein Unterschied zwischen coShp2 Mutanten und den Kontrollen bei der Geburt vorlag. Auch zum Zeitpunkt P7 bestand noch kein signifikanter Unterschied im Querschnitt der Fasern zwischen Kontrolltieren und coShp2 Mutanten. Zwischen P0 und P7 war die Vergrößerung dieser Querschnittsfläche auch in der Kontrolle gering. Erst zwischen P7 und P14 fand eine starke Vergrößerung der Querschnittsfläche in Kontrolltieren statt. Auch in coShp2 Mutanten hatte sich die Querschnittsfläche der Muskelfasern zum Zeitpunkt P14 vergrößert, mit durchschnittlich $230\mu m^2$ war sie jedoch signifikant kleiner als in den Kontrolltieren (p<0,01). Die Querschnittsfläche betrug in den Kontrolltieren 370 μm^2 (Abb.11C).

Abb.11 Störungen in der postnatalen Muskelentwicklung

(A) Immunfluoreszenzaufnahmen mit einem Antikörper gegen Desmin auf Schnitten der Vorderextremität. Zum Zeitpunkt E18 waren keine großen Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und der coShp2 Mutante zu erkennen. Sämtliche Muskeln waren vorhanden und in ihrer Größe den Kontrolltieren ähnlich. Zum Zeitpunkt P14 waren die Muskeln von Kontrolltieren wesentlich größer als die der coShp2 Mutanten. (Eichstriche je 500µm) (B) Anzahl der Zellkerne pro ECRL-Muskelfaser. Im Vergleich zu den Kontrolltieren besaßen die Muskelfasern der coShp2 Mutanten bereits zum Zeitpunkt P0 weniger Zellkerne. Dieser Unterschied war signifikant und vergrößerte sich im Lauf der Entwicklung (P0: p<0,05, n=3; P7: p<0,01, n=3; P14: p<0,001, n=4). (C) Fläche der ECRL-Muskelfasern im Querschnitt. Bis zum Zeitpunkt P7 gab es keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Fläche der Muskelfasern in Kontrolltieren und coShp2 Mutanten. Während dieser Phase hatte jedoch generell kaum ein Flächenwachstum stattgefunden. Erst zum Zeitpunkt P14 war die Fläche in Kontrolltieren stark vergrößert. Die Fläche in den Mutanten hatte sich im gleichen Zeitraum nur leicht vergrößert. Dieser Unterschied war signifikant (p<0,01, n=3).

→ nächste Seite



3.6 Veränderungen in der Satellitenzellpopulation während der postnatalen Entwicklung von coShp2 Mäusen

Auch in der Anzahl der Satellitenzellen bestand ein Unterschied zwischen den coShp2 Mutanten und den Kontrolltieren. Die Satellitenzellen sind die Stammzellen der Skelettmuskulatur. Sie gewährleisten das Wachstum und die Regeneration der postnatalen Muskulatur. Die Satellitenzellen sind durch die Expression des Transkriptionsfaktors Pax7 charakterisiert. Auch bei den Kontrolltieren nahm die Zahl der Satellitenzellen in der hypaxialen Muskulatur im Verlauf der postnatalen Entwicklung ab. Dieser Rückgang der Satellitenzellpopulation war bei coShp2 Mutanten jedoch wesentlich stärker. In der Skelettmuskulatur der unteren Vorderextremität bestand zum Zeitpunkt E16 und E18 der Entwicklung noch kein Unterscheid in der Zahl der Satellitenzellen pro Muskelfaser (Abb.12, Abb.13A).

Bereits direkt nach der Geburt, zum Zeitpunkt P0 war ein Unterschied in der Anzahl der Satellitenzellen pro Muskelfaser auf den Immunfluoreszenzbildern zu erkennen (Abb.12). Zu diesem Zeitpunkt existierten in den Kontrolltieren etwa 15 Satellitenzellen pro 100 Muskelfasern, in den coShp2 Mutanten dagegen nur 8 (Abb.13A). Aus den Immunfluoreszenzbildern ging außerdem hervor, dass im weiteren Verlauf der Entwicklung der Unterschied in der Anzahl der Satellitenzellen immer deutlicher wurde (Abb.12). Zum Zeitpunkt P7 war die Anzahl der Satellitenzellen pro 100 Muskelfasern in den coShp2 Mutanten auf etwa 4 Zellen gesunken, in den Kontrolltieren fanden sich noch etwa 12 Satellitenzellen pro 100 Muskelfasern. Zum Zeitpunkt P14 war die Anzahl der Satellitenzellen in den coShp2 Tieren auf etwa 1,4 Zellen pro 100 Muskelfasern im Vergleich zu 8 Zellen in den Kontrolltieren gesunken (Abb.13A).

Um die Unterschiede in der Anzahl der Satellitenzellen zwischen Kontrollen und coShp2 Mäusen besser vergleichen zu können, wurde die Anzahl der Satellitenzellen in den Kontrolltieren für jeden betrachteten Zeitpunkt gleich 100% gesetzt und die Anzahl der Satellitenzellen in der coShp2 Mutante auf diesen Wert bezogen. Daraus ging hervor, dass die Anzahl der Satellitenzellen in den coShp2 Mäusen im Vergleich zur Kontrolle zwischen den Zeitpunkten P0 und P14 konstant abnahm. Zum Zeitpunkt E18 besaß die coShp2 Mutante noch 85% der Satellitenzellen der Kontrolltiere, P0 noch 55%, P7 noch 36% und P14 nur noch 18% (Abb.13B).

Abb.12 Veränderungen der Anzahl der Satellitenzellen während der postnatalen Entwicklung

Immunfluoreszenzaufnahmen von Gewebeschnitten der unteren Vorderextremität zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung. Antikörper gegen Collagen IV (magenta) zur Markierung der die Muskelfasern umgebende Basalmembran. Antikörper gegen Pax7 (grün) zur Markierung der Satellitenzellen. Im Verlauf der Entwicklung der Kontrolltiere nahm die Anzahl der Pax7-positiven Satellitenzellen ab und der Durchmesser der einzelnen Muskelfasern zu. Während der Entwicklung der coShp2 Mäuse nahm die Anzahl der Satellitenzellen im Vergleich zur Kontrolle stärker ab. Zum Zeitpunkt P14 waren nur noch wenige Satellitenzellen nachzuweisen.

→ nächste Seite



47



Abb.13 Quantifizierung der Satellitenzellen

(A) Dargestellt sind die Anzahl der Satellitenzellen/100 Muskelfasern. Die Unterschiede in der Anzahl der Satellitenzellen zwischen den Kontrollen und den coShp2 Tieren zu den Zeitpunkten P0-P14 waren signifikant (P0: p<0,001, n=4; P7: p<0,01, n=4; P14: p<0,01, n=3) (B) In diesem Diagramm ist die Anzahl der Satellitenzellen/100 Muskelfasern der Kontrolltiere für jeden Zeitpunkt auf 100% gesetzt, die Anzahl der Zellen in den coShp2 Tieren wurde in Relation gesetzt. Daraus lässt sich ablesen, dass die Anzahl der Satellitenzellen in den coShp2 Tieren konstant abnahm und an P14 nur noch etwa 18% der Satellitenzellen vorhanden waren.

3.7 Veränderungen in der Satellitenzellpopulation der epaxialen Muskulatur

Um zu überprüfen, ob der Rückgang der Satellitenzellpopulation durch den Verlust von Shp2 ausschließlich in der hypaxialen oder auch in der epaxialen Muskulatur stattfand, wurde epaxiales Muskelgewebe der Rückenmuskulatur untersucht. Die Vorläuferzellen der epaxialen Muskulatur werden vor denen der hypaxialen Muskulatur gebildet und beginnen daher früher mit der Expression des Transkriptionsfaktors Pax7. Da mit der früheren Expression von Pax7 auch die Rekombinase in den Vorläuferzellen der epaxialen Muskeln früher exprimiert wurde, stellte sich die Frage, ob es in diesen Muskeln auch eher zum beobachteten Satellitenzellphänotyp kam. Dies war jedoch nicht der Fall. Wie in der hypaxialen Muskulatur war die Anzahl der Satellitenzellen in der epaxialen Muskulatur der coShp2 Mutante zum Zeitpunkt E16 unverändert. In den Kontrolltieren und der Mutante fanden sich etwa 26 Satellitenzellen pro 100 epaxiale Muskelfasern (Abb.14A). Dies entsprach in etwa der Anzahl der Satellitenzellen in der hypaxialen Muskulatur.

Ergebnisse

Parallel zum Rückgang der Satellitenzellpopulation in der hypaxialen Muskulatur sank auch die Anzahl der Satellitenzellen in der epaxialen Muskulatur in den ersten 2 Wochen nach der Geburt bei den Kantrolltieren. Dabei war die Anzahl der Satellitenzellen in der epaxialen Muskulatur mit 14 pro 100 Muskelfasern größer als die in der hypaxialen Muskulatur mit 8 Satellitenzellen pro 100 Muskelfasern (vgl. Abb.13A und Abb.14A). Der Rückgang der Satellitenzellpopulation von coShp2 Mäusen in der epaxialen Muskulatur war dem der hypaxialen Muskulatur ähnlich. Zum Zeitpunkt P14 waren in der epaxialen Rückenmuskulatur von coShp2 Mutanten noch etwa 2,5 Satellitenzellen pro 100 Muskelfasern vorhanden (Abb.14A). Das heißt nur etwa 18% der Satellitenzellen, die in Kontrolltieren nachgewiesen werden konnten (vgl. Abb.13B und Abb.14B). Die Rekombination des Shp2 Allels zu einem früheren Zeitpunkt der Entwicklung hatte demnach keinen Einfluss auf den Beginn des Phänotyps Außerdem war der Phänotyp der coShp2 Mutation nicht auf die Derivate der migrierenden Muskelvorläuferzellen beschränkt.



Abb.14 Reduktion der Satellitenzellpopulation in der epaxialen Muskulatur

Quantifizierung von Satellitenzellen in der epaxialen Rückenmuskulatur. (A) Dargestellt sind die Anzahl der Satellitenzellen/100 Muskelfasern. Der Unterschied in der Anzahl der Satellitenzellen zwischen Kontrolle und coShp2 Mutante zum Zeitpunkt P14 war signifikant (p<0,01, n=3) (B) In diesem Diagramm ist die Anzahl der Satellitenzellen/100 Muskelfasern der Kontrolltiere für jeden Zeitpunkt auf 100% gesetzt und die Anzahl der Zellen in den coShp2 Tieren in Relation gesetzt.

3.8 Veränderungen in den Myf5- und Mogeninexprimierenden Zellpopulation in coShp2 Mäusen

Neben dem Rückgang der Pax7-positiven Satellitenzellpopulation, konnte auch die Reduktion der Myf5und Myogenin-positiven Myoblastenpopulationen in der hypaxialen Muskulatur im Entwicklungsverlauf coShp2 Mutanten nachgewiesen Myf5 von werden. ist ein muskeldeterminierender Transkriptionsfaktor, der sehr früh während der Differenzierung der Myoblasten exprimiert wird. Myogenin wird dagegen erst in terminal differenzierenden Myoblasten exprimiert wird.

