

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Analyse der Funktion von *Lbx1* in der Mausentwicklung**

Der Homöobox-Transkriptionsfaktor *Lbx1* wird in der Embryogenese spezifisch in wandernden Muskelvorläuferzellen und im dorsalen Rückenmark exprimiert (Jagla *et al.*, 1995). Um die Funktion von *Lbx1* in der Myogenese und der neuronalen Entwicklung des Rückenmarks zu untersuchen, wurde eine Mauslinie etabliert, in der gezielt das *Lbx1*-Gen ausgeschaltet wurde.

##### **3.1.1 Isolierung des genomischen *Lbx1*-Locus**

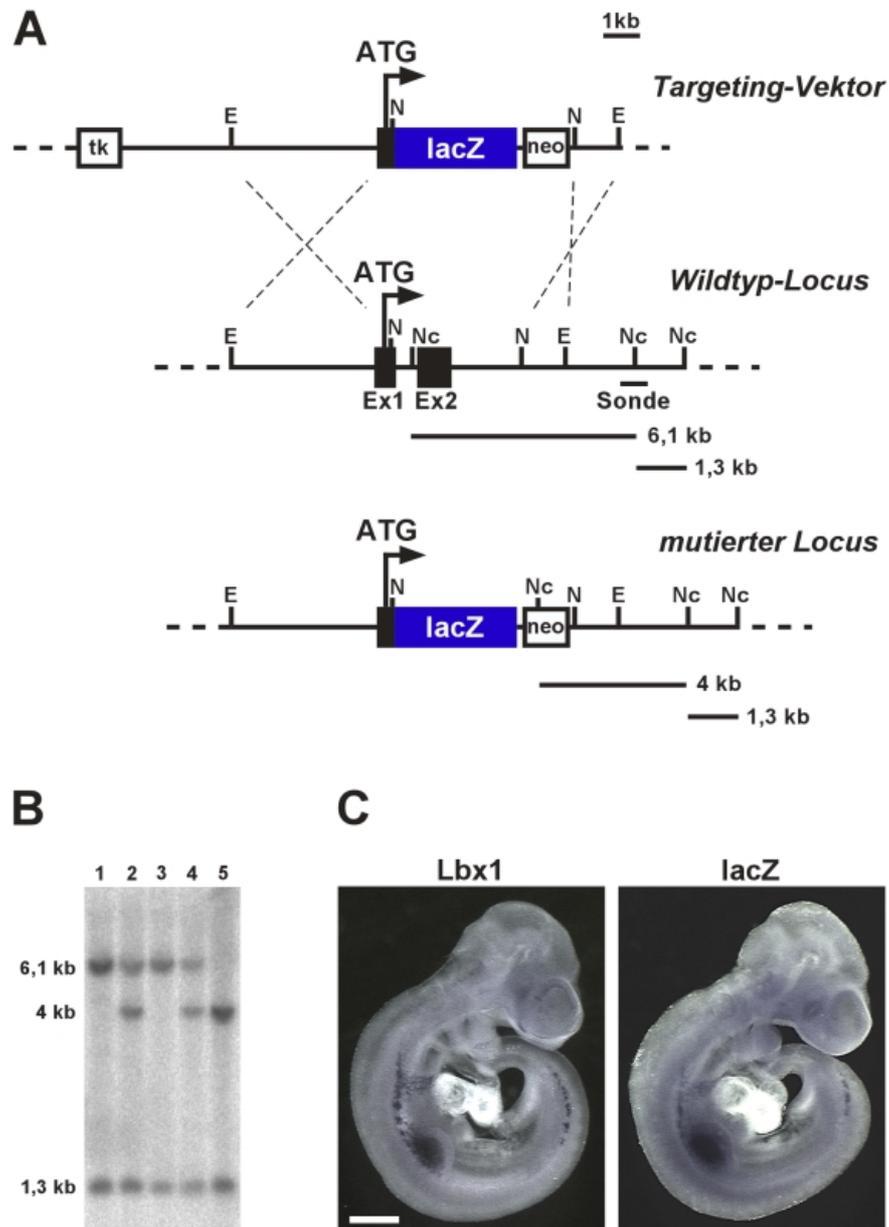
Zur Konstruktion des Targeting-Vektors für die Inaktivierung des *Lbx1*-Gens mußte der genomische *Lbx1*-Locus isoliert werden. Hierfür wurde zunächst auf genomischer DNA mit den Primern *lbx1*/HB20 und *lbx1*/HB23 eine *Lbx1*-spezifische PCR etabliert (siehe 2.2.3). Anschließend identifizierte die Firma Genome Systems Inc. (St. Louis, MO, USA; jetzt: Incyte Genomics Inc.) mit Hilfe dieser Primer zwei *Lbx1*-Klone aus ihrer genomischen *P1*-Phagen-Bibliothek (*P1* ES 129/Ola; Sternberg und Cohen, 1989). Beide *P1*-Klone wurden mittels Restriktionsendonukleasen und Southern-Hybridisierung kartiert (siehe 2.2.2 und 2.2.7). Dabei diente die grobe genomische Restriktionskarte des *Lbx1*-Locus der Maus von Krzysztof Jagla als Anhaltspunkt (Jagla *et al.*, 1995). Es stellte sich heraus, daß lediglich einer der beiden Klone den gewünschten *Lbx1*-Locus komplett enthielt. Von diesem Klon wurde ein etwa 10kb großes EcoRI/EcoRI- und ein ca. 13kb HindIII/HindIII-Fragment subkloniert, die überlappende Sequenzen und jeweils beide Exons des *Lbx1*-Gens aufweisen. Durch Sequenzierung (siehe 2.2.4) und Restriktionsanalysen weiterer Teilfragmente konnte eine genauere Restriktionskarte des Locus erstellt werden. Die im folgenden beschriebenen Subklone enthalten Teilfragmente der beiden großen genomischen Klone.

### 3.1.2 Konstruktion des *Lbx1*-Targeting-Vektors

Ein Targeting-Vektor zur gezielten Mutation von Genen in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Maus enthält üblicherweise zwei dem Zielgen homologe Bereiche sowie eine *Neomycin*- und eine *Thymidinkinase*-Genkassette. Das *Neomycin*-Gen liegt innerhalb der homologen genomischen Sequenzen und wird mit dem Targeting-Vektor in das Genom der ES-Zelle integriert. Es ermöglicht eine Positiv-Selektion, indem es der ES-Zelle eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Geneticin (= G418) verleiht. Das *Thymidinkinase*-Gen liegt dagegen im Targeting-Vektor 5' oder 3' von den homologen genomischen Sequenzen. Es ist deshalb nur bei zufälliger, nicht-homologer Integration des Vektors in der Zelle vorhanden und wird zur Negativ-Selektion von unspezifischen Integrationsereignissen eingesetzt. ES-Zellen, die das *Thymidinkinase*-Gen integriert haben, sterben nach Zusatz des mutagenen Nukleosidanalogons Gancyclovir, weil sie es phosphorylieren und in ihre DNA einbauen können. Durch die Doppelselektion mit G418 und Gancyclovir können ES-Zellen, in denen die transfizierte DNA homolog integriert wurde, signifikant angereichert werden (Thomas und Capecchi, 1987; Mansour *et al.*, 1988).

Als Grundgerüst des *Lbx1*-Targeting-Vektors diente das Plasmid pTV-0-nls lacZ-floxed neo (siehe 2.1.2). Dieses Plasmid enthält neben dem *Neomycin*-Resistenzgen das *Thymidinkinase*- und das bakterielle *lacZ*-Reporter gen mit Kernlokalisations signal (nls = „nuclear localization signal“, siehe Abb.3.1 A). Ein 4,5kb großes genomisches EcoRI/NotI *Lbx1*-Fragment wurde als 5'-homologe Sequenz verwendet. Dieses Fragment weist am 3'-Ende das ATG-Startcodon und die ersten 180bp aus dem Exon1 des *Lbx1*-Gens auf. Daran wurde das *lacZ*-Gen im *Lbx1*-Leseraster fusioniert. Das *lacZ*-Gen codiert für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase, deren Aktivität durch eine Farbreaktion nachweisbar ist (siehe 2.2.10.5). Deshalb wird dieses Gen häufig als Reporter verwendet, und es sollte die Identifizierung der Genexpression des mutierten *Lbx1*-Locus gestatten. Alle weiteren *Lbx1*-codierenden Sequenzen inklusive der Homöobox wurden deletiert. An das *lacZ*-Gen schloß sich das *Neomycin*-Gen an, das von loxP-Sequenzen flankiert war, um das Entfernen des *Neomycin*-Gens mit Hilfe der Cre-Rekombinase zu ermöglichen. Ein 1,2kb großes genomisches NotI/EcoRI *Lbx1*-Fragment wurde als zweite homologe Sequenz eingesetzt. An seinem 3'-Ende erfolgte die Insertion einer PmeI-Restriktions-

schnittstelle, die zur Linearisierung des Targeting-Konstruktes vor der Transfektion in die ES-Zellen diene.



**Abb.3.1: Strategie zur Mutagenese des *Lbx1*-Gens.**

(A) Schematische Darstellung des Targeting-Vektors (oben), der genomischen Struktur des Wildtyp *Lbx1*-Locus (Mitte) und des mutierten *Lbx1*-Allels (unten). Die Exons 1 und 2 sind schwarz und das *lacZ*-Reportergen blau eingezeichnet. Die Positionen von *Neomycin*- und *Thymidinkinase*-Gen sind angegeben. Die Lage der *Lbx1*-Sonde, die zur Southern-Hybridisierung verwendet wurde, und die Größen von Wildtyp- bzw. mutanten Fragmenten, die nach *NcoI*-Restriktionsverdau erhalten wurden, sind dargestellt. Die *EcoRI*- (E), *NcoI*- (Nc) und *NotI*- (N) Restriktionsschnittstellen sind ebenso wie das *Lbx1*-Initiationscodon (ATG) markiert. (B) Southern-Blot-Analyse von genomischer Wildtyp- (Spur 1) und *Lbx1*<sup>+/-</sup> ES-Zell-DNA (Spur 2), sowie von Wildtyp- (Spur 3), *Lbx1*<sup>+/-</sup> (Spur 4) und *Lbx1*<sup>-/-</sup> Tieren (Spur 5) nach *NcoI*-Restriktionsverdau. (C) *In situ*-Hybridisierung eines Wildtyp- (links) und *Lbx1*<sup>+/-</sup> Embryos (rechts) mit einer *lacZ*-spezifischen Sonde. Der Balken entspricht 500µm.

### 3.1.3 Inaktivierung des *Lbx1*-Gens in embryonalen Stammzellen und

#### Etablierung der *Lbx1* „knockout“-Mauslinie

Der *Lbx1*-Targeting-Vektor wurde mit *PmeI* linearisiert und in E14.1 ES-Zellen elektroporiert (siehe 2.2.8.2). Nach Doppelsektion mit G418 und Gancyclovir wurden resistente ES-Zellklone isoliert und mittels Southern-Hybridisierung auf homologe Rekombination getestet. Als Sonde diente dabei ein 750bp *XbaI/XbaI*-Fragment des *Lbx1*-Locus, das nicht im Targeting-Konstrukt vorhanden war. Unter den 681 analysierten Stammzellklonen befanden sich drei mit homolog integriertem Konstrukt (#115, #153 und #158). Dies entspricht einer Rekombinationsfrequenz von 0,4%. Die ES-Klone sind heterozygot für das mutierte *Lbx1*-Gen (*Lbx1*<sup>+/-</sup>).

Die drei *Lbx1* ES-Zellklone #115, #153 und #158 wurden in Blastozysten von C57Bl/6J-Weibchen injiziert (siehe 2.2.9.2), die anschließend in scheinchwangere CB6F1-Weibchen transferiert wurden (2.2.9.3). Die verwendeten ES-Zellen stammten aus dem 129/Ola Mausstamm mit gelblicher Fellfarbe (agouti), während C57Bl/6J Tiere schwarz sind. Alle drei Klone konnten zu somatischen Zellen in chimären Tieren beitragen. Der Beitrag von ES-Zellen zum somatischen Gewebe ist in solchen Tieren im allgemeinen variabel und kann anhand der Fellfarbe erkannt werden. Die Wahrscheinlichkeit, daß ES-Zellen zur Keimbahn beitragen, korreliert dabei häufig mit dem Beitrag zu somatischen Zellen. Zur Etablierung der *Lbx1*-Mauslinie wurden deshalb Männchen ausgewählt, von denen anhand der Fellfarbe erwartet wurde, daß die ES-Zellen einen hohen Beitrag zu somatischen Geweben leisteten. Diese wurden mit schwarzen C57Bl/6J-Weibchen verpaart. Bei Keimbahngängigkeit der Mutation, d.h. der Weitergabe der genetischen Information der ES-Zellen an die Folgegeneration, resultiert eine braune Fellfarbe der F1-Nachkommen, die aus der Anwesenheit der Erbinformation beider Stämme, der C57Bl/6J (schwarz) und 129/Ola (agouti) Elterntiere, resultiert.

Alle fünf chimären Männchen, die durch Injektion des ES-Zellklons #115 erhalten wurden, gaben das veränderte *Lbx1*-Allel an ihre Nachkommen weiter. Von den neun Männchen des Klons #153 waren es jedoch lediglich drei und von den sechs Männchen des Klons #158 ebenfalls nur drei. Das Vorhandensein des mutierten *Lbx1*-Allels wurde routinemäßig mit PCR überprüft (siehe 2.2.3) und zu Beginn zusätzlich mit Hilfe der

genomischen Southern-Hybridisierung verifiziert (siehe 2.2.7 und Abb.3.1 B). Heterozygote *Lbx1*-mutante Tiere waren lebensfähig, fertil und zeigten keinen Phänotyp.

