

**DER TRANSKRIPTIONSFAKTOR LBX1 –  
SEINE ROLLE BEI DER MIGRATION VON  
VORLÄUFERZELLEN  
UND SEIN EINFLUSS AUF MYOGENE UND NEURONALE  
DETERMINIERUNGSPROZESSE**

**KUMULATIVE DISSERTATION**

ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES  
DOCTOR RERUM NATURALIUM  
(DR. RER. NAT.)

VORGELEGT DER

MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN-  
TECHNISCHEN FAKULTÄT  
DER MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG

Verteidigung am 22.04.05

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Thomas Braun
2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Brand

VON KONSTANZE SCHÄFER  
GEBOREN AM 12.07.1966 IN ZELLA-MEHLIS

Diese kumulative Dissertation ist von der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg genehmigt worden.

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende kumulative Dissertation selbständig verfasst wurde und nur angegebene Hilfsmittel verwendet worden sind. Passagen und Ergebnisse aus anderen Schriften wurden unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Halle, im Oktober 2004

Konstanze Schäfer

gewidmet meiner Mutter, meiner Großmutter, meinem Großvater und meiner Tante Hilde

## **Danksagung**

Die Zeit, die ich mit meiner Doktorarbeit zugebracht habe, gehört zweifellos zu den wichtigeren Abschnitten in meinem Leben. Es gibt viele Menschen, die mir auf die eine oder die andere Weise hilfreich zur Seite gestanden haben und bei denen ich mich herzlich bedanken möchte. Ich bedanke mich bei meiner Familie und bei meinen Freunden. Ich bedanke mich herzlich bei Petra und Herbert Neuhaus für ihre freundschaftliche Unterstützung, für das Korrekturlesen und für die sonnigen Stunden am Schreibtisch in ihrem Garten. Ich bedanke mich bei Detlev Mennerich und Markus Krüger.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Thomas Braun für die Bereitstellung dieses Projektes, für seine engagierte wissenschaftliche Betreuung in Theorie und Praxis und für viele andere tiefe Einblicke in die Welt der Forschung. Seine wissenschaftlichen Anregungen haben viel zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen.

Bei den Co-Referenten dieser Dissertation möchte ich mich für deren Bemühungen bedanken, die damit verbunden waren.

Meine Hausmitbewohner in Berlin waren mir mit ihrem netten Drumherum eine angenehme Stütze, ganz besonders unsere kleine (mahnende) „Diss.-Habil.-Runde“, die es nun ja bald geschafft hat.

In dieser Dissertation diskutierte Publikationen:

Schäfer, K., Neuhaus, P., Kruse, J., Braun, T. **The Homeobox Gene Lbx1 Specifies a Subpopulation of Cardiac Neural Crest Necessary for Normal Heart Development**, *Circ. Res.*, 92, 73-80 (2003)

Krüger, M., Schäfer, K., Braun, T. **The homeobox containing gene Lbx1 is required for correct dorsal-ventral patterning of the neural tube**, *J. Neurochem.*, 82, 774-782 (2002)

Schäfer, K., Braun, T. **Early specification of limb muscle precursor cells by the homeobox gene Lbx1h**, *Nat. Genet.*, 23, 213-216 (1999)

Mennerich, D., Schäfer, K., Braun, T. **Pax3 is necessary but not sufficient for Lbx1 expression in myogenic precursor cells of the limb**, *Mechanisms of Development* 73, 147-158 (1998)

## Inhaltsverzeichnis

### Kapitel 1

1. Einleitung	4
1.1 Die Notwendigkeit von Zellmigration	4
1.2 Migrationsvorgänge spielen von Beginn der Embryogenese an eine wichtige Rolle	5
1.3 Die grundlegenden Mechanismen der Migration	7
1.4 Die Wirkungsweise von Transkriptionsfaktoren	8
1.5 Die Entstehung der Muskelvorläuferzellen der Extremitäten in den Somiten	9
1.6 Die Migration der Muskelvorläuferzellen aus den Somiten in das Mesenchym der Extremitätenknospen – Lbx1 als essentieller Faktor	11

### Kapitel 2

2. Die Rolle von Pax3 und Lbx1 bei der Muskelentwicklung	15
2.1 Pax3 ist notwendig aber nicht hinreichend für die Expression von Lbx1 in den Muskelvorläuferzellen der Extremitäten	15
2.2 Frühe Spezifizierung von Muskelvorläuferzellen der Extremitäten durch das Homöoboxgen Lbx1	16
2.3 Diskussion	19

### Kapitel 3

3. Lbx1 kontrolliert eine Subpopulation der kardialen Neuralleistenzellen	30
3.1 Das Homöoboxgen Lbx1 spezifiziert eine Subpopulation der kardialen Neuralleistenzellen, die für eine normale Herzentwicklung notwendig ist	30
3.2 Diskussion	32

### Kapitel 4

4. Die Funktion von Lbx1 bei der Festlegung von neuronalen Zellidentitäten im dorsalen Neuralrohr	37
4.1 Lbx1 ist erforderlich für eine korrekte dorsal-ventrale Musterbildung im Neuralrohr	37
4.2 Diskussion	38

### Kapitel 5

5. Zusammenfassung	41
--------------------	----

Anhang.....43

- Abkürzungen
- Curriculum vitae
- Publikationen
- Literatur





---

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Notwendigkeit von Zellmigration

Wenn Zellen aktiv über eine signifikante Entfernung hinweg von einem Ort zu einem anderen wandern, wird dieser Vorgang als Migration bezeichnet. Die migrierenden Zellen verlassen ihre ursprüngliche Region und suchen eine andere Region auf. Häufig induzieren sie dabei direkt oder indirekt in Ursprungs- und Empfängerregion Beziehungs- und Strukturveränderungen. Die Migration ist eine Folge der Zelldifferenzierung komplexer Systeme. Sie macht es erforderlich, dass einerseits Zellen in der Umgebung oder Zellen in der Empfängerregion Signale aussenden und andererseits die zur Migration programmierten Zellen in der Lage sind, diese Signale zu empfangen und umzusetzen.

Die ursprünglichste Form der Migration findet man bei einzelligen Organismen wie beispielsweise bei Amöben und Flagellaten. Durch die Erkennung spezifischer Signale sind diese Einzeller in der Lage, ihre Bewegung auf potentielle Nahrungsquellen oder potentielle Fortpflanzungspartner auszurichten (Gilbert 1997). Ein wesentlicher Schritt der Evolution war die Kooperation von mehreren Zellen zu echten vielzelligen Organismen. Dieses Ereignis fand vor ca. 700 Millionen Jahren statt (Gilbert 1997). Im Zuge der Evolution bildeten sich komplexere Organismen heraus. Durch Spezialisierung und Arbeitsteilung von Zellen entstanden qualitativ neue Strukturen. Es entwickelten sich Gewebe wie beispielsweise Muskel-, Binde- und Nervengewebe oder andere Gewebetypen und die sich daraus aufbauenden Organe (Gilbert 1997). In den vielzelligen Organismen entstanden Körperachsen von anterior/posterior und dorsal/ventral sowie spezifische Regionen wie Kopf-, Rumpf- oder Schwanzregion und Gliedmassen zur Fortbewegung. Die im Vergleich zu den Einzellern neu entstandene Komplexität der vielzelligen Organismen und deren stark gewachsene Körperdimension erforderten auch kompliziertere Mechanismen bei deren Entstehung und bei der Aufrechterhaltung ihrer funktionellen Systeme. Migrierende Zellen sind wichtige Bestandteile der Prozesse von Formgebung, Differenzierung und Fortpflanzung und bei Reparaturprozessen (Gilbert 1997). Während der Embryonalentwicklung höherer Organismen ist die Migration von Zellen ein unverzichtbarer Vorgang beim Aufbau eines differenzierten dreidimensionalen Körpers. Hierfür gibt es zahlreiche Beispiele, einige davon sind die Zellwanderungen während der Gastrulation, die Migration von Vorläuferzellen der Skelettmuskulatur und von Neuralleistenzellen oder migrierende Zellen bei der Entstehung

des Gehirns (Gilbert 1997). Auch im adulten Organismus ist die Migration von Zellen ein wichtiger Vorgang bei der Aufrechterhaltung der Funktionalität spezifischer Gewebe. Bei Reparaturprozessen wandern Stammzellen und Satellitenzellen innerhalb des betreffenden Gewebes über kürzere aber auch längere Distanzen zum Verletzungsort.

Folgende Fragen lassen sich im Zusammenhang mit zellulärer Migration formulieren:

Warum ist Migration notwendig? Warum müssen sich zur Migration programmierte Zellen aus ihrem ursprünglichen Zellverband herauslösen und in vorherbestimmte Ansiedlungsregionen einwandern? Die Zellen eines Organismus besitzen untereinander die gleiche genetische Information. Warum können migrierende Zellen nicht bereits ihren Ursprungsort in derjenigen Körperregion besitzen, in der sie in späteren Entwicklungsstadien benötigt werden? Was unterscheidet Zellen mit ursprünglich genetisch gleicher Information voneinander, wenn sie in räumlich unterschiedlichen Bereichen des Körpers entstanden sind?

## **1.2 Migrationsvorgänge spielen von Beginn der Embryogenese an eine wichtige Rolle**

Bereits die unbefruchtete Eizelle besitzt eine anterior-posteriore Polaritätsachse, die durch maternale mRNA im Cytoplasma erzeugt wird (Gilbert 1997). Nach der Befruchtung der Eizelle entwickelt sich durch Furchungsteilungen eine Morula. Die dabei gebildeten Zellen stehen unter dem Einfluss dieser anterior-posterioren Determinanten, die in Wechselwirkung mit den Genprodukten des Embryos zu einer Etablierung von Raumkoordinaten führen (Müller 1995). Die Morula erhält einen animalischen und einen vegetativen Pol. In den folgenden Stadien der Blastulation und Gastrulation wird diese räumliche Polarisierung weiter ausgebaut. Es kommt zur Ausbildung der drei Keimblätter Ektoderm, Mesoderm und Entoderm (Müller 1995). Obwohl die Zellen aller drei Keimblätter die gleiche genetische Ausgangsposition besitzen, haben sie durch ihre ursprünglich räumlich andere Positionierung innerhalb der Blastula unter dem Einfluss verschiedener Determinanten gestanden. Entsprechend dieser Determinierung erfahren bestimmte Genkaskaden eine Aktivierung der Expression, andere Genkaskaden werden stillgelegt. Das Entwicklungspotential dieser drei Keimblätter ist bereits verschieden. Aus dem Entoderm bildet sich in späteren Stadien der Magen-Darm-Trakt heraus. Aus dem Mesoderm entstehen die meisten Bereiche des sich entwickelnden Organismus, unter anderen Muskulatur, Skelett, Blutgefäße, Bindegewebe

---

und Exkretionsorgane. Aus dem Ektoderm entsteht die Epidermis, es liefert aber auch Zellen zur Bildung von Sinnesorganen (Müller 1995).

In den folgenden Stadien der Embryonalentwicklung bilden sich die anterior-posteriore und die dorsal-ventrale Polaritätsachse heraus. Außerdem entstehen Kopf-, Rumpf- und Schwanzregion und es kommt zum Auswachsen der Extremitätenknospen (Gilbert 1997). Die Zellen dieser Bereiche unterliegen einer positionsabhängigen Determinierung und entwickeln sich dementsprechend. Dieser Vorgang wird als Musterbildung bezeichnet. Musterbildung beruht auf der Interaktion zwischen signalgebenden und signalempfangenden Zellen (Gilbert 1997). Die Interaktion zwischen einzelnen Zellen oder verschiedenen Regionen kann auf verschiedene Weise stattfinden. Polypeptide können über weitere Bereiche diffundieren und von empfänglichen Zellen über membranständige Rezeptoren aufgefangen werden. Kleinere Moleküle mit geringerer Polarität können direkt über Zellmembranen hinweg von Zelle zu Zelle wandern. Wenn die Zellmembranen benachbarter Zellen durch gap junctions miteinander verbunden sind, kann auch ein unmittelbarer Austausch von Ionen oder kleinen Molekülen (z.B. cAMP, cGMP) erfolgen (Müller 1995). Auf diese Weise werden die Zellen und Zellverbände entsprechend ihrer räumlichen Position auf ein bestimmtes Schicksal festgelegt. Ihre Determinierung kann nicht mehr oder nur noch sehr begrenzt umprogrammiert werden.

Einige komplexe Bereiche des Embryos erfordern allerdings zu einem bestimmten Entwicklungsstadium das Vorhandensein anderer spezifisch determinierter Zellen, deren genetische Programmierung durch das Wirken regionstypischer Determinanten innerhalb dieses Bereiches nicht möglich war. Auch ist über die gewachsene Körperdimension höherer Organismen oft der Ursprungsbereich des benötigten Zelltyps in einer räumlich entfernten Region angesiedelt. Es besteht die Notwendigkeit der Migration solcher spezifisch determinierten Zellen aus ihrer Ursprungsregion in das Empfängergebiet, dessen normale Entwicklung vom Einmigrieren solcher spezifisch determinierten Zellen abhängig ist. Zwei Beispiele solcher Vorgänge werden in den folgenden Kapiteln beschrieben: die Migration von Vorläuferzellen der Extremitätenmuskulatur aus den Somiten in das Mesenchym der Extremitätenknospen und die Migration einer Subpopulation der Herzneuralleistenzellen in das noch tubulare Herz.

### 1.3 Die grundlegenden Mechanismen der Migration

Die Steuerung der Wanderung von Zellen wird oft durch Interaktionen ihrer Zelloberfläche mit umgebenden Strukturen bestimmt. Die Informationsübertragung von der Zelloberfläche zum Genom im Zellkern erfolgt meist durch rezeptorvermittelte Signaltransduktionsketten, die letztlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen. Diese neu aktivierten Transkriptionsfaktoren wiederum aktivieren oder reprimieren bestimmte Genkaskaden. Mit der extrazellulären Domäne des Rezeptormoleküls interagierende Signalmoleküle treten häufig an der extrazellulären Matrix gebunden oder auch im gelösten Zustand auf. Diffundierende Signalmoleküle können von Zellen aus der Umgebung sezerniert oder durch das Blut transportiert worden sein. Viele der verschiedenen Signaltransduktionswege sind untereinander verknüpft und können sich gegenseitig verstärken oder hemmen. Außerdem interagieren viele Signalmoleküle gleichzeitig mit einer Zelle, so dass eine Reihe von verschiedenen Informationen simultan verarbeitet werden muss. (Gilbert 1997)

Die beschriebenen Interaktionen der Zelle mit signalgebenden Molekülen aus ihrer Umgebung führen zu Determinierungs- und Differenzierungsvorgängen. Diese Prozesse finden auf den Ebenen der Transkription, der Translation und der posttranslationalen Modifikation statt. Die Zelle erfährt gezielte Veränderungen in ihrem Aufbau und in ihren Eigenschaften. Auf diese Weise wird festgelegt, welches Schicksal die Zelle einnimmt, wann sie differenziert und auch ob sie als migratorische Zelle Beweglichkeit erlangt und in welches Zielgebiet sie einwandert.