Während der fötalen Entwicklung konnten bezüglich der Anzahl der Myf5exprimierenden Myoblasten keine Unterschiede zwischen Kontrolltieren und coShp2 Mutanten festgestellt werden (Abb.15A). Sowohl in der Mutante als auch in den Kontrolltieren kam es zwischen E16 und E18 zu einer drastischen Reduktion in der Anzahl Myf5-exprimierender Myoblasten. Wie für die Satellitenzellpopulation bereits dargelegt manifestierte sich postnatal auch in der Anzahl der Myf5-exprimierenden Zellen ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrolltieren und den coShp2 Mutanten. Am Ende des beobachteten Zeitraums (P14) fanden sich in der Kontrolle noch 6 Myf5positive Zellen pro 100 Muskelfasern im Vergleich zu 1,5 in der coShp2 Mutante (Abb.15B). Wie bei den Pax7-positiven Zellen kann man auch in diesem Fall erkennen, dass in den coShp2 Mutanten die Population der Myf5positiven Myoblasten zwischen P0 und P14 konstant kleiner geworden ist (Abb.15C).



Abb.15 Myf5-positiven Zellpopulation in coShp2 Mäusen

(A) Immunfluoreszenzaufnahmen von Gewebeschnitten der unteren Vorderextremität zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung. Antikörper gegen Collagen IV (magenta) zur Markierung der die Muskelfasern umgebende Basalmembran. Antikörper gegen Myf5 (grün) zur Markierung der Myf5-exprimierenden Myoblasten. Zum Zeitpunkt E18 fand sich in Kontrollen und coShp2 Mutanten eine vergleichbare Anzahl Myf5-exprimierender Myoblasten. Zum Zeitpunkt P14 war die Anzahl der Myf5-positiven Zellen sowohl in der Kontrolle als auch in der Mutante, dort jedoch deutlicher, gesunken. (B) Quantifizierung der Anzahl der Myf5-positiven Zellen/100 Muskelfasern. Die Unterschiede in der Anzahl der Zellen zwischen den Kontrollen und den coShp2 Tieren zu den Zeitpunkten P0-P14 waren signifikant (P0/P7: p<0,05, n=3; P14: p<0,01, n=3) (C) In diesem Diagramm ist die Anzahl der Myf5-positiven Zellen/100 Muskelfasern der Kontrolltiere für jeden Zeitpunkt auf 100% gesetzt und die Anzahl der Zellen in den coShp2 Tieren dagegen relativiert. Daraus lässt sich erkennen, dass die Anzahl der Myf5-positiven Zellen in den coShp2 Tieren vom Tag P0 an konstant abnahm und P14 nur noch etwa 18% der Zellen vorhanden waren.

Wie bei den Myf5-positiven Zellen konnten bezüglich der Anzahl der Myogenin-positiven Zellen während der Fötalentwicklung zwischen coShp2 Mutanten und Kontrolltieren kein Unterschied festgestellt werden. Sowohl in den Kontrollen als auch in den Mutanten nahm die Anzahl der Myogeninpositiven Zellen zwischen E16 und E18 stark ab. Ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und Mutante etablierte sich erst während der postnatalen Entwicklung (Abb.16). Dadurch, dass die Anzahl der Myogenin-positiven Zellen der Kontrolltiere zu jedem beobachteten Zeitpunkt gleich 100% gesetzt und die Anzahl der Zellen in den coShp2 Mutanten in Relation dazu gebracht wurde, wurde ersichtlich, dass die Zahl der Myogenin-positiven Zellen bis zum Zeitpunkt P7 abgenommen hatte, dann aber bis zum Zeitpunkt P14 konstant bei etwa 42% der Kontrollen geblieben war (Abb.16C).

Neben der Größe der Pax7-, Myf5- und Myogenin-positiven Zellpopulationen wurden auch die MyoD-positiven Zellen erfasst. Auch bei dieser Fraktion der Myoblastenpopulation fand keine Veränderung während der fötalen Entwicklung statt. Leider ließ die Qualität des Antikörpers gegen MyoD eine Untersuchung von postnatalem Gewebe nicht zu.

Diesen Teil zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Vergleich zu Kontrolltieren in coShp2 Mutanten alle Populationen myogener Zellen im Verlauf der postnatalen Entwicklung stärker abgenommen haben.





(A) Immunfluoreszenzaufnahmen von Gewebeschnitten der unteren Vorderextremität zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung. Antikörper gegen Collagen IV (magenta) markierte die Muskelfasern umgebende Basalmembran. Antikörper gegen Myogenin (grün) markierte die Myogenin-exprimierenden Myoblasten. Zum Zeitpunkt E18 fanden sich in Kontrollen und coShp2 Mutanten eine vergleichbare Anzahl Myogenin-exprimierenden Myoblasten. Bis zum Zeitpunkt P14 ist die Anzahl der Myogenin-positiven Zellen sowohl in der Kontrolle als auch in der Mutante drastisch gesunken. Dabei sind in Kontrolltieren mehr Myogenin-positive Zellen zu finden. (B) Quantifizierung der Anzahl der Myogenin-positiven Zellen/100 Muskelfasern. Die Unterschiede in der Anzahl der Zellen zwischen den Kontrollen und den coShp2 Tieren zu den Zeitpunkten P0-P14 sind signifikant (P0/P14: p<0,05, n=3; P7: p<0,001, n=4) (C) In diesem Diagramm ist die Anzahl der Myf5-positiven Zellen pro 100 Muskelfasern der Kontrolltiere für jeden Zeitpunkt auf 100% gesetzt und die Anzahl der Zellen in den coShp2 Tieren darauf bezogen.

3.9 Proliferation und Apoptose myogener Vorläuferzellen

Für den Rückgang der Satellitenzellpopulation und der Myoblastenpopulation im Verlauf der postnatalen Entwicklung der coShp2 Mutanten waren zwei Ursachen denkbar. Eine Annahme war, dass die Zellen durch Apoptose verloren gehen. Die zweite, dass die Proliferation der myogenen Zellen postnatal reduziert war.

Um die Proliferationsrate der myogenen Zellen zu bestimmen, wurde den Tieren 2 Stunden vor der Entnahme des Gewebes BrdU (5-Brom-2'-desoxy-Uridin) injiziert. BrdU wird als Tymidin-Analog während der S-Phase der Mitose in die DNA inkorporiert. Dort lässt sich BrdU immunhistologisch nachweisen. Damit können Zellen identifiziert werden, die sich in der Zeit zwischen BrdU-Injektion und Präparation in der S-Phase der Mitose befunden haben.

Bei der Betrachtung der Proliferationsrate myogener Zellen in den Kontrolltieren, konnte man von E16 zu P0 einen starken Abfall der Rate erkennen, von 30 BrdU-positiven Zellen pro 100 Muskelfasern (E16) auf 6 BrdU-positiven Zellen pro 100 Muskelfasern (P0). Anschließend stieg die Proliferationsrate zum Tag P7 noch einmal leicht an, und sank dann auf 3,5 BrdU-positive Zellen pro 100 Muskelfasern ab (Tag P14) (Abb.17A). Ein Vergleich der Proliferationsrate myogener Zellen in coShp2 Mäusen und Kontrolltieren zeiqte keinen signifikanten Unterschied während der Fötalentwicklung. Während der postnatalen Entwicklung die war Proliferationsrate der coShp2 Mutanten stark reduziert. Am Tag P7konnten nur 3 und zwei Wochen nach der Geburt (P14)nur 0,7 BrdU-positive Zellen pro 100 Muskelfasern nachgewiesen werden (Abb.17A). Setzte man die Werte der Kontrolltiere zu jedem Zeitpunkt auf 100%, wurde deutlich, dass die Proliferationsrate in den coShp2 Mutanten im Vergleich zu den Kontrollen vom Tag der Geburt bis zum Tag P14 konstant abgenommen hatte. Zum Tag P0 betrug die Proliferation in der Mutante etwa 50% der Kontrolltiere, P7 noch 35% und P14 schließlich noch 22% (Abb.17B).

Die Anzahl der apoptotischen Zellen wurde mittels TUNEL Färbung bestimmt. Bei der TUNEL Färbung werden die DNA Doppelstrangbrüche, zu denen es bei der Apoptose kommt, enzymatisch sichtbar gemacht (Gavrieli et al., 1992). Diese Untersuchung zeigte, dass es während der postnatalen Entwicklung keinen Unterschied in der Anzahl apoptotischer Muskelzellen zwischen der coShp2 Mutante und den Kontrollen gab. Sowohl in der Kontrolle als auch in der Mutante war die Anzahl apoptotischer Muskelzellen sehr klein und bewegte sich zwischen 0,7 und 0,5 apoptotischen Zellen auf $100\mu m^2$ Muskelfläche (Abb.17C).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Apoptose keinen Einfluss auf den Phänotyp der coShp2 Mutante hatte. Um den Einfluss der verringerten Proliferationsrate auf den Phänotyp näher zu untersuchen, wurde die Proliferation einzelner Populationen myogener Zellen gesondert betrachtet.





(A) Quantifizierung von Immunfluoreszenzfärbungen gegen Collagen IV und BrdU auf Gewebeschnitten der unteren Vorderextremität. Dargestellt ist die Anzahl der BrdU-positiven Zellen/100 Muskelfasern. In der Kontrolle war die Proliferationsrate von E16 zu P0 drastisch gesunken und war bis P7 noch einmal leicht angestiegen. In den coShp2 Mutanten war die Proliferationsrate zu den Zeitpunkten P0 bis P14 signifikant kleiner als in Kontrolltieren (P0/P7: p<0,05, n=4; P14: p<0,05, n=3). (B) In diesem Diagramm wurde die Anzahl der BrdUpositiven Zellen/100 Muskelfasern der Kontrolltiere für jeden Zeitpunkt auf 100% gesetzt und die Anzahl der Zellen in den coShp2 Mutanten in Relation gesetzt. (C) Quantifizierung von TUNEL Färbungen auf Gewebeschnitten der unteren Vorderextremität. Dargestellt ist die Anzahl apoptotischer Zellen/100 μ m² Muskelfläche. Die Anzahl apoptotischer Zellen im Muskel war in Kontrollen und coShp2 Mutanten vergleichbar.

3.10 Reduktion der Proliferationsrate der Satellitenzellen in der coShp2 Mutante

Um die Proliferationsrate der Satellitenzellen zu bestimmen, wurde den zu untersuchenden Tieren 2 Stunden vor der Präparation BrdU injiziert (vgl. Kapitel 3.9). Auf immunhistologischen Gewebeschnitten dieser Tiere wurden die für den Satellitenzellmarker Pax7 und BrdU doppelt-positiven Zellen erfasst und als proliferierende Satellitenzellen definiert. Daraus ging hervor, dass sich die Proliferationsrate der Satellitenzellen in den Kontrolltieren ähnlich wie die gesamt Proliferationsrate entwickelte. Die Proliferationsrate der Satellitenzellen in der hypaxialen Muskulatur der unteren Vorderextremität war zum Zeitpunkt E16 mit etwa 50% BrdU-positiven Satellitenzellen am höchsten und fiel anschließend rapide ab. Am Tag P0 waren noch etwa 14% der Satellitenzellen in den Kontrolltieren BrdU-positiv. Bis zum Tag P7 stieg der Anteil der BrdU-positiven Satellitenzellen erneut auf etwa 25% an und sank schließlich zum Zeitpunkt P14 auf etwa 5% (Abb.18B).

