

4. Diskussion

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

Der Homöobox-Transkriptionsfaktor *Lbx1* wird in der Embryogenese ausschließlich in migrierenden hypaxialen Muskelvorläuferzellen und in postmitotischen Nervenzellen des dorsalen Rückenmarks exprimiert (Jagla *et al.*, 1995; Dietrich *et al.*, 1998; Mennerich *et al.*, 1998). In den Muskelvorläuferzellen überlappt das *Lbx1*-Expressionsmuster mit denen des Pairedbox-Transkriptionsfaktors *Pax3* und des Tyrosin-Kinase-Rezeptors *c-Met*. Um die Funktion von *Lbx1* in der Entwicklung der hypaxialen Skelettmuskulatur zu analysieren, wurde in der vorliegenden Arbeit das *Lbx1*-Gen in der Maus ausgeschaltet. Darüber hinaus konnten die *Lbx1*-Mutanten genutzt werden, um regulatorische Beziehungen zwischen den *Lbx1*-, *Pax3*- und *c-Met*-Genen zu untersuchen. In einem weiteren Aspekt wurde die Funktion von *Lbx1* bei der Differenzierung von Neuronen im dorsalen Rückenmark analysiert.

4.1.1 Gezielte Mutation des *Lbx1*-Gens

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein mutiertes *Lbx1*-Gen hergestellt, in dem codierende und nicht-codierende *Lbx1*-Sequenzen durch das bakterielle *lacZ*-Gen von *Escherichia coli* ausgetauscht worden waren. Zusätzlich enthielt das Allel eine *Neomycin*-Genkassette zur Selektion in der embryonalen Stammzellkultur (Brohmann *et al.*, 2000). Die Expression des *lacZ*-Gens sollte die Identifizierung der Muskelvorläuferzellen und Neurone gestatten, die in der normalen Entwicklung *Lbx1* exprimieren, um ihr Schicksal in den Mutanten verfolgen zu können. In heterozygoten Tieren war das zeitliche und räumliche Expressionsmuster des *lacZ*-Reportergens mit dem des *Lbx1*-Gens identisch. Allerdings erfolgte die *lacZ*-Expression deutlich schwächer, so daß der enzymatische Nachweis über eine β -Galaktosidase-Färbung nicht sensitiv genug war.

Für diese abgeschwächte Expression können mehrere Gründe verantwortlich sein. Erstens führt die Insertion des *lacZ*-Reportergens im ersten Exon dazu, daß ein *Lbx1*- β -Galaktosidase-Fusionsprotein produziert wird. Die aminoterminalen *Lbx1*-Sequenzen könnten dabei Translationseffizienz, Proteinstabilität oder enzymatische Aktivität der

β -Galaktosidase reduzieren. Zweitens wurden umfangreiche Bereiche des *Lbx1*-Locus deletiert, z.B. Intronsequenzen, die wichtige regulatorische Regionen für eine normal ablaufende Genexpression enthalten können. Drittens scheint ein durch genetische Manipulation ungewöhnlich großes erstes Exon oder das Fehlen von Spleiß-Sequenzen die Expressionseffizienz zu beeinträchtigen (unveröffentlichte Resultate aus dem Labor von K. Rajewsky, Köln; Hamer und Leder, 1979). Das mutierte *Lbx1*-Allel besteht lediglich aus einem mehr als 3kb umfassenden Exon. Viertens gibt es vermehrt Hinweise auf negative cis-regulatorische Einflüsse des bakteriellen *Neomycin*-Resistenzgens, wenn es ins Genom von Säugetieren eingebracht wird (Artelt *et al.*, 1991; Fiering *et al.*, 1995; Hug *et al.*, 1996; Scacheri *et al.*, 2001). Experimentelle Evidenz für diese letzte Möglichkeit ist, daß die Expression des *lacZ*-Reportergens durch Entfernen des geflochtenen *Neomycin*-Gens erheblich gesteigert werden konnte (eigene Beobachtung). Allerdings ist das *Neomycin*-Gen nicht allein für die verminderte *lacZ*-Expression verantwortlich, denn selbst nach seinem Entfernen schien die Expression des mutierten *Lbx1*-Allels nicht vergleichbar mit der des Wildtyp-Gens zu sein, d.h. die Signalintensitäten nach *in situ*-Hybridisierungs- oder Immunfluoreszenznachweis waren reduziert. Deshalb sind wahrscheinlich mehrere Ursachen für die Reduktion der Expression des mutierten Allels verantwortlich.

4.1.2 Bedeutung von *Lbx1* für die Migration von Muskelvorläuferzellen

Die hypaxiale Skelettmuskulatur entwickelt sich aus dem Dermomyotom der Somiten und wird von einer migrierenden und einer nicht-migrierenden Muskelvorläuferzellpopulation gebildet. Die migrierenden Zellen entstehen dabei lediglich auf bestimmten axialen Niveaus (occipital, cervikal und auf Höhe der Extremitätenanlagen). Sie delaminieren aus dem ventrolateralen Dermomyotom und wandern über große Distanzen, bevor sie an ihren Zielorten zu Muskulatur differenzieren.

Die migrierenden Muskelvorläuferzellen wurden in *Lbx1*^{-/-} Embryonen gebildet und delaminierten, ihre Wanderung war jedoch beeinträchtigt. Am stärksten waren dabei diejenigen Vorläuferzellen betroffen, die in die Gliedmaßenknospen einwanderten. Die Zellen erreichten keine dorsalen Positionen in den Extremitäten und verblieben

stattdessen in den proximo-ventralen Anteilen. Obwohl das Überleben der Muskelvorläufer an ihren Zielorten beeinträchtigt sein konnte, schien dies nicht der verantwortliche Mechanismus in den *Lbx1*-Mutanten zu sein, denn zu keinem Zeitpunkt konnten Vorläuferzellen in den dorsalen Regionen der Gliedmaßen identifiziert werden. Zusätzlich akkumulierten Muskelvorläuferzellen ektopisch im Seitenplattenmesoderm der ventralen Körperwand. In späteren Stadien der Embryogenese oder nach der Geburt wurde jedoch keine ektopische Muskulatur in der ventralen Körperwand gefunden. Dies demonstriert, daß die Muskelvorläuferzellen in *Lbx1*^{-/-} Tieren zuerst fehlgeleitet und erst dann in andere Muskelgruppen einbezogen werden oder aber absterben (Brohmann *et al.*, 2000).