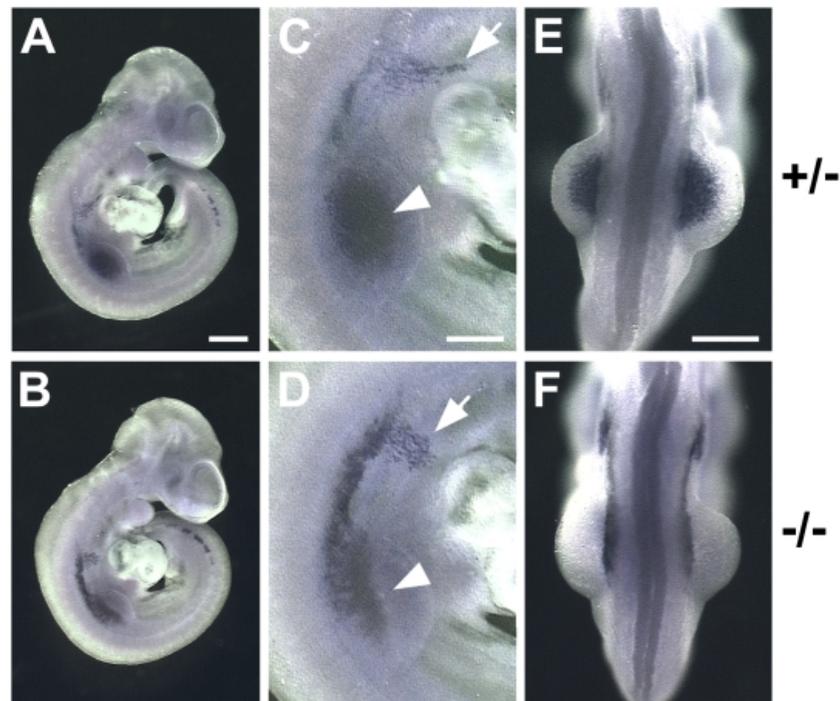
### 3.2 Phänotypische Analyse der *Lbx1*-Mutation

Aus der Verpaarung heterozygoter *Lbx1*-Mäuse gingen homozygot mutante *Lbx1*-Tiere hervor. In diesen Tieren waren beide *Lbx1*-Allele funktionsunfähig, das bakterielle *lacZ*-Reportergen wurde aber unter der Kontrolle des *Lbx1*-Promotors exprimiert. Die *Lbx1*<sup>-/-</sup>-Tiere wurden mit der nach Gregor Mendel erwarteten Wahrscheinlichkeit von 25% geboren, starben jedoch kurz nach der Geburt. Diese Neugeborenen fielen gegenüber Wildtyp-Tieren durch eine leicht gekrümmte Körperhaltung, durch erheblich dünnere Extremitäten, die charakteristische abgewinkelte Position der Vorderbeine und die eingeschränkte Beweglichkeit der Extremitäten auf. Darüber hinaus behielten die homozygoten *Lbx1*-Mutanten die dunkelrot/bläuliche Färbung der späten Embryonalstadien. Erste histologische Untersuchungen zeigten, daß die Lungen nicht vollständig entfaltet waren, die Tiere also nie normal geatmet hatten. Im weiteren wurde der Phänotyp der *Lbx1*-Mutation an Tieren bestimmt, die während der intrauterinen Entwicklung isoliert wurden.

#### 3.2.1 Bedeutung von *Lbx1* für die Wanderung von Muskelvorläuferzellen

Das spezifische *Lbx1*-Expressionsmuster in wandernden Muskelvorläuferzellen und die dünnen Extremitäten der neugeborenen *Lbx1*<sup>-/-</sup>-Mäuse deuteten auf eine Funktion von *Lbx1* in der Entwicklung der Muskulatur hin. Zunächst wurde untersucht, ob das *lacZ*-Reportergen für die Identifizierung der wandernden Muskelvorläuferzellen in den *Lbx1*-Mutanten verwendet werden könnte. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung erbrachte allerdings nur eine sehr schwache Färbung dieser Zellen. Darum wurde die *lacZ*-Expression vom *Lbx1*-Locus mittels *in situ*-Hybridisierung überprüft (siehe 2.2.11.2). Wie in Abb.3.1 C ersichtlich ist, stimmen die Expressionsmuster von *lacZ* (Expression des mutanten Allels) und *Lbx1* (Expression des Wildtyp-Allels) in heterozygoten *Lbx1*-Embryonen

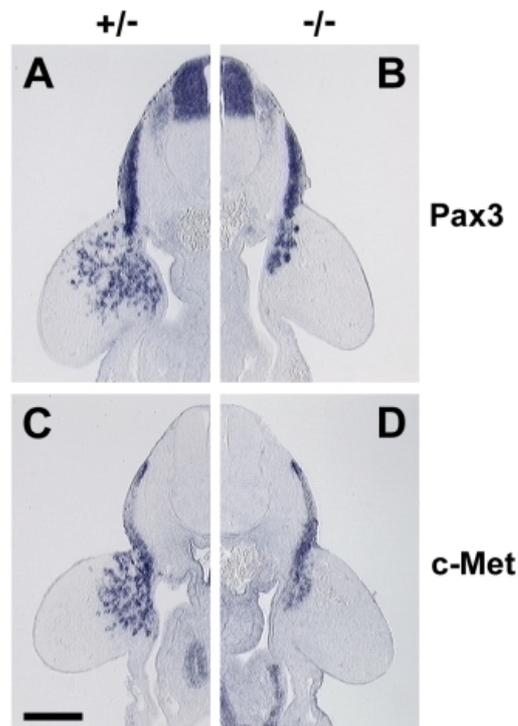
überein. Im folgenden wurden die Muskelvorläuferzellen daher durch *in situ*-Hybridisierung mit einer *lacZ*-Sonde nachgewiesen.



**Abb.3.2: Abnorme Wanderung von Muskelvorläuferzellen in *Lbx1*-Mutanten des Stadiums E9,75.** *In situ*-Hybridisierung mit einer *lacZ*-spezifischen Sonde von *Lbx1*<sup>+/-</sup> (A, C, E) und *Lbx1*<sup>-/-</sup> Embryonen (B, D, F) der Stadien E9,75. Gezeigt sind Übersicht (A, B), Seiten- (C, D) und Dorsalansicht (E, F) auf Höhe der vorderen Extremität. Die Pfeile kennzeichnen den Zellstrom zur Zungenanlage, die Pfeilspitzen markieren die Verteilung von Muskelvorläuferzellen auf Extremitätenniveau (C, D). Die Balken entsprechen 500µm (A), 300µm (C) bzw. 400µm (E).

Zuerst wurde die Bildung der wandernden Muskelvorläuferzellen in hetero- und homozygoten *Lbx1*-Embryonen miteinander verglichen. Im Stadium E9,75 erfolgte in den *Lbx1*-Mutanten die Induktion der *lacZ*-Expression im ventro-lateralen Dermomyotom der Somiten, die occipital, cervikal und auf Höhe der Extremitäten lokalisiert waren (Abb.3.2 A, B). Die Muskelvorläuferzellen wurden also korrekt spezifiziert. Auf Extremitätenniveau war dagegen bereits in der Seitenansicht zu erkennen, daß die Muskelvorläuferzellen zwar aus dem Dermomyotom auswanderten, sich in der vorderen Extremitätenknospe aber nicht normal verteilten (Abb.3.2 C, D). Dies wurde besonders deutlich, wenn homozygote *Lbx1*-Embryonen von der dorsalen Seite aus betrachtet wurden (Abb.3.2 E, F). Auf Transversalschnitten durch die vorderen Gliedmaßen sind in Kontrolltieren *Pax3*- und *c-Met*-positive Muskelvorläuferzellen zu sehen, die vom Dermomyotom delaminieren und in die Extremitätenknospen einwandern (Abb.3.3 A,

C). In homozygoten *Lbx1*-Embryonen delaminierten diese Zellen ebenfalls, sie wanderten jedoch im Stadium E9,75 nicht in die Extremitätenknospe ein (Abb.3.3 B, D).

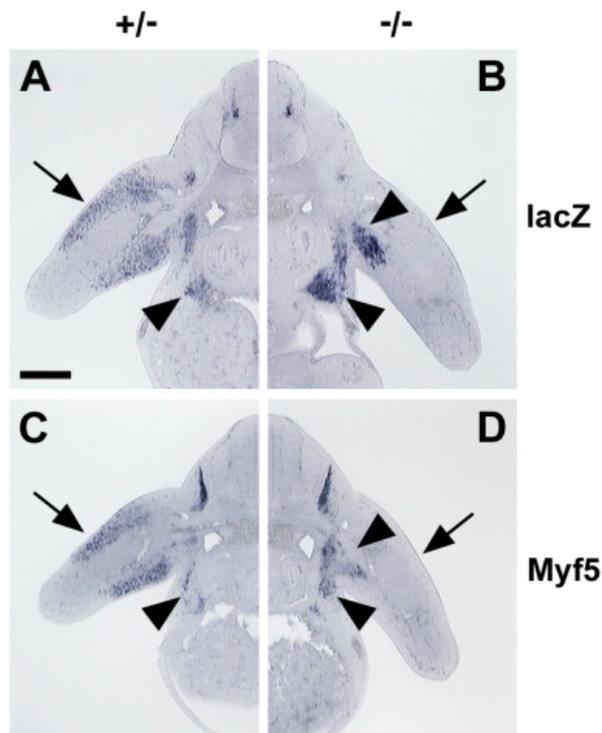


**Abb.3.3: Abnorme Wanderung von Muskelvorläuferzellen in *Lbx1*-Mutanten des Stadiums E9,75.**

Querschnitte von *Lbx1*<sup>+/-</sup> (A, C) und *Lbx1*<sup>-/-</sup> Embryonen (B, D) auf Höhe der vorderen Extremitätenanlage nach *in situ*-Hybridisierung mit einer *Pax3*- (A, B) bzw. *c-Met*-spezifischen Sonde (C, D). Der Balken entspricht 150µm.

Um zu überprüfen, ob die Muskelvorläuferzellen in den *Lbx1*<sup>-/-</sup> Embryonen abnorm wanderten, oder ob lediglich der Migrationsprozeß zeitlich verzögert ablief, wurden spätere Stadien der Embryonalentwicklung analysiert. Im Stadium E10,75 haben sich in heterozygoten *Lbx1*-Tieren die *lacZ*-positiven Muskelvorläuferzellen, die in die Extremitätenanlage eingewandert sind, in eine dorsale und eine ventrale Population aufgeteilt (Abb.3.4 A). Außerdem ist der in der Körperwand verlaufende Strom von Zellen zum *Septum transversum*, der Zwerchfell-Anlage, zu erkennen. Demgegenüber waren in homozygoten *Lbx1*-Embryonen keinerlei Muskelvorläuferzellen in die dorsale und distale Gliedmaßenknospe eingewandert. Nur im proximo-ventralen Teil der Extremität war eine Ansammlung solcher Zellen zu sehen (Abb.3.4 B). Sie bildete im anterioren Teil der Vorderextremität eine charakteristische Brücke zu einer weiteren großen Zellgruppe, die in der ventralen Körperwand akkumulierte. Obwohl einige dieser Zellen vermutlich die Population repräsentierten, die im Wildtyp zur Zwerchfell-Anlage wandert, befanden sich in der Körperwand der Mutanten mehr Zellen als in Wildtyp-

Embryonen. Die Mehrzahl dieser Zellen war also an einer ektopischen Position lokalisiert und somit fehlgeleitet.



**Abb.3.4: Abnorme Position von wandernden Vorläufer- und differenzierenden Muskelzellen in *Lbx1*-Mutanten des Stadiums E10,75.**

Transversalschnitte auf Höhe der vorderen Extremitätenanlage von *Lbx1*<sup>+/-</sup> (A, C) und *Lbx1*<sup>-/-</sup> Embryonen (B, D) nach *in situ*-Hybridisierung mit einer *lacZ*- (A, B) bzw. *Myf5*-spezifischen Sonde (C, D). Die Pfeile zeigen Vorläufer- und differenzierende Muskelzellen im dorsalen Anteil der Vorderextremität in *Lbx1*<sup>+/-</sup> Embryonen (A, C), die in *Lbx1*-Mutanten fehlten (B, D). Die Pfeilspitzen weisen in *Lbx1*<sup>+/-</sup> Embryonen (A, C) auf die migrierenden Vorläufer- und differenzierenden Muskelzellen des Zellstroms zur Zwerchfellanlage. In *Lbx1*<sup>-/-</sup> Embryonen war an dieser Stelle zusätzlich eine große Anzahl fehlgeleiteter Muskelvorläuferzellen zu erkennen (B), die jedoch normal differenzierten (D). Der Balken entspricht 250µm.