Bei der Proliferation der Satellitenzellen in der coShp2 Mutante zeigte sich während der fötalen Entwicklung kein signifikanter Unterscheid zu den Kontrolltieren (Abb.18A/B). Dies änderte sich aber in der postnatalen Entwicklung. Am Tag P0 waren in der Mutante etwa 6% der Satellitenzellen BrdU-positiv, am Tag P7 waren es etwa 15%. Diese Proliferationsrate war signifikant niedriger (p<0,05), als die in den Kontrolltieren. Am Tag P14 hatten die Satellitenzellen in der coShp2 Mutante die Proliferation vollständig eingestellt. Es fanden sich keine Pax7/BrdU doppelt-positiven Zellen mehr (Abb.18A/B). Dass die Proliferation der Satellitenzellen in coShp2 Mutanten während der postnatalen Entwicklung konstant abnahm, wurde in Relation zu den Werten der Kontrolltiere deutlich. Dazu wurden die Werte der jedes Zeitpunkts auf 100% gesetzt und die Werte der Mutanten darauf bezogen (Abb.18C).

In der epaxialen Muskulatur des Rückens war der Unterschied in der Proliferationsrate der Satellitenzellen zwischen coShp2 Mutante und den Kontrolltieren ähnlich (Abb.18D).

Abb.18 Proliferation der Satellitenzellen

(A) Immunfluoreszenzaufnahmen von Gewebeschnitten der unteren Vorderextremität zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung. Antikörper gegen Collagen IV (grün) markierte die Muskelfasern umgebende Basalmembran. Antikörper gegen Pax7 (rot) markierte die Satellitenzellen. Antikörper gegen BrdU (blau) markierte die proliferierenden Zellen (BrdU Injektion 2h vor Präparation). Zum Zeitpunkt E18 fanden sich noch ähnlich viele Pax7+/BrdU+ Zellen in Kontrolle und coShp2 Mutante. Zwei Wochen nach der Geburt waren in Kontrolltieren wenige, in coShp2 Mutanten keine Pax7+/BrdU+ Zellen vorhanden. (B) Quantifizierung der proliferierenden Satellitenzellen. Der Unterschiede in dem Anteil der proliferierenden Satellitenzellen zwischen Kontrollen und coShp2 Tieren zu dem Zeitpunkt P0 und P7 war signifikant (p<0,05, n=4). (C) Der Anteil der proliferierenden Satellitenzellen der Kontrolltiere wurde für jeden Zeitpunkt auf 100% gesetzt und der Anteil der Zellen in den coShp2 Tieren auf diesen Wert bezogen.

→ nächste Seite



3.11 Reduktion der Proliferation von Myf5- und Myogeninpositiven Myoblasten

Wie bei der Untersuchung der Proliferationsrate der Satellitenzellen, wurde den Tieren zur Untersuchung der Proliferation der Myoblasten 2 Stunden vor der Präparation BrdU injiziert. BrdU und Myf5 oder BrdU und Myogenin doppelt-positive Zellen wurden als proliferierender Anteil der jeweiligen Myoblastenpopulationen definiert.

Die Proliferation der Myf5-positiven Myoblasten wich geringfügig von der Proliferation der Satellitenzellen ab. Die Proliferationsrate der Myf5-positiven Myoblasten war niedriger als die der Satellitenzellen. Selbst zum frühesten untersuchten Zeitpunkt E16 proliferierten in den Kontrolltieren nur 23% der Myf5-positiven Zellen. Dabei ging die Proliferationsrate bis zum Zeitpunkt P0 jedoch weniger stark zurück und lag zu diesem Zeitpunkt noch bei 15%. Auch im Fall der Myf5-positiven Myoblasten nahm die Proliferation zwischen P0 und P7 leicht zu und lag zu diesem Zeitpunkt bei 18%. Schließlich fiel die Proliferation deutlich ab, so dass zum Zeitpunkt P14 nur noch etwa 2% der Myf5-positiven Zellen proliferierten (Abb.19A).

Während der Fötalentwicklung war die Proliferationsrate von Myf5-positiven Zellen in Kontrolltieren und coShp2 Mutanten ähnlich. Zu Beginn der postnatalen Entwicklung (P0) war die Proliferation der Myf5-positiven Myoblasten bereits stark inhibiert. Zu diesem Zeitpunkt war die Proliferationsrate dieser Zellen in der Mutante auf 7% im Vergleich zu 15% in den Kontrolltieren gesunken. Zwei Wochen nach der Geburt (P14) konnte keine Proliferation der Myf5-positiven Zellen in der coShp2 Mutanten mehr festgestellt werden (Abb.19A).

Myogenin-positiven Myoblasten teilen sich nicht so häufig, und der größte Teil dieser Zellen war bereits postmitotisch. In den Kontrolltieren sank die Rate von 13% während der späten fötalen Phase (E16) auf 2% in der postnatalen Entwicklung (P0 und P7). Myogenin-positiven Zellen teilten zwei Wochen

nach der Geburt (P14) in Kontrolltieren nicht mehr (Abb.19B).

Gegensatz zur Proliferation der Myf5-positiven Myoblasten Im und Satellitenzellen unterschied sich die Proliferation von Myogenin-positiven Myoblasten zwischen Kontrolle und coShp2 Mutante bereits am Ende der fötalen Entwicklung. Zum Zeitpunkt E16 war die Proliferationsrate der Myogenin-positiven Zellen in der coShp2 Mutante gegenüber der Kontrolle noch unverändert. Zum Zeitpunkt E18 war die Proliferation dieser Zellen auf etwa 2% im Vergleich zu etwa 8% in den Kontrollen gesunken (Abb.19B). Während der postnatalen Entwicklung der coShp2 Mutante konnte keine Proliferation Myogenin-positiven Myoblasten der festgestellt werden (Abb.19B).



Abb.19 Proliferation der Myf5- und Myogenin-positiven Myoblasten

Quantifizierung der proliferierenden Myf5- bzw. Myogenin-positiven Myoblasten. (A) Während der Fötalentwicklung bestand zwischen Mutante und Kontrolle kein Unterschied im Anteil der proliferierenden Myf5-positiven Myoblasten. In der postnatalen Entwicklung sank der Anteil dieser Zellen anders als bei der Kontrolle. P14 war keine Proliferation der Myf5-positiven Myoblasten in coShp2 Mäusen nachzuweisen. (B) Die Proliferationsrate der Myogenin-positiven Zellen war bereits während der Fötalentwicklung in Kontrolltieren gering und sank postnatal weiter ab. In der coShp2 Mutante war bereits E18 eine signifikante Reduktion der Proliferation zu beobachten (p<0,05, n=3). Postnatal war in der Mutante keine Proliferation der Myogenin-positiven Zellen festzustellen.

3.12 Aktivierung des PI3K/Akt- und Ras/Erk-Signalwegs in der coShp2 Mutante

Um zu überprüfen, ob Shp2 den Ras/Erk und/oder den Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-(PI3K)/Akt-Signalweg in Skelettmuskelzellen beeinflusst, wurden proteinbiochemische Analysen in Kontrolltieren und der coShp2 Mutante durchgeführt.

Eine Funktion von Shp2 in der Aktivierung des Ras/Erk-Signalwegs wurde bereits in verschiedenen Zelltypen beobachtet (Neel et al., 2003). Es ist auch bekannt, dass während der IGF-induzierten Differenzierung von Myoblasten *in vitro* der Ras/Erk-Signalweg über Shp2 stimuliert wird (Koyama et al., 2008). Um die Aktivierung des Ras/Erk-Signalwegs zu testen, wurde Proteinlysat aus dem ECRL Muskel von jeweils 3 Kontrollen und coShp2 Tieren zum Zeitpunkt P0 gewonnen und jeweils 25μ g Protein für einen Western Blot verwendet. Auf diesem Blot wurde das gesamte Erk1/2 Protein und die aktivierte Form von Erk1/2, pErk1/2, mittels Antikörperfärbung sichtbar gemacht. Eine Färbung gegen β -Actin diente dabei als Ladekontrolle (Abb.20A). Die Analyse von pErk1/2 ergab keinen Unterschied zwischen Kontroll- und coShp2-Lysaten (Abb.20B). Das bedeutet, dass trotz des Verlusts von Shp2 während der Muskelentwicklung kein Einfluss auf die Aktivierung des Ras/Erk-Signalwegs im Gesamtlysat des ECRL-Muskels festzustellen war.



Abb.20 Aktivierung des Ras/Erk-Signalwegs in der coShp2 Mutante

(A) Western Blot mit Antikörperfärbungen gegen gesamtes Erk1/2, pErk1/2 und β -Actin. Derselbe Blot wurde nacheinander mit den genannten Antikörpern gefärbt. Geladen wurden 25 μ g Protein pro Spur. β -Actin diente als Ladekontrolle. (B) Auswertung der pErk1/2 Färbung aus A. Dabei wurde die Stärke des pErk1/2 Signals mit der Ladekontrolle normalisiert und die Kontrolle auf 100% gesetzt. Es war kein Unterschied des pErk1/2 Signals zwischen der Kontrolle und coShp2 festzustellen.

Eine Funktion von Shp2 in der Aktivierung des PI3K/Akt–Signalwegs wurde bereits in der Literatur beschrieben (Neel et al., 2003). So ist die katalytische Aktivität von Shp2 notwendig, um beispielsweise in Fibroblasten den PI3K/Akt–Signalweg zu aktivieren, der dort anti-apoptotische Funktionen erfüllt (Ivins Zito et al., 2004). In Herzmuskelzellen führt der Verlust von Shp2 zu einem veränderten Insulin- und Glucose-Metabolismus. Dies beruht unter anderem auf der inhibierten Aktivierung des LIF induzierten PI3K/Akt– Signalwegs (Princen et al., 2009).

Um die Aktivität des PI3K/Akt–Signalwegs zu untersuchen wurde der Anteil des aktivierten Akt Proteins pAkt im Kontrolllysat und der coShp2 Mutante miteinander verglichen. Wie für den Ras/Erk-Signalweg wurden für diesen Western Blot jeweils 25μ g Protein aus dem Lysat des ECRL-Muskels aufgetragen und der Western Blot sukzessiv mit Antikörpern gegen das gesamte Akt und das aktivierte pAkt Protein gefärbt. Eine Färbung von β-Actin diente als Ladekontrolle (Abb.21A). Eine Auswertung dieses Western Blots, bei der die Stärke des pAkt Signal mit der Ladekontrolle normalisiert wurde, zeigte, dass in der coShp2 Mutante etwa 50% weniger aktiviertes Akt als im Kontrolllysat vorhanden war (Abb.21B). Dies bedeutet, dass der Verlust von Shp2 während der Entwicklung der Skelettmuskulatur zur einer Inhibition des PI3K/Akt–Signalwegs führte.



Abb.21 Die Aktivierung des Akt-Signalwegs war in coShp2 Tieren inhibiert

(A) Western Blot mit Antikörperfärbungen gegen gesamtes Akt, pAkt und β -Actin. Derselbe Blot wurde nacheinander mit den genannten Antikörpern gefärbt. Geladen wurden $25\mu g$ Protein pro Spur. β -Actin diente als Ladekontrolle. (B) Auswertung der pAkt Färbung aus A. Dabei wurde die Stärke des pAkt Signals mit der Ladekontrolle normalisiert und das Signal des Kontrollextrakts auf 100% gesetzt. In der coShp2 Mutante war nur etwa 50% des pAkt Signals vorhanden.