Zellen, die zur Migration programmiert sind, müssen für Signale empfänglich sein, wann die Migration gestartet oder beendet werden soll und welche Migrationsroute genutzt wird. In der Umgebung der Zellen einer Region existieren zahlreiche signalübertragende Moleküle. Die Hauptsignale scheinen mit Substanzen in der extrazellulären Matrix verbunden zu sein. Es wird vermutet, dass verschieden determinierte Zellen jeweils andere Moleküle in unterschiedlichen extrazellulären Matrices erkennen können. Jeder migrierende Zelltyp spricht vermutlich auf eine bestimmte Kombination von Matrixmolekülen an, die den Zellen mitteilen, wann sie migrieren sollen und wohin (Gilbert 1997).

Die Wirkungsweise des in dieser Arbeit untersuchten Gens *Lbx1* auf die Migration von Zellen liegt in erster Linie auf der Ebene der Transkription. *Lbx1* kodiert für einen Transkriptionsfaktor und ist Bestandteil einer Genkaskade, die Vorläuferzellen der

Extremitätenmuskulatur zur Migration von ihrem Ursprungsort in der lateralen Spitze im Dermamyotoms des Somiten in ihr Empfängergebiet des Mesenchyms der Extremitätenknospen befähigt. Lbx1 hat offensichtlich auch einen Einfluss auf die myogenen Differenzierungsprozesse dieser migratorischen Vorläuferzellen, wenn sie ihr Zielgebiet erreicht haben. Weiterhin ist der Transkriptionsfaktor Lbx1 involviert in die genetische Regulation einer Subpopulation der Herzneuralleistenzellen, die aus den Neuralleisten auswandert und sich im noch tubulären Herzen ansiedelt. In diesen Zellen ist Lbx1 ein Bestandteil eines autoregulatorischen „Feed-back-loops“, der scheinbar einen Einfluss auf deren Proliferationsrate hat. Lbx1 ist weiterhin ein wichtiger Faktor für die Entwicklung dorsaler Neuronen innerhalb des Neuralrohrs. Obwohl für Lbx1 ein dorsalisierender Einfluss auf die neuronale Entwicklung nachgewiesen wurde, ist nicht auszuschließen, dass die verringerte Anzahl dorsaler Neuronen durch einen Migrationsdefekt hervorgerufen wurde.

#### **1.4 Die Wirkungsweise von Transkriptionsfaktoren**

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die mittels besonderer Domänen in der Lage sind, an für sie typische DNA-Erkennungssequenzen zu binden und die Expression bestimmter Gene oder Genkaskaden zu regulieren. Die entsprechenden Sequenzen liegen innerhalb der Promotorregionen oder stromaufwärts davon. Manche Sequenzen können auch innerhalb von Introns liegen. Diese Proteine wirken entweder als Aktivator oder als Repressoren. Bisher kennt man eine Reihe von verschieden aufgebauten Transkriptionsfaktoren. Zu ihnen gehören Helix-Loop-Helix-Proteine und Helix-Turn-Helix-Proteine, Zinkfingerdomänproteine, Proteine mit Pax-Motiv, Leucin-Reißverschluss-Proteine und andere (Müller 1995, Gilbert 1997).

Der Transkriptionsfaktor Lbx1 zählt zu den Homeodomänproteinen. Das Protein besitzt ein Helix-Turn-Helix-Motiv mit hydrophoben Charakter, über das es mit anderen Helix-Turn-Helix-Proteinen oder Proteinen mit ähnlich hydrophoben Eigenschaften interagieren kann. Außerdem besitzt das Protein eine Domäne zur Bindung an die DNA. Da in den folgenden Experimenten nachgewiesen werden konnte, dass der Funktionsverlust von Lbx1 zu Migrationsdefekten von Muskelvorläuferzellen der Extremitäten bzw. zu einer Reihe von Differenzierungsstörungen spezifischer Zell-Linien führt, scheint dieser Transkriptionsfaktor ein wichtiger Bestandteil der Genkaskaden zu sein, die diese Prozesse kontrollieren. Obwohl

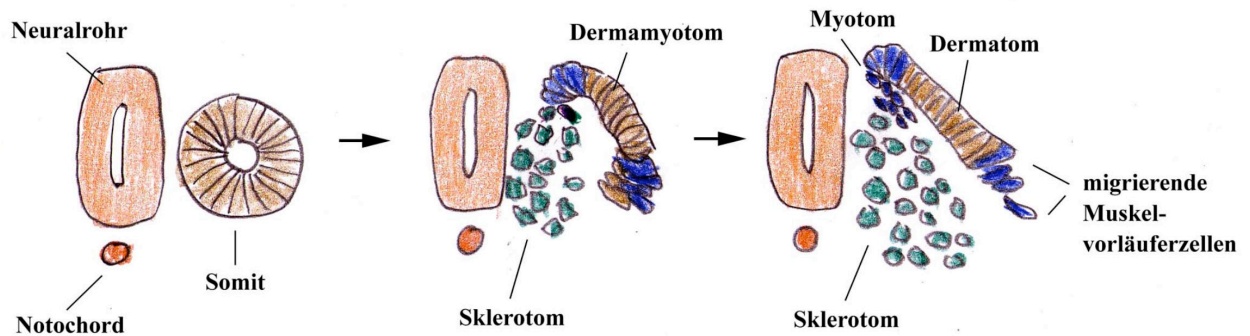
man zeigen konnte, dass die Expression von Lbx1 unter anderem auch vom Transkriptionsfaktor Pax3 abhängig ist (Mennerich et al. 1998), sind bisher keine direkten Interaktionen des Pax3 Proteins oder anderer Proteine mit regulatorischen Sequenzen von Lbx1 nachgewiesen worden. Überexpressionsexperimente mit Lbx1 (Mennerich und Braun 2001) zeigten eine ektopische Expression der Transkriptionsfaktoren Pax3 und MyoD. Ein Nachweis direkter Interaktionen des Lbx1 Proteins mit den regulatorischen Sequenzen dieser oder anderer Proteine oder Interaktionen mit anderen Proteinen wurden bisher nicht gezeigt.

### **1.5 Die Entstehung der Muskelvorläuferzellen der Extremitäten in den Somiten**

Höher entwickelte Organismen besitzen in der Regel eine größere Anzahl an Muskeln als niedrigere Organismen. Mit zunehmendem Evolutionsgrad sind diese Muskeln auch komplexer aufgebaut. Verschiedene Muskelgruppen bzw. Muskelarten entstehen aus unterschiedlichen Vorläuferzellen, die wiederum aus verschiedenen Zellarten oder Geweberegionen hervorgehen.

Die Entwicklung der Muskelvorläuferzellen für die Extremitäten beginnt mit der Herausbildung und Reifung der beidseitig lateral des Neuralrohrs gelegenen Somiten, die aus dem paraxialen Mesoderm hervorgegangen sind. Aus den Zellen ursprünglich gleichen Typs entstehen das Sklerotom und das Dermamyotom, aus dem sich im weiteren Verlauf das Dermatome und das Myotome abgrenzen (Gilbert 1997). Während dieser Phase unterliegen die Zellen dem Einfluss von Signalen, die vom Neuralrohr, vom Notochord und vom Ektoderm stammen und zur Determinierung eines der jeweiligen drei Bereiche führen (Gilbert 1997). Zuerst unterlaufen die Zellen des Sklerotoms eine epithelio-mesenchymale Transition. Dabei lösen sie sich aus dem epithelialen Zellverband, teilen sich mitotisch und nehmen einen mesenchymalen Charakter an. Diese Population stellt die Vorläuferzellen für Knorpel- und Knochenstrukturen der Wirbelsäule, aus denen beispielsweise Wirbelkörper und Rippen hervorgehen (Gilbert 1997). An der lateralen Spitze des Dermamyotoms unterlaufen die Zellen ebenfalls eine epithelio-mesenchymale Transition. Diese Population liefert die Muskelvorläuferzellen für die Körperwand und die Extremitäten, sowie für das Diaphragma und Hals- und Nackenmuskeln (Gilbert 1997). Um in ihre Zielregion zu gelangen, ist es für diese Zellen notwendig, entlang eines durch Signale aus der Umgebung markierten Weges zu migrieren. Die Zellen an der dorsalen Spitze des Dermamyotoms wandern entlang dessen

Innenseite und bilden dort als eine zweite innere Schicht das Myotom. Aus den myotomalen Zellen entstehen die autochthonen Muskeln des Rückens. Die äußere Schicht bildet das Dermatome, aus dessen Zellen mesenchymales Bindegewebe der dorsalen Dermis entsteht (Gilbert 1997).



#### **Darstellung: Somitenreifung** (nach Gilbert 1997)

Die Spezifizierung der einzelnen Somitenbereiche ist abhängig von den auf sie einwirkenden Signalen aus der sich ebenfalls entwickelnden Umgebung. Einige dieser Signale sind bekannt. Das Sklerotom steht unter dem Einfluss von Sonic hedgehog (Shh), das vom Notochord und dem ventralen Bereich des Neuralrohrs sezerniert wird. Die Sklerotomzellen selbst exprimieren einerseits den Transkriptionsfaktor Pax1, der knorpelspezifische Gene aktiviert und andererseits I-mf, einen Inhibitor für den Transkriptionsfaktor MyoD, wodurch eine muskelspezifische Entwicklung gehemmt wird (Gilbert 1997, Birchmeier et al. 2000). Das Dermatome entwickelt sich unter dem Einfluss eines aus dem Neuralrohr stammenden Faktors neurotrophin 3 (NT-3), der offensichtlich den Zellen die Umwandlung von einem epithelialen in einen mesenchymalen Charakter und deren Migration gegen die Dermis ermöglicht (Gilbert 1997, Birchmeier et al. 2000). Das Myotom wird beeinflusst von Signalen des dorsalen Neuralrohrs, möglicherweise von Proteinen aus der Wnt-Familie. Aus diesen Zellen entsteht die epaxiale Muskulatur des Rückens. Die laterale Spitze des Dermamyotoms wird wahrscheinlich durch eine Kombination von aus der Epidermis stammenden Wnt-Proteinen und dem Bone Morphogenic Protein 4 (BMP4) aus dem lateralen Plattenmesoderm beeinflusst. In diesem Bereich entstehen die Vorläuferzellen der hypaxialen Muskulatur der Körperwand und der Extremitäten (Gilbert 1997). Sowohl das Myotom als auch die in späteren Stadien an ihrem Zielort akkumulierten Abkömmlinge der Zellen in der lateralen

Spitze des Dermamyotoms exprimieren die myogenen Transkriptionsfaktoren MyoD und Myf5. Muskelspezifische Genkaskaden werden aktiviert, die letztendlich zu einer Differenzierung in Muskelzellen führen (Gilbert 1997, Birchmeier et al. 2000). Die laterale Spitze des Dermamyotoms liefert außerdem auch Vorläuferzellen für das Endothelium von Blutgefäßen (Kardon et al. 2002).

### **1.6 Die Migration der Muskelvorläuferzellen aus den Somiten in das Mesenchym der Extremitätenknospen – Lbx1 als essentieller Faktor**

Die Entwicklung migrierender myogener Zell-Linien schließt verschiedene Schritte ein. Zu ihnen gehören die Herausbildung von Muskelvorläuferzellen an ihrem Ursprungsort in der lateralen Spitze des Dermamyotoms, deren Delamination (epithelio-mesenchymale Transition), die Migration entlang eines vorherbestimmten Weges in die Extremitätenknospen, die dortige Vergrößerung der Zellmasse durch Proliferation und letztendlich die Differenzierung in Muskelzellen durch die Expression myogener Faktoren in Abhängigkeit von Signalen aus der Umgebung (Birchmeier et al. 2000). Bemerkenswerterweise exprimieren migrierende Muskelvorläuferzellen während der Phase der Migration keine myogenen Faktoren. Deren Expression setzt erst mit dem Erreichen des Zielortes ein. Ziele dieser Zellen sind die sich noch entwickelnden Strukturen der Vorder- und Hinterextremitäten, der Zunge und des Zwerchfells (Birchmeier et al. 2000).

Der Prozess der Migration von Muskelvorläuferzellen in die Extremitätenknospen wird von einem komplexen Zusammenspiel vieler Faktoren in den Zellen selbst und auch aus ihrer Umgebung gesteuert. Die für den Ablauf der Migration wichtigsten, in migratorischen Zellen exprimierten Faktoren sind Pax3, c-met und Lbx1. Diese drei Gene werden sowohl in der lateralen Spitze des Dermamyotoms, in den Zellen während der Migration und in den zu Vormuskelmassen der Extremitätenknospen akkumulierten migratorischen Zellen exprimiert (Birchmeier et al. 2000). Mox2 ist ebenfalls ein Faktor, der in migrierenden Zellen transkribiert wird und scheinbar der Aufrechterhaltung der Expression von Pax3 und Myf5 dient. Allerdings wird Mox2 zusätzlich auch im Mesenchym der Extremitäten gebildet (Mankoo et al. 1999). Msx1 wird nur in migratorischen Muskelvorläuferzellen der Vorderextremitäten exprimiert und hält offensichtlich die Myoblasten in Proliferation (Buckingham et al. 2003). Innerhalb der Extremitäten scheint die Signalübertragung durch FGFs sowohl für die Proliferation als auch für die Migration von Bedeutung. Der Rezeptor



---

FGFR4 und wahrscheinlich FGF8 als sein Ligand sind erforderlich für den Ausstieg der Myoblasten aus der Proliferation und deren Einstieg in die Differenzierung (Buckingham et al. 2003). Die letztendliche Differenzierung der migratorischen Muskelvorläuferzellen erfolgt mit der Expression von Myogenin und anderen Differenzierungsfaktoren wie beispielsweise Mef2 (Buckingham et al. 2003).