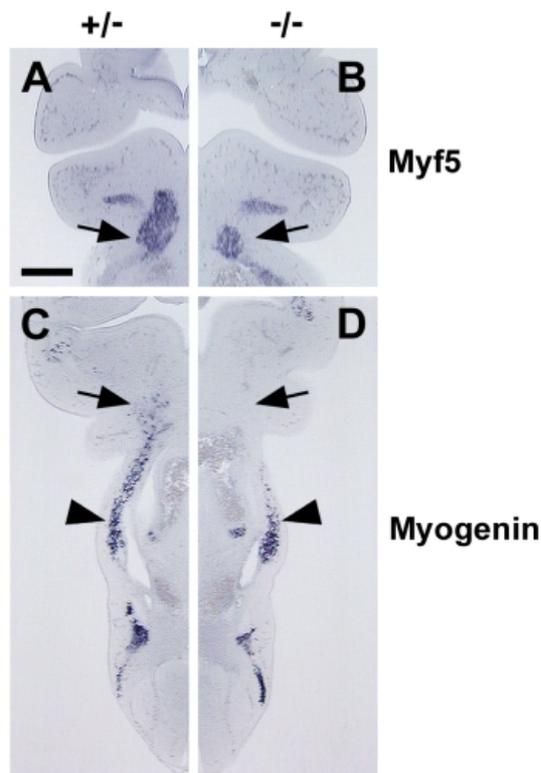
Muskelvorläuferzellen, die von den occipitalen Somiten ausgehend zur Zungenanlage wanderten, konnten ebenfalls in *Lbx1*<sup>-/-</sup> Embryonen identifiziert werden. Im Vergleich zu Kontrolltieren gleichen Entwicklungsstadiums war der Strom jedoch deutlich verkürzt (Abb.3.2 C, D). *In situ*-Hybridisierung mit *Pax3*- und *c-Met*-Sonden zeigten ähnliche Verteilungen der Muskelvorläuferzellen in *Lbx1*<sup>-/-</sup> Embryonen (nicht gezeigt).

### 3.2.2 Differenzierung der wandernden Muskelvorläuferzellen in *Lbx1*-mutanten Embryonen

Die Differenzierung von Muskelvorläuferzellen zu Muskulatur wird durch die Expression der myogenen Regulationsfaktoren eingeleitet. *Myf5* wird als erster dieser Faktoren am Ende des Wanderungsprozesses in den Muskelvorläuferzellen exprimiert, während die Expression der anderen Faktoren, wie z.B. von Myogenin, später einsetzt (Ott *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1994). In Wildtyp-Embryonen des Stadiums E10,75 können differenzierende *Myf5*-positive (*Myf5*<sup>+</sup>) Zellen im Zungenstrom, den Gliedmaßenknospen und im Myotom aller Somiten nachgewiesen werden. Transversalschnitte demonstrieren die Verteilung dieser Zellen in den dorsalen und ventralen Regionen der Vorderextremität sowie im Zellstrom zum *Septum transversum* (Abb.3.4 C). In homozygoten *Lbx1*-Embryonen wurden erheblich weniger *Myf5*<sup>+</sup> Zellen in den Gliedmaßenknospen beobachtet, die zudem nur im proximo-ventralen Teil der Vorderextremität lokalisiert waren (Abb.3.4 D). Dabei bildeten die *Myf5*<sup>+</sup> Zellen die gleiche charakteristische Brücke zwischen dem anterioren Teil der Vorderextremität und der großen Zellgruppe in der ventralen Körperwand, die zuvor schon mit der *lacZ*-Sonde markiert worden war (Abb.3.4 B). Diese fehlgeleiteten *lacZ*<sup>+</sup> Muskelvorläuferzellen durchliefen demzufolge trotz ihrer ektopischen Position ein normales Differenzierungsprogramm und exprimierten *Myf5*.

Die Zellen des Zungenstroms beginnen ebenfalls im Embryonalstadium E10,75 zu differenzieren und können auf Schnitten von Kontrollembryonen mittels *Myf5 in situ*-Hybridisierung nachgewiesen werden (Abb.3.5 A). Diese myogenen Vorläuferzellen exprimieren auch *Myogenin* entlang ihres Wanderungsweges, allerdings noch nicht, wenn sie die Zungenanlage erreicht haben (Abb.3.5 C). In *Lbx1*<sup>-/-</sup> Embryonen wurden im gleichen Stadium deutlich weniger *Myf5*<sup>+</sup> oder *Myogenin*<sup>+</sup> Zellen im Zungenstrom beobachtet, wie vorab auch bereits weniger Zellen mit der *lacZ*-Sonde beobachtet worden waren (Abb.3.2 D). Am Zielort innerhalb des ersten Branchialbogens waren am Tag E10,75 nur wenige *Myf5*<sup>-</sup> und keine *Myogenin*-exprimierenden Muskelzellen vorhanden (Abb.3.5 B, D). Hieraus läßt sich folgern, daß die Muskelvorläuferzellen zwar entlang ihrer normalen Route zur Zungenanlage wandern, jedoch im Vergleich zu Kontrolltieren erheblich weniger Zellen den Zielort erreichen und dort zu Muskulatur

differenzieren. In *Lbx1*<sup>-/-</sup> Tieren ist also die Wanderungsfähigkeit der Muskelvorläuferzellen und nicht ihr Differenzierungspotential beeinträchtigt.



**Abb.3.5: Reduktion differenzierender Muskelzellen im Zellstrom zur Zungenanlage in *Lbx1*-Mutanten des Stadiums E10,75.**

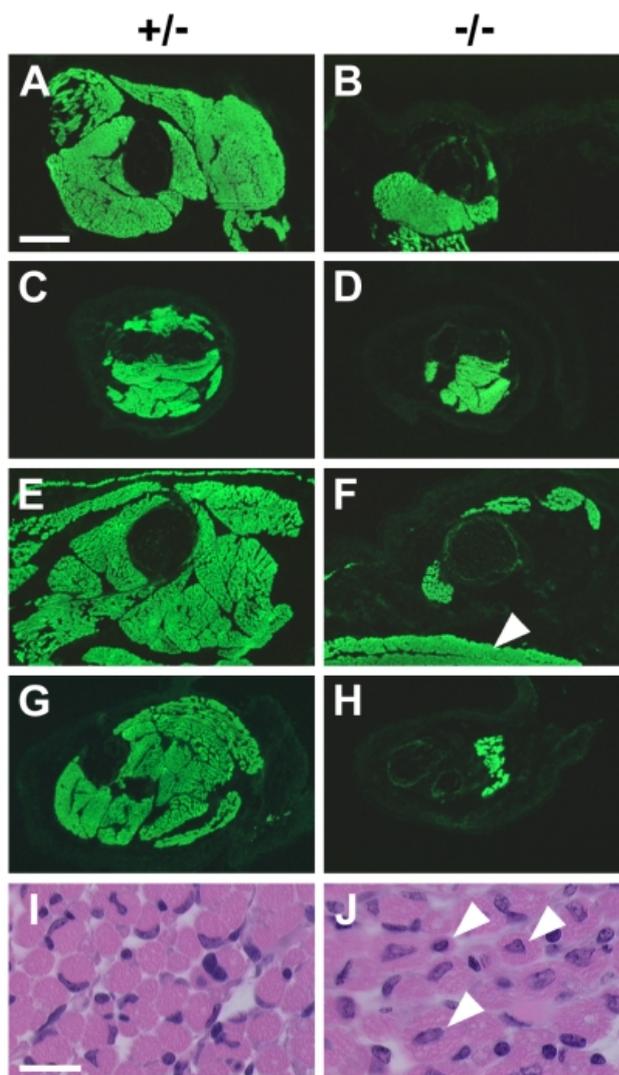
Schnitte von *Lbx1*<sup>+/-</sup> (A, C) und *Lbx1*<sup>-/-</sup> Embryonen (B, D) nach *in situ*-Hybridisierung mit einer *Myf5*- (A, B) bzw. *Myogenin*-spezifischen Sonde (C, D). Die Pfeile zeigen differenzierende Muskelzellen in der Zungenanlage von heterozygoten *Lbx1*-Embryonen (A, C), deren Anzahl in homozygoten *Lbx1*-Mutanten deutlich vermindert ist (B, D). Die Pfeilspitzen markieren *Myogenin*<sup>+</sup> Muskelzellen des Zellstroms zur Zungenanlage (C, D). Der Balken entspricht 250µm.

### 3.2.3 Skelettmuskeldefekte in *Lbx1*-mutanten Mäusen

Als Konsequenz des abnormen Wanderungsverhaltens der Muskelvorläuferzellen in *Lbx1*-Mutanten war zu einem späteren Zeitpunkt in der Entwicklung mit schweren Defekten in der Skelettmuskulatur zu rechnen. Deshalb wurden Muskeln, die aus wandernden Muskelvorläuferzellen hervorgehen, in Tieren des Stadiums E18,5, d.h. kurz vor der Geburt, histologisch (siehe 2.2.10.2) bzw. immunhistochemisch (2.2.10.6) mittels eines Anti-Myosin-Antikörpers untersucht. Dieser Antikörper erkennt die Myosin Typ II-Isoform schneller Skelettmuskelfasern, die in allen Skelettmuskeln nachweisbar ist.

Allgemein wurde eine Reduktion der gesamten Extremitätenmuskulatur in *Lbx1*<sup>-/-</sup> Embryonen festgestellt und es zeigten sich dorso-ventrale und proximo-distale Effekte der Mutation (Abb.3.6 A-H). Es war überwiegend die dorsale Extremitätenmuskulatur

beeinträchtigt, und distale Muskelgruppen waren im Vergleich zu proximalen deutlich stärker betroffen oder fehlten sogar. Während die Schultermuskulatur nahezu normal entwickelt war, fehlten in den vorderen Gliedmaßen sämtliche Extensoren. Außerdem waren die Flexoren erheblich in ihrer Größe reduziert (Abb.3.6 B, D). Dies erklärt die abnorme Haltung der Vorderextremitäten der *Lbx1*<sup>-/-</sup> Tiere in der charakteristischen gekrümmten Position. Die Muskeln der hinteren Extremitäten waren wesentlich stärker beeinträchtigt und fehlten fast vollständig (Abb.3.6 F, H). Im Oberschenkel waren lediglich der *Musculus vastus lateralis*, *M. caudofemoralis*, *M. semimembranosus* und *M. biceps femoris* extrem verkleinert vorhanden. Der *M. biceps femoris*, der sich vom Oberschenkel bis in den Unterschenkel erstreckt, konnte als einziger Muskel im Unterschenkel identifiziert werden. In den Pfoten fehlten alle Muskeln.

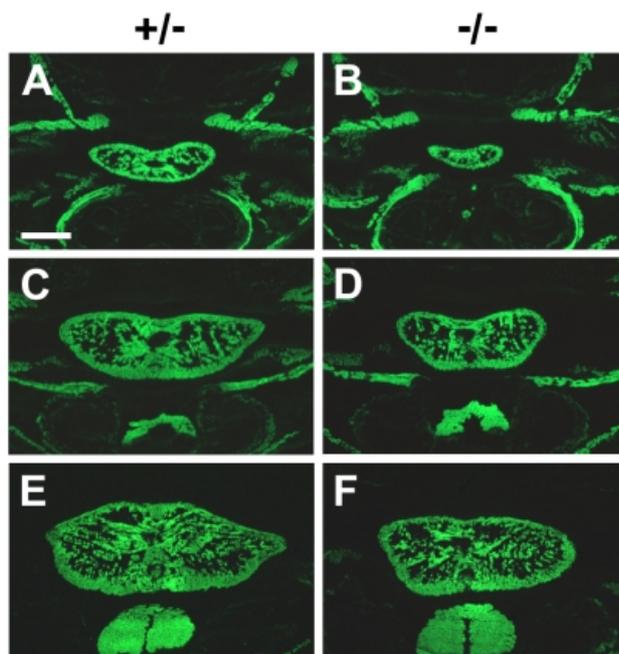


**Abb.3.6: Skelettmuskeldefekte in den Extremitäten von *Lbx1*-Mutanten.**

Immunhistologie mit einem Anti-Myosin-Antikörper auf Transversalschnitten der vorderen und hinteren Extremitäten von *Lbx1*<sup>+/+</sup> (A, C, E, G) und *Lbx1*<sup>-/-</sup> Embryonen (B, D, F, H) des Stadiums E18,5. Gezeigt sind Schnitte des oberen (A, B) und unteren Vorderbeins (C, D), sowie des Ober- (E, F) und Unterschenkels (G, H). Die Pfeilspitze in (F) kennzeichnet die in *Lbx1*-Mutanten normal entwickelte Muskulatur der Körperwand.

Histologie von Muskelfasern der Vorderbeine von *Lbx1*<sup>+/+</sup> (I) und *Lbx1*<sup>-/-</sup> Embryonen (J). Die Pfeilspitzen in (J) markieren zentrale Kernpositionen in den Muskelfasern der Mutanten. Die Balken entsprechen 500µm (A) bzw. 80µm (I).

Wie erwähnt erreichten deutlich weniger wandernde Muskelvorläuferzellen die Zungenanlage in *Lbx1*<sup>-/-</sup> Embryonen. Infolgedessen war die interne Zungenmuskulatur in ihrer Größe vermindert. Auf konsekutiven Transversalschnitten durch die Zunge ließ sich am Tag 18,5 erkennen, daß hauptsächlich der am weitesten distal gelegene Anteil des Zungenmuskels beeinträchtigt war (Abb.3.7 A, B). In weiter proximal gelegenen Zungenanteilen wurden die Unterschiede zwischen Kontroll- und mutanten Tieren jedoch zunehmend geringer (Abb.3.7 C-F). An der Basis der Zunge, dem Zungengrund, waren Wildtyp und Mutanten nicht mehr zu unterscheiden. Obwohl die Muskulatur des Zwerchfells ebenfalls von wandernden Muskelvorläuferzellen gebildet wird, war sie in *Lbx1*<sup>-/-</sup> Tieren normal entwickelt.