Die Gesamtdistanz, die diese fehlgeleiteten Zellen zurücklegten, war insgesamt kürzer als die der korrekt wandernden Zellen in Kontrolltieren. Ebenso war die Distanz der Muskelvorläuferzellen, die in *Lbx1*-Mutanten zur Zungenanlage migrierten und dabei den normalen Wanderungsweg benutzten gegenüber Wildtyp-Embryonen verkürzt. Trotz der verlangsamten Migration war also kein vollständiger Verlust an Wanderungsfähigkeit festzustellen und kann daher nicht der Grund sein, weshalb sich die Muskelvorläuferzellen an ektopischen Positionen ansammelten. Vielmehr unterstreichen diese Analysen, daß die migrierenden Muskelvorläuferzellen in *Lbx1*^{-/-} Embryonen bestimmte Ziele nicht finden, sie also spezifische Signale, die sie normalerweise zu ihren Zielorten leiten, nicht richtig erkennen oder verarbeiten können.

Da Mechanismen, die Zellen an ihre Zielorte dirigieren, anziehend oder abstoßend wirken können, sind Parallelen zum Auswachsen der Axone von Nervenzellen offensichtlich. Beim gerichteten Auswachsen werden Extensionen, die in eine favorisierte Richtung projizieren, selektiv stabilisiert, während andere wieder zurückgezogen werden (zur Übersicht siehe Yu und Bargmann, 2001). Interessanterweise können die Moleküle gleicher Familien sowohl bei der Zellmigration, als auch beim Auswachsen von Axonen ähnliche leitende Signale liefern. Zum Beispiel haben die Liganden der Eph-Tyrosinkinase-Rezeptoren, die Ephrine, abstoßende Wirkungen auf die Wanderung von Neuralleistenzellen und auf Axone (Wang und Anderson, 1997). Der Rezeptor EphA4 wird in migrierenden Muskelvorläuferzellen vor der Delamination und während der Wanderung exprimiert. Die Expression seines Liganden ephrin-A5 erfolgt dagegen im angrenzenden

Mesenchym (Swartz *et al.*, 2001). Untersuchungen im Hühnerembryo demonstrierten, daß ephrin-A5 die wandernden Muskelvorläuferzellen in der Extremitätenknospe durch Abstoßung positioniert, was mit seiner Wirkung auf Axone im Säugetier-Gehirn übereinstimmt (Frisén *et al.*, 1998, Gao *et al.*, 1998; Swartz *et al.*, 2001). Analog leiten die Zelloberflächenmoleküle Netrin und ihr Rezeptor DCC mesodermale Zellen und Axone in *Caenorhabditis elegans* und im Huhn (Hedgecock *et al.*, 1990; Serafini *et al.*, 1994). Netrin/DCC-Signale können allerdings auch abstoßend wirken (Colamarino und Tessier-Lavigne, 1995). Zelloberflächenmoleküle, die Wechselwirkungen mit der extrazellulären Matrix bzw. die Adhäsion zwischen Zellen ermöglichen, sind für Zellwanderungen von Bedeutung, wobei sie allgemein permissiv zu sein scheinen. So konnte z.B. die Migration von Muskelvorläuferzellen in die Gliedmaßenanlagen durch Injektionen von Antikörpern gegen Fibronectin und N-Cadherin inhibiert werden (Brand-Saberi *et al.*, 1993 und 1996a).

Welche Signale die migrierenden hypaxialen Muskelvorläuferzellen zu ihren Zielorten dirigieren, werden künftige Analysen klären müssen. Da die Ströme wandernder Muskelvorläuferzellen in die Extremitäten und zur Zungenanlage in *Lbx1*-Mutanten unterschiedlich stark betroffen sind, ist zu erwarten, daß die Erkennung verschiedener Wanderungswege nicht von den gleichen Signalen gesteuert wird. Die Komplexität solcher Signal-Systeme, die Zellmigrationen in niedrigeren Organismen wie *C. elegans* oder *Drosophila* kontrollieren, läßt dies ebenfalls erwarten (Montell, 1999).

4.1.3 Lbx1 und die Differenzierung hypaxialer Muskelvorläuferzellen

In der Embryogenese wird die räumliche und zeitliche Differenzierung myogener Vorläuferzellen durch ein Zusammenspiel von Wachstumsfaktoren mit Differenzierungssignalen präzise reguliert. Allgemein inhibieren Faktoren, die Wachstum induzieren und die Migration stimulieren, die Differenzierung, während umgekehrt Differenzierungsfaktoren Wachstum und Zellwanderungen behindern (Amthor *et al.*, 1998). Dadurch wird die Expansion und Motilität der wandernden Muskelvorläuferzellpopulation gewährleistet, so daß die Zellen in ausreichender Anzahl zu ihren Zielorten gelangen (Amthor *et al.*, 1999).

Lbx1 wird in delaminierenden Muskelvorläuferzellen und im Verlauf der Wanderung exprimiert bis die Zellen ihre Zielorte erreichen (Jagla *et al.*, 1995; Dietrich *et al.*, 1999). Somit korreliert die *Lbx1*-Expression mit der verzögerten Differenzierung dieser Zellpopulation. Dies steht im Gegensatz zu den epaxialen und nicht-migrierenden hypaxialen Muskelvorläuferzellen des Rumpfes, die myogene Regulationsfaktoren (MRFs) direkt nach ihrem Eintritt ins Myotom exprimieren und damit ihre Differenzierung zu Skelettmuskulatur einleiten (Smith *et al.*, 1994). In *Lbx1*-Mutanten erfolgte keine frühzeitige Expression von MRFs, wie z.B. von *Myf5* oder *Myogenin* (Brohmann *et al.*, 2000). Dennoch war das Differenzierungspotential der fehlgeleiteten Muskelvorläuferzellen in der ventralen Körperwand und dem proximo-ventralen Anteil der vorderen Gliedmaßenknospe nicht eingeschränkt, was die zeitlich normale Induktion von *Myf5* bewies. Die Zellen erreichten dabei zuerst die ektopischen Positionen in den *Lbx1*^{-/-} Embryonen und begannen anschließend mit der Expression von Differenzierungsmarkern, wie sie es üblicherweise in Wildtyp-Tieren an den Zielorten tun würden. Diese Resultate unterstreichen deshalb die Bedeutung von *Lbx1* für die korrekte Wegfindung der wandernden Muskelvorläuferzellen und belegen, daß *Lbx1* die Differenzierung dieser Zellen nicht verändert. Zur Klärung einer Funktion von *Lbx1* bei der Expansion der Vorläuferzellpopulation sind allerdings weitere Untersuchungen erforderlich.