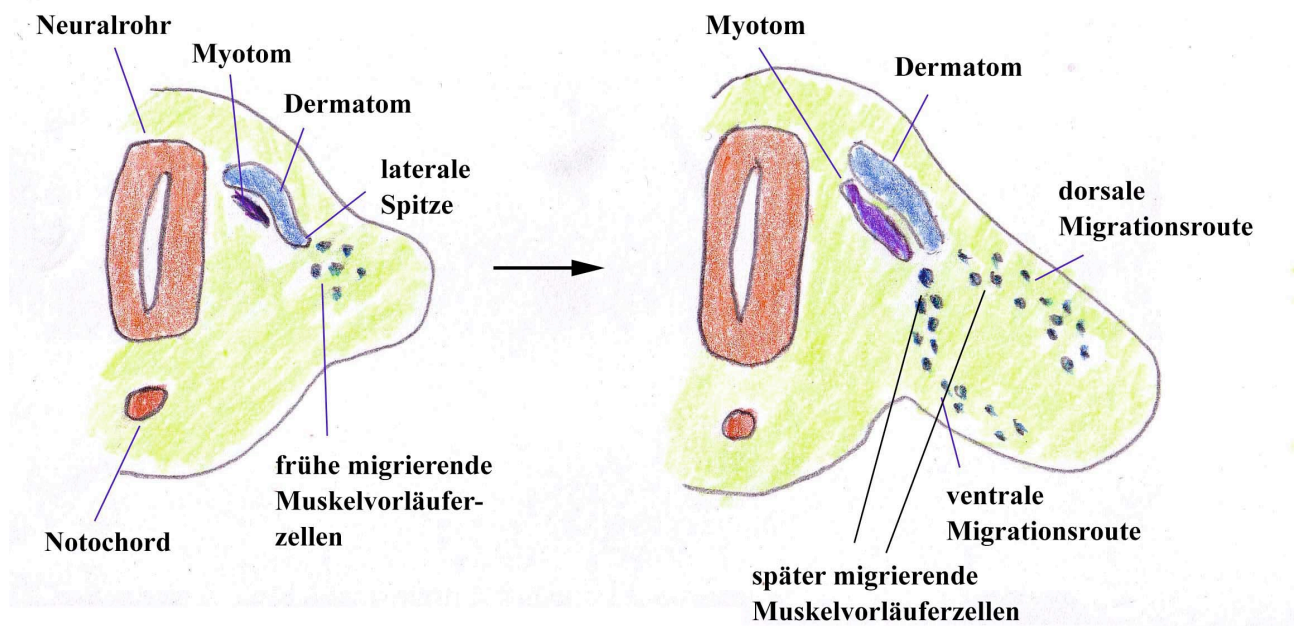
Pax3 wird in früheren Entwicklungsstadien im gesamten Somiten exprimiert und beschränkt sich in späteren Stadien auf eine Expression im Dermomyotom und letztendlich auf dessen medialen Bereich und die laterale Spitze (Golding et al. 1994). Das Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der eine Paired-Domäne und eine Homeodomäne enthält. Es gibt verschiedene Pax3-Mutationen (verschiedene Splotch-Allele), die zeigen, dass Pax3 für eine normale Herausbildung von Muskelvorläuferzellen erforderlich ist. Dieser Pool an Muskelvorläuferzellen ist in Splotch-Mäusen aufgrund zunehmender Apoptose reduziert. Die verbleibenden Muskelvorläuferzellen sind nicht in der Lage zu delaminieren. Als Resultat dessen fehlen den Pax3-Mutanten die Muskeln in den Extremitäten und im Zwerchfell (Birchmeier et al. 2000). Pax3 kontrolliert entweder direkt oder indirekt die Transkription von Genen, die für eine Muskelentwicklung relevant sind. Ein Pax3-Defekt hat negative Auswirkungen auf die Expression der beiden anderen, für die Migration essentiellen Gene *c-met* und *Lbx1*. Während die Expression von *c-met* reduziert und disorganisiert ist, entfällt die Expression von *Lbx1* in der lateralen Spitze des Dermamyotoms völlig (Birchmeier et al. 2000).

Das Gen *c-met* wird im lateralen Dermamyotom exprimiert und kodiert für einen Tyrosin-Kinase-Rezeptor, der an der Oberfläche der Zellen lokalisiert ist und spezifische Liganden erkennt. Die Bindung der Liganden induziert eine Tyrosin-Phosphorylierung der Rezeptoren und löst die Aktivierung von Signaltransduktionsketten aus. Sein Ligand Scatter-Faktor (SF/HGF) wird von den Zellen des Mesenchyms der Extremitäten sezerniert und diffundiert bis in die Somitenregion. Nach einer Signalübertragung durchlaufen die Zellen eine epithelio-mesenchymale Transition und werden motil. Mutationen von *c-met* oder von SF/HGF verhindern die Delamination der Muskelvorläuferzellen und führen zu einem Fehlen der Muskeln in den Extremitäten und im Zwerchfell. Im Gegensatz zu Pax3-Mutationen haben *c-met* oder SF/HGF keinen Einfluss auf die Herausbildung von Muskelvorläuferzellen im Dermamyotom (Birchmeier et al. 2000). In *c-met*- und SF/HGF-Mutanten wird *Lbx1* normal exprimiert. Die *c-met* Aktivität erhält die Dissoziation und Beweglichkeit der Zellen aufrecht.

---

Es wurde experimentell nachgewiesen, dass das Vorhandensein von SF/HGF zur Zerstreuung der Zellen führt (Birchmeier et al. 2000). Eine Wirkung als Chemoattraktant ist bisher umstritten. Einige Experimente scheinen die Chemoattraktanz von SF/HGF auszuschließen (Mennerich et al. 1998), andere Experimente scheinen im Gegensatz dazu darauf hinzuweisen (Birchmeier et al. 2000). Pax3 ist in der Lage, an den c-met-Promotor zu binden, was beweist, dass c-met ein direktes stromabwärts-Ziel von Pax3 ist (Birchmeier et al. 2000).

Lbx1 kodiert für einen Transkriptionsfaktor mit Homeodomäne. Auffällig für das Expressionsmuster von Lbx1 ist, dass innerhalb der Muskelentwicklung nur migratorische Zellen Lbx1 exprimieren. Im Gegensatz zu Pax3 und c-met, die beide auch in anderen Somitenbereichen transkribiert werden, ist die Expression von Lbx1 nur auf die laterale Spitze des Dermamyotoms beschränkt. Diese Expression verläuft zudem als Expressionswelle von anterior nach posterior entlang der Körperachse und wird in den Somiten im Bereich zwischen den Extremitäten bald herunterreguliert, wohingegen Pax3 und c-met auch in diesem Bereich eine Expression aufrechterhalten. Zum gleichen Zeitpunkt bleibt die Lbx1-Expression in den migratorischen Zellen auf Höhe der Extremitäten bestehen. Lbx1 wird genau wie Pax3 und c-met in den migratorischen Zellen anhaltend exprimiert und fällt in seiner Expression erst ab, wenn diese in Muskelzellen differenzieren. Das Expressionsmuster, das mit dem Vorgang der Migration noch enger als Pax3 und c-met verknüpft ist, gab Anlass zu der Vermutung, dass Lbx1 den Ablauf des Migrationsprozesses steuert. Da es sich bei Lbx1 um einen Transkriptionsfaktor handelt, waren sowohl Einflüsse auf den Migrationsprozess als auch möglicherweise auf die Differenzierung der Zellen denkbar. Um die Lbx1-Funktion während der Migration genauer untersuchen zu können, war es erforderlich, eine Maus mit einem Lbx1-Defekt herzustellen.



**Darstellung: Migration der Muskelvorläuferzellen in die Extremitätenknospen**  
(nach Gilbert 1997)

Aus dem reifenden Dermamyotom bilden sich die Strukturen des Myotoms, des Dermatoms und der lateralen Spitze des ehemaligen Dermamyotoms heraus, in der die zur Migration programmierten Muskelvorläuferzellen angesiedelt sind. Diese Zellen durchlaufen eine epithelio-mesenchymale Transition, zerstreuen und migrieren zielgerichtet entlang einer dorsalen und einer ventralen Migrationsroute in das Mesenchym der Extremitätenknospen.

Neuere Untersuchungen an Hühnchen bzw. an Fischen haben gezeigt, dass zwischen früh auswandernden und später auswandernden Muskelvorläuferzellen ein verschieden starkes Potential besteht, sich in den Extremitäten in langsame oder in schnelle Myotuben zu entwickeln. Während früh migrierende Zellen vorrangig in langsame Myotuben differenzieren, entwickeln sich später aus dem Somiten migrierende Vorläuferzellen überwiegend in schnelle Myotuben (Lance-Johnes 1995), was darauf schließen lässt, dass die Zellen bereits eine gewisse Determinierung erfahren, bevor oder während sie die Somiten verlassen und nicht erst, wenn sie an ihrem Zielort angelangt sind. Allerdings konnten diese Ergebnisse nicht auf Säugetiere übertragen werden.

## 2. Die Rolle von Pax3 und Lbx1 bei der Muskelentwicklung

### 2.1 Pax3 ist notwendig aber nicht hinreichend für die Expression von Lbx1 in den Muskelvorläuferzellen der Extremitäten

In der folgenden Veröffentlichung „**Pax-3 is necessary but not sufficient for lbx1 expression in myogenic precursor cells of the limb**“ wird die Bedeutung von Pax3 für die Initiation der Expression von Lbx1 diskutiert. Zusätzlich werden mögliche Wechselwirkungen der Gene Pax3, c-met und Lbx1 untereinander betrachtet.

Während der Migration der Muskelvorläuferzellen aus den Somiten in das Mesenchym der Extremitätenknospen werden eine Reihe spezifischer Faktoren exprimiert. Die Gene Pax3, c-met und Lbx1 werden in einem direkten Zusammenhang mit diesem Migrationsprozess gesehen. Die folgenden Experimente waren darauf angelegt, die Wirkungsweise und mögliche Wechselwirkungen dieser Gene untereinander herauszufinden. In Splotch-Mutanten mit einem nicht funktionstüchtigen Pax3-Protein wurde das Expressionsmuster von Lbx1 und c-met untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Expression von Lbx1 im Somiten stringent von einer normalen Pax3-Expression abhängig ist. In Splotch-Mutanten fand im Somiten keine Expression von Lbx1 statt. Das führt zu der Vermutung, dass Lbx1 stromabwärts von Pax3 innerhalb einer Kaskade reguliert wird. Die Lbx1-Expression im Neuralrohr schien von einer Pax3-Expression unabhängig zu sein. Im Gegensatz dazu war die Expression von c-met in den Somiten von Splotch-Mutanten nur gering reduziert. Überraschenderweise konnte in Splotch-Mäusen eine c-met-positive Zellpopulation in den Vorderextremitäten beobachtet werden, was einen Hinweis darauf gibt, dass die Migration von Muskelvorläuferzellen in die Extremitäten nicht zwingend nur von Pax3 abhängig sein könnte.

Die Beeinflussung Pax3-positiver Zellen in den Somiten durch SF/HGF führte zwar zu einer epithelio-mesenchymalen Transition und zur ungerichteten Migration der Zielzellen. Sie konnte aber keine ektopische Expression von Lbx1 herbeiführen. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass einerseits Pax3 für die Expression von Lbx1 unbedingt erforderlich ist, es aber andererseits offensichtlich neben Pax3 einen oder mehrerer weiterer Faktoren bedarf, um eine Expression von Lbx1 zu induzieren. Solche Faktoren sind bisher noch unbekannt. Diese Vermutung wurde in einem weiteren Experiment untermauert: Eine Induktion Pax3-positiver Zellen in den Somiten durch FGF-2 führte zur Ausbildung einer ektopischen Extremitätenknospe. Während dieses Vorgangs kam es auch zu einer ektopischen Expression

von Lbx1. Scheinbar werden durch FGF-2 direkt oder indirekt alle Faktoren aktiviert, die zu einer erfolgreichen Expression von Lbx1 erforderlich sind.

Pax3-positive Zellen, die durch SF/HGF induziert wurden und keine ektopische Expression von Lbx1 aufwiesen, waren nur zu einer epithelio-mesenchymalen Transition mit anschließender ungerichteter Zerstreuung der Zellen fähig. Im Gegensatz dazu konnten Pax3-positive Zellen, die durch FGF-2 induziert wurden, im Zuge der Ausbildung einer ektopischen Extremitätenknospe auch ektopisch Lbx1 exprimieren. Diese Lbx1-positiven Zellen vollzogen nach einer epithelio-mesenchymalen Transition eine zielgerichtete Migration in das Mesenchym der Extremitätenknospe. Die Gene Pax3 und c-met sind erforderlich für die Eigenschaft der Zellen, sich aus dem Epithel des Dermamyotoms der Somiten zu lösen und (ungerichtet) zu migrieren. Für die zielgerichtete Migration solcher Zellen scheint allerdings die Funktion von Lbx1 unbedingt erforderlich zu sein.

**Mennerich, D., Schäfer, K., Braun, T. Pax3 is necessary but not sufficient for Lbx1 expression in myogenic precursor cells of the limb, Mechanisms of Development 73, 147-158 (1998)**

## **2.2 Frühe Spezifizierung von Muskelvorläuferzellen der Extremitäten durch das Homeoboxgen Lbx1**

In der Veröffentlichung „**Early specification of limb muscle precursor cells by the homeobox gene Lbx1h**“ wird Lbx1 als ein Faktor beschrieben, der Muskelvorläuferzellen bereits zu einem frühen Zeitpunkt spezifiziert, noch bevor sie aus den Somiten in das Mesenchym der Extremitäten migrieren. Ursprünglich wurde bis dahin postuliert, dass Muskelvorläuferzellen vor ihrer Migration aus den Somiten eine homogene Population darstellen und erst im Mesenchym der Extremitäten zu verschiedenen Muskelzelltypen aufgrund der Faktoren determinieren, die in dieser Region auf die Vorläuferzellen einwirken. Hier konnte gezeigt werden, dass die Population der Muskelvorläuferzellen im Somiten zu Beginn der Migration keineswegs homogen ist, sondern bereits aus zumindest zwei großen Subpopulationen besteht.

Vorherige Untersuchungen haben gezeigt, dass c-met (reguliert durch Pax3) den Zellen des Dermatomyotoms der Somiten die Fähigkeit vermittelt, eine epithelio-mesenchymale Transition zu durchlaufen und anschließend zu zerstreuen. Aber ohne die Funktion von Lbx1 war der überwiegende Teil dieser Zellen nicht in der Lage, anschließend eine zielgerichtete Migration zu vollziehen (Mennerich et al. 1998). Möglicherweise ist Lbx1 als Bestandteil einer regulatorischen Genkaskade an der Umsetzung von Signalen aus der Umgebung beteiligt, die den migrierenden Zellen einen vorherbestimmten Migrationsweg markieren. Diese Ergebnisse waren der Ausgangspunkt zur Herstellung einer Lbx1 Knock-out Maus. Einerseits sollte durch den Verlust der Lbx1-Funktion dessen Wirkungsweise und dessen Wechselwirkung mit anderen in die Migration involvierten Genen (besonders mit c-met und Pax3) näher untersucht werden. Andererseits postulierten andere Experimente mit Wachtel/Huhn-Chimären (Chevallier & Kierry 1982, Butler et al. 1988) und Zellmarkierungsexperimente im Huhn (Kardon et al. 2002), dass migrierende Muskelvorläuferzellen im Stadium des Auswanderns aus den Somiten keine eigene Programmierung hinsichtlich ihrer Differenzierung in spezifische Muskelgruppen innerhalb der Extremitäten realisieren würden. Es wurde allgemein vermutet, dass migrierende Muskelvorläuferzellen erst an ihrem Zielort im Mesenchym der Extremitäten die erforderlichen Signale für die Differenzierung in individuelle Muskeln erhalten. Migrierende Muskelvorläuferzellen besäßen demzufolge keine eigenen (zellautonomen) Signale über deren spätere Identität innerhalb des Muskelapparates der Vorder- oder der Hinterextremitäten. Da Lbx1 offensichtlich eine zielgerichtete Migration in dorsale, ventrale, proximale und distale Bereiche des Mesenchyms der Extremitäten vermitteln kann, ist bei der Untersuchung seiner Wirkungsweise auch von Interesse, ob diese migrierenden Vorläuferpopulationen beim Ausfall der Lbx1-Funktion eine homogene Reaktion zeigen oder ob ein unterschiedliches Verhalten sichtbar wird.