**Abb.3.7: Reduktion der Zungenmuskulatur von *Lbx1*-Mutanten.**

Immunhistologie der Zungenmuskeln mit einem Anti-Myosin-Antikörper auf konsekutiven Koronalschnitten durch den Kopf von *Lbx1*<sup>+/-</sup> (A, C, E) und *Lbx1*<sup>-/-</sup> Embryonen (B, D, F) des Stadiums E18,5. Gezeigt sind Schnitte von der Zungenspitze (oben) bis zum Zungengrund (unten). Der Balken entspricht 500µm.

Muskelfasern sind Synzytien, die sich aus einer Fusion von Myoblasten entwickeln. Histologisch sind sie normalerweise durch ihre am Rand des Faserbündels positionierten Kerne charakterisiert (Abb.3.6 I). Im Gegensatz dazu wurden in den Extremitätenmuskeln von *Lbx1*<sup>-/-</sup> Tieren häufig zentrale Kernpositionen beobachtet, wie sie typischerweise in myopathischer Skelettmuskulatur gefunden werden (Abb.3.6 J).

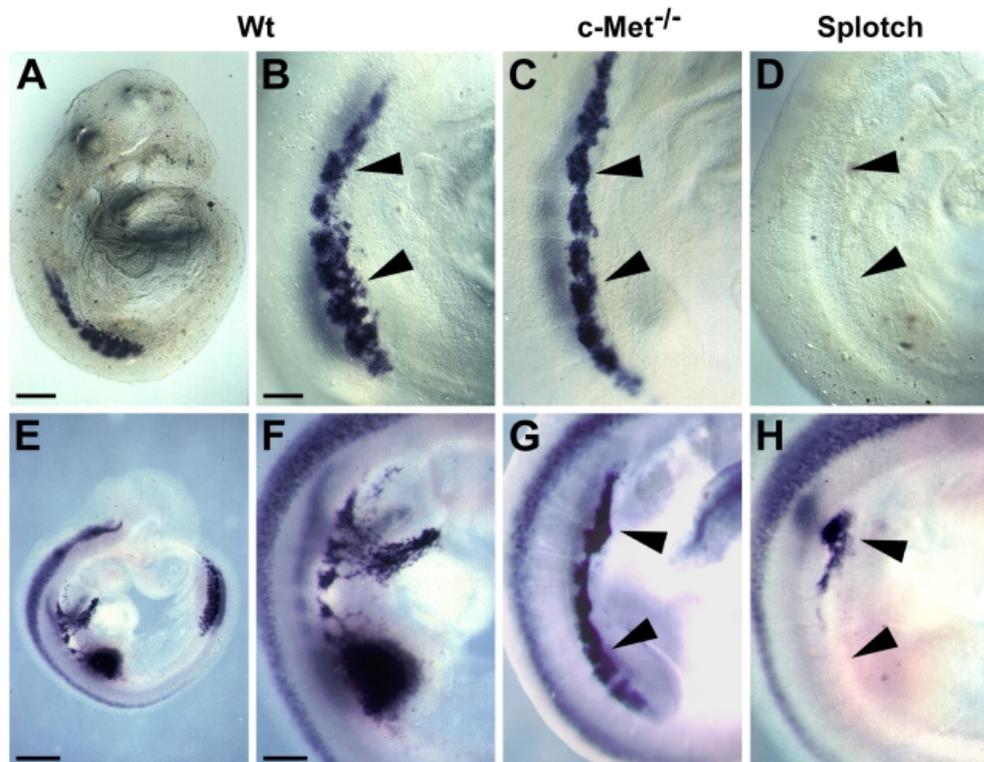
### **3.3 *Lbx1* als Komponente einer genetischen Hierarchie zur Kontrolle der Entwicklung wandernder Muskelvorläuferzellen**

*Lbx1* wird mit dem Transkriptionsfaktor *Pax3* und dem Tyrosin-Kinase-Rezeptor *c-Met* in wandernden Muskelvorläuferzellen co-exprimiert (Dietrich *et al.*, 1999). In *c-Met*- bzw. *SF/HGF*-Mutanten fehlten Muskelgruppen, die von wandernden Vorläuferzellen gebildet werden. Auch in Mäusen, in denen das *Pax3*-Gen mutiert vorlag, entwickelten sich diese Muskelgruppen abnorm. Somit beeinträchtigen diese Mutationen, ähnlich der *Lbx1*-Mutation, die Entwicklung der wandernden Vorläuferzellpopulation. Eine weitere Aufgabe dieser Dissertation bestand daher in Untersuchungen zur möglichen genetischen Interaktion zwischen *SF/HGF* bzw. *c-Met*, *Pax3* und *Lbx1*. Zusätzlich wurde der Einfluß des *SF/HGF/c-Met*-Signalsystems auf die Entwicklung des Dermomyotoms, das Wachstum und das Überleben der Muskelvorläuferzellen analysiert. Diese Experimente wurden in Kooperation mit Faikah Abou-Rebyeh (Max-Delbrück-Centrum, Berlin) durchgeführt.

#### **3.3.1 Vergleich der Entwicklung des Dermomyotoms in *SF/HGF*-, *c-Met*- und *Pax3*-mutanten Embryonen**

Die Expression von *Lbx1* beginnt in wandernden Muskelvorläuferzellen im ventrolateralen Dermomyotom kurz bevor die Zellen delaminieren. Sie wird während der Wanderung aufrecht erhalten und erst herunter reguliert, wenn die Vorläuferzellen ihre Zielorte erreichen und dort differenzieren. Im Stadium E9,25, wenn gewöhnlich die Emigration einsetzt (Abb.3.8 A, B), zeigten *c-Met*- und *SF/HGF*-Mutanten die *Lbx1*-Expression innerhalb des Dermomyotoms, es konnten jedoch keine auswandernden Zellen beobachtet werden (Abb.3.8 C). Im Stadium E10,5 waren *Lbx1*-positive Zellen zwar auf den entsprechenden axialen Niveaus in den Somiten der *c-Met*<sup>-/-</sup> und *SF/HGF*<sup>-/-</sup> Embryonen vorhanden, allerdings konnten auch zu diesem Zeitpunkt keine auswandernden Vorläuferzellen beobachtet werden (Abb.3.8 G). Das *Pax3*-Gen wurde ebenso in *c-Met*<sup>-/-</sup> und *SF/HGF*<sup>-/-</sup> Embryonen normal induziert und die Expressionsmuster von *Pax7* und *Sim1*, zwei spezifischen Markern des Dermomyotoms (Jostes *et al.*, 1990; Fan *et al.*, 1996), waren in den Mutanten unverändert (nicht gezeigt).

Allerdings konnten auch mit diesen Sonden keine auswandernden Zellen beobachtet werden.

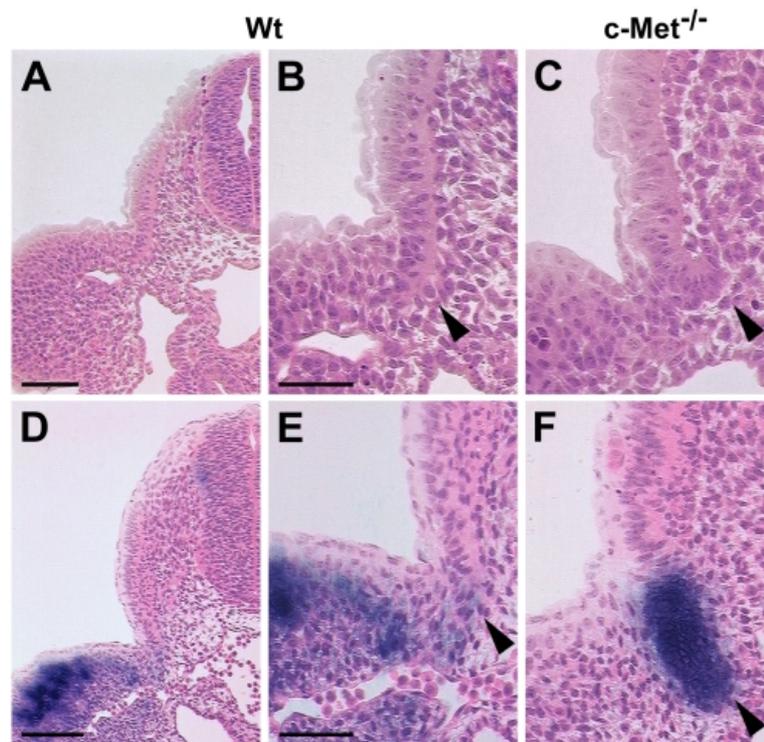


**Abb.3.8: Die *Lbx1*-Expression in Wildtyp-, *c-Met*- und *Pax3*-mutanten („Splotch“) Embryonen.** *In situ*-Hybridisierung von Wildtyp- (A, B, E, F), *c-Met*<sup>-/-</sup> (C, G) und *Pax3*-mutanten („Splotch“) Embryonen (D, H) der Stadien E9,25 (A-D) bzw. E10,5 (E-H) mit einer *Lbx1*-spezifischen Sonde. Die Pfeilspitzen weisen auf die occipitalen und cervikalen Somiten, die an die vordere Extremitätenknospe angrenzen. In *c-Met*<sup>-/-</sup> Embryonen erfolgte kein Auswandern von Muskelvorläuferzellen (C, G), während in *Pax3*-Mutanten bereits ihre Bildung beeinträchtigt war (D, H). Die Balken entsprechen 400µm (A), 175µm (B), 900µm (E) bzw. 375µm (F).

Die histologische Analyse von Querschnitten auf Höhe der vorderen Extremität zeigt in Wildtyp-Tieren der Stadien E9,5 und E10,5 deutlich die aufgelösten Dermomyotomkanten mit den auswandernden Muskelvorläuferzellen (Abb.3.9 A, B, D, E). In *c-Met*- und *SF/HGF*-Mutanten behielten die Dermomyotomkanten ihre epitheliale Zellorganisation bei (Abb.3.8 C, F). Die wandernden Muskelvorläuferzellen wurden demzufolge korrekt in *c-Met*- und *SF/HGF*-mutanten Tieren gebildet, sie waren aber nicht in der Lage, den epithelialen Zellverband des Dermomyotoms zu verlassen und auszuwandern.

In der natürlich vorkommenden *Pax3*-Mutante „Splotch“ wurde *Lbx1* im Stadium E9,25, wenn die Expression erstmals in Kontrollembryonen nachgewiesen werden kann, nicht exprimiert (Abb.3.8 D). Im Stadium E10,5 waren *Lbx1*-exprimierende Zellen nur in den

occipitalen Somiten sichtbar, jedoch lief die Emigration der Zungenmuskelvorläuferzellen von diesen Somiten verzögert ab (Abb.3.8 H). In weiter caudal gelegenen Somiten wurde keine *Lbx1*-Expression induziert. Im Vergleich zu *SF/HGF* bzw. *c-Met* steuert das *Pax3*-Gen also zu einem früheren Zeitpunkt die Entwicklung der myogenen Vorläuferzellen. Im gesamten Rumpfbereich von *Pax3*-Mutanten ist nicht das Auswandern der Muskelvorläuferzellen, sondern bereits ihre Bildung beeinträchtigt.



**Abb.3.9: Die Histologie des Dermomyotoms und die Expression von *Lbx1* in *c-Met*<sup>-/-</sup> Embryonen.** Hämatoxylin/Eosin-gefärbte Transversalschnitte von Wildtyp- (A, B, D, E) und *c-Met*<sup>-/-</sup> Embryonen (C, F) der Stadien E9,5 (A-C) und E10,5 (D-F) auf Höhe der vorderen Extremitätenanlage. Die Pfeilspitzen zeigen die deutlich aufgelösten ventro-lateralen Dermomyotomkanten der Wildtyp-Embryonen (B, E), die in *c-Met*<sup>-/-</sup> Embryonen ihre epitheliale Struktur beibehielten (C, F). Schnitte nach *in situ*-Hybridisierung mit einer *Lbx1*-spezifischen Sonde dokumentieren das Auswandern von Muskelvorläuferzellen aus dem Dermomyotom in Wildtyp-Embryonen (D, E), das in *c-Met*-Mutanten nicht erfolgte (F). Die Balken entsprechen 100µm (A, D) bzw. 50µm (B, E).

