

**Lbx1 in der Mausentwicklung:
Kontrolle der Migration von Muskelvorläuferzellen
und der Spezifizierung von Neuronen im Rückenmark**

Im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin eingereichte Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von

Henning Brohmann

aus Celle

2002

Referentin:

PD Dr. Carmen Birchmeier

Korreferent:

Prof. Dr. Ferdinand Hucho

Disputation:

14.10.02

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Der Homöobox-Transkriptionsfaktor Lbx1	1
1.2 Die Entwicklung der Skelettmuskulatur bei Wirbeltieren	2
1.3 Die genetische Kontrolle der Entwicklung migrierender hypaxialer Muskelvorläuferzellen	4
1.3.1 Pax3 und die Bildung der hypaxialen Muskelvorläuferzellpopulation	4
1.3.2 SF/HGF und c-Met: Kontrolle der Delamination hypaxialer Muskelvorläuferzellen und Bedeutung für die Skelettmuskelentwicklung	5
1.3.3 Kontrolle von Determination und Differenzierung migrierender Muskelvorläuferzellen durch myogene Regulationsfaktoren (MRFs)	7
1.4 Neuronale Organisation und Etablierung dorso-ventraler Polarität im embryonalen Rückenmark	8
1.5 Ziele der vorliegenden Arbeit	12
2. MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 Material	13
2.1.1 Bakterienstämme	13
2.1.2 Vektoren	13
2.1.3 Genomische <i>PI</i> -Phagen Bibliothek	13
2.1.4 Zelllinie	14
2.1.5 Mausstämme	14
2.1.6 Nährmedien	14
2.1.7 Zellkulturmedien	14
2.2 Methoden	16
2.2.1 Isolierung von Desoxyribonukleinsäuren	16
2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten	16
2.2.1.2 Isolierung genomischer DNA aus ES-Zellen	16
2.2.1.3 Isolierung genomischer DNA aus embryonalem Gewebe, Ohrhöchern bzw. Schwanzstücken	17
2.2.2 Restriktionsverdauung von Desoxyribonukleinsäuren und Transformation kompetenter Bakterien	17
2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	17
2.2.4 Sequenzierung	21
2.2.5 Radioaktive Markierung von Desoxyribonukleinsäuren	21
2.2.6 <i>In vitro</i> -Transkription	22
2.2.6.1 Synthese radioaktiv markierter <i>in vitro</i> -Transkripte	22
2.2.6.2 Synthese Digoxigenin-markierter <i>in vitro</i> -Transkripte	23
2.2.7 Southern-Hybridisierung	23
2.2.8 Zellkultur	23
2.2.8.1 Präparation und Kultur primärer embryonaler Fibroblasten	23
2.2.8.2 Kultur, Transfektion und Selektion embryonaler Stammzellen	25
2.2.9 Etablierung von „Knockout“-Mäusen	26
2.2.9.1 Superovulation und Isolierung von Blastozysten	26
2.2.9.2 Injektion embryonaler Stammzellen in Blastozysten (nach Bradley und Robertson, 1986)	27
2.2.9.3 Uterustransfer von Blastozysten	27
2.2.10 Histologische Methoden	28
2.2.10.1 Herstellung von Methacrylatschnitten	28
2.2.10.2 Hämatoxylin/Eosin-Färbung von Methacrylatschnitten	28
2.2.10.3 Toluidin Blau O-Färbung von Methacrylatschnitten	29
2.2.10.4 Herstellung von Gefrierschnitten	29
2.2.10.5 β -Galaktosidase-Färbung	30
2.2.10.6 Immunhistologie auf Gewebeschnitten	30