4.2 Kontrolle der Delamination migrierender Muskelvorläuferzellen durch das SF/HGF/c-Met-Signalsystem

Der Tyrosin-Kinase-Rezeptor c-Met und sein Ligand "Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor" (SF/HGF) sind für die Entwicklung wandernder Muskelvorläuferzellen essentiell. In *c-Met*- und *SF/HGF*-Mutanten wurden diese Muskelvorläuferzellen zwar korrekt gebildet, sie konnten allerdings nicht vom epithelialen Dermomyotom delaminieren. Demzufolge fehlten diesen Tieren die Extremitäten- und Zwerchfellmuskeln, sowie die intrinsische Zungenmuskulatur (Bladt *et al.*, 1995). Alle übrige epaxiale und hypaxiale Skelettmuskulatur entwickelte sich jedoch normal.

In dieser Arbeit wurde der Einfluß des SF/HGF/c-Met-Signalsystems auf die verschiedenen aufeinanderfolgenden Schritte in der Myogenese untersucht. Mit Hilfe verschiedener Marker, *Lbx1* (Jagla *et al.*, 1995), *Pax3* (Goulding *et al.*, 1991 und 1994; Bober *et al.*, 1994; Williams und Ordahl, 1994), *Pax7* (Jostes *et al.*, 1990) und *Sim1* (Fan *et al.*, 1996), konnten keine Veränderungen in der Differenzierung des Dermomyotoms und der Bildung der migrierenden Muskelvorläuferzellen in *c-Met*^{-/-} und *SF/HGF*^{-/-} Embryonen beobachtet werden. Während jedoch in Wildtyp-Embryonen migrierende Muskelvorläuferzellen, die aus dem Dermomyotom auswandern, anhand ihrer *Lbx1*- oder *Pax3*-Expression verfolgt werden können, verblieben diese Zellen in *c-Met*^{-/-} und *SF/HGF*^{-/-} Embryonen als dicht gepackte Aggregate innerhalb des epithelialen Dermomyotoms. Folglich wurden die migrierenden Vorläuferzellen unverändert in *c-Met*- und *SF/HGF*-Mutanten gebildet, die epithelial/mesenchymale Konversion und damit ihr Auswandern war allerdings unterbunden. Diese Funktion von SF/HGF und c-Met wird durch Experimente untermauert, in denen SF/HGF ektopisch in die Abdominalregion des Hühnerembryos appliziert wurde. Dies führte zum Auswandern von Muskelvorläuferzellen aus dem Dermomyotom der Abdominal-Somiten, die normalerweise keine wandernden Zellen erzeugen (Brand-Saberi *et al.*, 1996b; Heymann *et al.*, 1996).

Im Gegensatz zu *Lbx1* wird *c-Met* im dorso-medialen und ventro-lateralen Anteil aller Somiten exprimiert. Dennoch war in *c-Met*- und *SF/HGF*-mutanten Mäusen nur die wandernde Muskelvorläuferzellpopulation betroffen, und die Entwicklung der nicht-migrierenden Muskelvorläuferzellen war nicht beeinträchtigt. Durch Analyse der *SF/HGF*-Expression in Kontroll- und *c-Met*-mutanten Embryonen wurde gezeigt, daß *SF/HGF* lediglich im benachbarten Mesenchym solcher Somiten exprimiert wird, die Muskelvorläuferzellen delaminieren (Dietrich *et al.*, 1999). Die limitierte Verfügbarkeit des Liganden SF/HGF begrenzt dementsprechend die Aktivierung des Rezeptors c-Met auf bestimmte Somiten.

Interessanterweise wird *SF/HGF* auch entlang der Wanderungswege der Muskelvorläuferzellen und an den Zielorten exprimiert (Dietrich *et al.*, 1999). Im Verlauf des gesamten Wanderungsprozesses exprimieren die Vorläuferzellen darüber hinaus *c-Met* (Bladt *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1996) und können daher das SF/HGF-Signal empfangen. Dies läßt weitere Funktionen von SF/HGF und c-Met auch bei der Migration erwarten.

Die charakteristische Lokalisation könnte bedeuten, daß SF/HGF die Muskelvorläuferzellen zu ihren Zielorten dirigiert. Allerdings konnte in Hühnerembryonen, in denen SF/HGF in hohen Konzentrationen in die Abdominalregion appliziert worden war, keine zielgerichtete Wanderung von Muskelvorläuferzellen zur SF/HGF-Quelle festgestellt werden (Brand-Saberi *et al.*, 1996b; Heymann *et al.*, 1996). Dies spricht gegen eine chemoattraktive Wirkung des Faktors. Das SF/HGF/c-Met-Signalsystem könnte deshalb nach der anfänglichen Dissoziation beim Auswandern eine erneute Aggregation der Muskelvorläuferzellen während der Migration verhindern und dadurch die Motilität aufrecht erhalten. Da die Wanderung und Proliferation der Muskelvorläufer durch eine frühzeitige Differenzierung verhindert wird (Amthor *et al.*, 1999), könnten SF/HGF und c-Met außerdem die Differenzierung durch Repression myogener Regulationsfaktoren (MRFs) blockieren. Diese Funktion wurde in Satellitenzellen *in vitro* nachgewiesen (Leshem *et al.*, 2000). Experimente im Hühnerembryo unterstützen eine solche Kontrolle der Motilität und Beibehaltung des undifferenzierten Zustands in wandernden Vorläuferzellen durch SF/HGF und c-Met (Scaal *et al.*, 1999). Darüber hinaus wurden ektopisch lokalisierte Muskeln im Rückenmark transgener Mäuse gefunden, die SF/HGF unter der Kontrolle des Metallothionin-Promotors exprimieren (Takayama *et al.*, 1996). Ob die ektopische Skelettmuskulatur in solchen Tieren infolge einer abnormen Migration von Muskelvorläuferzellen gebildet wird, ist allerdings unklar.

