

# **Role of CXCR4 and Gab1 in the development of muscle precursor cells**

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

Elena Vasyutina  
aus Kysyl, Russland

Juli, 2005

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

Disputation am 02.11.2005

# TABLE OF CONTENTS

<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1. Generation of the skeletal musculature in vertebrate animals.....</b>	<b>5</b>
<b>1.2. Molecular basis of migrating hypaxial muscle precursor cell development... 7</b>	<b>7</b>
1.2.1. Specification of the precursor pool of hypaxial muscle.....	7
1.2.2. Genes that control delamination of muscle precursor cells .....	8
1.2.3. Genes involved in migration and proliferation of muscle precursor cells.....	8
1.2.4. Differentiation of muscle precursor cells .....	11
<b>1.3. CXCR4 receptor .....</b>	<b>12</b>
1.3.1. CXCR4 structure and downstream components of CXCR4 signaling pathway.....	12
1.3.2. The function of CXCR4 in developing and adult organism .....	14
<b>1.4. The purposes of the project.....</b>	<b>14</b>
<b>2. MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1. Abbreviations.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2. Materials .....</b>	<b>19</b>
2.2.1. Chemicals and enzymes .....	19
2.2.2. Bacterial strains .....	19
2.2.3. Vectors/plasmids .....	19
2.2.4. Cell lines .....	20
2.2.5. Antibodies.....	20
2.2.6. cDNA probes for <i>in situ</i> hybridization .....	20
2.2.7. Mouse strains.....	21
2.2.8. Chicken eggs.....	21
2.2.9. Bacterial and cell culture media.....	21
<b>2.3. Methods.....</b>	<b>23</b>
2.3.1. Extraction and purification of nucleic acids.....	23
2.3.2. Polymerase chain reaction (PCR).....	24
2.3.3. Cell culture .....	28
2.3.4. Generation of <i>Lbx1<sup>GFP</sup></i> mice .....	30
2.3.5. Affymetrix analysis .....	34
2.3.6. COS-1 cell transfection and implantation <i>in ovo</i> .....	34
2.3.7. Phenotype analysis: histology and staining procedures.....	35
<b>3. RESULTS .....</b>	<b>44</b>
<b>3.1. Generation of an <i>Lbx1<sup>GFP</sup></i> mutant allele.....</b>	<b>44</b>
<b>3.2. Isolation and expression profiling of muscle precursor cells from <i>Lbx1<sup>GFP/+</sup></i> and <i>Lbx1<sup>GFP/GFP</sup></i> embryos.....</b>	<b>45</b>
<b>3.3. Analysis of genes expressed in <i>Lbx1<sup>GFP/+</sup></i> muscle precursor cells.....</b>	<b>47</b>

3.4. Analysis of genes differentially expressed in <i>Lbx1</i> <sup>GFP/+</sup> and <i>Lbx1</i> <sup>GFP/GFP</sup> muscle precursor cells .....	50
3.5. Expression of <i>CXCR4</i> its ligand <i>SDF1</i> in mouse and chick embryos.....	53
3.6. <i>CXCR4</i> is expressed in muscle precursors of hypoglossal stream, but not of the limb in <i>Lbx1</i> mutant.....	56
3.7. Ectopic application of <i>SDF1</i> in the chick limb attracts muscle precursor cells and delays their differentiation.....	57
3.8. Loss of <i>CXCR4</i> affects the distribution and the number of muscle precursor cells.....	59
3.9. Effect of <i>CXCR4</i> mutation on the generation of skeletal muscle.....	63
4. DISCUSSION .....	67
4.1. Gene expression profiling of <i>Lbx1</i> <sup>GFP/+</sup> and <i>Lbx1</i> <sup>GFP/GFP</sup> muscle precursor cells .....	67
4.2. <i>Lbx1</i> is not sufficient to control the expression of <i>CXCR4</i> .....	70
4.3. <i>CXCR4</i> is expressed in a subpopulation of migrating muscle precursor cells .....	71
4.4. <i>CXCR4</i> is important for migration and survival of muscle precursor cells..	72
4.5. A genetic interaction of <i>Gab1</i> and <i>CXCR4</i> .....	75
4.6. Outlook .....	76
5. SUMMARY .....	78
ZUSAMMENFASSUNG.....	79
6. REFERENCES.....	80