4 Diskussion

Satellitenzellen sind die Stammzellen der postnatalen Skelettmuskulatur. Sie gewährleisten das Wachstum der Muskulatur in der juvenilen Phase der Entwicklung, zudem die Regeneration der Muskeln selbst nach schwerwiegenden Verletzungen im juvenilen und adulten Organismus. Dennoch sind sowohl erworbene als auch erbliche Muskelkrankheiten (Myopathien) bekannt, in denen der Muskel nicht ausreichend regeneriert. Bei diesen Krankheiten reicht das Regenerationspotenzial der Satellitenzellen nicht aus, um die Muskulatur wiederherzustellen. Mögliche Ursachen dafür können eine unzureichende Aktivierung oder eine beeinträchtigte Differenzierung der Satellitenzellen. sowie ein Verlust der Satellitenzellpopulation sein (Decary et al., 2000). Auch der altersbedingte Muskelabbau und Rückgang der Muskelkraft (Sarkopenie) könnte auf eine Reduktion der Satellitenzellpopulation und deren Regenerationspotential zurückzuführen sein (Collins et al., 2007; Gopinath and Rando, 2008). Ein Verständnis der endogenen Regulation besseres der Aktivierung. Differenzierung und Proliferation der Satellitenzellpopulation könnte zur Entwicklung neuer Therapien führen, durch die Muskelwachstum und Regeneration angeregt werden könnten. Die Ergebnisse meiner Arbeit sind in diesem Zusammenhang relevant, da sie einen Einblick in die endogene Regulation der Proliferation von Satellitenzellen ermöglichen.

4.1 Entwicklungsdefekte der coShp2 Mutante

Aus den oben beschriebenen Ergebnissen geht hervor, dass der Verlust des Shp2 Proteins in der Skelettmuskulatur zu einer Inhibierung des postnatalen **Muskelwachstums** und zu einer Reduktion der Pax7-positiven Satellitenzellpopulation und der Myf5und Myogenin-positiven Myoblastenpopulationen führte. Die Hauptursache für den Rückgang dieser Zellpopulationen war die stark verminderte Proliferation dieser Zellen während der späten fetalen und postnatalen Entwicklung. Eine erhöhte Apoptoserate konnte nicht festgestellt werden. Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Faktoren, wie zum Beispiel eine beeinträchtigte Selbst-Erneuerung der Satellitenzellen, in diesem Zusammenhang relevant waren. Die Migration der Muskelvorläuferzellen in die Extremitätenanlagen war in der coShp2 Mutante nicht beeinträchtigt. Der Grund dafür ist die durch Expression der Rekombinase in der Pax7^{Cre} Linie induzierte Rekombination des Shp2 Allels, nachdem die Migration der Zellen bereits abgeschlossen ist. Daher blieb die Funktion von Shp2 bei der Migration der Muskelvorläuferzellen gewährleistet.

4.2 Der Einfluss der Proliferation myogener Zellen auf das postnatale Muskelwachstum

Das postnatale Muskelwachstum wird durch die Satellitenzellen und die aus diesen hervorgehenden Myoblasten getragen. Während der Differenzierung beginnt die anfangs Pax7-positive Satellitenzelle mit der Expression myogener Differenzierungsmarker, zunächst Myf5 und MyoD, später Myogenin. Während dieses Prozesses proliferieren die aus der Satellitenzelle entstanden Myoblasten ständig (siehe Abb.18B/D). Auf diese Weise kann eine einzige Satellitenzelle eine Vielzahl von Nachkommen produzieren, die durch Fusion mit den Muskelfasern zum Muskelwachstum beitragen (Buckingham, 2006; Zammit, 2008). In coShp2 Mutanten ist diese Proliferation massiv gestört. Nicht nur die Proliferation der Satellitenzellen, die sondern auch aller untersuchten Myoblastenpopulationen war beeinträchtigt (siehe Abb.19). Daraus resultiert, dass Shp2-defiziente Satellitenzellen wesentlich weniger fusionskompetente Nachkommen produzieren als Wildtyp Satellitenzellen. Diese Tatsache ist der Hauptgrund für die stark reduzierte Muskelmasse und die im Vergleich zu Kontrollen kleineren Muskelfasern von coShp2 Mutanten zwei Wochen nach der Geburt (vgl. dazu Kapitel 3.5).

4.3 Der progressive Rückgang myogener Zellpopulationen

Ein weiterer Aspekt des coShp2 Phänotyps ist die kontinuierliche Reduktion der Satellitenzellen mit zunehmendem Alter der Tiere (siehe Abb.13A). Als Ursache ist anzunehmen, dass die Satellitenzellen trotz gestörter Proliferation differenzieren, und auf diese Weise die Population aufgebraucht/erschöpft wird. Im Wildtyp sorgt die anhaltende Proliferation der Satellitenzellen während der juvenilen Phase der Entwicklung dafür, dass trotz Differenzierung einiger Zellen die Population aufrechterhalten wird (Zammit, 2008). Durch die gestörte Proliferation in coShp2 Mutanten geht dieses verloren. die Gleichgewicht so dass Satellitenzellpopulation mit zunehmendem Alter aufgebraucht wird. Aus der verminderten Anzahl der Satellitenzellen ergibt sich die ebenfalls mit zunehmendem Alter sinkende Anzahl der Myf5- und Myogenin-positiven Myoblasten. Da kontinuierlich weniger Satellitenzellen vorhanden sind, welche mit der Differenzierung beginnen könnten, entstehen dementsprechend weniger Myoblasten.

Dies erklärt jedoch nicht, warum die Proliferation der myogenen Zellen mit zunehmendem Alter der Tiere zurückgeht. Eine mögliche Erklärung ist, dass das Shp2-abhängige Signal, welches die Proliferation myogener Zellen reguliert, während der postnatalen Entwicklung immer wichtiger wird.

4.4 Die Aktivierung des Ras/Erk- und Akt/PI3K-Siganlwegs

Durch proteinbiochemische Analysen konnte keine Beeinträchtigung der Aktivierung des Ras/Erk-Signalwegs während der postnatalen Muskelentwicklung festgestellt werden. Für die biochemische Analyse setzte ich aus technischen Gründen Gesamtlysat aus Muskelgewebe ein. Darin stammt nur ein kleiner Teil des Proteins aus Vorläuferzellen und Myoblasten. Daher könnten Unterschiede in der Phosphorylierung von Erk in den Vorläuferzellen und Myoblasten überdeckt worden sein. Um einen möglichen Effekt auf den Ras/Erk-Signalweg in der Muskulatur von coShp2 Mutanten zu untersuchen, war ein "Rettungsexperiment" geplant. Zu diesem Zweck wurde ein transgenes Allel, das nach Cre-vermittelter Rekombination gewebespezifisch eine konstitutiv aktivierte Form der MEK1 Kinase exprimiert, in die coShp2 Mutante gekreuzt. Die so entstandenen coShp2/Mek Mutanten waren jedoch nicht lebensfähig. Aus diesem Grund können zum jetzigen Zeitpunkt keine weiteren Aussagen über den Einfluss der Shp2 Mutation auf die Aktivierung des Ras/Erk-Signalwegs in der Skelettmuskulatur während der fötalen und postnatalen Entwicklung getroffen werden.

Eine zweite mögliche Ursache für die beeinträchtigte Proliferation der Myoblasten ist eine verringerte Aktivität des PI3K/Akt-Signalwegs. In proteinbiochemischen Analysen konnte gezeigt werden, dass die Aktivität dieses Signalwegs in Lysaten der Muskulatur von coShp2 Mutanten gehemmt Bekräftigt wird die Hypothese durch vorläufige Ergebnisse aus war. Rettungsexperimenten. Zu diesem Zweck wurde ein Stamm, der nach Crevermittelter Rekombination eine konstitutiv aktivierte Form der katalytischen Untereinheit P110 α von Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) exprimiert, in die coShp2 Mutante gekreuzt. Diese Mäuse (im Weiteren coShp2/P110* genannt), wie auch Mäuse, die nur konstitutiv aktivierte P110* in Muskelzellen exprimieren (im weiteren coP110* genannt), zeigten zu Beginn der postnatalen Entwicklung (P2) eine erhöhte Anzahl von Satellitenzellen in der hypaxialen Muskulatur. Ebenso war die Proliferationsrate der Satellitenzellen in coShp2/P110* Mäusen und in coP110* Mäusen zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung wesentlich erhöht (Kontrolle = 17%; coP110^{*} = 70%; $coShp2/P110^* = 61\%$). Andere Zeitpunkte der Entwicklung sowie eine aussagekräftige Anzahl von Mäusen konnten bisher noch nicht untersucht werden. Meine vorläufigen Ergebnisse weisen demnach darauf hin, dass die konstitutive Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs einen positiven Effekt auf die Proliferation der Satellitenzellen hat, der den Verlust von Shp2 überwindet.

Dies deutet darauf hin, dass Shp2 eine Funktion in der PI3-Kinase Signalkette ausübt, die *upstream* von P110 α liegt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Reduktion der Myoblasten- und Satellitenzellpopulation in der coShp2 Mutante auf eine beeinträchtigte Proliferation dieser Zellen zurückzuführen ist, und dass der Grund dafür vermutlich in der unzureichenden Aktivierung des PI3K/Akt–Signalwegs liegt.

4.5 Akt/PI3K vs. Ras/Erk

Meine Ergebnisse implizieren die Regulation des Akt/PI3K-Signalwegs durch Shp2. Auch in anderen Zelltypen ist wurde dieser Zusammenhang bereits beobachtet (Ivins Zito et al., 2004; Zhang et al., 2004). Die Regulation des Akt/PI3K-Signalwegs ist jedoch nicht die typische Funktion von Shp2 in der Entwicklung. Eine Mutation von Shp2 geht in den meisten Zelltypen mit einer gestörten anhaltenden Aktivierung des Ras/Erk-Signalwegs einher (Feng, 1999; Grossmann et al., 2009; O'Reilly et al., 2000). Ein Beispiel bei dem der Einfluss von Shp2 auf die Aktivierung des Ras/Erk-Signalwegs umfassend untersucht wurde, ist die Entwicklung der Trophoblasten-Stammzellen. Ohne Shp2 sind diese Stammzellen nicht in der Lage, das anti-apoptotische Protein Bim1 zu exprimieren, was zur Apoptose der Zellen führt (Yang et al., 2006). Die Expression von Bim1 wird durch ein FGF4/FGF-Rezeptor induziertes Signal gewährleistet, das durch Shp2 im Zytoplasma weitergeleitet wird. Dies führt zur Aktivierung einer Src-Kinase, die für eine andauernde Aktivität des Ras/Erk-Signalwegs in Trophoblasten-Stammzellen notwendig ist (Yang et al., 2006).

Ein weiteres umfassend untersuchtes Beispiel für die Rolle von Shp2 in der Aktivierung des Ras/Erk-Signalweg ist die Entwicklung der Schwann´schen Zellen. Der Verlust des Shp2 Proteins führt in Neuralleistenzellen, den Vorläuferzellen unter anderem der Schwann´schen Zellen, zu einer inhibierten Proliferation und Migration. Ein Fehlen von Shp2 während der terminalen Differenzierung von Schwann´schen Zellen führt zu einer Hypomyelinisierung (Grossmann et al., 2009). Der Grund dafür ist eine gestörte Weiterleitung von Nrg1 Signalen, die durch ErbB-Rezeptoren vermittelt werden. In wildtyp Zellen führt dies zu einer anhaltenden Aktivierung des Ras/Erk-Signalwegs. In Shp2 mutanten Schwann´schen Zellen führt die Bindung von Nrg1 an die Rezeptoren nur zu einer kurzen, und nicht zu einer andauernden Aktivierung des Ras/Erk-Signalwegs. Die Aktivität des Akt/PI3K-Signalwegs ist durch den Verlust von Shp2 jedoch nicht beeinträchtigt (Grossmann et al., 2009).