In späteren Stadien der Embryogenese bleibt *c-Met* in der Skelettmuskulatur exprimiert und ist im adulten Muskel in den Satellitenzellen nachweisbar (Sonnenberg *et al.*, 1993). SF/HGF gilt als ein wichtiger Wachstumsfaktor für Satellitenzellen *in vitro* (Allen, 1995; Anastasi *et al.*, 1997; Cornelison und Wold, 1997; Gal-Levi *et al.*, 1998; Tatsumi *et al.*, 1998) und eine Rolle des SF/HGF/c-Met-Signalsystems bei der Regeneration im adulten Muskel ist möglich. Die hier präsentierten Untersuchungen sprechen aber gegen eine Bedeutung von SF/HGF und c-Met für das Wachstum und Überleben der hypaxialen Muskelvorläuferzellen in der Entwicklung. Es konnte kein Unterschied in der mitotischen Aktivität der Muskelvorläuferzellen innerhalb des Dermomyotoms von *SF/HGF*^{-/-} bzw. *c-Met*^{-/-} Embryonen ermittelt werden. Ebenso war eine gesteigerte Apoptose solcher Zellen nicht feststellbar. Diese Ergebnisse wurden durch Experimente mit Aggregaten aus tetraploiden Wildtyp- und *c-Met*-mutanten Morulastadien unter-

stützt, welche die frühembryonale Letalität der *c-Met*-Mutation verhinderten und dadurch eine Analyse späterer Embryonalstadien ermöglichten (Dietrich *et al.*, 1999). Diesen Embryonen fehlte ausschließlich diejenige Muskulatur, die sich von wandernden Vorläuferzellen ableitet, während sich die übrigen Muskelgruppen unverändert bis zur Geburt entwickelten. Folglich war auch in diesen Embryonen ausschließlich ein Effekt der *c-Met*-Mutation auf die migrierenden Muskelvorläuferzellen nachweisbar.

4.3 Gab1 als essentielle Komponente für die Weiterleitung des c-Met-Signals

Das Adapterprotein Gab1 bindet an die cytoplasmatische Domäne des aktivierten c-Met-Rezeptors. Verschiedene biochemische Analysen demonstrierten, daß Gab1 die Signale des c-Met-Rezeptors weiterleiten kann (Weidner *et al.*, 1996; Bardelli *et al.*, 1997; Maroun *et al.*, 1999; Schaeper *et al.*, 2000). Im Rahmen dieser Dissertation wurde deshalb die Bedeutung von Gab1 für die Transmission des c-Met-Signals anhand der Entwicklung der migrierenden Muskelvorläuferzellen untersucht. Die Inaktivierung des *Gab1*-Gens resultierte in Phänotypen, die mit den in *SF/HGF*^{-/-} bzw. *c-Met*^{-/-} Tieren beobachteten Effekten weitgehend identisch waren oder ihnen ähnelten (Sachs, Brohmann *et al.*, 2000). Wie *SF/HGF*^{-/-} und *c-Met*-Mutanten wiesen auch *Gab1*^{-/-} Embryonen Defekte in der Plazenta- und Leberentwicklung auf (Bladt *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1995; Uehara *et al.*, 1995). Die *Lbx1*-Expression zeigte, daß die wandernden Muskelvorläuferzellen zwar unverändert in *Gab1*-Mutanten gebildet wurden, die Delamination dieser Zellen aus dem epithelialen Dermomyotom allerdings beeinträchtigt war. Infolgedessen wanderten sichtbar weniger myogene Zellen in die vordere und hintere Gliedmaßenknospe, und der Strom von Zellen, die entlang des Hypoglossus zur Zungenanlage wanderten, war verkürzt. Immunhistologische Untersuchungen späterer Embryonalstadien zeigten vor allem in den dorsalen Anteilen eine erhebliche Verringerung der Extremitätenmuskulatur. Dabei waren distale Muskelgruppen stärker als proximale betroffen, und die Defekte der hinteren Extremitäten waren deutlicher als die der vorderen ausgeprägt. Zusätzlich war die Zwerchfellmuskulatur beträchtlich vermindert (Sachs, Brohmann *et al.*, 2000).

Das c-Met-vermittelte Signal wird jedoch in *Gab1*^{-/-} Tieren nicht komplett unterbrochen, denn es ist zwar eine beeinträchtigte, aber doch vorhandene restliche Delamination von Muskelvorläuferzellen festzustellen. Dadurch wird die Bedeutung weiterer Adapterproteine bei der Signalweiterleitung unterstrichen. Diese assoziieren entweder direkt über ihre Src-homologe Domäne 2 (SH2-Domäne) oder nutzen Gab1 als „Andockstation“ (Ingham *et al.*, 1998), um an den aktivierten c-Met-Rezeptor zu binden (Ponzetto *et al.*, 1994; Weidner *et al.*, 1996). Zu diesen Signalmolekülen gehören Grb2, Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-Kinase), Shp2, Src, Shc, c-Cbl, Phospholipase C- γ und CRKL (Ponzetto *et al.*, 1994; Pelicci *et al.*, 1995; Fixman *et al.*, 1997; Maroun *et al.*, 1999; Sakkab *et al.*, 2000; Schaeper *et al.*, 2000). Die Mutation der Tyrosine 14 und 15 in der cytoplasmatischen Domäne von c-Met reproduzierte den Phänotyp der *c-Met*-Mutanten in der Maus (Bladt *et al.*, 1995; Maina *et al.*, 1996). Gab1 nutzt diese beiden phosphorylierten Tyrosine, um an c-Met zu binden und leitet dann das Signal an andere Moleküle weiter (Nguyen *et al.*, 1997). Biochemische Experimente unterstrichen die Bedeutung der Interaktion von Gab1 mit Shp2 und PI-3-Kinase für die c-Met-vermittelte Dissoziation epithelialer Zellen (Khwaja *et al.*, 1998; Schaeper *et al.*, 2000). Die Tyrosin-Phosphatase Shp2 reguliert zudem positiv die Zellmigration (Yu *et al.*, 1998). Inaktivierung des *Shp2*-Gens in der Maus demonstrierte eine entscheidende Bedeutung für die Zellwanderungen in der Gastrulation zur Bildung des Mesoderms (Saxton *et al.*, 1997; Saxton und Pawson, 1999). Die frühen Defekte in *Shp2*-Mutanten verhinderten jedoch bislang die Analyse der Funktion von *Shp2* bei der Wanderung von Muskelvorläuferzellen.