2.2.10.7	Detektion von Zellproliferation und Apoptosen	31
2.2.10.8	Herstellung von Vibratomschnitten	31
2.2.11	<i>In situ</i> -Hybridisierung	32
2.2.11.1	Radioaktive <i>in situ</i> -Hybridisierung auf Gewebeschnitten (nach Wilkinson, 1992)	32
2.2.11.2	Whole Mount <i>in situ</i> -Hybridisierung	33
2.2.11.3	Präparation von Embryo-Pulver	35
3.	ERGEBNISSE	36
3.1	Analyse der Funktion von <i>Lbx1</i> in der Mausentwicklung	36
3.1.1	Isolierung des genomischen <i>Lbx1</i> -Locus	36
3.1.2	Konstruktion des <i>Lbx1</i> -Targeting-Vektors	37
3.1.3	Inaktivierung des <i>Lbx1</i> -Gens in embryonalen Stammzellen und Etablierung der <i>Lbx1</i> „knockout“-Mauslinie	39
3.2	Phänotypische Analyse der <i>Lbx1</i>-Mutation	40
3.2.1	Bedeutung von <i>Lbx1</i> für die Wanderung von Muskelvorläuferzellen	40
3.2.2	Differenzierung der wandernden Muskelvorläuferzellen in <i>Lbx1</i> -mutanten Embryonen	44
3.2.3	Skelettmuskeldefekte in <i>Lbx1</i> -mutanten Mäusen	45
3.3	<i>Lbx1</i> als Komponente einer genetischen Hierarchie zur Kontrolle der Entwicklung wandernder Muskelvorläuferzellen	48
3.3.1	Vergleich der Entwicklung des Dermomyotoms in <i>SF/HGF</i> -, <i>c-Met</i> - und <i>Pax3</i> -mutanten Embryonen	48
3.3.2	Einfluß des <i>SF/HGF/c-Met</i> -Signalsystems auf Wachstum und Überleben der Muskelvorläuferzellen	50
3.3.3	Expression von <i>SF/HGF</i> entlang der Wanderungswege der Muskelvorläuferzellen	51
3.3.4	Das Wanderungsverhalten von Muskelvorläuferzellen in <i>Gab1</i> ^{-/-} Embryonen	53
3.4	Die Funktion von <i>Lbx1</i> in der Neurogenese	55
3.4.1	Die Expression von <i>Lbx1</i> in verschiedenen dorsalen Nervenzelltypen des embryonalen Rückenmarks	55
3.4.2	Die Entwicklung von dI5- und dIL ^B -Neuronen in <i>Lbx1</i> -mutanten Mäusen	59
3.4.3	Die Entwicklung von dI4- und dIL ^A -Neuronen in <i>Lbx1</i> -mutanten Mäusen	63
4.	DISKUSSION	65
4.1	Die Funktion von <i>Lbx1</i> in der Maus-Entwicklung	65
4.1.1	Gezielte Mutation des <i>Lbx1</i> -Gens	65
4.1.2	Bedeutung von <i>Lbx1</i> für die Migration von Muskelvorläuferzellen	66
4.1.3	<i>Lbx1</i> und die Differenzierung hypaxialer Muskelvorläuferzellen	68
4.2	Kontrolle der Delamination migrierender Muskelvorläuferzellen durch das <i>SF/HGF/c-Met</i>-Signalsystem	69
4.3	<i>Gab1</i> als essentielle Komponente für die Weiterleitung des <i>c-Met</i>-Signals	72
4.4	Die genetische Hierarchie zur Kontrolle der Entwicklung migrierender Muskelvorläuferzellen	73
4.5	Spezifizierung der <i>Lbx1</i>-Nervenzellen im dorsalen Neuralrohr	76
4.6	Veränderungen im Differenzierungsprogramm dorsaler Neurone in <i>Lbx1</i>-Mutanten	78
5.	ZUSAMMENFASSUNG - SUMMARY	81
6.	LITERATURVERZEICHNIS	83

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
BrdU	5-Brom-2'-desoxy-Uridin
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
cpm	"counts per minute"
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindoldihydrochlorid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddH ₂ O	Aqua bidestillata
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Embryonalstadium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis (β -Aminoethyläther)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
F	Farad
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
G418	Geneticin
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter

LIF	"Leukemia Inhibitory Factor"
M	Molar
mA	Milliampère
mCi	Millicurie
MEM	„Modified Eagle Medium“
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
μ M	Mikromolar
mRNA	"Messenger" Ribonukleinsäure
NaAc	Natriumacetat
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
PCR	"Polymerase Chain Reaction"
PBS	"Phosphate Buffered Saline"
p.c.	post coitum
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potentium hydrogenii</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	"rotations per minute"
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SSC	"Standard Saline Citrate"
SDS	Natriumdodecylsulfat
t	Zeit
TBS	"Tris Buffered Saline"
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
U	"unit" (= Enzymeinheit)
UTP	Uraciltriphosphat
V	Volt
Vol.	Volumen
W	Watt
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid