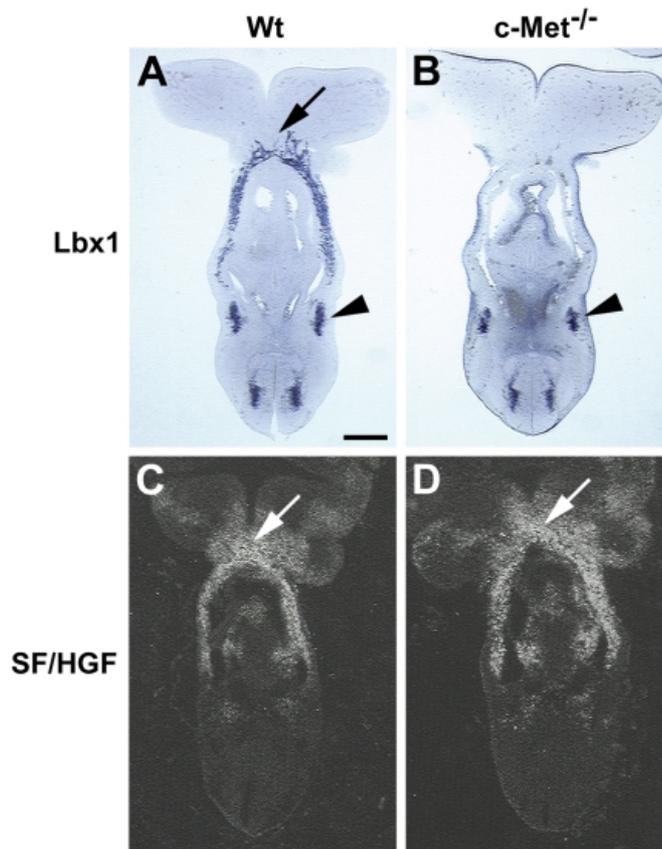
### 3.3.2 Einfluß des SF/HGF/c-Met-Signalsystems auf Wachstum und Überleben der Muskelvorläuferzellen

SF/HGF induziert nicht nur die Dissoziation epithelialer Zellverbände zu mesenchymalen Einzelzellen („Scattering“), sondern kann zudem das Wachstum und Überleben verschiedenster Zelltypen in Kultur fördern. Um den Einfluß des

SF/HGF/c-Met-Signalsystems auf das Wachstum und Überleben von Muskelvorläuferzellen zu ermitteln, wurde das Verhältnis von mitotischen und apoptotischen Zellen im Dermomyotom von Wildtyp- im Vergleich zu *c-Met*- und *SF/HGF*-mutanten Tieren bestimmt. Hierzu wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt (siehe 2.2.10.7) und anschließend intakte, mitotisch aktive und pyknotische Zellen im Dermomyotom auf Extremitätenniveau ausgezählt. Der mitotische Index im Dermomyotom von Wildtyp-Embryonen ( $2,49\% \pm 0,33\%$ ) war verglichen mit *c-Met*- und *SF/HGF*-mutanten Tieren ( $2,38\% \pm 0,21\%$ ) nahezu identisch. Im Gegensatz dazu war die Anzahl apoptotischer Zellen in Kontroll- sowie *c-Met*<sup>-/-</sup> und *SF/HGF*<sup>-/-</sup> Tieren sehr variabel. Wurden jedoch die Mittelwerte verschiedener Individuen zum Vergleich herangezogen, ergaben sich ähnliche Werte für pyknotische Zellen in Wildtyp- ( $2,7\% \pm 1,2\%$ ) und *c-Met*- bzw. *SF/HGF*-mutanten Tieren ( $2,9\% \pm 2,5\%$ ). In *c-Met*<sup>-/-</sup> und *SF/HGF*<sup>-/-</sup> Tieren waren deshalb weder Wachstum, noch Überleben der Muskelvorläuferzellen, sondern nur ihre Delamination beeinträchtigt.

### **3.3.3 Expression von *SF/HGF* entlang der Wanderungswege der Muskelvorläuferzellen**

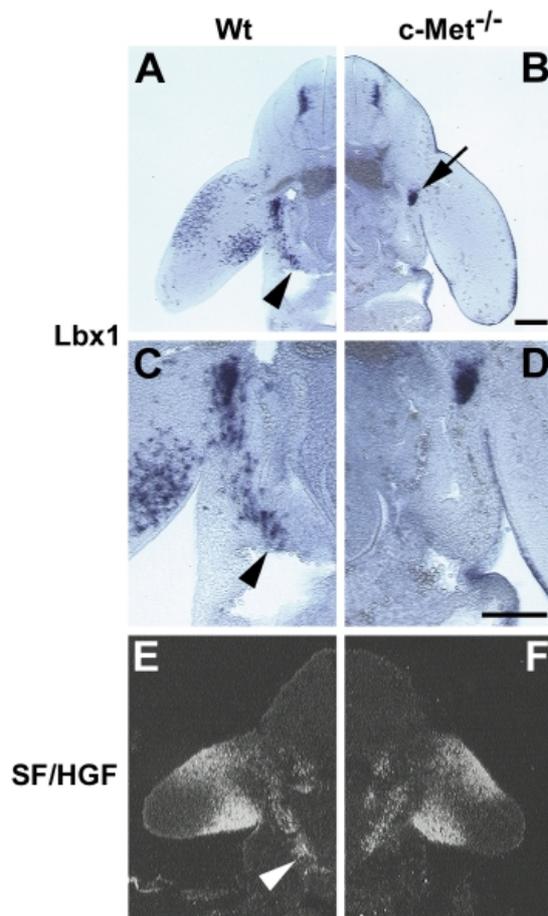
Aus migrierenden Muskelvorläuferzellen geht die Skelettmuskulatur der Extremitäten, des Zwerchfells und der Zungenspitze hervor. Dementsprechend lassen sich charakteristische Ströme unterscheiden, die diese Zellen während ihrer Wanderung bilden. Im Stadium E10,5 der Embryonalentwicklung können in Wildtyp-Embryonen die Ströme *Lbx1*-positiver Zellen verfolgt werden, die von den occipitalen Somiten ausgehen und dicht unter dem Oberflächenektoderm in das Zentrum der ersten Branchialbögen migrieren, wo die Zungenanlage lokalisiert ist (Abb.3.10 A). Diese Zellen exprimieren auch *c-Met*. *SF/HGF* wird entlang des gesamten Wanderungsweges der Vorläuferzellen der Zungenmuskulatur exprimiert (Abb.3.10 C). In *c-Met*-mutanten Embryonen, in denen die myogenen Vorläuferzellen nicht delaminierten, wurde keine Veränderung dieses Musters beobachtet (Abb.3.10 B, D).



**Abb.3.10: Die Expression von *SF/HGF* korreliert mit dem Wanderungsweg der Muskelvorläuferzellen zur Zungenanlage.**

Vibratonschnitte eines Wildtyp- (A) und eines *c-Met*<sup>-/-</sup> Embryos (B) des Stadiums E10,75 nach *in situ*-Hybridisierung mit einer *Lbx1*-spezifischen Sonde. In der Kontrolle, jedoch nicht in *c-Met*-Mutanten, wandern Muskelvorläuferzellen von den occipitalen Somiten (Pfeilspitzen) zur Zungenanlage innerhalb des ersten Branchialbogens (Pfeile). Die radioaktive *in situ*-Hybridisierung auf Gefrierschnitten (C, D) dokumentiert, daß *SF/HGF* auch in *c-Met*<sup>-/-</sup> Embryonen unverändert entlang dieses Wanderungswegs exprimiert wurde, obwohl in *c-Met*-Mutanten keine migrierenden Muskelvorläuferzellen vorhanden waren. Der Balken entspricht 250µm.

In Kontrollembryonen sind in den vorderen Gliedmaßenknospen *Lbx1*-exprimierende Muskelvorläuferzellen zu erkennen, die in die Extremitäten eingewandert sind und sich in eine dorsale und eine ventrale Population aufgespalten haben (Abb.3.11 A). Darüber hinaus ist ein Zellstrom erkennbar, der an den cervikalen Somiten beginnt, sich weiter ventral in das Seitenplattenmesoderm erstreckt und bis zur Anlage des Zwerchfells, dem *Septum transversum*, reicht (Abb.3.11 A, C). *SF/HGF* wird zu diesem Zeitpunkt im Mesenchym der Extremitäten sowie entlang der Route der Muskelvorläuferzellen zum *Septum transversum* exprimiert (Abb.3.11 E). Dieses *SF/HGF*-Expressionsmuster war in *c-Met*-Mutanten unverändert (Abb.3.11 F). Die *SF/HGF*-Expression ist deshalb unabhängig von der Anwesenheit von Muskelvorläuferzellen (Abb.3.11 B, D). Die enge räumliche und zeitliche Korrelation der *SF/HGF*-Expression mit den Wanderungswegen der Muskelvorläuferzellen deutet darauf hin, daß das *SF/HGF/c-Met*-Signalsystem nicht nur eine Rolle bei der Delamination, sondern zusätzliche Funktionen während des Wanderungsprozesses ausüben kann.

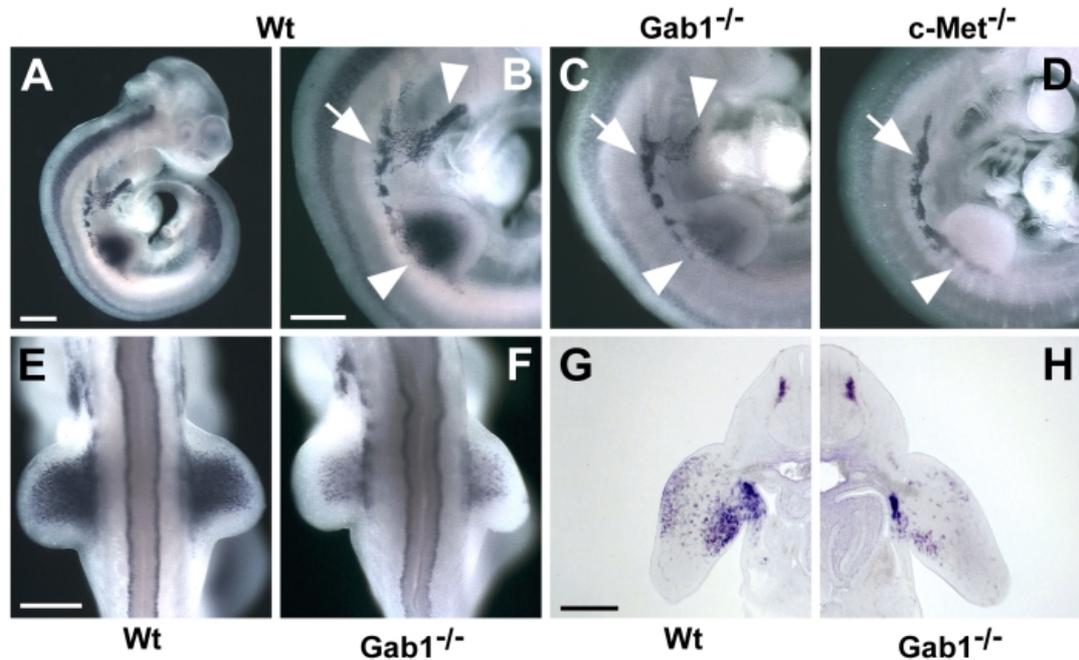


**Abb.3.11: Die Expression von *SF/HGF* korreliert mit den Wanderungswegen der Muskelvorläuferzellen in die Gliedmaßenknospen und zum *Septum transversum*.**

Vibratonschnitte eines Wildtyp- (A, C) und eines *c-Met*<sup>-/-</sup> Embryos (B, D) des Stadiums E10,75 nach *in situ*-Hybridisierung mit einer *Lbx1*-spezifischen Sonde. Im Wildtyp wandern die Muskelvorläuferzellen in die Extremitätenknospen und zum *Septum transversum* (Pfeilspitze), während sie in *c-Met*-Mutanten im Dermomyotom verblieben (Pfeil). Die radioaktive *in situ*-Hybridisierung auf Gefrierschnitten (E, F) zeigt die *SF/HGF*-Expression entlang dieser Wanderungswege, die in *c-Met*-Mutanten unverändert erfolgte, obwohl dort keine migrierenden Muskelvorläuferzellen vorhanden waren. Die Balken entsprechen 100µm.

### 3.3.4 Das Wanderungsverhalten von Muskelvorläuferzellen in *Gab1*<sup>-/-</sup> Embryonen

Verschiedene *in vitro*-Untersuchungen zeigen, daß das Adapterprotein Gab1 an die cytoplasmatische Domäne des aktivierten c-Met-Rezeptors bindet und dadurch weitere Proteine rekrutiert, die dann das c-Met-vermittelte Signal weiterleiten (Weidner *et al.*, 1996; Maroun *et al.*, 1999; Schaeper *et al.*, 2000). Das *Gab1*-Gen wurde in der Maus von Martin Sachs durch gezielte Mutagenese inaktiviert (Sachs, Brohmann *et al.*, 2000). Diese Mäuse weisen Veränderungen in der Plazenta- und Leberentwicklung auf, die mit den in *c-Met*- und *SF/HGF*-Mutanten beobachteten Phänotypen übereinstimmen und die essentielle Funktion von Gab1 bei der Transmission des c-Met-Signals *in vivo* dokumentieren. In Kollaboration mit Martin Sachs und Walter Birchmeier (Max-Delbrück-Centrum, Berlin) wurde im Rahmen dieser Dissertation der Einfluß der *Gab1*-Mutation auf die Entwicklung der Skelettmuskulatur untersucht.



**Abb.3.12: Verzögerte Delamination und abnorme Wanderung von Muskelvorläuferzellen in *Gab1*-mutanten Embryonen.**

*In situ*-Hybridisierung von Wildtyp- (A, B, E), *Gab1*<sup>-/-</sup> (C, F) und *c-Met*<sup>-/-</sup> (D) Embryonen der Stadien E10,25 mit einer *Lbx1*-spezifischen Sonde. Gezeigt sind Übersicht (A), Seiten- (B-D) und Dorsalansicht (E, F) sowie Vibratomschnitte eines Wildtyp- (G) und eines *Gab1*<sup>-/-</sup> Embryos (H) auf Höhe der vorderen Extremität. Die Pfeilspitzen zeigen Muskelvorläuferzellen, die in die vordere Extremitätenknospe und zur Zungenanlage migrieren. In *Gab1*<sup>-/-</sup> Embryonen waren gegenüber der Kontrolle mehr Muskelvorläuferzellen im Dermomyotom vorhanden, die in *c-Met*<sup>-/-</sup> Mutanten nicht auswanderten (Pfeile). Die Balken entsprechen 500µm (A), 400µm (B, E) bzw. 250µm (G).