4.4 Die genetische Hierarchie zur Kontrolle der Entwicklung migrierender Muskelvorläuferzellen

Bisherige Untersuchungen und die Resultate dieser Dissertation zeigen, daß die Entwicklung der wandernden Muskelvorläuferzellen durch *Pax3*, *Lbx1*, *c-Met* und weitere Gene kontrolliert wird, die wie *Gab1* an der c-Met-Signalübertragung beteiligt sind. Expressionsanalysen in Maus-Embryonen, die Mutationen in diesen Genen tragen,

und ein Vergleich der Phänotypen erlauben es, diese Gene in eine funktionelle Hierarchie einzuordnen (Birchmeier und Brohmann, 2000).

In *Pax3*-mutanten Embryonen wurde die Expression von *c-Met* und *Lbx1* im ventrolateralen Dermomyotom, dem Ort der Bildung der wandernden Muskelvorläuferzellen, nicht korrekt initiiert (Daston *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996; Mennerich *et al.*, 1998; Dietrich *et al.*, 1999). Verschiedene histologische Analysen können sogar dahingehend interpretiert werden, daß diese Zellen nicht gebildet werden und als Konsequenz diesen Tieren die Muskeln der Gliedmaßen, des Zwerchfells und ein Teil der Schultermuskulatur fehlte (Franz *et al.*, 1993; Bober *et al.*, 1994; Goulding *et al.*, 1994; Daston *et al.*, 1996; Tremblay *et al.*, 1998). Das *Pax3*-Gen agiert also oberhalb von *Lbx1* und *c-Met* in der genetischen Hierarchie, welche die Entwicklung der Muskelvorläuferzellen steuert (Abb.4.1). Die Reduktion der *c-Met*-Expression in *Pax3*-mutanten Embryonen wies darauf hin, daß *Pax3* die Expression von *c-Met* kontrolliert (Daston *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996). Der *c-Met*-Promotor enthält *Pax3*-Bindungsstellen, und *Pax3* kann den *c-Met*-Promotor *in vitro* aktivieren. Dies läßt eine direkte Kontrolle erwarten (Epstein *et al.*, 1996). Deshalb könnte das Fehlen der wandernden Muskelvorläuferzellen in *Pax3*-Mutanten auf die fehlende *c-Met*-Expression zurückzuführen sein (Yang *et al.*, 1996). Allerdings beeinflusste die *Pax3*-Mutation nicht nur die Delamination der Vorläuferzellen, denn im Gegensatz zu *c-Met*-Mutanten war bereits die zelluläre Organisation des Dermomyotoms beeinträchtigt. Zusätzlich zu den Veränderungen in der migrierenden Muskelvorläuferzellpopulation, wurde in den *Pax3*-Mutanten auch eine abnorme Entwicklung der Derivate der nicht-migrierenden Vorläuferzellen beobachtet. *Pax3* spielt daher vermutlich eine generelle Rolle in der Myogenese und der Dermomyotom-Entwicklung und kontrolliert neben *c-Met* eine Reihe weiterer Gene (Tajbakhsh *et al.*, 1997; Tremblay *et al.*, 1998).

Die Induktion von *Lbx1* im Dermomyotom von *Pax3*-Mutanten wurde verspätet und nur in occipitalen und cervikalen Somiten beobachtet (Dietrich *et al.*, 1999). Dagegen wurde umgekehrt *Pax3* normal in *Lbx1*^{-/-} Embryonen aktiviert (Brohmann *et al.*, 2000). Die Expression von *Pax7*, einem nah verwandten Gen, war im Dermomyotom von *Pax3*-Mutanten verstärkt (Borycki *et al.*, 1999). Deshalb könnte die verbleibende Induktion von *Lbx1* in den *Pax3*-Mutanten auf die Aktivität von *Pax7* zurückzuführen sein.

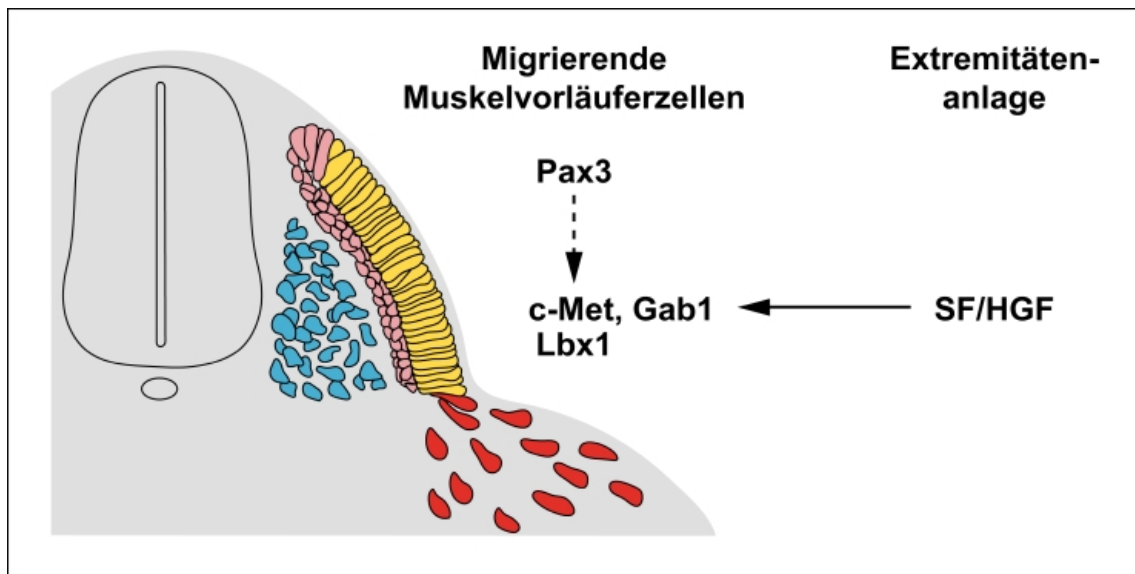


Abb.4.1: Schematische Darstellung der genetischen Hierarchie zur Kontrolle der Entwicklung migrierender Muskelvorläuferzellen.