Sowohl in der Entwicklung der Neuralleistenzellen als auch bei den Satellitenzellen ist Shp2 für die Aufrechterhaltung der Proliferation notwendig. Jedoch wird diese im Fall der Neuralleistenzellen über den Ras/Erk-Signalweg reguliert, wohingegen keine Beeinträchtigung dieses Signalwegs in Satellitenzellen nachgewiesen werden konnte. Die vorliegenden Ergebnisse deuten dagegen auf eine Funktion des Akt/PI3K-Signalwegs bei der Regulation der Satellitenzellenproliferation hin. Interessanterweise ist die Funktion von Shp2 auf die Aktivierung von Ras/Erk also abhängig vom Zelltyp.

4.6 Späte Ausbildung des coShp2 Phänotyps

Ein wesentlicher Aspekt des Phänotyps in der coShp2 Mutante ist, dass dieser erst spät in der Muskelentwicklung auftritt. Obwohl ab dem Zeitpunkt E14 kein Shp2 Protein mehr nachgewiesen werden kann, sind die ersten Veränderungen in der Muskelentwicklung der coShp2 Mutanten perinatal (d.h. E18-P0) zu beobachten. Dies gilt auch für die epaxiale Muskulatur des Rückens, wo Pax7^{Cre} früher als in der hypaxialen Muskulatur exprimiert wird und das Shp2^{flox} Allel daher auch früher rekombiniert werden sollte. Trotzdem wurde ein Phänotyp erst in der postnatalen Phase der epaxiale Muskelentwicklung beobachtet. Der Funktionsverlust von Shp2 wird folglich erst während der postnatalen Phase der Entwicklung von epaxialer und hypaxialer Muskulatur durch einen Phänotyp manifest.

Dass der coShp2 Phänotyp erst in einer späten Phase der Entwicklung

auftrat, weist darauf hin, dass ein prinzipieller Unterschied in der Kontrolle der Proliferation myogener Zellen in verschiedenen Stadien der Muskelentwicklung besteht. In der sich entwickelnden fötalen und postnatalen Muskulatur existiert ein Gemisch von Zellen: proliferierende Vorläuferzellen, differenzierenden Myoblasten, und Myotuben. Ein Teil der Vorläuferzellen bleibt in einem undifferenzierten Zustand über einen langen Zeitraum erhalten und bildet die zelluläre Reserve, die das weitere Muskelwachstum ermöglicht (Buckingham, 2006). Der letzte Schritt in der Entwicklung der Muskulatur ist die Entstehung der Basalmembran, welche die Muskelfasern umschließt. Nachdem diese Membran gebildet wird, nehmen myogene Vorläuferzellen eine Satellitenzellposition ein, d.h. sie werden zwischen der Basalmembran und der zytoplasmatischen Membran der Muskelfasern positioniert. Die ersten Satellitenzellen werden zum Zeitpunkt E15.5 unter der Basalmembran beobachtet, und ihre Anzahl steigt bis zur Geburt. Somit ist dies ein Aspekt der Muskelentwicklung, der zeitlich in etwa mit der Manifestation des Phänotyps in der coShp2 Mutante korreliert. Es wäre also möglich, dass myogene Vorläuferzellen, die in einer Satellitenzellposition unter der Basalmembran liegen, andere Wachstumssignale empfangen als Zellen, die außerhalb der Basalmembran im interstitiellen Raum lokalisiert sind.

4.7 Satellitenzellen und ihre Nische

Durch die Positionierung der Satellitenzellen unter die Basalmembran ändern sich ihre adhäsiven Kontakte. Sie können nun gleichzeitig über Integrine an die Basalmembran und über M-Cadherin an die Muskelfaser binden. Integrine und Cadherine haben aber neben ihrer adhäsiven Funktion auch eine Funktion als Signalmolekül. Daher ist anzunehmen, dass sich durch die Positionierung der Satellitenzellen unter die Basalmembran neben den adhäsiven Kontakten auch die Aktivität von Signalwegen ändert. *In vitro* Studien von M-Cadherin weisen auf eine Funktion in der Fusion der Myoblasten hin (Charrasse et al., 2007). Dass die Null-Mutante keine Beeinträchtigung der Muskelentwicklung zeigt, lässt auf eine redundante oder kompensatorische Funktion anderer Cadherine schließen (Hollnagel et al., 2002; Krauss, 2010). Durch Integrine vermittelte Signale sind in vielen Zelltypen für die Kontrolle der Proliferation notwendig (Giancotti and Ruoslahti, 1999). In der Muskelentwicklung ist eine Funktion der Integrin aktivierten Signalwege sowohl bei der Fusion von Myoblasten als auch bei der Regulation des Ruhezustands der Satellitenzellen beschrieben (Burkin and Kaufman, 1999; Rosen et al., 1992).

4.8 Mögliche Shp2 regulierte Signalwege in der Muskelentwicklung

Eine Funktion von Shp2 ist bei der Signalweiterleitung von Rezeptor-Tyrosinkinasen, Interleukin-Rezeptoren und Integrine beschrieben (Neel et al., 2003). Zu diesen Rezeptoren gehören der c-Met-, FGF- und ErbB-Rezeptoren, alle drei Rezeptor-Tyrosinkinasen, sowie Interleukin-Rezeptoren und Integrine, die während der Entwicklung der Skelettmuskulatur exprimiert sind (Birchmeier, 2009; Buckingham, 2006; Horsley et al., 2003; Vasyutina et al., 2005).

FGF Signale haben einen Einfluss auf die Differenzierung myogener Zellen und der FGF4-Rezeptor wird in sich teilenden Myoblasten, aber nicht in Muskelfasern exprimiert (Buckingham, 2006; Lagha et al., 2008; Marcelle et al., 1995). Jedoch ist die Funktion des FGF4-Rezeptors anscheinend redundant, da die Null-Mutante keinen Muskelphänotyp zeigt, und auch weitere FGF-Rezeptoren während der Muskelentwicklung exprimiert werden (Vasyutina et al., 2005; Weinstein et al., 1998). FGF-Rezeptoren sind demnach Kandidaten für Aktivatoren von Shp2 in der Muskelentwicklung.

Nrg1 Signale, die über ErbB-Rezeptoren vermittelt werden, werden für die Bildung der Muskelspindeln benötigt (Hippenmeyer et al., 2002). Der Crevermittelte Verlust der Expression von ErbB3 und ErbB4 in Muskelvorläuferzellen, der von Katharina Paulick in unserem Labor untersucht wurde, führte zu keiner Veränderung in der Anzahl der Satellitenzellen.

71
Interessanterweise ist die Bildung von Muskelspindeln im Shp2 mutanten Muskel unverändert. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Reduktion der Anzahl der Satellitenzellen in der coShp2 Mutante nicht auf einer beeinträchtigten Signalweiterleitung des ErbB3- und ErbB4-Rezeptors beruht, und dass das ErbB Signal, das die Spindel induziert, nicht über Shp2 vermittelt wird.

Eine Funktion von Interleukinen ist vornehmlich in der Differenzierung verschiedener Zelltypen beschrieben. Während der Muskelentwicklung wird IL-4 von den Muskelfasern exprimiert und ist für die Bildung von sekundären Muskelfasern notwendig. Postuliert wurde für IL-4 eine chemoattraktive Funktion, d.h. ein Anlocken von Myoblasten an bereits bestehende Muskelfasern, die dann fusionieren können (Horsley et al., 2003).

Über den c-Met-Rezeptor vermittelte Signale sind notwendig für die Delamination der Muskelvorläuferzellen vom Somiten und die Wanderung dieser Zellen in die Extremitätenanlagen (Bladt et al., 1995; Brand-Saberi et al., 1996; Dietrich et al., 1999). Des Weitern wird eine Funktion des c-Met-Rezeptors bei der Aktivierung der postnatalen Satellitenzellen vermutet (Tatsumi et al., 1998).

Dominique Bröhl unersuchte in unserer Arbeitsgruppe den Pax7^{Cre}vermittelten muskelspezifischen Verlust des c-Met-Rezeptors und gp130. rezeptorassoziiertes Glykoprotein, gp130 ist ein welches für die Signalweiterleitung von Interleukinen der IL-6-Familie notwendig ist. In beiden Fällen kam es zu einer leichten Reduktion der Anzahl der Satellitenzellen, die jedoch wesentlich schwächer war als die Reduktion, die in der coShp2 Mutante beobachtet wurde. Der Einfluss auf die Anzahl der Satellitenzellen wurde auch durch eine c-Met/gp130 Doppel-Mutante nicht erhöht. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die beeinträchtigte Proliferation der Satellitenzellen in der coShp2 Mutante auf eine Störung in der Weiterleitung von Signalen des c-Met-Rezeptors oder von Interleukinen der IL-6-Familie zurückzuführen ist.

Zell-Zell oder Zell-Matrix Kontakte über Integrine sind für die Proliferation vieler Zelltypen essentiell (Giancotti and Ruoslahti, 1999). Integrine werden auch während der Entwicklung myogener Zellen und in Satellitenzellen exprimiert und üben dabei verschiedene Funktionen aus (Burkin and Kaufman, 1999). Die Funktion bei der Proliferationskontrolle in vielen Zelltypen und der Zeitpunkt an dem sich der Phänotyp in der coShp2 Mutante manifestiert (siehe Kapitel 4.6) lassen die Hypothese zu, dass die beeinträchtigte Proliferation in der coShp2 Mutante auf eine gestörte Integrin-Signalkaskade zurückzuführen ist.

4.9 Die Rolle von Shp2 im Integrin-Signalweg

Anders als Rezeptor-Tyrosinkinasen haben Integrine keine Kinasedomäne in ihrer intrazellulären Seguenz. Sie können jedoch Tyrosinkinasen ohne eine Transmembrandomäne wie z.B. Kinasen der Src Familie binden und diese aktivieren (Giancotti and Ruoslahti, 1999; Schwartz, 2001). Wie in durch Rezeptor-Tyrosinkinasen aktivierten Signalwegen ist eine Funktion von Shp2 in der durch Integrine aktivierten Signalkaskade beschrieben. Auf Fibronektin Komponenten der extrazellulären und weiteren Matrix wachsende Fibroblasten, die kein Shp2 exprimieren, zeigen Defekte bei der Migration. Des Weiteren zeigen diese Fibroblasten eine Beeinträchtigung des Src-Signalwegs nach Integrin-Aktivierung (Oh et al., 1999). Eine Funktion von Shp2 im Src-Signalweg ist die Dephosphorylierung des Csk-Regulators PAK, woraufhin Csk seine inhibitorische Funktion auf Src verliert (Zhang et al., 2004). In Epithelzellen agiert der Shp2/Gab1-Komplex als Adapter zwischen dem IGF-1-Rezeptor und β1c-Integrin, wodurch die Aktivierung von IGF-1R nach Bindung des Liganden verhindert wird (Goel et al., 2004). Außerdem kann Shp2 direkt an die Tyrosine Y1440 und Y1494 der β Untereinheit von α6β4-Integrin binden und die Src-ähnliche Kinase Fyn aktivieren (Yang et al., 2010). Es ist auch bekannt, dass Integrine den PI3K/Akt-Signalweg aktivieren können. In vitro aktiviert die Bindung von Fibronektin an Integrine den PI3K/Akt-Signalweg, wobei eine Funktion des Adaptermoleküls ILK angenommen wird (Delcommenne et al., 1998; Hannigan et al., 1996).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die beeinträchtigte Proliferation myogener Zellen in der coShp2 Mutante zeitlich in etwa mit der Lokalisierung der Satellitenzellen unter die Basalmembran korreliert. Dies geht mit einer verstärkten Bindung von Integrinen der Satellitenzellen an Laminin in der Basalmembran einher. Eine Funktion von Shp2 in der Signalaktivierung durch Integrine ist für verschiedene Zelltypen beschrieben. Eine mögliche Hypothese ist daher, dass die inhibierte Proliferation der myogenen Zellen in der coShp2 Mutante auf der Beeinträchtigung eines Integrin-abhängigen Signalwegs beruht, der über PI3K/Akt vermittelt wird. Es ist jedoch auch möglich, dass andere noch nicht betrachtete Wachstumsfaktoren durch die Positionierung der Satellitenzellen unter der Basalmembran relevant werden und Shp2-abhängig einen Signalweg in der Zelle aktivieren können. Nach der Veränderung der Positionierung verringerte sich die Distanz zwischen Satellitenzelle und Muskelfaser. Ein Faktor, der von der Muskelfaser generiert wird, könnte dadurch dominanter werden als Faktoren, die von Zelltypen im interstitiellen Raum sekretiert werden.

