



Die Rolle des Bindegewebs-spezifischen Transkriptionsfaktors Odd skipped-related (Osr1) in der Musterbildung der Muskulatur

Die korrekte Musterbildung der verschiedenen Komponenten des muskuloskeletalen Systems, d.h. von Muskel, Bindegewebe (inklusive Sehnen, Ligamenten und Muskelbindegewebe) und skeletalen Elementen ist essentiell für die Fähigkeit zur Fortbewegung. Dieses aus mehreren Komponenten bestehende System erfordert eine koordinierte Morphogenese während der Entwicklung. Dabei ist es erforderlich, dass die einzelnen sich entwickelnden Gewebe nach einem präzisen zeitlichen und räumlichen Plan miteinander interagieren und kommunizieren um eine exakte endgültige Organisation zu erreichen. Das Bindegewebe wie auch das Skelett der Extremitäten entsteht während der Embryogenese aus Zellen des Seitenplattenmesoderms, während die Muskel-Vorläuferzellen und damit die gesamte spätere Muskulatur dem paraxialen Mesoderm, genauer den Somiten, entstammen. Klassische embryologische wie auch genetische Studien suggerieren, dass die myogenen Zellen selbst keinerlei Information darüber besitzen, zu welchen Muskelgruppen sie wann beitragen. Es wird vielmehr davon ausgegangen, dass die umgebenden Muskel-Bindegewebszellen die instruktiven Information beisteuern, die die Proliferation, Differenzierung und endgültige Musterbildung der Muskeln bestimmen.

Das Osr1 (Odd skipped-related 1) Gen kodiert für einen Zink-Finger Transkriptionsfaktor der im Muskel-Bindegewebe der Extremität im Huhn wie auch in der Maus exprimiert ist. Das Ziel dieser Arbeit war, die Funktion von Osr1 in der nicht-Zell-autonomen Regulation der Muskelentwicklung in der Extremität der Maus zu analysieren.

Die detaillierte Analyse der Osr1 Expression in der Mausentwicklung wurde mit Hilfe eines Osr1 Reporterallels durchgeführt, bei welchem GFP unter Kontrolle des endogenen Osr1 Locus exprimiert wird (Osr1GCE/+). Dies zeigte eine frühe Expression von Osr1 in mesenchymalen Zellen der Extremität innerhalb der frühen Muskelmassen und später in Zellen zwischen Muskelfasern. Dabei war Osr1 stets in Zellen mit engem Kontakt zu myogenen Zellen exprimiert, jedoch nie in myogenen Zellen selbst. Mit Hilfe einer vom Osr1 Locus exprimierten induzierbaren Cre Rekombinase (CreERT2 Gen im Osr1GCE Allel), was eine stabile genetische Markierung der Osr1 Zellpopulation zu einem bestimmten Zeitpunkt erlaubt, wurde eine Analyse der Osr1 Zelllinie durchgeführt. Dies zeigte, dass Osr1 Zellen Vorläufer für verschiedene Arten von Bindegewebe sind, darunter das Muskelbindegewebe, das Bindegewebe der Dermis oder retikuläre Fibroblasten der Lunge. Außerdem wurde gefunden, dass Osr1 Zellen Vorläufer für glatte Muskelzellen darstellen und, überraschenderweise, auch für braune Fettzellen.

Eine comprehensive Analyse des Muskelphänotyps in Osr1-defizienten Mäusen (Osr1GCE/GCE) mit Hilfe von Immunfärbungen und 3-dimensionaler Rekonstruktion zeigte klare Defekte in der lokalen Musterbildung. Mehrere Muskeln der Extremität zeigten trunkationsartige Phänotypen, wobei die myogenen Vorläuferzellen offenbar nicht in der Lage waren, ihre normalen Bestimmungspunkte zu erreichen. Der Musterbildungsdefekt trat in Kombination mit desorganisierten und deformierten Muskelfasern auf. Durch eine Transkriptomanalyse via RNA deep sequencing (RNA-Seq) von FACS-isolierten Osr1

exprimierenden Zellen aus Osr1^{GCE/+} und Osr1^{GCE/GCE} Embryos zeigte, dass zwei Hauptaspekte durch das Fehlen von Osr1 betroffen waren. Zum einen wird Osr1 benötigt, um die Aktivität von Genen zu reprimieren, die mit der Entwicklung von Knorpel- und Sehnenzellen assoziiert sind, was suggeriert, dass Osr1 an der Festlegung einer zellulären „Bindegewebsidentität“ in den mesenchymalen Vorläufern der Extremität beteiligt ist. Zweitens wird Osr1 benötigt, um Gene der muskulären extrazellulären Matrix zu aktivieren. Die Expression von Collagen Genen war in der Osr1 Mutante deutlich herunterreguliert, sowohl in der RNA-Seq als auch in unabhängigen Messungen via quantitativer real-time PCR (qRT-PCR). Durch Immunfärbungen wurde eine Herunterregulation von Collagen typ VI (COLVI) in Osr1^{GCE/GCE} Embryos auf Proteinebene bestätigt. COLVI ist eines der wichtigsten nicht-fibrillären Collagene und ist für die Integrität von Muskelfasern essentiell. Außerdem wurde durch Immunfärbungen festgestellt, dass das Muskel-Bindegewebe desorganisiert war und eine reduzierte Einlagerung von Fibronectin aufwies. Dies war begleitet durch eine Reduktion von Vinculin, einer Komponente von Focal Adhesion Komplexen. Dies deutet auf eine beeinträchtigte Anheftung der Muskelfasern an die extrazelluläre Matrix via Focal Adhesions hin. Dies resultierte schließlich in einem Stabilitätsverlust der Muskelfaser, was durch einen Verlust an N-Cadherin und einen teilweisen Verlust der Muskelfaser-Basallamina reflektiert wurde. Zusätzlich zu einer Reduktion der Matrixkomponenten zeigte die RNA-Seq Analyse eine Herunterregulation von zahlreichen Signalmolekülen in Osr1⁺ Zellen aus Osr1^{GCE/GCE} Embryos. So war in Osr1-defizienten Zellen das Chemokin Cxcl12, das durch frühere Studien bereits in Migration und Aufrechterhaltung der myogenen Zellpopulation involviert wurde, von frühen Stadien an signifikant herunterreguliert. Darüber hinaus war die aktivierte Form der mitogen-activated protein kinase ERK (pERK), die durch die Bindung von Cxcl12 an seinen Rezeptor Cxcr4 aktiviert werden kann, in den Muskelmassen der Extremität in Osr1 Mutanten reduziert. Entsprechend zeigten myogene Progenitoren in Osr1 Mutanten eine abnormale Lokalisierung, eine reduzierte Proliferation sowie erhöhte Apoptoseraten.

Zusammengenommen zeigen diese Daten eine funktionelle Rolle der Osr1 Bindegewebs-Zellpopulation im Prozess der Muskelentwicklung der Säugetier-Extremität. Osr1 scheint in diesem Zusammenhang die Transkription von extrazellulären Matrix Komponenten positiv zu regulieren, die für eine korrekte Entwicklung und Aufrechterhaltung der Muskulatur essentiell sind. Schließlich suggerieren die Daten, dass Osr1 einen Teil seiner Funktion auch darüber bewerkstelligt, Chemokine und andere sekretierte Faktoren zu induzieren, welche auf die Muskel-Vorläuferzellen einwirken. Insgesamt scheint Osr1 also daran beteiligt zu sein, an bestimmten Positionen der Extremität eine pro-myogene Umgebung für die Muskelvorläufer zu generieren und dadurch die Musterbildung der Muskeln zu bestimmen.