5. Zusammenfassung

Der Homöobox-Transkriptionsfaktor *Lbx1* wird in der Embryonalentwicklung ausschließlich in migrierenden Muskelvorläuferzellen und im Rückenmark exprimiert. Um die Funktion von *Lbx1* in der Myogenese und der Spezifizierung von Nervenzellen im Rückenmark zu untersuchen, wurde in dieser Dissertation das *Lbx1*-Gen in der Maus gezielt inaktiviert. Hierzu wurden zunächst genomische *Lbx1*-Sequenzen isoliert, die daraufhin zur Konstruktion des Targeting-Vektors dienten. Mit Hilfe dieses Konstrukts wurde das *Lbx1*-Gen in embryonalen Stammzellen mutiert und nachfolgend eine *Lbx1*-mutante Mauslinie etabliert. Heterozygote *Lbx1*-Mäuse zeigten keinen Phänotyp, während homozygote *Lbx1*-Mutanten nicht lebensfähig und durch eine abnorme Entwicklung der Extremitätenmuskulatur gekennzeichnet waren. Die weitergehende Analyse ergab, daß wandernde Muskelvorläuferzellen zwar in *Lbx1*-Mutanten gebildet wurden, die Skelettmuskeldefekte jedoch eine Folge der aberranten Migration dieser Zellpopulation darstellten, da die Zellen bestimmte Zielorte nicht fanden.

Darüber hinaus wurden regulatorische Beziehungen zwischen *Lbx1*, dem Pairedbox-Transkriptionsfaktor *Pax3* und dem Tyrosin-Kinase-Rezeptor *c-Met* untersucht. Diese Gene werden ebenfalls in Muskelvorläuferzellen exprimiert und besitzen wichtige Funktionen in der Myogenese. *Pax3* spezifiziert die Muskelvorläuferzellen und agiert in der genetischen Hierarchie oberhalb von *c-Met* und *Lbx1*. *c-Met* und sein Ligand SF/HGF steuern die Delamination der Zellen aus dem Dermomyotom und für die Weiterleitung des *c-Met*-Signals *in vivo* ist das Adapterprotein *Gab1* essentiell.

Im dorsalen Rückenmark können anhand der *Lbx1*-Expression zwei Klassen post-mitotischer Nervenzellen definiert werden. Die Klasse A Neurone der Subtypen dI1-dI3 exprimieren *Lbx1* nicht und ihre Bildung wird durch dorsale Signale dirigiert. Dagegen entwickeln sich die *Lbx1*-positiven dI4-dI6-Subtypen der Klasse B unabhängig von diesen instruktiven Einflüssen. In *Lbx1*-Mutanten veränderten die Neurone der Klasse B ihr Differenzierungsprogramm und nahmen stattdessen die Identität von Klasse A Neuronen an. *Lbx1* kontrolliert daher die Spezifizierung von Nervenzellen im dorsalen Rückenmark, die im adulten Organismus wichtige Funktionen bei der Verarbeitung sensorischer Information übernehmen.

Summary

The homeodomain transcription factor Lbx1 is exclusively expressed in migrating myogenic precursor cells and in the dorsal spinal cord during embryonic development. In order to determine the function of Lbx1 in myogenesis and spinal cord development, the *Lbx1* gene was inactivated in the mouse by gene targeting. Genomic *Lbx1* sequences were isolated and used to construct a targeting vector. This construct allowed the mutation of *Lbx1* by homologous recombination in embryonic stem cells and the establishment of a *Lbx1* mutant mouse strain. Heterozygous *Lbx1* mice displayed no overt phenotype, whereas homozygous *Lbx1* mutants died shortly after birth and showed an abnormal limb musculature. Further analysis demonstrated, that muscle precursor cells were formed in *Lbx1* mutants, but migrated aberrantly and were unable to respond or interpret guidance cues that direct them towards their target sites.

The expression of *Lbx1*, *Pax3* and *c-Met* overlap in muscle progenitor cells. Analysis of the corresponding mutant mice revealed that *Pax3* controls formation and specification of these cells and functions on top of a genetic hierarchy that controls the development of migrating myogenic precursor cells. *c-Met* and its ligand SF/HGF are essential for the delamination of this myogenic progenitor population from the dermomyotome. In addition, the adaptor protein Gab1 is essential for the transmission of the *c-Met* signal *in vivo*.

Lbx1 expression distinguishes two classes of postmitotic neurons in the dorsal spinal cord. The formation of class A neurons, which consist of the dI1-dI3 subtypes, is directed by dorsal instructive signals and these cells do not express *Lbx1*. In contrast, the Lbx1 positive class B neurons of the dI4-dI6 subtypes develop independently of instructive dorsal signals. In *Lbx1* mutant mice, class B neurons change their differentiation program and adapt the identities of class A neurons. Therefore Lbx1 controls the specification of spinal cord neurons, which mature into dorsal interneurons and function as the first central relay station for somatosensory perception.