## 5. Summary

By the use of the microarray technology I have determined the gene expression profile of migrating muscle precursors of *Lbx1*<sup>GFP/+</sup> and *Lbx1*<sup>GFP/GFP</sup> mutant mice. Among the expressed genes, the chemokine receptor *CXCR4* was identified. Expression of *CXCR4* was downregulated in *Lbx1*<sup>GFP/GFP</sup> mutant mice in muscle precursors of the limb, but not in those cells that migrate to the tongue anlage. The *CXCR4* ligand, *SDF1*, is expressed in the mesenchyme of the limb and the first branchial arch, the targets of the migrating cells. In my thesis, I analyzed the function of *CXCR4* signaling in the development of migrating muscle precursors. Gain-of-function experiments of chick embryos demonstrate that SDF1 can provide attractive cues for muscle precursor cells and suppress their differentiation. Analysis of *CXCR4* mutant mice demonstrates changes in the distribution of migrating muscle precursors in the dorsal limb and branchial arches. These changes were accompanied by increased apoptosis, indicating that *CXCR4* signals provide not only attractive cues but control also survival. Furthermore, I found that *CXCR4* and *Gab1* interact genetically. Both *CXCR4* and *Gab1* mutations interfere with appropriate distribution and survival of migrating muscle precursor cells. However, in *CXCR4;Gab1* mutant mice the migrating muscle precursors are affected more strongly than in either of the single mutants. For instance, migrating muscle precursor cells arrive at the anlage of the tongue in *CXCR4* and *Gab1* mutant mice, but fail to reach this site in the *CXCR4;Gab1* double mutant mice. The genetic interaction of *CXCR4* and *Gab1* might reflect a cross-talk between signaling cascades employed by G-protein coupled receptors and tyrosine kinases.

## Zusammenfassung

Das Homeobox Gen *Lbx1* wird ausschliesslich in wandernden Muskelvorläuferzellen, nicht aber in anderen Muskelzellen exprimiert. In meiner Doktorarbeit habe einen Mausstamm, der ein *Lbx1<sup>GFP</sup>* Allel trägt, konstruiert und diesen Tiere benutzt, um GFP+ Muskelvorläuferzellen durch *FACS sorting* zu isolieren. Mittels DNA-Microarray-Technologie erstellte dann ich das Genexpressionsprofil von wandernden Muskelvorläuferzellen aus *Lbx1<sup>GFP/+</sup>* und *Lbx1<sup>GFP/GFP</sup>* Embryonen. So konnte ich bestimmen, dass der Chemokine-Rezeptor CXCR4 in Muskelvorläuferzellen von *Lbx1<sup>GFP/GFP</sup>* mutanten Mäusen schwächer exprimiert ist als in den Zellen der *Lbx1<sup>GFP/+</sup>* Kontrolltiere.

SDF1, der Ligand von CXCR4 in den Zielgebieten der wandernden Muskelvorläuferzellen, dem Mesenchym der Extremitäten und Branchialbögen exprimiert. "Gain-of-function" Experimente an Hühnerembryonen zeigen, dass SDF1 als chemoattraktives Signal für Muskelvorläuferzellen wirkt und eine Differenzierung der Zellen verhindert. In CXCR4 mutanten Mäusen ist die Verteilung der Muskelvorläuferzellen in den dorsalen Extremitäten und den Branchialbögen fehlerhaft. Diese Änderung geht mit einer verstärkten Apoptoserate einher. Dies zeigt, dass CXCR4 sowohl für die Wanderung, als auch für das Überleben der Muskelvorläuferzellen eine Rolle spielt.

Zudem konnte ich in meiner Arbeit eine genetische Interaktion zwischen CXCR4 und *Gab1* nachweisen. Sowohl die CXCR4 als auch die *Gab1* Mutation führt zu einem veränderten Verteilung und einer erhöhten Apoptose der Muskelvorläuferzellen. Allerdings ist in *CXCR4;Gab1* doppelmutanten Mäusen die Wanderung der Muskelvorläufer stärker beeinträchtigt als in den jeweiligen Einzelmutanten. Zum Beispiel wandern Muskelvorläufer in *CXCR4;Gab1* doppelmutanten Mäusen nicht in die Zungenanlage ein, während dies für Muskelvorläuferzellen in *CXCR4* bzw. *Gab1* mutanten Mäusen der Fall ist. Diese genetische Interaktion zwischen *CXCR4* und *Gab1* deutet auf eine Interaktion der Signalkaskaden von G-Protein gekoppelten Rezeptoren und Tyrosinkinaserzeptoren hin.