Wandernde Muskelvorläuferzellen wurden korrekt in *Gab1*-Mutanten gebildet, wie die *in situ*-Hybridisierung mit einer *Lbx1*-spezifischen Sonde in Abb.3.12 C zeigt. Im Vergleich zu Kontrollembryonen befanden sich im Dermomyotom von *Gab1*<sup>-/-</sup> Embryonen allerdings erheblich mehr Muskelvorläuferzellen, die noch nicht ausgewandert waren (Abb.3.12 A-C). Es migrierten infolgedessen weniger Zellen in die vordere Extremitätenknospe und der Zellstrom zur Zungenanlage war verkürzt (Abb.3.12 C, G, H). Die Dorsalansicht der vorderen Gliedmaßenknospen verdeutlicht diesen Unterschied (Abb.3.12 E, F). Wie unter 3.1.1 beschrieben, emigrierten diese Muskelvorläuferzellen in *c-Met*-Mutanten nicht (Abb.3.12 D). Neben der Extremitätenmuskulatur war außerdem die Zwerchfellmuskulatur in *Gab1*<sup>-/-</sup> Tieren reduziert (Sachs, Brohmann *et al.*, 2000). Wie auch in *SF/HGF*- bzw. *c-Met*-Mutanten waren dagegen sämtliche Muskeln, die von nicht-migrierenden Vorläuferzellen gebildet werden, nicht betroffen.

Neben dem Auswandern schien auch das Migrationsverhalten der Muskelvorläuferzellen in *Gab1*<sup>-/-</sup> Tieren beeinträchtigt zu sein. Demzufolge erreichten weniger wandernde Vorläuferzellen ihre Zielorte in den Anlagen von Extremitäten, Zwerchfell und Zunge. Diese Analysen unterstreichen, daß die Signalweiterleitung vom c-Met Tyrosin-Kinase-Rezeptor *in vivo* über das Adapterprotein Gab1 verläuft.

### 3.4 Die Funktion von *Lbx1* in der Neurogenese

*Lbx1* wird in der Embryonalentwicklung nicht nur in wandernden Muskelvorläuferzellen, sondern ab dem Stadium E10 auch auf allen axialen Niveaus des Rückenmarks exprimiert (Jagla *et al.*, 1995). Mit Hilfe der von mir etablierten *Lbx1*-mutanten Mauslinie wurde in dieser Arbeit die Funktion von *Lbx1* im embryonalen Rückenmark analysiert. Wie erwähnt, war die *lacZ*-Expression des mutierten *Lbx1*-Allels gegenüber der Expression des Wildtyp-Locus vermindert (siehe 3.2.1). Hierfür konnten negative regulatorische Einflüsse des *Neomycin*-Gens, das mit dem Targeting-Vektor ins Genom eingebracht worden war, verantwortlich sein. Aus diesem Grund wurde das von loxP-Sequenzen flankierte *Neomycin*-Gen durch Kreuzen von „*Cre-Deleter*“-Mäusen (Schwenk *et al.*, 1995) mit *Lbx1*-Tieren entfernt. Tatsächlich war die *lacZ*-Expression vom *Neomycin*-deletierten *Lbx1*-Locus erheblich stärker. Diese Untersuchungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Thomas Müller (Max-Delbrück-Centrum, Berlin), Alessandra Pierani und Thomas M. Jessell (Columbia University, New York).

#### 3.4.1 Die Expression von *Lbx1* in verschiedenen dorsalen Nervenzelltypen des embryonalen Rückenmarks

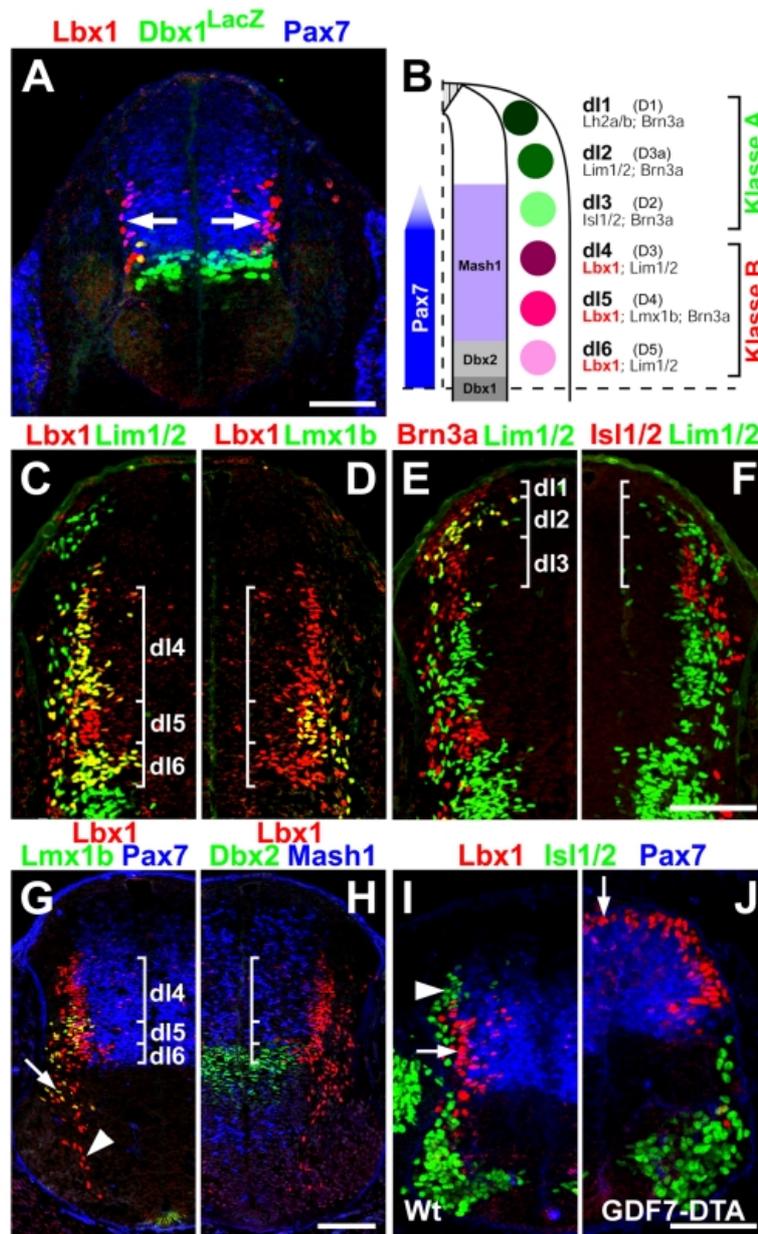
Um die *Lbx1*-positiven (*Lbx1*<sup>+</sup>) Nervenzellen im Rückenmark genauer charakterisieren zu können, wurde ein Antikörper gegen das Maus-*Lbx1*-Protein hergestellt, mit dem *Lbx1* in postmitotischen Nervenzellen innerhalb der Mantelzone der dorsalen Neuralrohrhälfte nachgewiesen werden kann (Abb.3.13 A). Die *Pax7*<sup>+</sup>, proliferierenden neuronalen Vorläuferzellen in der angrenzenden Domäne der Ventrikularzone induzieren jedoch *Lbx1* nicht. In Markierungsexperimenten mit BrdU (siehe 2.2.10.7), das nur in die

DNA mitotisch aktiver Zellen eingebaut wird, konnten *Lbx1*<sup>+</sup> Neurone nicht markiert werden, während die Vorläuferzellen in der Ventrikularschicht stark markiert waren (nicht gezeigt). Dies unterstreicht zusätzlich zur Position der Neurone in der Mantelzone, daß die *Lbx1*-Expression in postmitotischen Nervenzellen erfolgt.

Die Homöobox-Transkriptionsfaktoren *Lim1/2*, *Brn3a*, *Isl1/2* und *Lmx1b* werden ebenfalls im dorsalen Rückenmark exprimiert (Abb.3.13 C-F). Mit Hilfe dieser Marker wurden sechs verschiedene neuronale Subtypen, dI1-dI6, klassifiziert, die im dorsalen Neuralrohr im Stadium E10,5 vorhanden sind (Abb.3.13 B). Die drei Subtypen dI1-dI3 exprimieren *Lbx1* nicht. Sie sind am weitesten dorsal lokalisiert und bilden die Klasse A. Dagegen wird *Lbx1* in der ventralen Hälfte des dorsalen Neuralrohrs in den dI4-dI6 Nervenzellen produziert, die zur Klasse B gehören (Abb.3.13 C, D).

In den am weitesten ventral gelegenen dI6-Neuronen wird *Lbx1* mit *Lim1/2* co-exprimiert (Abb.3.13 C). Unmittelbar dorsal grenzt die dI5-Klasse an, in der *Lbx1*, *Lmx1b* und *Brn3a* produziert werden (Abb.3.13 D, E). Die *Lmx1b*-Expression erfolgt ausschließlich in diesem neuronalen Subtyp. Ab dem Stadium E10,75 der Embryonalentwicklung wandern die dI5- und dI6-Nervenzellen in ventrale Regionen des Neuralrohrs (Abb.3.13 G). Die dI4-Neurone co-exprimieren *Lbx1* und *Lim1/2* und unterscheiden sich demnach vom dI6-Subtyp lediglich durch ihre unterschiedliche Position entlang der dorso-ventralen Achse des Neuralrohrs (Abb.3.13 C). Im Vergleich dazu sind die drei dorsalen Subtypen *Lbx1*-negativ. Die dI3-Nervenzellen (ehemals als D2 bezeichnet, Lee und Jessell, 1999) produzieren *Isl1/2* und *Brn3a*, während dI2-Neurone *Lim1/2*<sup>+</sup> und *Brn3a*<sup>+</sup> sind (ehemals D3a, Gowan *et al.*, 2001; siehe Abb.3.13 E, F). Direkt unterhalb der Deckplatte des Neuralrohrs befinden sich die dI1-Nervenzellen, die *Lh2a/b* und *Brn3a* exprimieren (ehemals D1, Lee und Jessell, 1999).

Die Vorläuferzellen in der Ventrikularzone des dorsalen Neuralrohrs, aus denen die postmitotischen *Lbx1*-Neurone entstehen, wurden durch Analyse der *Pax7*<sup>-</sup>, *Mash1*<sup>-</sup>, *Dbx1*<sup>-</sup> und *Dbx2*-Expression charakterisiert. Untersuchungen an heterozygoten *Dbx1-lacZ*-Embryonen zeigen, daß die *Dbx1*<sup>+</sup> Zellen die ventrale Grenze der Vorläuferdomäne markieren, welche die *Lbx1*<sup>+</sup> Neurone erzeugt (Abb.3.13 A; siehe auch Pierani *et al.*, 2001).



**Abb.3.13: Die Expression von *Lbx1* definiert zwei Klassen postmitotischer Neurone im dorsalen Neuralrohr.**

(A) Die Immunhistologie des Neuralrohrs eines heterozygoten *Dbx1-lacZ*-Embryos des Stadiums E10,5 zeigt die Expression von *Lbx1*,  $\beta$ -Galaktosidase und *Pax7*. (B) Schema der sechs dorsalen neuronalen Subtypen und ihrer Vorläuferdomänen. (C-F) Identifizierung von drei *Lbx1*+ und drei *Lbx1*- Subtypen im Stadium E10,5 mit Antikörpern gegen (C) *Lbx1* und *Lim1/2*, (D) *Lbx1* und *Lmx1b*, (E) *Brn3a* und *Lim1/2* bzw. (F) *Isl1/2* und *Lim1/2*. Die dl1-dl6 Neurone sind markiert. (G, H) Analyse *Lbx1*+ Neurone und ihrer Vorläufer im Stadium E10,75 mit Hilfe von Antikörpern gegen (G) *Lbx1*, *Lmx1b* und *Pax7* bzw. (H) *Lbx1*, *Dbx2* und *Mash1*. Die Vorläuferdomänen, die die dl4-dl6-Subtypen produzieren und die Ströme von dl5- (Pfeil) und dl6-Neuronen (Pfeilspitze) sind gekennzeichnet. (I, J) Immunhistologische Analyse der Expression von *Lbx1*, *Isl1/2* und *Pax7* in Wildtyp- (I) und *GDF7-DTA*-Embryonen (J). Die dorsalen *Lbx1*+ (Pfeil) und *Isl1/2*+ Neurone (Pfeilspitze) sind markiert. Die Balken entsprechen 100 $\mu$ m.