Die Entwicklung migrierender Muskelvorläuferzellen (rot) wird durch verschiedene Gene kontrolliert. Der Pairedbox-Transkriptionsfaktor Pax3 beeinflusst die Spezifizierung dieser Zellpopulation im Dermomyotom (gelb) und steuert direkt oder indirekt die Expression des Tyrosin-Kinase-Rezeptors *c-Met* und des Homöobox-Transkriptionsfaktors *Lbx1*. Die restriktive Expression des Liganden *SF/HGF* kontrolliert die Aktivität des Rezeptors *c-Met*. Dieses parakrine Signalsystem induziert die Delamination der myogenen Vorläuferzellen aus dem Dermomyotom. Das Adapterprotein Gab1 leitet das *c-Met*-vermittelte Signal weiter. *Lbx1* ist im Verlauf des Wanderungsprozesses für die korrekte Interpretation von externen Signalen notwendig, welche die Muskelvorläuferzellen zu ihren Zielorten leiten.

Die Aktivität von *c-Met* wird durch die restriktive Expression von *SF/HGF* nur im Dermomyotom solcher Somiten beobachtet, in denen wandernde Muskelvorläuferzellen gebildet werden (Abb.4.1). In *SF/HGF*- und *c-Met*-Mutanten konnten diese Zellen nicht delaminieren und es fehlten infolgedessen alle Muskeln, die sich von migrierenden Vorläuferzellen ableiten (Bladt *et al.*, 1995; Dietrich *et al.*, 1999). Im Dermomyotom dieser Somiten wird *c-Met* mit *Lbx1* co-exprimiert, so daß *Lbx1* durch *c-Met* reguliert werden könnte. In *c-Met*- (oder *SF/HGF*- bzw. *Gab1*-) mutanten Embryonen wurde die *Lbx1*-Expression allerdings korrekt initiiert (Dietrich *et al.*, 1999; Sachs, Brohmann *et al.*, 2000). Weitere Faktoren sind also zur Aktivierung von *Lbx1* notwendig. Mitglieder der FGF-Familie könnten zur Regulation der *Lbx1*-Aktivität und auch von *SF/HGF* beitragen, weil sie zum richtigen Zeitpunkt ebenfalls auf diesen axialen Niveaus exprimiert werden und die Migration von Muskelvorläuferzellen stimulieren (Hannon *et al.*, 1996; Itoh *et al.*, 1996; Webb *et al.*, 1997). Hierfür fehlt jedoch bislang ein endgültiger Nachweis, der durch die Fähigkeit der FGF-Faktoren zur Induktion einer Extremität schwer zu erbringen ist (Cohn *et al.*, 1995; Crossley *et al.*, 1996). Zum

Beispiel führte die ektopische Applikation von FGF2 in der Abdominalregion des Hühnerembryos zwar zur Induktion von *Lbx1* und zum ektopischen Auswandern von Muskelvorläuferzellen (Mennerich *et al.*, 1998). Es bildete sich jedoch gleichzeitig eine neue Extremitätenknospe, in der die Expression anderer Signalfaktoren erfolgte, die *Lbx1* aktivieren könnten. Da *c-Met* in *Lbx1*-mutanten Embryonen korrekt exprimiert wurde, scheint daher eine Interaktion zwischen *Lbx1* und *c-Met* nicht zu bestehen (Brohmann *et al.*, 2000).

Pax3 induziert die Muskeldifferenzierung in embryonalen Gewebekulturen und *in vivo* (Maroto *et al.*, 1997; Tajbakhsh *et al.*, 1997). Dennoch reicht die *Pax3*-Expression allein nicht aus, um die Differenzierung von 10T1/2 Fibroblasten zu Muskulatur zu bewirken (Maroto *et al.*, 1997). Als weitere Faktoren werden *Dach2*, *Eya2* und *Six1* vor und nach dem Auswandern der Muskelvorläuferzellen aus dem Dermomyotom exprimiert. Wie *Pax3* steuern sie positiv die Myogenese und können direkt oder indirekt mit dem *Pax3*-Protein interagieren (Heanue *et al.*, 1999). In welchem Ausmaß sie die Regulation von *c-Met* oder *Lbx1* beeinflussen, werden künftige Experimente zeigen müssen.

4.5 Spezifizierung der *Lbx1*-Nervenzellen im dorsalen Neuralrohr

In der Embryogenese spezifizieren dorsale und ventrale morphogenetische Signale die unterschiedlichen neuronalen Vorläuferdomänen entlang der dorso-ventralen Achse des embryonalen Rückenmarks (Übersicht in Jessell, 2000). Diese Vorläuferdomänen sind durch die Expression von Transkriptionsfaktoren in Form charakteristischer Streifen gekennzeichnet. „Sonic Hedgehog“ (*Shh*), welches von Notochord und Bodenplatte synthetisiert wird, spezifiziert verschiedene Vorläuferdomänen im ventralen Neuralrohr, aus denen Motorneurone und Interneurone entstehen (Abb.4.2; siehe auch Roelink *et al.*, 1995; Ericson *et al.*, 1995 und 1996). Im Vergleich dazu steuern Signale der Deckplatte, darunter Mitglieder der BMP-Familie, wie z.B. *GDF7*, die Bildung von Vorläuferdomänen, aus denen Interneurone im dorsalen Neuralrohr hervorgehen (Liem *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1998 und 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß *Lbx1*-positive (*Lbx1*+) Nervenzellen unabhängig von dorsalen und ventralen Signalen gebildet werden, so daß sie einen neuronalen „Grundtyp“ repräsentieren könnten. Die dorsalen und

ventralen Signale scheinen allerdings die Bildung der *Lbx1*⁺ Neurone auf eine Domäne in der ventralen Hälfte des dorsalen Rückenmarks zu begrenzen. In *GDF7*- bzw. *Shh*-Mutanten wurden *Lbx1*⁺ Nervenzellen demzufolge produziert, sie traten jedoch in der gesamten dorsalen bzw. ventralen Hälfte auf (Abb.3.13 J; T. Müller und H. Brohmann, eigene Beobachtungen). Im dorsalen Neuralrohr können also zwei verschiedene Populationen postmitotischer Neurone definiert werden (Abb.4.2). Die Klasse A-Nervenzellen exprimieren *Lbx1* nicht, und ihre Entwicklung hängt von dorsalen induktiven Signalen ab. Demgegenüber sind die Klasse B-Neurone durch ihre *Lbx1*-Expression charakterisiert und entwickeln sich unabhängig von dorsalen und ventralen Signalen. Die Neuronentypen im ventralen Neuralrohr werden dagegen durch ventrale *Shh*-Signale spezifiziert.