Bei der Herstellung des Lbx1-Knock-outs wurde ein großer Bereich der kodierenden Lbx1-Sequenz einschließlich der Homeobox im zweiten Exon entfernt und durch ein bakterielles lacZ-Gen ersetzt. Dieses Konstrukt ermöglichte, sowohl homozygote Knock-out-Zellen als auch heterozygote Zellen, die sich in der Regel wie Wildtypzellen verhielten, durch eine LacZ-Anfärbung zu verfolgen. Das mutierte Lbx1-Protein selbst war funktionsuntüchtig, da es aufgrund der fehlenden Homeodomäne nicht mit einem Interaktionspartner interagieren und an die DNA binden konnte. Mittels homologer Rekombination in ES-Zellen wurden Zelllinien etabliert, die die Null-Mutation von Lbx1 trugen. Diese Zellen wurden zur Generation transgener Mäuse verwendet, die kein funktionsfähiges Lbx1-Protein bilden konnten.

Lbx1-Knock-out Mäuse zeigten einen Muskeldefekt in den Vorder- und Hinterextremitäten. Während die Hinterextremitäten völlig frei von Muskeln waren, konnten in den Vorderextremitäten im proximal-ventralen Bereich Muskelgruppen mit normaler Anordnung detektiert werden. In den restlichen dorsalen und distalen Bereichen der Vorderextremitäten waren ebenfalls keine Muskeln nachweisbar. Histologische Untersuchungen der verbleibenden Muskelgruppen im proximal-ventralen Bereich (Flexormuskeln) deuteten auf eine gestörte Muskeldifferenzierung hin. Bei der Betrachtung früherer Entwicklungsstadien der Embryonalentwicklung von Lbx1-Knock-out Mäusen wurde deutlich, dass dieser Muskeldefekt die Folge eines starken Migrationsdefektes der Muskelvorläuferzellen darstellt. In heterozygoten Embryonen teilten sich die migrierenden Muskelvorläuferzellen beim Eintritt in die vorderen oder hinteren Extremitätenknospen in eine dorsale und eine ventrale Population. Im Kontrast dazu fand in den homozygoten Lbx1-Mutanten zwar eine epithelio-mesenchymale Transition statt und die Zellen des Dermamyotoms konnten auch zerstreuen, aber die Migrationswege der Zellen waren größtenteils unterbrochen. Nur in den proximal-ventralen Bereich der vorderen Extremitäten konnten Muskelvorläuferzellen einwandern, was das Vorhandensein von Muskeln in diesem Bereich zu einem späteren Entwicklungsstadium erklärt. Die Vorläuferzellen waren nicht in der Lage, in den dorsalen und distalen Bereich der Vorderextremitäten sowie in den gesamten Bereich der Hinterextremitäten einzuwandern. Sie blieben zerstreut in der Rumpffregion zurück. Es ist unklar, ob diese Zellen aufgrund fehlender Signale aus der Umgebung Apoptose vollzogen oder ob sie in der Entwicklung der Körperwandmuskeln aufgingen.

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass die beobachteten Muskeldefekte der Lbx1-Knock-out Mäuse die Folge eines Migrationsdefektes der entsprechenden Vorläuferzellen sind. Der auftretende Muskeldefekt scheint also in den migratorischen Zellen selbst zu liegen, da nur in ihnen Lbx1 normalerweise exprimiert wurde. Auch ist offensichtlich, dass ein Ausfall der Lbx1-Funktion bei einem Teil dieser migratorischen Zellpopulationen zu einem Migrationsdefekt führte und bei einem anderen Teil nicht. Diese Zellpopulationen müssen also schon zum Zeitpunkt des Auswanderns aus dem Dermamyotom der Somiten unterschiedliche regulatorische Mechanismen besitzen und scheinen keineswegs einen homogenen Zelltyp darzustellen.

**Schäfer, K., Braun, T. Early specification of limb muscle precursor cells by the homeobox gene Lbx1h, Nat. Genet., 23, 213-216 (1999)**

## 2.3 Diskussion

Der Transkriptionsfaktor Lbx1 wird ausschließlich in migrierenden Muskelvorläuferzellen und den sich daraus entwickelnden Vormuskelmassen exprimiert. In verschiedenen Experimenten wurden die Wirkungsweise von Lbx1 und seine Wechselwirkungen mit den für die Migration von Zellen ebenfalls wichtigen Genen Pax3 und c-met untersucht. Um die Bedeutung von Lbx1 innerhalb des Migrationsprozess besser erforschen zu können, wurde eine Lbx1-Knock-out Maus hergestellt. Dazu ist ein großer Bereich der kodierenden Lbx1-Sequenz einschließlich der Homeobox im zweiten Exon entfernt und durch ein bakterielles lacZ-Gen ersetzt worden, wodurch sowohl homozygote als auch heterozygote Zellen verfolgt werden konnten.

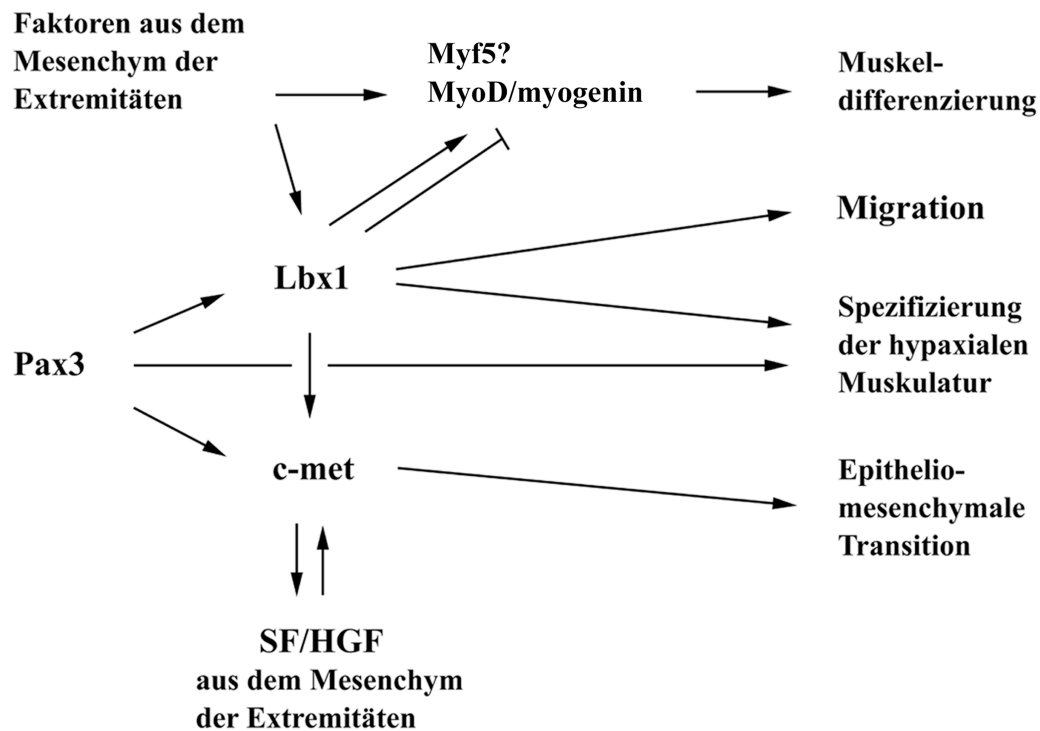
Die Expression von Lbx1 im Somiten ist abhängig von einer normalen Pax3-Expression. In Splotch-Mutanten fand im Somiten keine Expression von Lbx1 statt, was vermuten lässt, dass Lbx1 ein stromabwärts gerichtetes Ziel von Pax3 darstellt. Die Induktion Pax3-positiver Zellen in den Somiten durch den Einfluss von SF/HGF führte zwar zu einer epithelio-mesenchymalen Transition und zur Zerstreung der induzierten Zellen. Sie konnte aber keine ektopische Expression von Lbx1 herbeiführen (Mennerich et al. 1998). Pax3 ist also essentiell erforderlich, um eine Lbx1-Expression zu induzieren. Sein alleiniges Vorhandensein jedoch scheint für die Expression von Lbx1 nicht auszureichen. Es bedarf weiterer Faktoren, welche bisher noch unbekannt sind. Mögliche Kandidaten könnten Wnt- oder BMP-Proteine sein. Diese Vermutung wird in einem weiteren Experiment untermauert: Eine Induktion Pax3-positiver Zellen in den Somiten durch FGF-2 führte zur Ausbildung einer ektopischen Extremitätenknospe und ebenfalls zu einer ektopischen Expression von Lbx1 (Mennerich et al. 1998). Scheinbar werden durch FGF-2 direkt oder indirekt alle Faktoren aktiviert, die zu einer erfolgreichen Expression von Lbx1 erforderlich sind.

In Lbx1-Mutanten wurden in den verbleibenden migrierenden Muskelvorläuferzellen die Gene Pax3, MyoD, Myf5 und Mox2 normal exprimiert. Die Expression von Mox2 konnte allerdings nur bedingt verfolgt werden, da Mox2 auch in den Zellen des Mesenchyms der Extremitäten exprimiert wird. Die Expression von c-met scheint in frühen Phasen der Somitenentwicklung normal zu sein. In späteren Stadien konnte c-met nicht mehr detektiert werden, was zeigt, dass Lbx1 für die Aufrechterhaltung der c-met-Expression essentiell ist (Schäfer & Braun 1999). Der Funktionsausfall von Lbx1 definiert zumindest zwei



Subpopulationen in der ansonsten homogenen Population der myogenen Vorläuferzellen: Zellen, die durch den Verlust von Lbx1 ihr Vermögen verloren haben, notwendige Signale aus der Umgebung zu verarbeiten und eine zielgerichtete Migration zu durchlaufen und Zellen, die über weitere Signaltransduktionswege verfügen, durch die der Lbx1-Ausfall kompensiert werden kann. Diese Zellen waren fähig, auch ohne Lbx1-Protein eine zielgerichtete Migration in die vorderen Extremitäten durchzuführen (Schäfer & Braun 1999). Wenn diese trotz Lbx1-Defekt migrierenden Zellen tatsächlich über weitere Signaltransduktionswege verfügen sollten, in deren Besitz die in der Migration unterbrochenen Zellen der Mutanten scheinbar nicht sind, ist das ein Zeichen unterschiedlicher Potentiale, auf spezifische Signale aus der Umgebung reagieren zu können.

Die noch migrierenden Zellen in Lbx1-Mutanten scheinen nur Signale aus dem proximal-ventralen Bereich der vorderen Extremitäten erkennen zu können, da dies die einzige Region ist, in die diese Zellen noch einzuwandern vermochten (Schäfer & Braun 1999). Im Wildtyp war die Lbx1-Expression genau in dieser Region verglichen mit dorsalen und distalen Bereichen zu einem früheren Zeitpunkt verringert, was auf eine weniger starke Funktion von Lbx1 im proximal-ventralen Bereich der vorderen Extremitäten hinweist (Schäfer & Braun 1999). Die sich aus diesen Vormuskelmassen entwickelnden Flexormuskeln der Mutanten zeigten ein pathogenes Erscheinungsbild. Die Myotuben waren vergrößert und deren Kerne nicht rand- sondern zentralständig. Trotzdem schien die Expression von MyoD und Myf5 aber normal zu sein (Schäfer & Braun 1999). So führt die gestörte Differenzierung der Flexormuskeln zu der Vermutung, dass beim Ausfall des Lbx1-Proteins nicht alle, dafür notwendigen Faktoren exprimiert werden. Für Lbx1 ist also abgesehen von seiner Rolle im Migrationsprozess auch eine Rolle innerhalb der regulatorischen Prozesse der Muskeldifferenzierung denkbar. Die Expression von MyoD in den Vormuskelmassen von Wildtypmäusen erhöhte sich, wenn die Lbx1-Expression herunterreguliert wurde (Schäfer & Braun 1999). In Experimenten, in denen Lbx1 im Hühnchen ektopisch überexprimiert wurde (Mennerich & Braun 2001), konnte gezeigt werden, dass Lbx1 in der Lage ist, MyoD und Myogenin zu induzieren. Beides weist auf einen direkten oder indirekten Einfluss von Lbx1 auf die Muskeldifferenzierung hin. Da in Lbx1-Knock-out Mäusen die Expression von Pax3 in den Vormuskelmassen der Flexormuskeln verglichen zur Situation im Wildtyp normal zu sein scheint, kann man die Entwicklung des Phänotyps der Flexormuskeln aufgrund eines Proliferationsproblems eher ausschließen.



Darstellung: Genetische Regulation von Lbx1 und Wechselwirkungen mit anderen Genen

Die Expression von Lbx1 ist abhängig von Pax3 und weiteren, noch nicht identifizierten Faktoren aus dem Mesenchym der Extremitäten. Lbx1 ist notwendig für die Aufrechterhaltung der c-met-Expression und kann eine Expression von MyoD und Myogenin anschalten. Die Anschaltung der MyoD-Expression geht einher mit der Abschaltung der Lbx1-Expression. Lbx1 vermittelt den Muskelvorläuferzellen der Extremitäten die Fähigkeit der Migration. Pax3 induziert die Expression von c-met. c-met-positive Zellen reagieren auf SF/HGF-Signale aus dem Mesenchym und vollziehen eine epithelio-mesenchymale Transition. Pax3 und Lbx1 spezifizieren die Entwicklung von Muskelvorläuferzellen, die aus der lateralen Spitze des Dermamyotoms in die Extremitäten einwandern (hypaxiale Muskulatur). Die Expression der myogenen Faktoren MyoD, Myf5 und myogenin führt zur Differenzierung der Vorläuferzellen in Myotuben.

Lbx1 ist als Transkriptionsfaktor in regulatorische Prozesse eingebunden, die migrierende Muskelvorläuferzellen dazu befähigen, Faktoren aus der Umgebung zu erkennen und eine zielgerichtete Bewegung vom Dermamyotom der Somiten ausgehend in das Mesenchym der Extremitäten hinein zu durchlaufen. Andererseits spezifiziert Lbx1 Subpopulationen dieser Vorläuferzellen zu einem frühen Zeitpunkt, wenn diese aus dem Dermamyotom der Somiten

auswandern, noch bevor sie dem Einfluss von positions- oder identitätsgebenden Signalen des Mesenchyms der Extremitäten ausgesetzt sind. Besonders die Frage danach, ob diese Zellen zum Zeitpunkt des Auswanderns eine homogene Gruppe darstellen oder ob sich bereits (ohne externe Einflüsse aus dem Mesenchym der Extremitäten) unterschiedliche Populationen herausgebildet haben, wie die Ergebnisse des Lbx1-Knock-outs vermuten lassen, wurde in den letzten Jahren in einer Reihe verschiedener Experimente untersucht und kontrovers diskutiert:

Frühere Experimente mit Wachtel/Huhn-Chimären (Chevallier & Kierry 1982, Butler et al. 1988) ließen vermuten, dass migrierende Muskelvorläuferzellen im Stadium des Auswanderns aus den Somiten keine zellautonome Information für ihre Entwicklung in individuelle Muskelgruppen innerhalb des Muskelapparates besitzen würden. Neuere Zellmarkierungsexperimente im Huhn (Kardon et al. 2002) scheinen ebenfalls dafür zu sprechen. Markierte Muskelvorläufer- und Endotheliumvorläuferzellen, die beide ihren Ursprungsort in der lateralen Spitze des Dermamyotoms der Somiten besitzen, wurden auf ihrem Migrationsweg in das Mesenchym der Extremitäten verfolgt. Dabei war eine Festlegung der migrierenden Muskelvorläuferzellen auf die Einwanderung in dorsale oder ventrale und in proximale oder distale Regionen nicht nachweisbar (Kardon et al. 2002). Der überwiegende Anteil der Abkömmlinge von in den Somiten oder von im proximalen Bereich der Extremitäten markierten Zellklone konnten sowohl in proximalen und distalen Regionen als auch in dorsalen und ventralen Regionen wieder gefunden werden (Kardon et al. 2002). Die Abkömmlinge des überwiegenden Teils der markierten Zellklone zeigten auch keine Festlegung auf den Aufbau spezifischer individueller Muskelgruppen. Die meisten markierten Zellklone trugen zu einer Reihe verschiedener individueller Muskelgruppen bei. Es konnte sogar gezeigt werden, dass neben Klonabkömmlingen, die entweder nur Muskelvorläuferzellen oder nur Endotheliumvorläuferzellen stellten, auch ein großer Teil von Klonen auftrat, aus denen beide Zelltypen hervorgingen (Kardon et al. 2002). Die Abkömmlinge der meisten myogenen Klone konnten sich außerdem sowohl in schnelle als auch in langsame Myotuben entwickeln. Allerdings existierten auch Klone, die nur schnelle Myotuben oder nur langsame Myotuben stellten: Ausschließlich schnelle Myotuben konnten sich aus Klonabkömmlingen aller untersuchten Somitenstadien (I, V, VII, HH) oder der im proximalen Bereich der Extremitätenknospe markierten Zellklone entwickeln. Dahingegen entstanden ausschließlich langsame Myotuben nur aus Klonen, die in den Somitenstadien V und VII (also später) oder im proximalen Bereich der Extremitätenknospen markiert wurden.