Aus den dorsal angrenzenden Vorläufern, die *Dbx2* und stark *Pax7* exprimieren, geht der *Lbx1*+ dl6-Subtyp hervor (Abb.3.13 G, H). Die weiter dorsal gelegenen dl5- und dl4-Subtypen synthetisieren ebenfalls *Lbx1* und werden von einer *Pax7*/*Mash1*-Vorläufer-

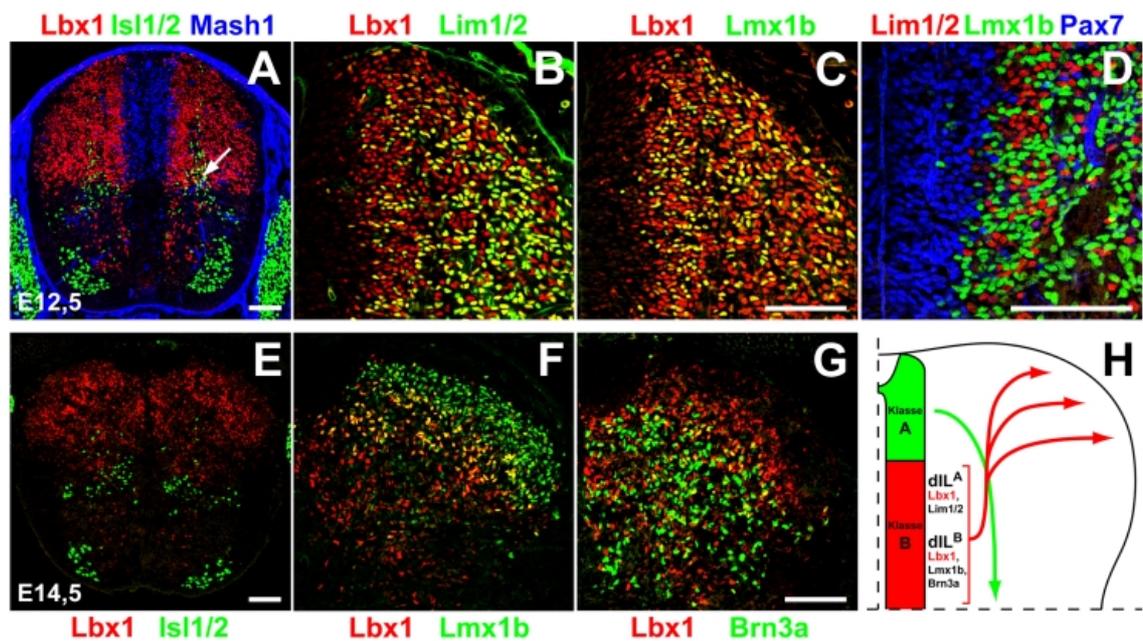
domäne gebildet. An der dorsalen Grenze dieser Domäne produzieren die Vorläufer Mash1, jedoch nur wenig Pax7. Die Lbx1+ Nervenzellen gehen also aus verschiedenen Vorläuferdomänen hervor.

In den am weitesten dorsal gelegenen Regionen des Neuralrohrs hängt die Entwicklung der Vorläufer- und postmitotischen Nervenzellen von induktiven BMP-Signalen der Deckplatte und des Oberflächenektoderms ab (Lee *et al.*, 2000). In *GDF7-DTA*-Mäusen, die Diphtheria-Toxin unter der Kontrolle des BMP-verwandten *GDF7* exprimieren, fehlen diese induktiven Strukturen. Lbx1+ Neurone werden in *GDF7-DTA*-Embryonen zusätzlich in den dorsalen Anteilen des Neuralrohrs gebildet, während die Isl1/2+ dI3-Neurone fehlen (Abb.3.13 I, J). Die Entwicklung von Klasse B-Nervenzellen, die durch die *Lbx1*-Expression gekennzeichnet sind, erfolgt also unabhängig von dorsalen induktiven Signalen. Die unterschiedliche Abhängigkeit von solchen Signalen ist neben der *Lbx1*-Expression ein weiteres Unterscheidungsmerkmal von Klasse A- und Klasse B-Nervenzellen.

Am Tag E12,5 der Embryonalentwicklung wird *Lbx1* im ganzen dorsalen Rückenmark exprimiert (Abb.3.14 A). Die in diesem Stadium entstehenden Lbx1+ Neurone gehen dabei aus der gesamten Mash1/Pax7-Vorläuferdomäne hervor. Zwei spät gebildete Lbx1-Subtypen co-exprimieren zudem entweder *Lim1/2* oder *Lmx1b* und werden daher im weiteren als dIL<sup>A</sup> bzw. dIL<sup>B</sup> bezeichnet (Abb.3.14 B, C). Diese beiden Subtypen verteilen sich bereits nahe der Ventrikularzone ähnlich einem Pfeffer-und-Salz-Muster und scheinen demzufolge aus einer einzigen Vorläuferdomäne zu entstehen (Abb.3.14 D). Dies ist ungewöhnlich, da im allgemeinen eine bestimmte Vorläuferdomäne nur einen einzigen Nervenzelltyp im Neuralrohr erzeugt. Die dI3-Neurone erreichen in diesem Stadium intermediäre Regionen im Neuralrohr (Abb.3.14 A).

Im Stadium E14,5 ist die Neurogenese im dorsalen Rückenmark abgeschlossen (Nornes und Carry, 1978), und die charakteristische Struktur des dorsalen Horns wird ausgebildet (Abb.3.14 E). Die Lbx1+ Neurone, die durch die Co-Expression mit verschiedenen Homöobox-Faktoren gekennzeichnet sind, teilen sich auf spezifische Schichten des dorsalen Horns auf. In der äußersten Schicht produzieren die Nervenzellen wenig Lbx1 aber viel *Lmx1b* (Abb.3.14 F). In den beiden darunterliegenden Schichten co-exprimieren die Nervenzellen *Lbx1* und *Lmx1b* bzw. *Lbx1* und *Brn3a* (Abb.3.14 F, G). Zusätzlich

befinden sich in allen drei Schichten Lim1/2+ Neurone (nicht gezeigt). Die dIL<sup>-</sup> und ein Teil der dIL<sup>+</sup>-Nervenzellen, die auch *Lbx1* induzieren, wandern in die ventrale Hälfte des Rückenmarks (Abb.3.14 E). Im Gegensatz dazu sammelt sich die Mehrzahl der *Lbx1*+ Neurone im oberen dorsalen Horn. Die dorsalen Nervenzellen der Subpopulationen dIL<sup>-</sup>-dIL<sup>+</sup>, die *Lbx1* nicht exprimieren, migrieren dagegen in tiefere Schichten des dorsalen Horns (Abb.3.14 H; siehe auch Lee *et al.*, 1998 und 2000; Bermingham *et al.*, 2001; Gowan *et al.*, 2001).



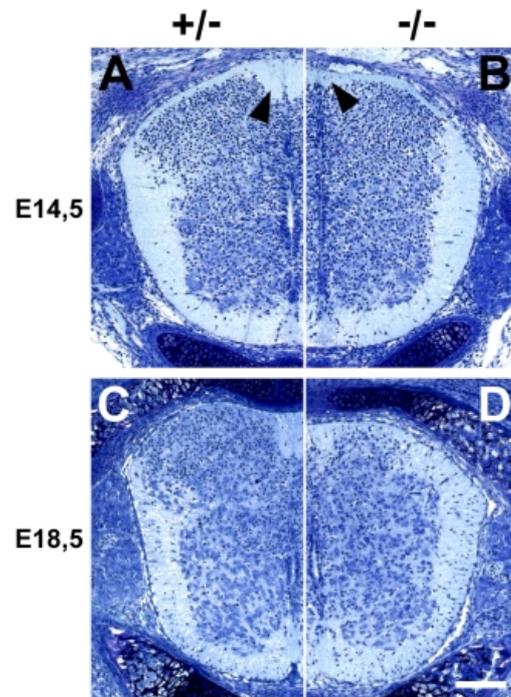
**Abb.3.14: Die *Lbx1*+ Neurone entstehen aus einer breiten Vorläuferdomäne und sammeln sich im oberen dorsalen Horn.**

(A) Die immunhistologische Analyse des Stadiums E12,5 dokumentiert, daß die *Lbx1*+ Neurone aus der gesamten *Mash1*+ Vorläuferdomäne hervorgehen. *Isl1/2*+ Neurone erreichen zu diesem Zeitpunkt ventrale Regionen des dorsalen Horns (Pfeil). Die stärkeren Vergrößerungen des gleichen Stadiums zeigen die Expression von *Lbx1* und *Lim1/2* (B), von *Lbx1* und *Lmx1b* (C) und von *Lim1/2*, *Lmx1b* und *Pax7* (D) im dorsalen Horn. Die spät gebildeten *Lbx1*+ Neurone co-exprimieren entweder *Lim1/2* oder *Lmx1b*. (E) Verteilung *Lbx1*+ und *Isl1/2*+ Neurone im Rückenmark des Stadiums E14,5. (F, G) Die Ausschnittsvergrößerungen kennzeichnen die Aufteilungen *Lmx1b*+ und *Brn3a*+ Neurone in spezifischen Schichten des dorsalen Horns in diesem Stadium, die z.T. *Lbx1* co-exprimieren. (H) Schematische Darstellung der Entstehungsorte und endgültigen Positionen der *Lbx1*-positiven dIL<sup>A</sup>- und dIL<sup>B</sup>-Subtypen sowie der *Lbx1*-negativen Klasse A Nervenzellen. Die Balken entsprechen 100µm.

### 3.4.2 Die Entwicklung von dIL<sup>B</sup>-Neuronen in *Lbx1*-mutanten Mäusen

Die histologische Analyse des Rückenmarks homozygoter *Lbx1*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigte, daß sich die Struktur des dorsalen Horns nicht wie gewöhnlich ab dem Tag E14,5 der

Embryonalentwicklung ausbildete (Abb.3.15). Als Konsequenz war die Größe des dorsalen Rückenmarks in späteren Stadien reduziert (E18,5).



**Abb.3.15: Die Histologie des embryonalen Rückenmarks von *Lbx1*<sup>-/-</sup> Mäusen.**

Toluidin Blau O-gefärbte Transversalschnitte des thorakalen Rückenmarks von Wildtyp- (A, C) und *Lbx1*<sup>-/-</sup> Embryonen (B, D) der Stadien E14,5 (A, B) und E18,5 (C, D). In der Kontrolle ist deutlich die Ausbildung des dorsalen Horns ab dem Stadium E14,5 zu sehen, dessen Struktur in *Lbx1*<sup>-/-</sup> Embryonen fehlte. Die Pfeilspitzen zeigen die zusätzliche Reduktion der Hinterstrangbahnen. Der Balken entspricht 100µm.

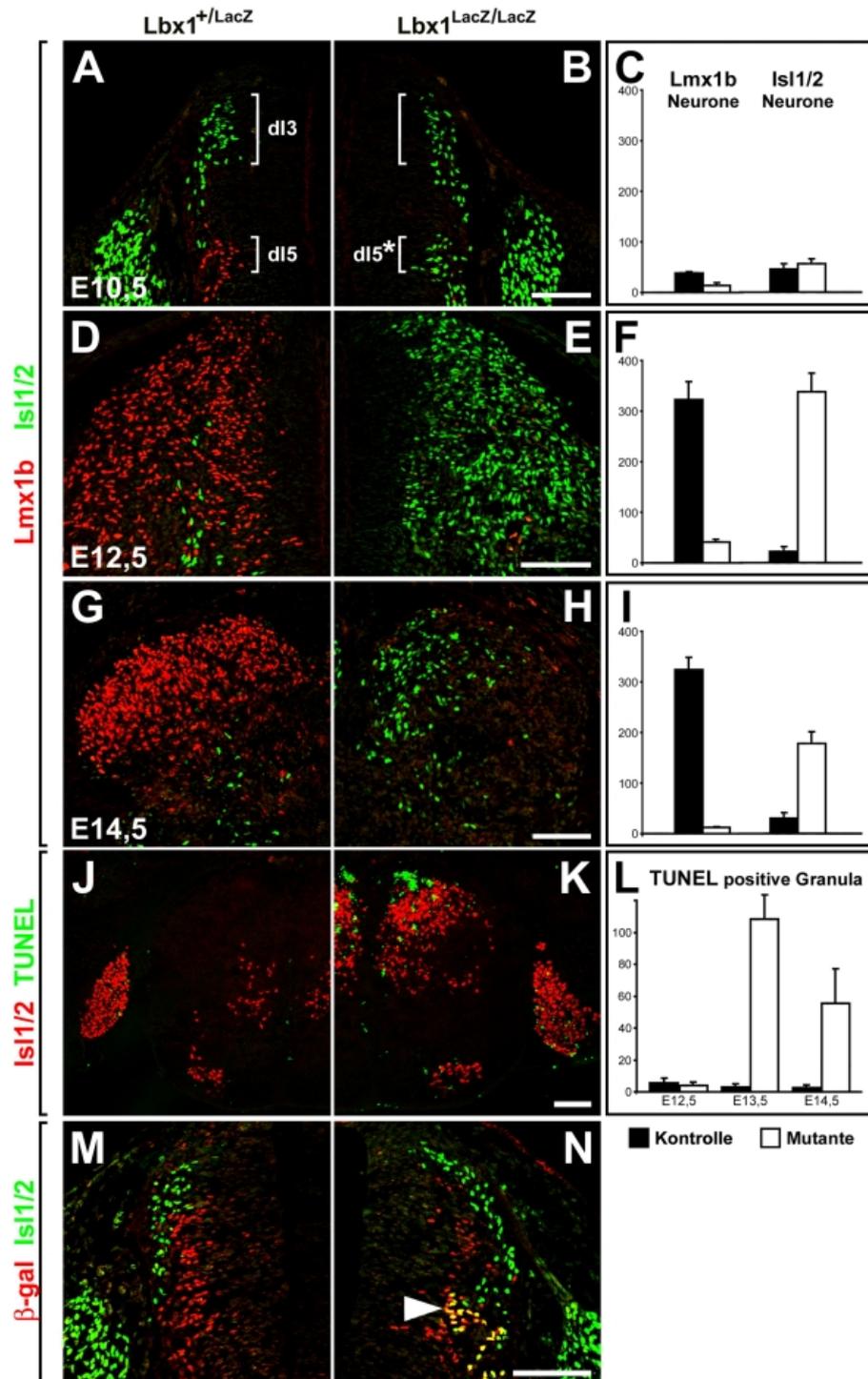
Außerdem waren Veränderungen im Expressionsmuster diverser Homöobox-Transkriptionsfaktoren zu beobachten, die nachfolgend beschrieben werden. In Wildtyp-Embryonen erfolgt die frühembryonale *Lmx1b*-Expression in dI5-Neuronen und von *Isl1/2* in dI3-Neuronen (E10,5; Abb.3.16 A). Im Stadium E12,5 co-exprimieren viele dorsale Neurone *Lbx1* und *Lmx1b* (dIL<sup>B</sup>-Neurone; Abb.3.14 C und 3.16 D) und haben sich im Stadium E14,5 in spezifische Schichten des dorsalen Horns aufgeteilt (Abb.3.14 F und 3.16 G). Die wenigen *Isl1/2*<sup>+</sup> dI3-Neurone sind zumeist in der ventralen Hälfte des dorsalen Rückenmarks lokalisiert. In *Lbx1*-mutanten Mäusen konnte im Stadium E10,5 kein *Lmx1b*-Protein nachgewiesen werden (Abb.3.16 B). Anstelle der *Lmx1b*<sup>+</sup> waren in dieser Region *Isl1/2*<sup>+</sup> Nervenzellen vorhanden, die auch *Brn3a* produzierten. Diese Veränderungen setzten sich im Verlauf der Neurogenese im dorsalen Rückenmark fort. Im Stadium E12,5 konnten in *Lbx1*<sup>-/-</sup> Tieren nur sehr wenige *Lmx1b*<sup>+</sup> Zellen detektiert werden (Abb.3.16 E). Stattdessen war die *Isl1/2*<sup>+</sup> Population erheblich vergrößert und füllte das gesamte dorsale Horn aus. Neu entstandene *Isl1/2*<sup>+</sup> Nervenzellen, die in der Nähe der Ventrikularschicht lokalisiert waren, exprimierten