Die unterschiedlichen neuronalen Vorläuferzellen sind in der Ventrikularzone lokalisiert und exprimieren gemäß ihrer Position entlang der dorso-ventralen Achse charakteristische Transkriptionsfaktoren. Die Expression dieser Faktoren wird zwar beim Einsetzen der Differenzierung abgeschaltet, sie induzieren aber ihrerseits die Expression anderer Transkriptionsfaktoren in den postmitotischen Neuronen der Mantelzone (Briscoe *et al.*, 2000). Beispielsweise induzieren die *Math1*⁺ Vorläuferzellen die Expression von *Lh2a/b* und *BarHI* in postmitotischen *dI1*-Neuronen und die *Neurogenin1/2*⁺ Vorläuferzellen die Bildung von *dI2*-Neuronen, welche *Lim1/2* und *Brn3a* exprimieren (Helms und Johnson, 1998; Bermingham *et al.*, 2001; Gowan *et al.*, 2001).

Die Analyse der *Lbx1*-Expression und BrdU-Markierungsexperimente dokumentierten, daß *Lbx1* einer der Transkriptionsfaktoren ist, die in postmitotischen Nervenzellen induziert werden. *Lbx1* wird in drei neuronalen Subtypen produziert, den *dI4*-*dI6* Neuronen, die zusammen die dorsale Klasse B bilden. Die *dI4*- und *dI5*-Neurone gehen dabei aus einer *Pax7/Mash1*⁺ Vorläuferdomäne hervor, während sich der *dI6*-Subtyp aus einer *Pax7/Dbx2*⁺ Vorläuferdomäne entwickelt (Abb.3.13). Die *Lbx1*⁺ Nervenzellen entstehen also aus verschiedenen Vorläuferdomänen. Erste Experimente zeigten, daß *Lbx1*⁺ Neurone sowohl in *Pax7*^{-/-}, als auch in *Mash1*^{-/-} Mäusen produziert werden (T. Müller und H. Brohmann, unveröffentlichte Beobachtungen). Welche Transkriptionsfaktoren die Induktion der *Lbx1*-Expression in postmitotischen Neuronen

steuern, ist somit noch unklar. Im dorsalen Neuralrohr sind bislang nur wenige Gene bekannt, die in den typischen Streifenmustern der Vorläuferdomänen exprimiert werden. Deshalb ist es vielleicht nicht erstaunlich, daß die entsprechenden Spezifizierungsfaktoren noch nicht identifiziert werden konnten.

Die beiden spät gebildeten Subtypen Lbx1+ Nervenzellen, dIL^A und dIL^B, gehen aus einer breiten Vorläuferdomäne in einem Pfeffer-und-Salz-Muster hervor (Abb.3.14 B-D). Verglichen mit der frühembryonalen Entwicklung postmitotischer Neurone aus unterschiedlichen Vorläuferzellen, die in charakteristischen Streifen angeordnet sind, ist ein solcher Mechanismus für die späte Spezifizierung der dIL^A- und dIL^B-Neurone nicht verantwortlich. Interessanterweise ist die Vorläuferdomäne, die dIL^A- und dIL^B-Neurone produziert, durch eine Mischung von Mash1-positiven und -negativen Zellen gekennzeichnet (Abb.3.14 A). Diese Heterogenität könnte daher an der Spezifizierung von dIL^A- und dIL^B-Neuronen beteiligt sein.

4.6 Veränderungen im Differenzierungsprogramm dorsaler Neurone in *Lbx1*-Mutanten

Die Analyse der Neurogenese in *Lbx1*^{-/-} Mäusen zeigte, daß Lbx1 die Entwicklung von Klasse B Nervenzellen steuert. In *Lbx1*-mutanten Embryonen veränderten die Zellen ihr Differenzierungsprogramm und entwickelten sich stattdessen zu Klasse A-Neuronen (Abb.4.2). Solche Veränderungen der Zellschicksale wurden bereits im Rückenmark von *Hb9*^{-/-} bzw. *Evx1*-mutanten Mäusen beobachtet. Hb9 und Evx1 sind Homöobox-Transkriptionsfaktoren, die in postmitotischen Nervenzellen des ventralen Neuralrohrs exprimiert werden (Arber *et al.*, 1999; Thaler *et al.*, 1999; Moran-Rivard *et al.*, 2001). In *Hb9*^{-/-} Embryonen entstanden aus Motorneuronen V2-Interneurone, während in *Evx1*-Mutanten anstelle der V0- die V1-Interneurone gebildet wurden. In beiden Fällen nahmen die Zellen demzufolge die Identität benachbarter Neurone an (siehe Abb.1.2 zur Position der Neuronen-Populationen). Die Identitätswechsel in *Lbx1*-Mutanten sind im Vergleich dazu ungewöhnlich, denn die dI4-Nervenzellen entwickelten sich zu dI4*-Neuronen, welche die charakteristischen Transkriptionsfaktor-Kombinationen des dI2- und nicht des benachbarten dI3-Subtyps exprimierten. Ebenso entwickelten sich die dI5-

zu dI5*-Neuronen, die den molekularen Charakter von dI3- und nicht der unmittelbar angrenzenden dI4-Nervenzellen annehmen (Abb.4.2).