Klone, die nur langsame Myotuben ausbildeten, waren in ihrer Zellzahl sehr klein und nur in ein oder zwei individuellen Muskeln lokalisiert. Die Klone, aus denen nur schnelle Myotuben hervorgingen, waren in ihrer Zellzahl größer und in Regionen lokalisiert, in denen nur wenige langsame Muskeln existierten. Man schloss darauf, dass das Auftreten von Klonen, aus denen nur ein Muskelfibrillentyp hervorgeht, aus der geringen Klonegröße resultieren würde (Kardon et al. 2002). Allerdings scheinen einige Resultate spezifisch für die jeweiligen Modellsysteme zu sein. So konnten separate Ausgangszellen für schnelle und langsame Muskelfasern in Säugetieren nicht gefunden werden.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde vermutet, dass der Migrationsweg myogener Zellen (proximale oder distale Regionen und dorsale oder ventrale Regionen der Extremitäten) sowie deren Entwicklung in individuelle Muskelgruppen nur durch externe Faktoren aus dem Mesenchym der Extremitäten gesteuert wird und keine zellautonomen Faktoren der migrierenden Zellen von belang sind. Gegensätzlich dazu räumte man allerdings bei der Spezifizierung dieser migrierenden Vorläuferzellen in langsame und schnelle Myotuben neben diesen externen Faktoren auch das Wirken zellautonomer Faktoren ein. Andere Experimente im Huhn (Lance-Johnes & Van Swearing 1995) hatten gezeigt, dass früh aus den Somiten auswandernde myogene Zellen vorrangig in langsame Myotuben differenzierten, währenddessen sich zu einem späteren Zeitpunkt auswandernde myogene Zellen hauptsächlich in schnelle Myotuben entwickelten. Auch diese Beobachtung scheint spezifisch für das entsprechende Modellsystem zu gelten.

Während diese Experimente zellautonome regulatorische Faktoren der migrierenden Muskelvorläuferzellen eher ausschließen und diese lediglich innerhalb der Entwicklungswege in langsame oder schnelle Myotuben in Betracht ziehen, gibt es eine Reihe anderer Experimente, die dem widersprechen:

Die Resultate der Knock-out-Experimente mit den Homeoboxgenen Lbx1 und Mox2 und den Genen c-met und Gab1, die in eine Tyrosin-Kinase-Rezeptor abhängige Signaltransduktion involviert sind, lassen auf einen zellautonomen Beitrag bei der Differenzierung in individuelle Muskelgruppen schließen.

Wie oben bereits beschrieben, besitzen Lbx1 Knock-out Mäuse einen Muskeldefekt, der sich auf unterschiedliche Weise in Vorder- und Hinterextremitäten äußert. Während die Hinterextremitäten völlig frei von Muskeln waren, zeigten die Vorderextremitäten im proximal-ventralen Bereich Muskelgruppen mit normaler Anordnung. In den restlichen dorsalen und distalen Bereichen der Vorderextremitäten waren ebenfalls keine Muskeln

detektierbar. Die Muskelvorläuferzellen in Lbx1-Knock-out Mäusen vermochten es nicht, aus dem Dermamyotom der Somiten in den dorsalen und distalen Bereich der Vorderextremitäten sowie in den gesamten Bereich der Hinterextremitäten einzuwandern, obwohl eine epithelio-mesenchymale Transition stattgefunden hatte. Da Lbx1 ausschließlich nur in migratorischen Muskelvorläuferzellen und in den daraus entstehenden Vormuskelmassen exprimiert wird, ist es offensichtlich, dass der auftretende Migrationsdefekt innerhalb der migratorischen Zellen selbst angelegt sein muss.

Der Ausfall der Lbx1-Funktion führte nur bei einem Teil dieser migratorischen Zellpopulationen zu einem Migrationsdefekt. Ein anderer Teil, der in den proximal-ventralen Bereich der Vorderextremitäten einwanderte, zeigte sich von diesem Migrationsdefekt nicht betroffen. Diese Zellpopulationen müssen also schon zum Zeitpunkt des Auswanderns aus dem Dermamyotom der Somiten unterschiedliche regulatorische Mechanismen besitzen und scheinen keineswegs zusammen mit den anderen vom Migrationsdefekt betroffenen Zellen einen homogenen Zelltyp darzustellen. Die Inaktivierung von Lbx1 enthüllt das unterschiedliche Potential dieser migratorischen Vorläuferzellen, auf spezifische Signale aus dem Mesenchym reagieren zu können. Lbx1 Knock-out-Mäuse zeigten zum Zeitpunkt der Migration aus dem Dermamyotom eine normale Expression der Gene Pax3 und c-met. Wenn diese Zellen das Mesenchym der Vorderextremitäten erreichten, konnte eine Expression von c-met nicht mehr nachgewiesen werden. Lbx1 ist offensichtlich ein essentieller Faktor für die Aufrechterhaltung der c-met-Expression innerhalb der migrierenden Muskelvorläuferpopulationen. Dahingegen scheint die Expression der Gene Pax3, Myf5 und MyoD in Lbx1 Knock-out Zellen vom Migrationsdefekt abgesehen unbeeinflusst.

Mox2-Knock-out Mäuse zeigen ebenfalls Muskeldefekte in den Vorder- und Hinterextremitäten. Eine Gemeinsamkeit zu Lbx1-Knock-out Mäusen besteht darin, dass innerhalb der Vorderextremitäten spezifische Muskelgruppen völlig fehlen, währenddessen in den Hinterextremitäten alle Muskelgruppen gleichsam betroffen sind (Mankoo et al, 1999). Bei Mox2-Knock-out Mäusen sind alle Muskeln der hinteren Extremitäten in der Anzahl der Fibrillen stark reduziert. Man konnte nachweisen, dass in migrierenden Muskelvorläuferzellen von Mox2-Mutanten eine verringerte Expression von Pax3 und Myf5 aber nicht von MyoD vorliegt (Mankoo et al, 1999). Da die Expression von Pax3 mit einer Zellproliferation einhergeht, könnte deren mögliches Ausbleiben eine Erklärung für das Fehlen von Muskelgruppen geben, würde aber nicht erklären, warum manche Muskelzellen davon betroffen sind und andere wiederum nicht. Bei Mox2-Knock-out Mäusen ist kein

Migrationsdefekt nachweisbar. Mox2 wird zusätzlich zu seiner Expression in migrierenden Zellen auch im Mesenchym der Vorder- und Hinterextremitäten exprimiert (Mankoo et al, 1999). Da die Reduktion der Muskeln im Knock-out aber nur auf spezifische Muskelgruppen in den vorderen und auf den gesamten Muskelapparat in den hinteren Extremitäten abzielt, ist ein für Vorder- und Hinterextremitäten in gleicher Weise fehlendes Mox2 Protein im Mesenchym allein als Erklärung für das unterschiedliche Entwicklungspotential eher unwahrscheinlich. Ein zellautonomer Faktor der migrierenden Zellen kann hier nicht ausgeschlossen werden.

Mutationen von c-met, welche die Funktion seines Rezeptors durch Entkopplung verschiedener intrazellulärer Signaltransduktionswege beeinflussen, haben ebenfalls Auswirkungen auf spezifische Muskelgruppen. Die Muskelvorläuferzellen scheinen zu delaminieren und korrekt in die Extremitäten zu migrieren, dann allerdings scheint die Proliferation gestört zu sein (Maina et al. 2000). Der phosphorylierte c-Met Tyrosin-Kinase-Rezeptor bindet an das Signaltransduktions-protein Gab1. Gab1 kann auch von anderen phosphorylierten Rezeptoren oder von anderen Kinasen aktiviert werden (Sachs et al. 2000). Gab1-Knock-out Mäuse zeigten eine beeinträchtigte Migration der Muskelvorläuferzellen aus dem Dermamyotom in das Mesenchym der Extremitäten (Sachs et al. 2000). Genau wie beim Lbx1-Knock-out werden bei Gab1-/- Mäusen die Extensormuskeln der vorderen Extremitäten nicht gebildet und die existierenden Flexormuskeln reichen weniger weit distal als die des Wildtyps. In den Hinterextremitäten von Gab1-Knock-out Mäusen wurden zwar einige Muskelgruppen detektiert, diese besaßen aber weniger Myotuben und waren disorganisiert. Gab1-/-/c-met+/- Mutanten zeigten zusätzlich ein fast vollständiges Fehlen der Flexormuskeln in den Vorderextremitäten und ein völliges Fehlen von Muskelzellen in den hinteren Extremitäten (Sachs et al. 2000). Die Muskeldefekte von Gab1-Mutanten, die einen gestörten Signaltransduktionsweg von c-met widerspiegeln, besitzen ihren Ursprung in dem Unvermögen eines Großteils der Muskelvorläuferzellen, eine zielgerichtete Migration durchzuführen (Sachs et al. 2000). Auch hier zeigt sich ein individuelles Verhalten dieser Zellen bereits zum Zeitpunkt des Auswanderns aus der lateralen Spitze des Dermamyotoms. Die unterschiedlichen Reaktionen auf verschiedenartige Defekte innerhalb der c-met-Signaltransduktionskette lassen erkennen, dass diese Zellen verschiedene regulatorische Mechanismen besitzen müssen. Manche Zellen sind noch in der Lage zu migrieren und zu differenzieren, also auf Signale aus dem Mesenchym der Extremitäten zu reagieren und andere Zellen wiederum nicht. Ein zellautonomer Beitrag zur individuellen Entwicklung

dieser Vorläuferzellen ist hier sehr wahrscheinlich. Ein funktionsuntüchtiger c-met Rezeptor führt zum Unvermögen der gesamten Muskelvorläuferpopulation des Dermamyotoms, eine epithelio-mesenchymale Transition zu durchlaufen, dahingegen lässt aber eine Funktionsunterbrechung von Gab1 diese epithelio-mesenchymale Transition für alle Zellen der Population zu und unterteilt diese Population anschließend in Zellen, die migrieren können und Zellen, die diese Eigenschaft verloren haben (Sachs et al. 2000). Man kann also davon ausgehen, dass der Tyrosin-Kinase-Rezeptor c-Met seine Signale über verschiedene Signaltransduktionskaskaden auslöst. Die Kaskade, die zu einer Herauslösung aus dem Epithelium des Dermamyotoms führt, scheint unabhängig von Gab1 zu verlaufen. Stattdessen zeigt die spätere Migrationsphase, die eine Verarbeitung von Signalen aus der Umgebung notwendig macht, eine Gab1-Abhängigkeit. Offensichtlich könnte eine solche Kaskade auch in Lbx1-Mutanten durch das Nichtaufrechterhalten der c-met-Expression betroffen zu sein. Die Ähnlichkeit im Phänotyp von Lbx1- und Gab1-Mutanten lässt eine solche Verknüpfung vermuten.

Die Knock-out Mäuse von Lbx1, Mox2 und Gab1 zeigen in ihren Muskeldefekten Gemeinsamkeiten: Während in den vorderen Extremitäten immer spezifische Muskelgruppen betroffen sind, wird in den hinteren Extremitäten in der Regel der gesamte Muskelapparat reduziert oder ist völlig verschwunden. Während es sich in den Lbx1<sup>-/-</sup> und Gab1<sup>-/-</sup> Mäusen eindeutig um Migrationsdefekte handelt, kann man bei Mox2<sup>-/-</sup> Mäusen keine gestörte Migration erkennen. Trotzdem scheinen alle drei Gendefekte ein gemeinsames Grundmuster in der Ausprägung ihrer Muskeldefekte zu besitzen. Vom Funktionsausfall von Lbx1 oder von Gab1 betroffene Zellen leiten sich aus Zellen späterer Somitenstadien ab (vergleichbar mit Stadium HH V beim Huhn). Für diese Stadien wurde in Zellmarkierungsexperimenten bereits eine gewisse Heterogenität (Entwicklung in langsame/schnelle Myotuben) beobachtet (Lance-Johnes & Van Swearing 1995). Die Population der myogenen Zellen in der lateralen Spitze des Dermamyotoms besitzt nach ihrer Reifung offensichtlich doch eine gewisse Heterogenität in ihrem Potential, spezifische regulatorische Mechanismen nutzen zu können. Sie wird nur dann enthüllt, wenn bestimmte Genfunktionen ausfallen und manche Zellen diese entfallenen Funktionen durch andere Regulationswege kompensieren können, andere Zellen dies wiederum nicht vermögen. Zellmarkierungsexperimente im Hühnchen müssten also mit der Blockierung diverser Genfunktionen verbunden werden. Verschiedene Mutationen des c-met-Signaltransduktionsweges (einschließlich des Knock-outs von Gab1) haben innerhalb der Population myogener Vorläuferzellen im Dermamyotom unterschiedliche Auswirkungen

gezeigt. Wenn der Tyrosin-Kinase-Rezeptor selbst funktionsuntüchtig ist, sind alle Zellen der Population betroffen. Wird ein späteres Signalübertragungsprotein dieser Kette getroffen, kann eine Subpopulation der myogenen Zellen des Dermamyotoms diesen Defekt kompensieren (Birchmeier & Brohmann 2000, Sachs et al. 2000). Diese Beobachtung spricht dafür, dass diese zur Kompensation fähigen Zellen über weitere Signaltransduktionswege verfügen, die den Verlust einzelner Komponenten des c-met-Signaltransduktionsweges (beispielsweise des Proteins Gab1) kompensieren können. Für das Signalübertragungsprotein Gab1 konnte man nachweisen, dass es auch durch andere Rezeptoren und andere Kinasen phosphorylierbar ist (Sachs et al. 2000). Interessanterweise gleichen die phänotypischen Veränderungen beim Funktionsausfall von Lbx1 in großen Bereichen dem Funktionsausfall von Gab1. Obwohl es dafür noch keine weiteren Beweise gibt, liegt die Annahme nahe, dass sowohl beim Lbx1-Knock-out (über die spätere Abschaltung von c-met) als auch beim Gab1-Knock-out gemeinsame regulatorische Wege betroffen sind. In beiden Knock-outs sind die myogenen Zellen des Dermamyotoms in der Lage, eine epithelio-mesenchymale Transition zu durchlaufen und zu zerstreuen. Anschließend, in einem späteren Stadium der Somitenreifung vermag nur eine Subpopulation dieser Zellen, in eine proximal-ventrale Region der Vorderextremitäten einzuwandern. Der überwiegende Teil der normalerweise migrierenden Zellen hat die Fähigkeit einer zielgerichteten Migration verloren und bleibt, unempfindlich für Signale aus dem Mesenchym der Extremitäten, in der Rumpfregeion zurück. Diesen Zellen fehlt offensichtlich ein Faktor, der die gestörten regulatorischen Prozesse von Lbx1 oder von Gab1 kompensieren kann. Die myogene Population, die trotz dieser Defekte eine zielgerichtete Migration durchläuft, bildet (in beiden Knock-outs) die im proximal-ventralen Bereich der Vorderextremitäten gelegene Flexor-Muskelgruppe, kann aber offensichtlich nicht in weiter distal oder dorsal gelegene Regionen vordringen. Der Phänotyp der Hinterextremitäten ist bei beiden Knock-outs ebenfalls ähnlich ausgeprägt. In Lbx1-Mutanten gibt es auf der Ebene der Hinterextremitäten im lateralen Dermamyotom keine Zellpopulationen, die in der Lage sind, den Lbx1-Defekt auszugleichen. Gab1-Mutanten zeigen eine sehr kleine Population myogener Vorläuferzellen, die trotz Gab1-Defekt in die hinteren Extremitäten einwandern kann. Gab1<sup>-/-</sup>/c-met<sup>+/-</sup> Mutanten besitzen wie die Lbx1-Mutanten keine myogenen Zellen im lateralen Dermamyotom, die in die Hinterextremitäten einwandern können.