zusätzlich *Brn3a*, aber kein *Lim1/2* (nicht gezeigt). In den reifen Neuronen, die sich weiter lateral in der Mantelzone befanden, konnte *Brn3a* jedoch nicht mehr nachgewiesen werden. Am Tag E14,5 der Entwicklung sammelte sich die *Isl1/2+* Population im medialen Anteil des dorsalen Rückenmarks (Abb.3.16 H). Die Expression von *Lmx1b* war dagegen kaum sichtbar.

Die zeitliche und räumliche Verteilung der ektopischen *Isl1/2+* Neurone wies darauf hin, daß sie statt der *Lmx1b+* Neurone in den *Lbx1*-Mutanten gebildet wurden. Das Auszählen der Nervenzellen im dorsalen Rückenmark ergab, daß die Summe der *Lmx1b+* Neurone in Wildtyp-Embryonen der Stadien E10,5 und E12,5 vergleichbar war mit der Anzahl der *Isl1/2+* Neurone in *Lbx1*-Mutanten (Abb.3.16 C, F). Allerdings sank die Zahl *Isl1/2+* Nervenzellen ab dem Stadium E13,5 in den *Lbx1*<sup>-/-</sup> Embryonen (Abb.3.16 I). Gleichzeitig dokumentierte die TUNEL-Analyse die gesteigerte Apoptose im dorsalen Horn der *Lbx1*-Mutanten (Abb.3.16 L; siehe 2.2.10.7). Besonders im dorso-medialen Rückenmark ging die Anhäufung sehr vieler ektopischer *Isl1/2+* Neurone mit dem Auftreten absterbender Zellen einher, so daß Apoptose zur Reduktion der *Isl1/2+* Population beitragen könnte (Abb.3.16 K).

Insgesamt zeigen diese Resultate, daß die Nervenzellen im dorsalen Rückenmark, die normalerweise *Lbx1*, *Lmx1b* und *Brn3a* exprimieren (dI5- und dIL<sup>B</sup>-Neurone), ihr Expressionsprofil in *Lbx1*<sup>-/-</sup> Embryonen verändern und *Isl1/2* und *Brn3a* produzieren, jedoch *Lmx1b* verlieren. Damit zeigen diese abnormen Nervenzellen die molekulare Charakteristik von dI3-Neuronen, einem neuronalen Typ der Klasse A und werden daher im weiteren als dI5\* bzw. dIL<sup>B\*</sup> bezeichnet.

Verglichen mit heterozygoten *Lbx1*-Embryonen der Stadien E10,5 und E12,5, in denen keine Co-Expression von  $\beta$ -Galaktosidase und *Isl1/2* beobachtet wurde, produzierten in *Lbx1*<sup>-/-</sup> Tieren die ektopischen *Isl1/2+* Neurone (dI5\* bzw. dIL<sup>B\*</sup>)  $\beta$ -Galaktosidase (Abb.3.16 M, N). Die Induktion der *Isl1/2*-Expression infolge des Verlustes von *Lbx1* in dI5\* und dIL<sup>B\*</sup>-Neuronen ist daher auf einen zell-autonomen Mechanismus zurückzuführen.

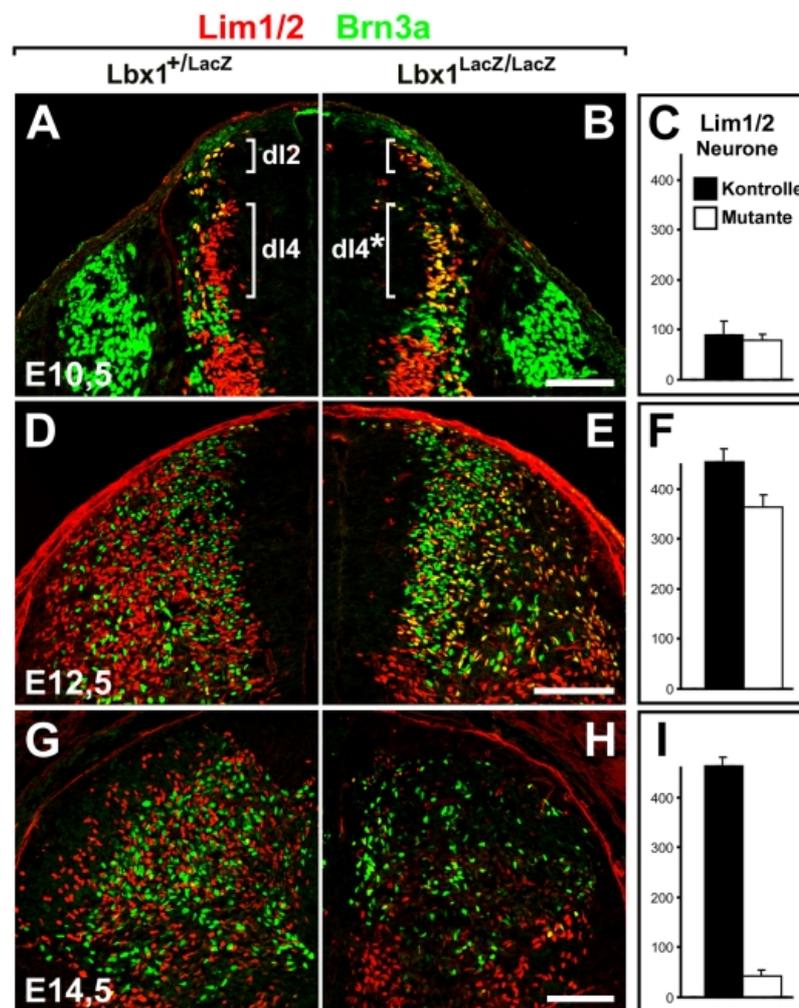


**Abb.3.16: *Lbx1* ist für die Entwicklung von dI5-Neuronen essentiell.**

Die immunhistologische Analyse der Stadien E10,5 (A, B), E12,5 (D, E) und E14,5 (G, H) zeigt die Expression von Lmx1b (A-H) und Isl1/2 (A-N) in Wildtyp- (A, D, G, J, M) und *Lbx1*<sup>-/-</sup> (= *Lbx1*<sup>LacZ/LacZ</sup>; B, E, H, K, N) Embryonen. Die Positionen der im Wildtyp gebildeten Lmx1b<sup>+</sup> dI5- bzw. Isl1/2<sup>+</sup> dI3-Neurone (A) sind ebenso wie die ektopischen Isl1/2<sup>+</sup> dI5-Neurone markiert, die in *Lbx1*<sup>-/-</sup> Embryonen entstanden (B). In späteren Stadien konnten gleichfalls ektopische Isl1/2<sup>+</sup> Neurone beobachtet werden (H, K). Die Anzahl der Lmx1b<sup>+</sup> und Isl1/2<sup>+</sup> Neurone (C, F, I) des Stadiums E10,5 (C), E12,5 (F) und E14,5 (I) von Kontrolle (schwarze Säulen) und Mutanten (weiße Säulen) wurden anhand von immunhistologischen Untersuchungen ermittelt. (J, K) Detektion von Apoptosen durch TUNEL-Färbung und von Isl1/2<sup>+</sup> Neuronen im dorsalen Horn von E14,5 Wildtyp- (J) und *Lbx1*<sup>-/-</sup> Embryonen (K) sowie ihre Quantifizierung von E12,5-E14,5 (L). In *Lbx1*-Mutanten erfolgte die Co-Expression von  $\beta$ -Galaktosidase und Isl1/2 in den ektopischen dI5<sup>\*</sup>-Neuronen (M, N). Die Balken entsprechen 100 $\mu$ m.

### 3.4.3 Die Entwicklung von dI4- und dIL<sup>A</sup>-Neuronen in *Lbx1*-mutanten Mäusen

Normalerweise exprimieren frühembryonale dI4-Neurone *Lim1/2* und *Lbx1*, aber nicht *Brn3a*, und unterscheiden sich damit klar vom dI2-Subtyp, der *Lim1/2* und *Brn3a* produziert (E10,5; vergleiche Abb.3.13 C, E und Abb.3.17 A). Im Stadium E12,5 kann ebenfalls die Co-Expression von *Lim1/2* und *Lbx1* in dIL<sup>A</sup>-Nervenzellen beobachtet werden (Abb.3.14 B). Die Zellen produzieren aber weiterhin kein *Brn3a* (Abb.3.14 G).



**Abb.3.17: *Lbx1* ist für die Entwicklung von dI4-Neuronen essentiell.**

Die immunhistologische Analyse der Stadien E10,5 (A, B), E12,5 (D, E) und E14,5 (G, H) zeigt die Expression von *Lim1/2* und *Brn3a* (A-H) in Wildtyp- (A, D, G) und *Lbx1*<sup>-/-</sup> (= *Lbx1*<sup>LacZ/LacZ</sup>; B, E, H) Embryonen. Die Positionen der im Wildtyp gebildeten *Lim1/2*<sup>+</sup> *dI4*<sup>-</sup> bzw. *Lim1/2*<sup>+</sup>/*Brn3a*<sup>+</sup> *dI2*-Neurone (A) sind ebenso wie die ektopischen *Lim1/2*<sup>+</sup>/*Brn3a*<sup>+</sup> *dI4*<sup>\*</sup>-Neurone markiert, die in *Lbx1*<sup>-/-</sup> Embryonen entstanden (B). Im Stadium E12,5 konnten gleichfalls ektopische *Lim1/2*<sup>+</sup>/*Brn3a*<sup>+</sup> Neurone beobachtet werden (E). Sie waren jedoch im Stadium E14,5 verschwunden (H). Die Anzahl der *Lim1/2*<sup>+</sup> Neurone (C, F, I) des Stadiums E10,5 (C), E12,5 (F) und E14,5 (I) von Kontrolle (schwarze Säulen) und Mutanten (weiße Säulen) wurden mit Hilfe von immunhistologischen Untersuchungen bestimmt. Die Balken entsprechen 100µm.

In *Lbx1*-mutanten Embryonen wurden im Stadium E10,5 in der Region, in der üblicherweise der dI4-Subtyp gebildet wird, ektopische *Lim1/2+* und *Brn3a+* Neurone nachgewiesen (Abb.3.17 B). Diese Nervenzellen verloren im Verlauf ihrer Reifung ab dem Stadium E12,5 beide Markerproteine, was mit einer geringfügigen Reduktion dorsaler *Lim1/2+* Neurone einher ging (Abb.3.17 E, F). Am Tag E14,5 der Embryogenese war die Anzahl der *Lim1/2+* Nervenzellen in *Lbx1*<sup>-/-</sup> Tieren um das Zehnfache vermindert (Abb.3.17 H, I). Die *Lim1/2 in situ*-Hybridisierung bestätigte die verringerte *Lim1/2*-Expression in den *Lbx1*-Mutanten ab dem Stadium E12,5 (nicht gezeigt), obwohl natürlich die einsetzende Apoptose am Tag E13,5 ebenso zu dieser Reduktion beitragen könnte.

Somit lassen sich in *Lbx1*<sup>-/-</sup> Embryonen anstelle der dI4-Neurone abnorme Nervenzellen nachweisen, welche *Lim1/2* und *Brn3a* exprimieren, die charakteristisch für den dI2-Subtyp sind. Deshalb werden diese abnormen Neurone im folgenden als dI4\* bzw. dIL<sup>A\*</sup> bezeichnet. Neben den dI5\*- und dIL<sup>B\*</sup>-Neuronen verändern daher mit den dI4\*- und dIL<sup>A\*</sup>-Nervenzellen weitere Subtypen der Klasse B in *Lbx1*-Mutanten ihr Expressionsprofil, wechseln ihre Identität und nehmen die molekularen Charakteristiken von Klasse A Neuronen an.