5 Literatur

Adachi, M., Sekiya, M., Miyachi, T., Matsuno, K., Hinoda, Y., Imai, K., and Yachi, A. (1992). Molecular cloning of a novel protein-tyrosine phosphatase SH-PTP3 with sequence similarity to the src-homology region 2. FEBS Lett *314*, 335-339.

Agazie, Y.M., and Hayman, M.J. (2003). Molecular mechanism for a role of SHP2 in epidermal growth factor receptor signaling. Molecular and cellular biology *23*, 7875-7886.

Ahmad, S., Banville, D., Zhao, Z., Fischer, E.H., and Shen, S.H. (1993). A widely expressed human protein-tyrosine phosphatase containing src homology 2 domains. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *90*, 2197-2201.

Ali, S., Nouhi, Z., Chughtai, N., and Ali, S. (2003). SHP-2 regulates SOCS-1mediated Janus kinase-2 ubiquitination/degradation downstream of the prolactin receptor. J Biol Chem *278*, 52021-52031.

Amthor, H., Christ, B., and Patel, K. (1999). A molecular mechanism enabling continuous embryonic muscle growth - a balance between proliferation and differentiation. Development *126*, 1041-1053.

Amthor, H., Christ, B., Weil, M., and Patel, K. (1998). The importance of timing differentiation during limb muscle development. Curr Biol *8*, 642-652.

Amthor, H., Otto, A., Macharia, R., McKinnell, I., and Patel, K. (2006). Myostatin imposes reversible quiescence on embryonic muscle precursors. Dev Dyn *235*, 672-680.

Aoyama, H., and Asamoto, K. (1988). Determination of somite cells: independence of cell differentiation and morphogenesis. Development *104*, 15-28.

Araki, T., Nawa, H., and Neel, B.G. (2003). Tyrosyl phosphorylation of Shp2 is required for normal ERK activation in response to some, but not all, growth factors. J Biol Chem *278*, 41677-41684.

Bard-Chapeau, E.A., Yuan, J., Droin, N., Long, S., Zhang, E.E., Nguyen, T.V., and Feng, G.S. (2006). Concerted functions of Gab1 and Shp2 in liver regeneration and hepatoprotection. Molecular and cellular biology *26*, 4664-4674.

Barford, D., and Neel, B.G. (1998). Revealing mechanisms for SH2 domain mediated regulation of the protein tyrosine phosphatase SHP-2. Structure *6*, 249-254.

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.

Bennett, A.M., Tang, T.L., Sugimoto, S., Walsh, C.T., and Neel, B.G. (1994). Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 couples platelet-derived growth factor receptor beta to Ras. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *91*, 7335-7339.

Berchtold, S., Volarevic, S., Moriggl, R., Mercep, M., and Groner, B. (1998). Dominant negative variants of the SHP-2 tyrosine phosphatase inhibit prolactin activation of Jak2 (janus kinase 2) and induction of Stat5 (signal transducer and activator of transcription 5)-dependent transcription. Mol Endocrinol *12*, 556-567.

Birchmeier, C. (2009). ErbB receptors and the development of the nervous system. Experimental cell research *315*, 611-618.

Bischoff, R., and Heintz, C. (1994). Enhancement of skeletal muscle regeneration. Dev Dyn *201*, 41-54.

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*, 768-771.

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. Developmental biology *179*, 303-308.

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*, 701-709.

Brohmann, H., Jagla, K., and Birchmeier, C. (2000). The role of Lbx1 in migration of muscle precursor cells. Development *127*, 437-445.

Buckingham, M. (2006). Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates. Curr Opin Genet Dev *16*, 525-532.

Buckingham, M., Bajard, L., Chang, T., Daubas, P., Hadchouel, J., Meilhac, S., Montarras, D., Rocancourt, D., and Relaix, F. (2003). The formation of skeletal muscle: from somite to limb. J Anat *202*, 59-68.

Burkin, D.J., and Kaufman, S.J. (1999). The alpha7beta1 integrin in muscle development and disease. Cell and tissue research *296*, 183-190.

Charrasse, S., Comunale, F., Fortier, M., Portales-Casamar, E., Debant, A., and Gauthier-Rouviere, C. (2007). M-cadherin activates Rac1 GTPase

through the Rho-GEF trio during myoblast fusion. Molecular biology of the cell *18*, 1734-1743.

Chen, Y., Wen, R., Yang, S., Schuman, J., Zhang, E.E., Yi, T., Feng, G.S., and Wang, D. (2003). Identification of Shp-2 as a Stat5A phosphatase. J Biol Chem *278*, 16520-16527.

Chevallier, A., Kieny, M., and Mauger, A. (1977). Limb-somite relationship: origin of the limb musculature. J Embryol Exp Morphol *41*, 245-258.

Christ, B., Brand-Saberi, B., Grim, M., and Wilting, J. (1992). Local signalling in dermomyotomal cell type specification. Anat Embryol (Berl) *186*, 505-510.

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*, 171-186.

Christ, B., and Ordahl, C.P. (1995). Early stages of chick somite development. Anat Embryol (Berl) *191*, 381-396.

Chughtai, N., Schimchowitsch, S., Lebrun, J.J., and Ali, S. (2002). Prolactin induces SHP-2 association with Stat5, nuclear translocation, and binding to the beta-casein gene promoter in mammary cells. J Biol Chem *277*, 31107-31114.

Cleghon, V., Feldmann, P., Ghiglione, C., Copeland, T.D., Perrimon, N., Hughes, D.A., and Morrison, D.K. (1998). Opposing actions of CSW and RasGAP modulate the strength of Torso RTK signaling in the Drosophila terminal pathway. Molecular cell *2*, 719-727.

Collins, C.A., Zammit, P.S., Ruiz, A.P., Morgan, J.E., and Partridge, T.A. (2007). A population of myogenic stem cells that survives skeletal muscle aging. Stem cells (Dayton, Ohio) *25*, 885-894.

Cunnick, J.M., Meng, S., Ren, Y., Desponts, C., Wang, H.G., Djeu, J.Y., and Wu, J. (2002). Regulation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway by SHP2. J Biol Chem *277*, 9498-9504.

Davis, R.L., Weintraub, H., and Lassar, A.B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. Cell *51*, 987-1000.

Decary, S., Hamida, C.B., Mouly, V., Barbet, J.P., Hentati, F., and Butler-Browne, G.S. (2000). Shorter telomeres in dystrophic muscle consistent with extensive regeneration in young children. Neuromuscul Disord *10*, 113-120.

Delcommenne, M., Tan, C., Gray, V., Rue, L., Woodgett, J., and Dedhar, S. (1998). Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of

America *95*, 11211-11216.

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., Abou-Rebyeh, F., Brohmann, H., Bladt, 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*, 1621-1629.

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*, 628-640.

Feng, G.S. (1999). Shp-2 tyrosine phosphatase: signaling one cell or many. Experimental cell research *253*, 47-54.

Fornaro, M., Burch, P.M., Yang, W., Zhang, L., Hamilton, C.E., Kim, J.H., Neel, B.G., and Bennett, A.M. (2006). SHP-2 activates signaling of the nuclear factor of activated T cells to promote skeletal muscle growth. The Journal of cell biology *175*, 87-97.

Gavrieli, Y., Sherman, Y., and Ben-Sasson, S.A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. The Journal of cell biology *119*, 493-501.

Giancotti, F.G., and Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. Science (New York, NY *285*, 1028-1032.

Goel, H.L., Fornaro, M., Moro, L., Teider, N., Rhim, J.S., King, M., and Languino, L.R. (2004). Selective modulation of type 1 insulin-like growth factor receptor signaling and functions by beta1 integrins. The Journal of cell biology *166*, 407-418.

Gopinath, S.D., and Rando, T.A. (2008). Stem cell review series: aging of the skeletal muscle stem cell niche. Aging cell *7*, 590-598.

Gros, J., Manceau, M., Thome, V., and Marcelle, C. (2005). A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. Nature *435*, 954-958.

Grossmann, K.S., Rosario, M., Birchmeier, C., and Birchmeier, W. (2010). The tyrosine phosphatase Shp2 in development and cancer. Adv Cancer Res *106*, 53-89.

Grossmann, K.S., Wende, H., Paul, F.E., Cheret, C., Garratt, A.N., Zurborg, S., Feinberg, K., Besser, D., Schulz, H., Peles, E., *et al.* (2009). The tyrosine phosphatase Shp2 (PTPN11) directs Neuregulin-1/ErbB signaling throughout

Schwann cell development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 16704-16709.

Hadari, Y.R., Kouhara, H., Lax, I., and Schlessinger, J. (1998). Binding of Shp2 tyrosine phosphatase to FRS2 is essential for fibroblast growth factor-induced PC12 cell differentiation. Molecular and cellular biology *18*, 3966-3973.

Hanafusa, H., Torii, S., Yasunaga, T., and Nishida, E. (2002). Sprouty1 and Sprouty2 provide a control mechanism for the Ras/MAPK signalling pathway. Nat Cell Biol *4*, 850-858.

Hannigan, G.E., Leung-Hagesteijn, C., Fitz-Gibbon, L., Coppolino, M.G., Radeva, G., Filmus, J., Bell, J.C., and Dedhar, S. (1996). Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. Nature *379*, 91-96.

Herbst, R., Carroll, P.M., Allard, J.D., Schilling, J., Raabe, T., and Simon, M.A. (1996). Daughter of sevenless is a substrate of the phosphotyrosine phosphatase Corkscrew and functions during sevenless signaling. Cell *85*, 899-909.

Hippenmeyer, S., Shneider, N.A., Birchmeier, C., Burden, S.J., Jessell, T.M., and Arber, S. (2002). A role for neuregulin1 signaling in muscle spindle differentiation. Neuron *36*, 1035-1049.

Hof, P., Pluskey, S., Dhe-Paganon, S., Eck, M.J., and Shoelson, S.E. (1998). Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2. Cell *92*, 441-450.

Hollnagel, A., Grund, C., Franke, W.W., and Arnold, H.H. (2002). The cell adhesion molecule M-cadherin is not essential for muscle development and regeneration. Molecular and cellular biology *22*, 4760-4770.

Horsley, V., Jansen, K.M., Mills, S.T., and Pavlath, G.K. (2003). IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth. Cell *113*, 483-494.

lvins Zito, C., Kontaridis, M.I., Fornaro, M., Feng, G.S., and Bennett, A.M. (2004). SHP-2 regulates the phosphatidylinositide 3'-kinase/Akt pathway and suppresses caspase 3-mediated apoptosis. J Cell Physiol *199*, 227-236.

Jarvis, L.A., Toering, S.J., Simon, M.A., Krasnow, M.A., and Smith-Bolton, R.K. (2006). Sprouty proteins are in vivo targets of Corkscrew/SHP-2 tyrosine phosphatases. Development *133*, 1133-1142.