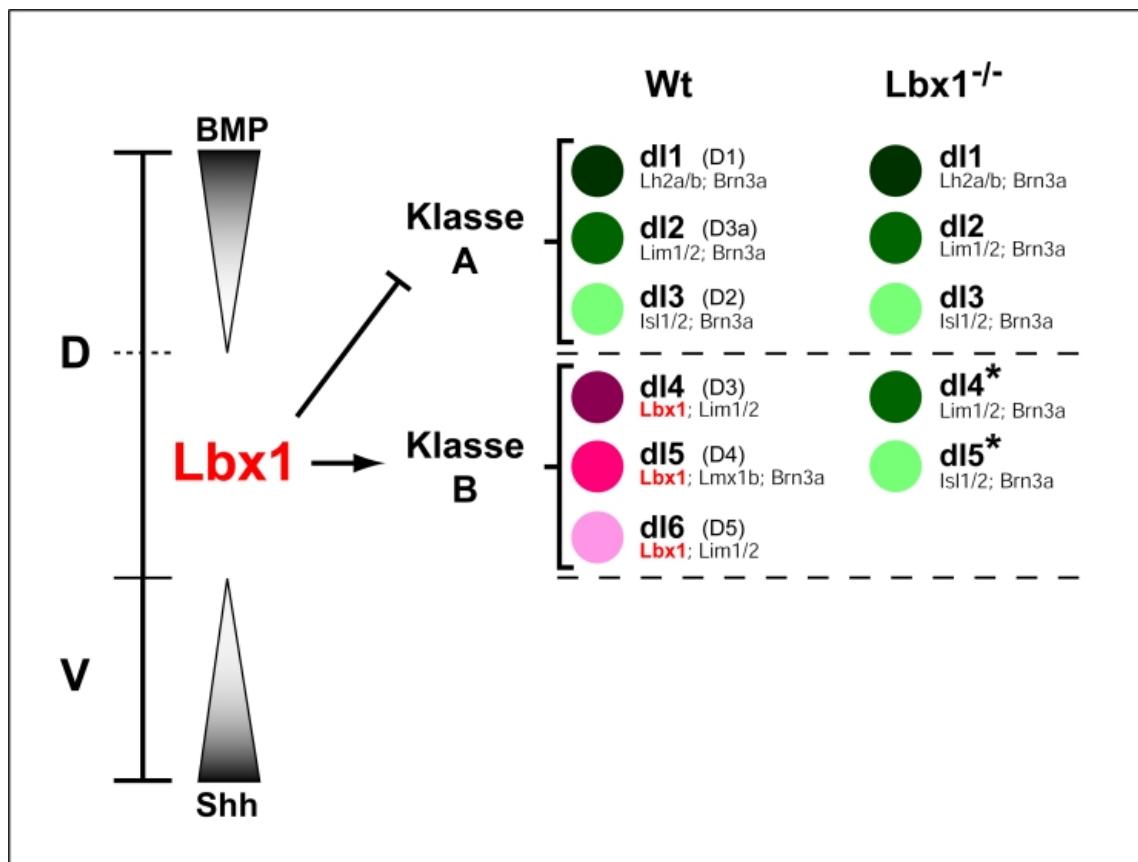


Abb.4.2: Schematische Darstellung der Spezifizierung von Nervenzellen im dorsalen Neuralrohr und der Veränderungen ihres Differenzierungsprogramms in *Lbx1*-Mutanten.

Graduelle BMP- und „Sonic hedgehog“- (Shh) Signale induzieren die Bildung dorsaler (D) bzw. ventraler (V) neuronaler Vorläuferdomänen. Im dorsalen Neuralrohr entwickeln sich daraufhin zwei Klassen neuronaler Subtypen A und B. Gezeigt ist die Position, an der diese Nervenzellen (dI1-dI6) entlang der dorso-ventralen Achse entstehen sowie die charakteristischen Kombinationen von Transkriptionsfaktoren, die sie in Wildtyp- (Wt) Embryonen exprimieren. *Lbx1* reprimiert die Entwicklung von Klasse A Neuronen und spezifiziert Klasse B Neurone. Infolgedessen veränderten die Klasse B Nervenzellen in *Lbx1*-Mutanten ihr Differenzierungsprogramm und exprimierten Transkriptionsfaktoren, die für Klasse A Neurone typisch sind, d.h. sie wechselten ihre Identität (dI4* und dI5*).

Die ektopische Expression von *Lbx1* im Hühner-Embryo zeigte, daß *Lbx1* die Entwicklung von Klasse A Neuronen reprimiert (Müller, Brohmann *et al.*, 2002). Solche antagonistischen Funktionsweisen postmitotischer Homöobox-Faktoren konnten bereits im ventralen Rückenmark nachgewiesen werden. Zum Beispiel induziert Hb9 die Entwicklung von Motorneuronen, reprimiert jedoch die Differenzierung von V2-Interneuronen (Arber *et al.*, 1999). *Evx1*, ein Marker für V0-Interneurone, reprimiert die Bildung von V1-Interneuronen (Moran-Rivard *et al.*, 2001). Die Spezifizierung des Differenzierungsprogramms postmitotischer Neurone durch Repression alternativer

Entwicklungsrichtungen scheint deswegen ein allgemeines Prinzip im embryonalen Rückenmark darzustellen (Briscoe *et al.*, 2000; Gowan *et al.*, 2001).

Lbx1 nimmt eine Schlüsselstellung in der Entwicklung dorsaler Nervenzellen ein. In *Lbx1*^{-/-} Tieren waren viele Aspekte der Differenzierung der Klasse B-Zellen verändert: Die *Lmx1b*-Expression wurde nicht normal initiiert. *Lim1* und *Drg11* wurden zwar unverändert aktiviert, ihre Expression jedoch nicht aufrecht erhalten, und die *Isl1*-Expression wurde ektopisch induziert (Abb.3.16 und 3.17; Müller, Brohmann *et al.*, 2002). Wie bereits geschildert, weisen die Faktoren Evx1 und Hb9 ein ähnlich starkes Potential zur Steuerung der Entwicklung postmitotischer Neurone im ventralen Neuralrohr auf. Andere Homöobox-Transkriptionsfaktoren, wie z.B. En1, besitzen nicht so eine wichtige Bedeutung und der Verlust von En1 in V1-Interneuronen führt nicht zu einem Wechsel der Zellidentität, sondern zu abnormer Faszikulation und Projektion der Axone (Saueressig *et al.*, 1999). Postmitotisch exprimierte Faktoren, wie Lbx1, Evx1 und Hb9, können also einerseits generelle Funktionen im Differenzierungsprogramm übernehmen oder andererseits, wie En1, nur bestimmte Eigenschaften kontrollieren.