Mox2-Knock-out Mäuse zeigen ebenfalls einen Ausfall individueller Muskelgruppen in den vorderen Extremitäten. Bei ihnen liegt aber kein Migrationsdefekt vor. In migrierenden



myogenen Vorläuferzellen dieser Mutanten sind die Gene Pax3 und Myf5 weniger stark exprimiert, die MyoD Expression erscheint normal. Die Mox2-Funktion innerhalb dieser Zellen greift in regulatorische Prozesse ein, die nicht in den Verlauf der Migration involviert sind. Möglicherweise werden durch den geringen Pax3-Gehalt die Vorläuferzellen in bestimmten Regionen der Extremitäten nicht genug zur Proliferation angeregt. Da aber offensichtlich in allen myogenen Vorläuferzellen dieser Mutanten Pax3 reduziert wird, in den vorderen Extremitäten aber nur einzelne individuelle Muskelgruppen fehlen und in den hinteren Extremitäten gleichsam alle Muskeln in der Anzahl ihrer Myotuben reduziert sind, könnten auch hier bestimmte Populationen für den Mox2-Defekt empfänglich sein, währenddessen zu Muskeln differenzierende Populationen das Fehlen von Mox2 möglicherweise ausgleichen bzw. für die Mox2 nicht erforderlich zu sein scheint. In Mox2-Mutanten wird zwar Myf5 in geringerer Masse exprimiert als im Wildtyp, die MyoD-Expression scheint aber unbeeinflusst. MyoD kann normalerweise die Funktion von Myf5 übernehmen. (Braun et al. 1992). Der Differenzierungsdefekt diverser Muskelgruppen könnte damit erklärt werden, dass diesen Zellen aufgrund des Mox2-Ausfalls noch andere, für diesen Weg erforderliche Faktoren fehlen oder in den betroffenen Zellen diejenigen regulatorischen Prozesse, die beispielsweise in Myf5-Mutanten zur Kompensation durch MyoD führen, nicht vorhanden sind. Ob das heterogene Verhalten der Muskelvorläuferzellen in Mox2-Mutanten nur das Resultat unterschiedlicher Signale aus dem Mesenchym der Extremitäten ist oder ob auch hier zellautonome Signale beteiligt sind, ist bisher nicht eindeutig untersucht worden.

Bei der kontroversen Diskussion, ob migrierende Muskelvorläuferzellen des Dermamyotoms eine homogene Population darstellen oder nicht, sollte nicht übersehen werden, dass die oben beschriebenen Zellmarkierungsexperimente im Hühnchen, die für eine homogene Population sprechen, an Somiten auf der Höhe der Hinterextremitäten durchgeführt wurden. Die gravierendsten Beobachtungen in den Knock-out Mäusen von Lbx1, Gab1 und Mox2, die für eine Heterogenität dieser myogenen migrierenden Populationen des Dermamyotoms sprechen, wurden jedoch an Somiten auf der Höhe der vorderen Extremitäten beobachtet. Bei allen dieser drei Knock-outs zeigten sich die Auswirkungen auf die Muskelbildung in den hinteren Extremitäten eher in einer homogenen Weise.

Muskelvorläuferzellen im Dermamyotom von Somiten früher Entwicklungsstadien zeigen keine Heterogenität in ihrer Population. Funktionsausfälle der Faktoren Lbx1 oder Gab1 führen zu keiner sichtbaren Abweichung im Verhalten der Zellen im Vergleich zum Wildtyp.

Eine epithelio-mesenchymale Transition findet statt und die Zellen zerstreuen sich über eine kurze, zielungerichtete Bewegung in die Umgebung. Zu einem späteren Reifestadium der Somiten teilen sich diese Zellenpopulationen im Wildtyp in eine dorsale und in eine ventrale Migrationsroute und besiedeln auf beiden Wegen das Mesenchym der Extremitäten (Schäfer & Braun 1999, Sachs et al. 2000). Alle migrierenden Zellen scheinen normalerweise sowohl das Potential für einen dorsalen als auch das Potential für einen ventralen Migrationsweg zu besitzen. Bei einem Funktionsausfall von *Lbx1* oder von *Gab1* hat ein Grossteil dieser Zellen diese Fähigkeit verloren. Eine Subpopulation ist allerdings weiterhin in der Lage, eine zielgerichtete Migration zu vollführen und unterscheidet sich somit klar vom Rest der Population der zurückbleibenden Zellen. Diese Subpopulation besitzt scheinbar weitere, kompensatorisch wirksame Regulationsmechanismen.

Nimmt man hypothetisch an, dass eine solche Heterogenität der zur Migration programmierten Muskelvorläuferzellen im lateralen Dermamyotom reiferer Somiten angelegt ist, stellt sich die Frage danach, unter welchen Einflüssen diese herausgebildet wird und welche Funktion in dieser Variabilität liegen würde. Offensichtlich wäre dieser Prozess mit dem Ablauf der Somitenreifung verknüpft und abhängig vom Gradienten bestimmter Faktoren aus der näheren Umgebung. Möglicherweise wären auch Wechselwirkungen zwischen den myogenen Vorläuferzellen selbst denkbar. Da bisher nur der Funktionsausfall von in migratorischen Muskelvorläuferzellen exprimierten Genen zur Beobachtung einer unterschiedlichen Reaktion dieser Zellen führte und bisher keine Erkenntnisse darüber vorliegen, ob wirklich Faktoren existieren, die nur in Subpopulationen dieser migratorischen Muskelvorläuferzellen exprimiert werden, bleibt der letztendliche Beweis auf molekularer Ebene für eine Heterogenität dieser Zellpopulationen noch offen.

### 3. Lbx1 kontrolliert eine Subpopulation der kardialen Neuralleistenzellen

#### 3.1 Das Homeoboxgen Lbx1 spezifiziert eine Subpopulation der Herzneuralleistenzellen, die für eine normale Herzentwicklung notwendig ist

In der Veröffentlichung „**The Homeobox Gene Lbx1 Specifies a Subpopulation of Cardiac Neural Crest Necessary for Normal Heart Development**“ wird gezeigt, dass Lbx1 in einer Subpopulation der Herzneuralleistenzellen exprimiert wird. Diese Subpopulation wandert in einem sehr frühen Entwicklungsstadium in das noch tubuläre Herz ein. Lbx1 Mutantenerzen zeigen diverse Veränderungen sowohl in der Genexpression als auch in ihrer Morphologie.

Das sich entwickelnde embryonale Herz liegt in direkter Nachbarschaft zu den entstehenden Kiemenbögen, durch die die Migrationsrouten der aus den Neuralleisten auswandernden Zellen laufen. Die Herzneuralleistenzellen stellen eine Subpopulation der cranialen Neuralleistenzellen dar. Obwohl alle Neuralleistenzellen pluripotente Eigenschaften besitzen, konnte in Verpflanzungsexperimenten nachgewiesen werden, dass Herzneuralleistenzellen nicht durch andere Neuralleistenzellen ersetzbar sind (Kirby et al. 1983).

Herzneuralleistenzellen migrieren über die Kiemenbögen 3, 4 und 6 in die Region des Ausflusstraktes des sich entwickelnden embryonalen Herzens ein (Gilbert 1997). Die Ablation dieser Herzneuralleistenzellen noch vor ihrer Migration führte zu Missbildungen in diesem Bereich. Betroffene Embryonen zeigten eine unvollständige Ausbildung der Trennwand zwischen Aorta und Pulmonalkanal (persistent truncus arteriosus, PTA) oder einen doppelten Ausflusstrakt im rechten Ventrikel (double outlet right ventricle, DORV) (Kirby et al. 1983). Neben diesen offensichtlichen Fehlbildungen konnten allerdings auch Veränderungen bei der Herzentwicklung beobachtet werden, die entweder in wesentlich früheren Entwicklungsstadien auftraten oder in späteren Entwicklungsstadien nicht als direkte Folge eines fehlgebildeten Ausflusstraktes gedeutet werden konnten. Es wurden verschiedene Veränderungen während der myokardialen Entwicklung beobachtet: eine verringerte Auswurfleistung des Herzens, ein fehlerhaftes Herzlooping und eine abnormal erhöhte Zellproliferation. Diese Malformationen scheinen sich unabhängig von PTA oder DORV herauszubilden (Waldow et al. 1999).

Ein zentrales Markergen für migrierende Neuralleistenzellen ist Pax3. Die durch Ablationsexperimente hervorgerufenen Fehlentwicklungen des embryonalen Herzens konnten ebenso durch einen Defekt dieses Transkriptionsfaktors ausgelöst werden (Franz 1989). Allerdings wird Pax3 in allen migrierenden Neuralleistenzellen exprimiert. Bisher war kein molekularer Marker identifiziert worden, der innerhalb dieser Population der Neuralleistenzellen nur die Population der Herzneuralleistenzellen oder eine Subpopulation davon detektiert.

Lbx1 markiert eine kleine Subpopulation der Herzneuralleistenzellen, die zu einem frühen Zeitpunkt zwischen E9.0 und E9.5 in das noch tubuläre Herz (truncus arteriosus) einwandert. Es konnten keine Lbx1 positiven migrierenden Herzneuralleistenzellen im späteren Ausflusstrakt zweikammeriger Herzen detektiert werden. Zum Zeitpunkt E11.0 waren wenige, zerstreut liegende Lbx1-LacZ positive Zellen im linken Ventrikel nachweisbar. Der Ursprung dieser Zellen ist noch unklar, da bisher nicht nachgewiesen werden konnte, dass Zellen der Neuralleiste auch an der Bildung des Myokardiums beteiligt sind.

Lbx1-Knock-out Mäuse besitzen erwartungsgemäß keine Fehlbildungen des Ausflusstraktes, zeigen aber eine Reihe von anderen Fehlentwicklungen des embryonalen Herzens, die bereits in vorausgegangenen Ablationsexperimenten beobachtet werden konnten (Waldow et al. 1999): Ca. 15% der homozygoten Lbx1 Mutanten zeigten ein gestörtes Herzlooping. Das Herzlooping leitet den Übergang vom tubulären zum zweikammerigen embryonalen Herzen ein. Betroffene Mutanten zeigten zu einem Stadium, in dem Wildtypmäuse bereits zweikammerige Herzen besitzen, gerade Herztuben, unkorrekt gewundene Herztuben oder missgebildete Herztuben. Eine weitere Fehlentwicklung der Mutantenherzen zeigte sich in der Ausbildung einer myokardialen Hyperplasie, die sich besonders im linken Ventrikel und in der Herzspitze ausprägte. Diese wurde begleitet durch eine Vergrößerung der koronaren Blutgefäße. Die Myozyten des Myokardiums von Lbx1 Mutanten waren im Vergleich zu denen der Wildtypmäuse unverändert in Größe und Erscheinung. Eine erhöhte Proliferationsrate im Myokardium von Lbx1-Knock-out Mäusen konnte mittels BrdU-Einbau nachgewiesen werden. Weil Mutantenherzen keine Abnormitäten im Ein- oder Ausflusstrakt zeigten, und auch die Blutgefäße normal ausgeprägt waren, scheint die Ausbildung einer Hyperplasie im Myokardium nicht das Ergebnis einer gestörten Herzmorphologie zu sein.

Neben einer veränderten Morphologie konnte auch eine veränderte Genexpression verschiedener Herzmarker in Lbx1 Mutantenherzen nachgewiesen werden. FHL2 und Connexin40 (Cx40) sind zwei Gene, die normalerweise in Wildtypherzen exprimiert werden und deren Expression in Lbx1-Knock-out Mäusen verändert war. FHL2 gehört zur Gruppe der LIM-Proteine, die an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt sind. Eine FHL2-Expression war in Lbx1-Mutantenherzen nicht mehr nachweisbar. Cx40 ist ein Strukturprotein der Gap junctions, seine Expression zeigte sich in Lbx1-Mutanten stark reduziert. Eine weitere Beobachtung in Lbx1-Knock-out Mäusen bzw. in homozygoten *Spotch/Lbx1<sup>+/-</sup>* Mäusen ist ein autoregulatorischer Feed back Loop von Lbx1 und Pax3. Zum Zeitpunkt zwischen E12.5 und E13.0 zeigten die Herzen beider Mutanten eine starke de novo Lbx1/LacZ -Expression im linken Ventrikel und in der Herzspitze. In heterozygoten Lbx1-LacZ Mäusen war dagegen keine Lbx1/LacZ-Expression nachweisbar. Lbx1-Knock-out Mäuse sterben wenige Minuten nach der Geburt. Ein direkter Zusammenhang mit dem Herzphänotyp ist denkbar, konnte aber bisher nicht nachgewiesen werden.