Kablar, B., Krastel, K., Ying, C., Tapscott, S.J., Goldhamer, D.J., and Rudnicki, M.A. (1999). Myogenic determination occurs independently in somites and limb buds. Developmental biology *206*, 219-231.

Kahane, N., Cinnamon, Y., and Kalcheim, C. (1998a). The cellular mechanism by which the dermomyotome contributes to the second wave of myotome development. Development *125*, 4259-4271.

Kahane, N., Cinnamon, Y., and Kalcheim, C. (1998b). The origin and fate of pioneer myotomal cells in the avian embryo. Mech Dev *74*, 59-73.

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*, 466-471.

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*, 1426-1431.

Ke, Y., Lesperance, J., Zhang, E.E., Bard-Chapeau, E.A., Oshima, R.G., Muller, W.J., and Feng, G.S. (2006). Conditional deletion of Shp2 in the mammary gland leads to impaired lobulo-alveolar outgrowth and attenuated Stat5 activation. J Biol Chem *281*, 34374-34380.

Keller, C., Hansen, M.S., Coffin, C.M., and Capecchi, M.R. (2004). Pax3:Fkhr interferes with embryonic Pax3 and Pax7 function: implications for alveolar rhabdomyosarcoma cell of origin. Genes Dev *18*, 2608-2613.

Kontaridis, M.I., Eminaga, S., Fornaro, M., Zito, C.I., Sordella, R., Settleman, J., and Bennett, A.M. (2004). SHP-2 positively regulates myogenesis by coupling to the Rho GTPase signaling pathway. Molecular and cellular biology *24*, 5340-5352.

Kontaridis, M.I., Yang, W., Bence, K.K., Cullen, D., Wang, B., Bodyak, N., Ke, Q., Hinek, A., Kang, P.M., Liao, R., *et al.* (2008). Deletion of Ptpn11 (Shp2) in cardiomyocytes causes dilated cardiomyopathy via effects on the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase and RhoA signaling pathways. Circulation *117*, 1423-1435.

Koyama, T., Nakaoka, Y., Fujio, Y., Hirota, H., Nishida, K., Sugiyama, S., Okamoto, K., Yamauchi-Takihara, K., Yoshimura, M., Mochizuki, S., *et al.* (2008). Interaction of scaffolding adaptor protein Gab1 with tyrosine phosphatase SHP2 negatively regulates IGF-I-dependent myogenic differentiation via the ERK1/2 signaling pathway. J Biol Chem *283*, 24234-24244.

Krauss, R.S. (2010). Regulation of promyogenic signal transduction by cellcell contact and adhesion. Experimental cell research *316*, 3042-3049.

Krenz, M., Gulick, J., Osinska, H.E., Colbert, M.C., Molkentin, J.D., and Robbins, J. (2008). Role of ERK1/2 signaling in congenital valve

malformations in Noonan syndrome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *105*, 18930-18935.

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.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature *227*, 680-685.

Lagha, M., Kormish, J.D., Rocancourt, D., Manceau, M., Epstein, J.A., Zaret, K.S., Relaix, F., and Buckingham, M.E. (2008). Pax3 regulation of FGF signaling affects the progression of embryonic progenitor cells into the myogenic program. Genes Dev *22*, 1828-1837.

Le Grand, F., and Rudnicki, M.A. (2007). Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. Curr Opin Cell Biol *19*, 628-633.

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. Developmental biology *172*, 100-114.

Maroun, C.R., Naujokas, M.A., Holgado-Madruga, M., Wong, A.J., and Park, M. (2000). The tyrosine phosphatase SHP-2 is required for sustained activation of extracellular signal-regulated kinase and epithelial morphogenesis downstream from the met receptor tyrosine kinase. Molecular and cellular biology *20*, 8513-8525.

Mason, J.M., Morrison, D.J., Basson, M.A., and Licht, J.D. (2006). Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling. Trends in cell biology *16*, 45-54.

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*, 1438-1452.

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*, 723-732.

Montagner, A., Yart, A., Dance, M., Perret, B., Salles, J.P., and Raynal, P. (2005). A novel role for Gab1 and SHP2 in epidermal growth factor-induced Ras activation. J Biol Chem *280*, 5350-5360.

Nakamura, T., Colbert, M., Krenz, M., Molkentin, J.D., Hahn, H.S., Dorn, G.W., 2nd, and Robbins, J. (2007). Mediating ERK 1/2 signaling rescues congenital heart defects in a mouse model of Noonan syndrome. The Journal of clinical investigation *117*, 2123-2132.

Nakamura, T., Gulick, J., Colbert, M.C., and Robbins, J. (2009a). Protein tyrosine phosphatase activity in the neural crest is essential for normal heart and skull development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 11270-11275.

Nakamura, T., Gulick, J., Pratt, R., and Robbins, J. (2009b). Noonan syndrome is associated with enhanced pERK activity, the repression of which can prevent craniofacial malformations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 15436-15441.

Neel, B.G., Gu, H., and Pao, L. (2003). The 'Shp'ing news: SH2 domaincontaining tyrosine phosphatases in cell signaling. Trends Biochem Sci *28*, 284-293.

Newbern, J., Zhong, J., Wickramasinghe, R.S., Li, X., Wu, Y., Samuels, I., Cherosky, N., Karlo, J.C., O'Loughlin, B., Wikenheiser, J., *et al.* (2008). Mouse and human phenotypes indicate a critical conserved role for ERK2 signaling in neural crest development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *105*, 17115-17120.

Nguyen, T.V., Ke, Y., Zhang, E.E., and Feng, G.S. (2006). Conditional deletion of Shp2 tyrosine phosphatase in thymocytes suppresses both pre-TCR and TCR signals. J Immunol *177*, 5990-5996.

O'Reilly, A.M., Pluskey, S., Shoelson, S.E., and Neel, B.G. (2000). Activated mutants of SHP-2 preferentially induce elongation of Xenopus animal caps. Molecular and cellular biology *20*, 299-311.

Oh, E.S., Gu, H., Saxton, T.M., Timms, J.F., Hausdorff, S., Frevert, E.U., Kahn, B.B., Pawson, T., Neel, B.G., and Thomas, S.M. (1999). Regulation of early events in integrin signaling by protein tyrosine phosphatase SHP-2. Molecular and cellular biology *19*, 3205-3215.

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. Developmental biology *275*, 375-388.

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.

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*, 3430-3439.

Peng, Z.Y., and Cartwright, C.A. (1995). Regulation of the Src tyrosine kinase and Syp tyrosine phosphatase by their cellular association. Oncogene *11*, 1955-1962.

Perkins, L.A., Larsen, I., and Perrimon, N. (1992). corkscrew encodes a putative protein tyrosine phosphatase that functions to transduce the terminal signal from the receptor tyrosine kinase torso. Cell *70*, 225-236.

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*, 461-471.

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*, 2609-2617.

Princen, F., Bard, E., Sheikh, F., Zhang, S.S., Wang, J., Zago, W.M., Wu, D., Trelles, R.D., Bailly-Maitre, B., Kahn, C.R., *et al.* (2009). Deletion of Shp2 tyrosine phosphatase in muscle leads to dilated cardiomyopathy, insulin resistance, and premature death. Molecular and cellular biology *29*, 378-388.

Qu, C.K. (2002). Role of the SHP-2 tyrosine phosphatase in cytokine-induced signaling and cellular response. Biochim Biophys Acta *1592*, 297-301.

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. The Journal of cell biology *172*, 91-102.

Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A., and Buckingham, M. (2005). A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. Nature *435*, 948-953.

Ren, Y., Meng, S., Mei, L., Zhao, Z.J., Jove, R., and Wu, J. (2004). Roles of Gab1 and SHP2 in paxillin tyrosine dephosphorylation and Src activation in response to epidermal growth factor. J Biol Chem *279*, 8497-8505.

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*, 2050-2061.

Rosario, M., Franke, R., Bednarski, C., and Birchmeier, W. (2007). The neurite outgrowth multiadaptor RhoGAP, NOMA-GAP, regulates neurite extension through SHP2 and Cdc42. The Journal of cell biology *178*, 503-516.

Rosen, G.D., Sanes, J.R., LaChance, R., Cunningham, J.M., Roman, J., and Dean, D.C. (1992). Roles for the integrin VLA-4 and its counter receptor VCAM-1 in myogenesis. Cell *69*, 1107-1119.

Rudnicki, M.A., and Jaenisch, R. (1995). The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis. Bioessays *17*, 203-209.

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 (New York, NY *230*, 1350-1354.

Sasaki, Y., Derudder, E., Hobeika, E., Pelanda, R., Reth, M., Rajewsky, K., and Schmidt-Supprian, M. (2006). Canonical NF-kappaB activity, dispensable for B cell development, replaces BAFF-receptor signals and promotes B cell proliferation upon activation. Immunity *24*, 729-739.

Schaeper, U., Gehring, N.H., Fuchs, K.P., Sachs, M., Kempkes, B., and Birchmeier, W. (2000). Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses. The Journal of cell biology *149*, 1419-1432.

Schaeper, U., Vogel, R., Chmielowiec, J., Huelsken, J., Rosario, M., and Birchmeier, W. (2007). Distinct requirements for Gab1 in Met and EGF receptor signaling in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *104*, 15376-15381.

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. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *103*, 945-950.

Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell *103*, 211-225.

Schoenwaelder, S.M., Petch, L.A., Williamson, D., Shen, R., Feng, G.S., and Burridge, K. (2000). The protein tyrosine phosphatase Shp-2 regulates RhoA activity. Curr Biol *10*, 1523-1526.

Schulze, W.X., Deng, L., and Mann, M. (2005). Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. Mol Syst Biol *1*, 2005 0008.

Schuster-Gossler, K., Cordes, R., and Gossler, A. (2007). Premature myogenic differentiation and depletion of progenitor cells cause severe muscle hypotrophy in Delta1 mutants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *104*, 537-542.

Schwartz, M.A. (2001). Integrin signaling revisited. Trends in cell biology *11*, 466-470.

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*, 777-786.

Shi, Z.Q., Lu, W., and Feng, G.S. (1998). The Shp-2 tyrosine phosphatase has opposite effects in mediating the activation of extracellular signal-regulated and c-Jun NH2-terminal mitogen-activated protein kinases. J Biol Chem *273*, 4904-4908.

Shi, Z.Q., Yu, D.H., Park, M., Marshall, M., and Feng, G.S. (2000). Molecular mechanism for the Shp-2 tyrosine phosphatase function in promoting growth factor stimulation of Erk activity. Molecular and cellular biology *20*, 1526-1536.

Shinin, V., Gayraud-Morel, B., Gomes, D., and Tajbakhsh, S. (2006). Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells. Nat Cell Biol *8*, 677-687.

Soriano, P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. Nature genetics *21*, 70-71.

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. Developmental biology *133*, 361-374.

Tatsumi, R., Anderson, J.E., Nevoret, C.J., Halevy, O., and Allen, R.E. (1998). HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. Developmental biology *194*, 114-128.

Tefft, D., De Langhe, S.P., Del Moral, P.M., Sala, F., Shi, W., Bellusci, S., and Warburton, D. (2005). A novel function for the protein tyrosine phosphatase Shp2 during lung branching morphogenesis. Developmental biology *282*, 422-431.

Tefft, D., Lee, M., Smith, S., Crowe, D.L., Bellusci, S., and Warburton, D. (2002). mSprouty2 inhibits FGF10-activated MAP kinase by differentially binding to upstream target proteins. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol *283*, L700-706.