**Schäfer, K., Neuhaus, P., Kruse, J., Braun, T. The Homeobox Gene Lbx1 Specifies a Subpopulation of Cardiac Neural Crest Necessary for Normal Heart Development, Circ. Res., 92, 73-80 (2003)**

### **3.2 Diskussion**

Lbx1 markiert eine Subpopulation der Herzneuralleistenzellen. Diese Subpopulation stellt einen nur kleinen Anteil der gesamten in die Herzregion migrierenden Neuralleistenzellen dar (Schäfer et al. 2003). In früheren Experimenten (Lo et al. 1997) konnte gezeigt werden, dass migrierende Neuralleistenzellen gewöhnlich Cx43 positiv sind. In Doppelanfärbungen von LacZ und Cx43 wurde in Lbx1/LacZ positiven Neuralleistenzellen keine Cx43-Expression nachgewiesen, obwohl in unmittelbarer Nachbarschaft Cx43 positive migrierende Neuralleistenzellen detektiert wurden (Schäfer et al. 2003). Ähnlich der frühen Neuralleistenablation, die keinen PTA oder DORV hervorrief, sondern zu Störungen des Looping und der Proliferationsrate führte (Kirby et al. 1983), zeigten ca. 15% der Lbx1-Knock-out Mäuse ein gestörtes Herzlooping (Schäfer et al. 2003). Da in homozygoten Lbx1-Knock-out Mäusen verglichen zu heterozygoten Mäusen die Migration Lbx1/LacZ positiver Herzneuralleistenzellen in das noch tubuläre Herz nicht gestört war (Schäfer et al. 2003),

kommt ein Migrationsdefekt als Ursache für diesen Phänotyp nicht in Betracht. Die geringe Anzahl der Lbx1/LacZ positiven migrierenden Herzneuralleistenzellen und deren verstreute Anordnung im tubulären Herzen deuten eher auf eine signalgebende Funktion dieser Zellen und das Zusammenspiel mehrerer Faktoren hin.

Lbx1-Mutanten zeigten während der Embryonalentwicklung zu verschiedenen Entwicklungsstadien eine gesteigerte Zellproliferation im Myokard, die zu einer Myokardhyperplasie führte (Schäfer et al. 2003). Der Mechanismus, der diese Hyperplasie hervorruft, ist noch ungeklärt und eine Reihe regulatorischer Konstellationen scheinen möglich. Denkbar wäre ein in die Umgebung sezernierter Faktor, der entweder von den Neuralleistenzellen selbst oder von einem anderen Zelltyp gebildet wird und dann mit den Myokardzellen interagiert. Auch die Aktivierung eines bereits im Gewebe vorliegenden Faktors scheint möglich, der eine das Zellwachstum begrenzende Funktion besitzt oder der transient die Apoptose bestimmter Zellen herbeiführt. Eine weitere Möglichkeit wäre die Unterdrückung eines durch eine dritte Gruppe von Zellen sezernierten Faktors, der - wenn nicht mehr aktiv - zu einer unnatürlich verlängerten Freisetzung eines Wachstumsfaktors führt. Möglicherweise könnte es sich hier um einen FGF-ähnlichen Faktor aus dem Entoderm des Pharynx handeln, da für diesen Bereich bereits die Sezernierung wichtiger Faktoren für die Herzentwicklung nachgewiesen werden konnte (Waldow et al. 1999). Ein ausschließlich zellautonomer Defekt der Herzneuralleistenzellen selbst ist unwahrscheinlich, da die Lbx1/LacZ positiven Zellen in der Herzregion in nur verhältnismäßig geringer Anzahl und sehr verstreut auftreten und die Lbx1-Expression nur in kurzen Zeiträumen zu beobachten ist (Schäfer et al. 2003).

In einer Reihe von Zellmarkierungs- und Ablationsexperimenten sowie Experimenten mit Splotch-Mutanten (Kirby et al. 1983, Franz 1989, Waldow et al. 1999) konnte bereits nachgewiesen werden, dass Neuralleistenzellen zum Zeitpunkt E10.5 in den Ausflusstrakt des zweikammrigen Herzen migrieren. Diese Populationen sind zum Zeitpunkt des Auswanderns Pax3 positiv und bewirken im sich normal entwickelnden Ausflusstrakt die Trennung zwischen Aorta und Pulmonalkanal. In Splotch-Mutanten mit einem Migrationsdefekt solcher Zellen ist die Entwicklung des Ausflusstraktes gestört. Im Myokard konnten bisher keine Zellpopulationen nachgewiesen werden, deren Ursprung in den Neuralleisten liegt.

Das bei Lbx1 Mutanten beobachtete gestörte Herzlooping, sowie die gesteigerte Proliferationsrate im Myokard wurden ebenfalls bei Pax3 Mutanten entdeckt (Franz 1989). Allerdings konnte ein erhöhtes Myokardwachstum nur bis zu dem Zeitpunkt beobachtet werden, an dem sich der für diese Mutanten typische Defekt im Ausflusstrakt des Herzen herausbildet. Ein späterer Vergleich mit Lbx1 Mutanten bezüglich der Entwicklung des Myokardiums war somit nicht möglich. Diese Ergebnisse deuten aber darauf hin, dass die aus den Neuralleisten migrierende Population Lbx1 positiver Zellen eine Subpopulation der Pax3 positiven Neuralleistenzellen darstellt. Lbx1 positive Zellen im Ausflusstrakt waren nicht detektierbar, was das Fehlen eines Defektes bei Lbx1 Mutanten in dieser Region erklärt (Schäfer et al. 2003).

Im Stadium E11.0 waren Lbx1-LacZ positive Zellen im linken Ventrikel detektierbar (Schäfer et al. 2003). Da in vorangegangenen Experimenten bisher noch nie Neuralleistenzellen im Myokardium nachgewiesen werden konnten, vermutete ich, dass diese Zellen entweder das Ergebnis einer Lbx1 - de novo-Expression darstellen oder es sich um eine separate Zellpopulation unabhängig von Neuralleistenderivaten handelt. Eine andere Hypothese stellt die Möglichkeit dar, dass in das tubuläre Herz einwandernde Lbx1 positive Neuralleistenzellen durch das anschließende Herzlooping (auf dem Weg vom tubulären zum zweikammrigen Herzen) durch die Drehbewegung und den Umbau des Herzen in einer passiven Weise in die Region des linken Ventrikels gelangen könnten. Figur 1C (Schäfer et al. 2003) zeigt migrierende Lbx1/LacZ positive Neuralleistenzellen, die sich in einer vom Truncus arteriosus weiter kaudalen Region befinden. Möglicherweise wandern diese Zellen bis in die Region des primitiven Ventrikels hinein, aus dem sich nach dem Looping zum überwiegenden Teil der linke Ventrikel herausbildet. Da die Lbx1/LacZ-Expression in Herzneuralleistenzellen einen transienten Charakter trägt und im tubulären Herzen nur wenige Stunden anhält (Schäfer et al. 2003), ist eine genaue Beobachtung dieses Umstandes kaum möglich und müsste durch Zellmarkierungsexperimente untersucht werden. Denkbar wäre, dass auf eine solche Weise in den linken Ventrikel gelangte ehemals Lbx1/LacZ positive Zellen zum Zeitpunkt E11.0 erneut Lbx1 transient exprimieren. Diese Expression dauert ebenfalls nur wenige Stunden an (Schäfer et al. 2003).

Der rechte Ventrikel geht aus dem Bulbus cordis hervor (Gilbert 1997). Obwohl in dieser Region im Zeitraum von E9.0 bis E9.5 einwandernde Lbx1/LacZ positive Zellen detektiert wurden, konnte im Gegensatz zum linken Ventrikel zum Zeitpunkt E11.0 keine LacZ-Expression beobachtet werden (Schäfer et al. 2003). Das Myokard des rechten Ventrikels in

Lbx1-Mutanten entwickelte sich verglichen zum Wildtyp ohne Störung. Die entstehende Hyperplasie war begrenzt auf den linken Ventrikel und die Herzspitze (Schäfer et al. 2003).

34

Abgesehen von der erhöhten Zellzahl zeigten sich die Myozyten der homozygoten Lbx1-Knock-out Mäuse verglichen zum Wildtyp nicht vergrößert. Dagegen konnte eine veränderte Expression verschiedener, im Herzen detektierbarer Gene nachgewiesen werden. Die signifikantesten Veränderungen der Genexpression in Lbx1 Mutantenherzen zeigten sich bei den Genen FHL2 und Cx40 (Schäfer et al. 2003). Das LIM Protein von FHL2 ist während der embryonalen Herzentwicklung ein frühes Markergen für sich entwickelnde Kardiomyozyten (Kong et al. 2001). Obwohl man festgestellt hat, dass FHL2 für eine normale Herzentwicklung nicht notwendig ist, konnte man im adulten Herzen von FHL2 Mutanten eine modifizierte Antwort auf  $\beta$ -adrenergische Stimulation beobachten (Kong et al. 2001). Andere Vertreter der LIM Proteine sind bei der Aufrechterhaltung der Zytoarchitektur während der Kontraktion beteiligt (Kong et al. 2001). Cx40 ist als ein Strukturprotein bei der Ausbildung von Gap Junctions erforderlich (Kirchhoff et al 2000). Seine Expression in Lbx1-Knock-out Mäusen ist zum Zeitpunkt E14.5 stark verringert und deutet auf eine verzögerte Entwicklung hin, allerdings konnten keine Defekte in der Reizleitung nachgewiesen werden (Schäfer et al. 2003).

Pax3 und Lbx1 agieren in einem negativ regulatorischen Feed back loop. Die Aktivität des Lbx1-Promotors zeigte sich zum Zeitpunkt E13.0 sowohl in Lbx1-Knock-out Mäusen als auch in Splotch/Lbx1<sup>+/-</sup> Mutanten hochreguliert, während zu diesem Zeitpunkt im Wildtyp Lbx1 abgeschaltet war. In homozygoten Splotch-Mutanten kam es ebenfalls zu einer Überexpression von Lbx1 (Schäfer et al. 2003). Diese Beobachtungen stützen die Vermutung, dass Pax3 und Lbx1 mittelbar an der Aktivierung eines Repressors partizipieren, der die Expression von Lbx1 abhängig von Gewebetyp und Entwicklungsstadium beschränkt. Eine Kontrolle von Pax3 durch diesen Mechanismus ist im Herzen nur schwer nachweisbar, da Pax3 anders als der Lbx1-Promotor schon abgeschaltet ist, bevor die Zellen der Neuralleisten die Herzregion erreicht haben.



## Negativ regulatorischer Feed back loop

35



Darstellung: Zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt kommt ein durch Lbx1 (und Pax3) beeinflusster Repressor zur Wirkung, der einerseits einen begrenzenden Einfluss auf die Proliferation ausübt und andererseits die Expression von Lbx1 abschaltet.

Da bereits gezeigt werden konnte, dass Pax3 in der Lage ist, Lbx1 zu aktivieren (Mennerich et al. 1998), kann man eine unmittelbare Repression von Lbx1 durch Pax3 am Lbx1-Promotor ausschließen. Vielmehr ist eine indirekte, zeitlich versetzte Repression wahrscheinlich. Obwohl eine retrovirale Überexpression von Lbx1 bzw. von Pax3 ebenfalls zu einer starken Induktion der Proliferation führen kann (Mennerich & Braun 2001), sind die Regulationsmechanismen, durch die im Lbx1 Knock-out Herzen eine Hyperplasie hervorgerufen wird, noch unerforscht.

In anderen Experimenten konnte bewiesen werden, dass eine Überexpression von Pax3 die Expression von Lbx1 hochreguliert sowie umgekehrt eine Überexpression von Lbx1 die Expression von Pax3 (Mennerich & Braun 2001). Diese regulatorische Verknüpfung von Lbx1 und Pax3 zeigt, dass beide Gene miteinander in einer synergistischen Wechselwirkung stehen und bekräftigt die Vermutung eines negativ regulatorischen Feed back loops. In dieser Regulationsschleife scheinen Lbx1 und Pax3 in Verbindung mit Signalen über Populationsdichte und Differenzierungsgrad des Gewebes zu agieren und zu einem spezifischen Zeitpunkt über die Anschaltung eines Repressors reprimierend auf ihre eigene Expression zu wirken. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Differenzierung einer Zellpopulation vermittelt durch Pax3 oder durch Lbx1 immer in Verbindung mit einer voranschreitenden Proliferation einhergeht (Mennerich & Braun 2001). Unterdrückt man in diesem Stadium die Proliferation, wird auch die Differenzierung unterbrochen. Wenn die Zellzahl eine kritische Größe erreicht hat („community effect“), kann in dieser Population die Differenzierung weiter voranschreiten, ohne von einer fortlaufenden Proliferation abhängig zu sein (Mennerich & Braun 2001). Dies könnte die Abschaltung von Pax3 und Lbx1 zu einem bestimmten Entwicklungsstadium plausibel machen.

## 4. Die Funktion von Lbx1 bei der Festlegung von neuronalen Zellidentitäten im dorsalen Neuralrohr

### 4.1 Lbx1 ist erforderlich für eine korrekte dorsal-ventrale Musterbildung im Neuralrohr

Die nachfolgende Veröffentlichung „**The homeobox containing gene Lbx1 is required for correct dorsal-ventral patterning of the neural tube**“ beschreibt die Rolle von Lbx1 für die Ausbildung einer normalen Morphologie des Neuralrohrs und für einen positionsbestimmenden Einfluss auf die Ausprägung der ventral gelegenen Interneurone des dorsalen Bereiches innerhalb des Neuralrohrs.

Die dorsal-ventrale Spezifizierung neuronaler Zellpopulationen im Neuralrohr wird beeinflusst durch ventrale Signale (Shh) aus dem Notocord und der Bodenplatte sowie von dorsalen Signalen (BMPs) aus dem epidermalen Ektoderm und der Dachplatte (Gilbert 1997). Eine Reihe sich überlappender Transkriptionsfaktoren werden von diesen sezernierten Faktoren beeinflusst und sind im Zusammenspiel ihrer spezifischen Expressionsmuster für die Ausbildung bestimmter Neuronentypen entlang der dorsal-ventralen Achse verantwortlich (Tanabe und Jessell 1996). Das Neuralrohr wird funktionell in einen dorsalen und einen ventralen Bereich unterteilt, deren Neurone durch eine Grenzregion, den Sulcus Limitans, räumlich voneinander getrennt sind. Neuronale Zellen dieser beiden Hauptregionen differenzieren aufgrund der spezifischen Expressionsmuster weiterer determinierender Transkriptionsfaktoren in eine Reihe von Unterregionen, die mit V0, V1, V2 oder V3 (im ventralen Bereich) bzw. D0, D1, D2 oder D3 (im dorsalen Bereich) bezeichnet werden (Gilbert 1997).

Der Transkriptionsfaktor Lbx1 markiert eine spezifische Subpopulation der dorsalen Interneurone, die dorsal des Sulcus Limitans gelegen sind. In den meisten dorsalen Populationen der ventralen Neurone ist Lbx1 nicht exprimiert. Lbx1 Knock-out Mäuse zeigen eine stark verringerte Anzahl der Neurone im dorsalen Horn (Krüger et al. 2002).

Auch die Expressionsdomänen einiger Transkriptionsfaktoren sind verändert und deuten auf ein möglicherweise gestörtes Gleichgewicht von dorsalisierenden und ventralisierenden Faktoren hin. Versuche mit Lbx1<sup>-/-</sup>/Splotch Doppelmutanten lassen eine indirekte Funktion von Lbx1 bei der Schließung des Neuralrohrs vermuten (Krüger et al. 2002).