Uhlen, P., Burch, P.M., Zito, C.I., Estrada, M., Ehrlich, B.E., and Bennett, A.M. (2006). Gain-of-function/Noonan syndrome SHP-2/Ptpn11 mutants enhance calcium oscillations and impair NFAT signaling. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *103*, 2160-2165.

Van Vactor, D., O'Reilly, A.M., and Neel, B.G. (1998). Genetic analysis of protein tyrosine phosphatases. Curr Opin Genet Dev *8*, 112-126.

Vasyutina, E., Lenhard, D.C., Wende, H., Erdmann, B., Epstein, J.A., and Birchmeier, C. (2007). RBP-J (Rbpsuh) is essential to maintain muscle

progenitor cells and to generate satellite cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *104*, 4443-4448.

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*, 2187-2198.

Vogel, W., Lammers, R., Huang, J., and Ullrich, A. (1993). Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation. Science (New York, NY *259*, 1611-1614.

Weinstein, M., Xu, X., Ohyama, K., and Deng, C.X. (1998). FGFR-3 and FGFR-4 function cooperatively to direct alveogenesis in the murine lung. Development *125*, 3615-3623.

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*, 1377-1386.

White, R.B., Bierinx, A.S., Gnocchi, V.F., and Zammit, P.S. (2010). Dynamics of muscle fibre growth during postnatal mouse development. BMC Dev Biol *10*, 21.

Wright, W.E., Sassoon, D.A., and Lin, V.K. (1989). Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. Cell *56*, 607-617.

Wu, T.R., Hong, Y.K., Wang, X.D., Ling, M.Y., Dragoi, A.M., Chung, A.S., Campbell, A.G., Han, Z.Y., Feng, G.S., and Chin, Y.E. (2002). SHP-2 is a dual-specificity phosphatase involved in Stat1 dephosphorylation at both tyrosine and serine residues in nuclei. J Biol Chem *277*, 47572-47580.

Yang, W., Klaman, L.D., Chen, B., Araki, T., Harada, H., Thomas, S.M., George, E.L., and Neel, B.G. (2006). An Shp2/SFK/Ras/Erk signaling pathway controls trophoblast stem cell survival. Dev Cell *10*, 317-327.

Yang, X., Dutta, U., and Shaw, L.M. (2010). SHP2 mediates the localized activation of Fyn downstream of the alpha6beta4 integrin to promote carcinoma invasion. Molecular and cellular biology *30*, 5306-5317.

You, M., Flick, L.M., Yu, D., and Feng, G.S. (2001). Modulation of the nuclear factor kappa B pathway by Shp-2 tyrosine phosphatase in mediating the induction of interleukin (IL)-6 by IL-1 or tumor necrosis factor. J Exp Med *193*, 101-110.

Yu, D.H., Qu, C.K., Henegariu, O., Lu, X., and Feng, G.S. (1998). Proteintyrosine phosphatase Shp-2 regulates cell spreading, migration, and focal adhesion. J Biol Chem *273*, 21125-21131.

Zammit, P.S. (2008). All muscle satellite cells are equal, but are some more

equal than others? J Cell Sci 121, 2975-2982.

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? The Journal of cell biology *166*, 347-357.

Zhang, S.Q., Tsiaras, W.G., Araki, T., Wen, G., Minichiello, L., Klein, R., and Neel, B.G. (2002). Receptor-specific regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activation by the protein tyrosine phosphatase Shp2. Molecular and cellular biology *22*, 4062-4072.

Zhang, S.Q., Yang, W., Kontaridis, M.I., Bivona, T.G., Wen, G., Araki, T., Luo, J., Thompson, J.A., Schraven, B.L., Philips, M.R., *et al.* (2004). Shp2 regulates SRC family kinase activity and Ras/Erk activation by controlling Csk recruitment. Molecular cell *13*, 341-355.

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.

6 Zusammenfassung/Abstract

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Mutation des Shp2^{flox} Allels in Mäusen, in denen die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Pax7-Promoters exprimiert wurde, zu einem Verlust des Shp2 Proteins in Myoblasten zum Zeitpunkt E14 führte (coShp2 Mutante). Dieser Verlust resultierte während der postnatalen Entwicklung in einem verringerten Muskelwachstum, welches sich in einer Reduktion sowohl der Anzahl der Kerne, als auch des Querschnitts der Muskelfaser widerspiegelte. Der Grund für das inhibierte Muskelwachstum war eine Reduktion der Pax7-positiven Satellitenzellpopulation sowie der Myf5und Myogenin-positiven Myoblastenpopulationen. Die Abnahme dieser Zellpopulationen manifestierte sich zum Ende der Fetalentwicklung sowohl in der hypaxialen, als auch in der epaxialen Muskulatur und setzte sich während der postnatalen Entwicklung fort. Am Ende des untersuchten Zeitraums (P14) konnten nur noch sehr wenige Satellitenzellen und Myoblasten nachgewiesen werden. Der Grund für den Rückgang dieser Zellpopulationen war eine massive Reduktion der Proliferationsraten. Die molekulare Ursache für die eingeschränkte Proliferation der myogenen Zellen in der coShp2 Mutante liegt vermutlich in Beeinträchtigung des Akt/PI3K-Signalwegs. einer Es konnte auf proteinbiochemischem Wege gezeigt werden, dass die Aktivität dieses Signalwegs im Muskelgewebe der coShp2 Mutante reduziert war. Zudem war die Proliferation der myogenen Zellen bei konstitutiver Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs unabhängig vom Shp2 Verlust gesteigert. Die späte Manifestation des Phänotyps in coShp2 Mäusen deutet darauf hin, dass grundlegende Unterschiede in der Regulierung der Proliferation myogener Zellen zwischen der frühen Muskelentwicklung und der Muskelentwicklung ab der späten fetalen Phase bestehen. Eine Änderung in der Muskulatur, die zeitlich in etwa mit dem Auftreten dieses Phänotyps korreliert, ist die Positionierung der Satellitenzellen unter der Basalmembran. Dadurch

kommt die Satellitenzelle in einen direkten Kontakt mit Laminin in der Basalmembran. Eine Arbeitshypothese ist daher, dass die durch den Verlust von Shp2 beeinträchtigte Proliferation myogener Zellen auf einer gestörten Weiterleitung von Signalen eines Integrin-Rezeptors beruht, der an Laminin in der Basalmembran bindet. Es ist jedoch auch möglich, dass unbekannte Wachstumsfaktoren, die Shp2-abhängig signalisieren, von der Muskelfaser produziert werden. Sie würden erst dann eine dominante Funktion ausüben, wenn die Satellitenzelle zusammen mit der Faser durch die Basalmembran abgeschirmt wird.

Abstract

In this work it was shown that a recombination of a Shp2^{flox} allele recombined in a cre-dependent manner under control of the Pax7 promoter (coShp2 mice) results in a loss of Shp2 protein in myoblasts after embryonic day 14 (E14). The outcome of this loss is a reduced muscle growth reflected by a reduction of nuclei and cross sectional area of myofibers during postnatal development. The reason for the impaired muscle growth was a reduced number of Pax7positive satellite cells as well as Myf5- and Myogenin-positive myoblasts. At the end of fetal development reduction of these cell populations became manifest in hypaxial and epaxial muscle. During development this reduction continued and at postnatal day 14 (P14) only few satellite cells and myoblasts could be detected. The reduction of cell populations was due to a strongly impaired proliferation of myogenic cells. The molecular mechanism underlying the impaired proliferation might be an inhibited activation of Akt/PI3K-pathway. A reduced activity of this pathway in muscle of coShp2 mice was shown on western blots. In addition, in mice with constitutively activated Akt/PI3Kpathway, proliferation of myogenic cells was up regulated independent of Shp2 loss. The late manifestation of the phenotype in coShp2 mice points to the fact that fundamental differences exist between the adjustment of myogenic proliferation in early muscle development and the muscle development after late fetal phase. A difference in muscle which corresponds temporally with the occurrence of the coShp2 phenotype, is the positioning of satellite cells under the basallamina. Thus the satellite cell gets direct contact with laminin in the basallamina. This leads to a working hypothesis where the impaired proliferation of myogenic cells in coShp2 mutants is based on disturbed signaling of an integrin receptor, which binds to laminin in the basallamina. However it is also possible that unknown growth factors, which are signaling in a Shp2-dependent manner, are produced by the muscle fiber. After the satellite cell and the fiber become shielded by the basallamina these factors would be able to act in a dominant manner.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
bHLH	basische Helix Loop Helix Domäne
bp	Basenpaare
BrdU	5-Brom-2'-desoxy-Uridin
BSA	(engl.: bovine serum albumin) Rinderserumalbumin
cDNA	(engl.: complementary DNA) komplementäre DNA
CollV	Collagen IV
Cre	Cre-Rekombinase aus dem P1 Bakteriophagen
Cy2	Cyanin
СуЗ	Indocarbocyanin
d.h.	das heißt
DMEM	engl.: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	(engl.: desoxyribonucleic acid) Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E	Embryonalstadium (Tag der Embryonalentwicklung nach
	Vaginalpfropfen)
ECL	Elektrochemilumineszenz
ECRL	Extensor Carpi Radialis Longus
EDTA	(engl.: ethylenendinitrilotetraacetic acid)
	Ethylendinitrilotetraessigsäure
engl.	englisch
ES	embryonale Stammzelle
GFP	grün fluoresziernedes Protein
h	(engl.: hour) Stunde
HRP	(engl.: horseradish peroxidase) Meerrettichperoxidase

IF	Immunfluoreszenz
Kontr.	Kontrolle
loxP	(engl.: lokus of crossover in P1)
MDC	Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin, Berlin-Buch
min	Minute
MRF	(engl.: myogenic regulatory factor) myogene
	Regulationsfaktoren
NEN	Blockierlösung
Р	postnataler Tag (Tag der postnatalen Entwicklung nach der
	Geburt)
р	p-Wert, Signifikanzwert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	(engl.: phosphate buffered saline) phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-T	PBS mit 0,1% Tween 20
PBX	PBS mit 0,1% Triton X-100
PCR	(engl. polymerase chain reaction) Polymerase-Ketten-Reaktion
Pen/Strep	Peicilin/Strepdavidin
PFA	Paraformaldehyd
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SDS	(engl.: sodium dodecylsulfate) Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
ßGal	ß-Galactosidase
Tab.	Tabelle
TUNEL	(engl.: TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)
üN	über Nacht
vgl.	vergleiche
WB	Western Blot
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-InolyI-D-Galaktopyranosid

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.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dominique Bröhl, Jochen Welcker und Katharina Paulick für die Diskussion meiner Ergebnisse und für Ratschläge bedanken.

Ein außerordentlicher Dank gilt Michael Strehle und Franziska Rietz für die Korrektur dieser Arbeit.

Petra Stallerow, Claudia Päseler und Karin Gottschling danke ich für die ausgezeichnete technische Assistenz.

Auch möchte ich allen anderen Mitgliedern des Labors für die gute Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit und den üblichen Verdächtigen für feucht fröhliche Abende außerhalb des Labors danken.

Folgenden Wissenschaftlern danke ich dafür, dass sie mir Mauslinien zur Verfügung gestellt haben: Katja Grossmann (Shp2^{flox}), Charles Keller (Pax7^{Cre}), Klaus Rajewsky (P110* und MEK1DD) und Philippe Soriano (*Rosa26*).

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Partnerin Franziska Rietz für ihre Unterstützung und unserem Sohn Frederik Wilhelm dafür, dass er mich stets früh genug weckte, um an dieser Dissertation zu arbeiten.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig 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.

Robin Schneider