---

**Krüger, M., Schäfer, K., Braun, T. The homeobox containing gene Lbx1 is required for correct dorsal-ventral patterning of the neural tube, *J. Neurochem.*, 82, 774-782 (2002)**

## **4.2 Diskussion**

Die Untersuchungen an Lbx1-Knock-out Mäusen zeigen, dass dieses Gen in die Determinierung spezifischer dorsaler Neuronentypen im Neuralrohr involviert ist. In Lbx1-Mutanten waren die dorsalen Interneurone im dorsalen Horn in ihrer Anzahl stark reduziert.

Lbx1 ist ein Bestandteil der Genkaskaden, die in den ventraler gelegenen Subpopulationen der dorsalen Interneurone das ihnen positionsabhängige Zellschicksal vermitteln. Der Ausfall der Lbx1-Funktion führte bei einigen anderen positionsbestimmenden Transkriptionsfaktoren zu veränderten Expressionsdomänen. In Lbx1-Knock-out Mäusen war die Expression der Gene *Math1* und *Ngn2* nur leicht verändert (Krüger et al 2002). Beide Gene sind in die Determinierung von Neuronen involviert und werden in proliferierenden Vorläuferzellen exprimiert. Die Funktion von Lbx1 scheint offensichtlich stromabwärts dieser Gene zu liegen. In Lbx1 Mutanten zeigte sich die Expressionsdomäne des dorsalen Markers *Lmx1a* stark reduziert, wohingegen die Expressionsdomäne des ventralen Markergens *En I* weiter ausgedehnt vorlag (Krüger et al. 2002). Zusätzlich konnte eine leicht erweiterte Expressionsdomäne der beiden Gene *Math I* und *Ngn2* beobachtet werden, welche gewöhnlich in proliferierenden neuronalen Zellen exprimiert werden (Krüger et al 2002). Möglicherweise ist in den Lbx1-Mutanten die Differenzierung bestimmter dorsaler neuronaler Subpopulationen unterbrochen. Dieser Umstand könnte einerseits in eine Zunahme proliferierender Vorläuferzellen münden und andererseits Lbx1 gegenüber antagonistisch eingestellten, positionsbestimmenden Faktoren einen größeren Spielraum geben. Man kann davon ausgehen, dass die postulierte transiente Zunahme proliferierender Vorläuferzellen anschließend zellreduzierenden regulatorischen Mechanismen ausgesetzt ist, da die letztendliche Anzahl dorsaler Interneurone im dorsalen Horn stark reduziert vorliegt (Krüger et al. 2002). Eine andere Erklärung für die starke Reduktion der dorsalen Interneuronenpopulation (D1) im dorsalen Horn könnte das Ausbleiben einer programmierten Expansion einer spezifischen Zellpopulation sein. In Überexpressionsexperimenten mit Lbx1 in Neuralrohr-Explantaten aus dem Hühnchen konnte gezeigt werden, dass die Lbx1-Anschaltung zu einer starken Induktion der Zellproliferation führt (Mennerich & Braun

2001). Die Induktion der Proliferation durch Lbx1 kann in dieser Weise in Lbx1-Knock-out Mäusen nicht stattfinden. Eine unterbliebene Expansion von normalerweise Lbx1 positiven neuronalen Subpopulationen und die starke Verringerung der Neuronenanzahl im dorsalen Horn könnten darin ihren Ursprung haben.

In einer Reihe von Experimenten konnte eine Umprogrammierung von Neuronen in verschiedenen Bereichen des dorsalen Horns nachgewiesen werden. Einerseits differenzieren in Lbx1-Knock-out Mäusen die sonst Lbx1 positiven Neurone, die normalerweise in den ventralen Bereichen des dorsalen Horns angesiedelt sind, in Typen, die spezifisch sind für dessen dorsale Bereiche und Lbx1 unabhängig zu sein scheinen. Andererseits kann eine ektopische Expression von Lbx1 die Ausbildung der für den dorsalen Bereich des dorsalen Horns typischen Neurone verhindern (Müller et al 2003, Gross et al. 2002). Diese beiden Ergebnisse bekräftigen, dass der Transkriptionsfaktor Lbx1 spezifische dorsale Interneurone determiniert und dass sowohl der Ausfall dieses Gens als auch seine ektopische Expression bei Neuronen zu Umprogrammierungsprozessen führt.

Lbx1 und Pax3 agieren synergistisch im Neuralrohr. Lbx1-Knock-out Mäuse zeigen erweiterte Expressionsdomänen von Lbx1 und Pax3 im Stadium E18.5. Pax3-Mutanten (Splotch) zeigen eine erweiterte Expressionsdomäne von Lbx1 im Stadium E13.0 (Krüger et al.). Möglicherweise partizipieren Lbx1 und Pax3 mittelbar an der Aktivierung eines Repressors, der die Expression von Pax3 und Lbx1 abhängig von Entwicklungsstadium und Gewebetyp einschränkt. Zusätzlich sind beide Gene in einen noch unbekanntem Mechanismus involviert, der zur Schließung des Neuralrohrs beiträgt. Pax3-Mutanten (Splotch) besitzen ein posterior und meist auch anterior nicht geschlossenes Neuralrohr (Lakkis et al. 1999). Lbx1-Knock-out Mäuse besitzen ein normal geschlossenes Neuralrohr (Krüger et al. 2002). Pax3/Lbx1<sup>-/-</sup>-Doppelmutanten zeigen ein durchgängig geöffnetes Neuralrohr (Krüger et al. 2002). Auch sonst von Pax3-unabhängige Bereiche waren betroffen. Denkbar wäre ein mittelbarer Einfluss von Lbx1 über das Gen Lmx1a, dessen Expressionsdomäne in Lbx1 Knock-out Mäusen reduziert ist. Lmx1a-Mutanten (Dreher), die kein funktionstüchtiges Lmx1a-Protein besitzen, bilden ein unvollständig geschlossenes Neuralrohr aus (Millonig et al. 2000). Die Herabregulation von Lmx1a und das Fehlen von Pax3 in Pax3/Lbx1<sup>-/-</sup>-Doppelmutanten münden in eine genetische Fehlregulation, die zu der Ausbildung eines durchgängig geöffneten Neuralrohrs führt.

Lbx1 und Pax3 im Neuralrohr agieren offensichtlich gemeinsam und synergistisch in genetischen Prozessen, die einerseits in die Regulation ihrer eigenen Expression involviert sind und andererseits in Prozesse der Induktion von Zellproliferation und Differenzierung sowie in Mechanismen, die eine korrekte Schließung des Neuralrohrs kontrollieren.

## 5. Zusammenfassung

In den vorangegangenen Veröffentlichungen wird deutlich, dass der Transkriptionsfaktor Lbx1 in eine Reihe von Determinierungsprozessen involviert ist. Er spezifiziert zu einem bereits sehr frühen Zeitpunkt Muskelvorläuferzellen, die aus dem Dermamyotom der Somiten in das Mesenchym der Extremitätenknospen einwandern. Ursprünglich postulierte man, dass diese Zellen zum Zeitpunkt der Migration aus den Somiten eine noch homogene Zellmasse darstellen. Der Funktionsverlust von Lbx1 spaltet diese Population jedoch in mindestens zwei Subpopulationen, nämlich in Zellen, die aus den Somiten zu migrieren vermögen und Zellen, die diese Fähigkeit verloren haben (Schäfer und Braun 1999). Dieser Nachweis führte zu einer neuen Betrachtungsweise bei der Fragestellung, ob für die Differenzierung dieser Muskelvorläuferzellen in spezifische Extremitätenmuskeln ausschließlich Signale aus dem umgebenden Mesenchym der Extremitätenknospen verantwortlich sind oder ob diese Zellen schon zu einem früheren Zeitpunkt Informationen erhalten haben. Die Experimente mit Lbx1-Knock-out Mäusen zeigen, dass zum Zeitpunkt der Migration bereits zellinterne Informationen vorliegen müssen, da diese Population schon vor dem Erreichen des Mesenchyms der Extremitätenknospen kein homogenes Erscheinungsbild mehr aufweist (Schäfer und Braun 1999). Lbx1 ist abgesehen von seiner zentralen Funktion innerhalb des Migrationsprozesses auch an der Determinierung von Muskelvorläuferzellen der Extremitäten beteiligt.

Lbx1 spezifiziert eine Subpopulation der Herzneuralleistenzellen. Bis zur Entdeckung dieser kleinen Lbx1 positiven Zellgruppe, die in das noch tubuläre Herz einwandert, bestand die Vorstellung, dass aus den Neuralleisten stammende Zellen im Herzen nur in die Region des sich entwickelnden Ausflusstraktes des zweikammrigen Herzen einwandern und dort akkumulieren. Die in den Lbx1 Mutantenherzen auftretenden Fehlentwicklungen definieren eine neue Subpopulation der Neuralleistenzellen, die eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Proliferation von Kardiomyocyten und der Morphogenese des Herzen spielen (Schäfer et al. 2003).

Lbx1 wird in migrierenden Muskelvorläuferzellen der Extremitäten und in einer Subpopulation der migrierenden Herzneuralleistenzellen exprimiert. Für die Population der Muskelvorläuferzellen konnte eindeutig eine Schlüsselfunktion von Lbx1 im Prozess der

Migration nachgewiesen werden (Schäfer und Braun 1999). Die Regulationsmechanismen, die im einzelnen während der Migration zum Tragen kommen und in die Lbx1 involviert ist, sind noch weitgehend unbekannt. Die Lbx1 positive Subpopulation der Herzneuralleistenzellen vermag auch ohne eine Funktion dieses Gens ungehindert zu migrieren. Da diese Zellen dennoch während der Migration Lbx1 exprimieren, zeigt, dass Lbx1 in andere Prozesse eingebunden sein muss, die zum Zeitpunkt der Migration in diesen Zellen ablaufen (Schäfer et al. 2003).

Die Transkriptionsfaktoren Lbx1 und Pax3 sind in eine negativ regulatorische Feed-back-Schleife eingebunden (Schäfer et al. 2003). Ein vermuteter Repressor wird von diesen beiden Genen auf indirektem Wege bei Erreichen einer angestrebten Zellzahl aktiviert. Dieser führt dann zur Abschaltung der Expression von Lbx1 bzw. Pax3. Diese Schlussfolgerung aus den Geninaktivierungsexperimenten wird durch andere Experimente gestützt. Es konnte gezeigt werden, dass die Differenzierung einer Zellpopulation vermittelt durch Lbx1 oder durch Pax3 immer in Verbindung mit einer voranschreitenden Proliferation einhergeht. Wenn die Zellzahl eine kritische Größe erreicht hat („community effect“), kann diese Population die Differenzierung weiter vorantreiben, ohne von einer fortlaufenden Proliferation abhängig zu sein (Mennerich & Braun 2001). In Überexpressionsexperimenten mit Lbx1 und Pax3 konnte gezeigt werden, dass diese Gene in der Lage sind, Proliferation auszulösen (Mennerich & Braun 2001).

Bei der Entwicklung von Interneuronen des Neuralrohrs vermittelt Lbx1 positionsbestimmende determinierende Signale in einer ventral gelegenen Subpopulation dorsaler Interneurone (Krüger et al 2002). Hier ist Lbx1 Bestandteil einer komplexen Interaktion ventralisierender und dorsalisierender determinierender Faktoren. Der Funktionsausfall von Lbx1 führt zu Umprogrammierungen dieser Interneuronen (Müller et al 2003, Gross et al. 2002) und zu einer Dezimierung ihrer Anzahl. Außerdem wird deutlich, dass Lbx1 eine indirekte Funktion bei der ordnungsgemäßen Schließung des Neuralrohrs besitzt (Krüger et al. 2002).

Der Transkriptionsfaktor Lbx1 ist somit sowohl an der Regulation des Zellzyklus als auch an der Kontrolle des Prozesses der Migration und an den Vorgängen der Determinierung spezifischer myogener und neuronaler Populationen beteiligt.

---

## Anhang

### Abkürzungen

BMP	Bone Morphogenic Protein
Cx	Connexin
DORV	Double Outlet Right Ventricle
FGF	Fibroblast Growth Factor
En	Engrailed
FHL	Formate hydrogen-lyase
Gab	growth factor receptor bound protein 2-associated protein
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HH	Hamburger Hamilton Stadium
I-mf	Inhibitor für myogenen Faktor
LacZ	$\beta$ -Galaktosidase Gen aus dem Laktose-Operon
Lbx1	Ladybird
Lmx	LIM homeobox transcription factor
LIM	LIM domain (named from the Lin-11, Isl-1 and Mec-3 genes)
Pax	Paired Box
PTA	Persistent Truncus Ateriosus
Math	Synonym für Atoh (atonal Homolog/Drosophila)
Mef	Myosin enhancing factor
Mox	antigen identified by monoclonal antibody MRC OX
Msx	mash-like
Myf	Myogener Faktor
MyoD	Myogener Determinator
NT	Neutrophin



Ngn	Noggin
SF	Scatter Faktor
shh	sonic hedgehog
Wnt	Wint
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactosid

### 6.3 Curriculum vitae



Dipl.Biologin Konstanze Schäfer

Tel.: (030) 42 084 084

Email: [KONSTANZE.SCHAEFER@t-online.de](mailto:KONSTANZE.SCHAEFER@t-online.de)

geb. am 12.07.66 in Zella-Mehlis

- 1973-1980 Polytechnische Oberschule Zella-Mehlis
- 1980-1983 Kinder- und Jugendsportschule Oberhof
- 1983-1986 Berufsschule Hildburghausen, Abitur, Facharbeiter als Zootechniker
- 1986-1989 Studium der Biologie mit Schwerpunkt Genetik an der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg
- 1990-1993 Studium der Biologie mit Schwerpunkt Biochemie/Biotechnologie an der Technischen Universität Braunschweig, Diplom
- 1994-1995 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Biochemie und Biotechnologie der TU Braunschweig
- 1995-1999 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biochemie und Biotechnologie der TU Braunschweig
- 1999-2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 2002-2003 Projektleiterin und Produktmanagerin bei der co.don AG Teltow
- seit 2003 Dozentin für Molekularbiologie an der Fachhochschule Lausitz in Senftenberg

---

## Publikationen

„Monoclonal anti-FLAG antibodies react with a new isoform of rat Mg<sup>2+</sup> dependent protein phosphatase beta“, **Biochem Biophys Res Commun.**, 1995 Feb 15; 207(2):708-14

„Pax-3 is necessary but not sufficient for lbx1 expression in myogenic precursor cells of the limb“, **Mech Dev.**, 1998 May; 73(2):147-58.

„Early specification of limb muscle precursor cells by the homeobox gene Lbx1h“, **Nat Genet.**, 1999 Oct; 23(2):213-6

„The homeobox containing gene Lbx1 is required for correct dorsal-ventral patterning of the neural tube“, **J Neurochem.**, 2002 Aug; 82(4):774-82

„The homeobox gene Lbx1 specifies a subpopulation of cardiac neural crest necessary for normal heart development“, **Circ Res.**, 2003 Jan 10; 92(1):73-80

## Literatur

**Birchmeier C.**, Brohmann, H. Genes that control the development of migrating muscle precursor cells, *Current Opinion in Cell Biology*, 12: 725-730 (2000)

**Buckingham, M.**, Bajard, L., Chang, T., Daubas, P., Hadchoul, J., Meilhac, S., Montarras, D., Rocancourt, D., Relaix, F. The formation of skeletal muscle: from Somite to limb, *Journal of Anatomy*, 59-68 (2003)

**Chien, K.R.**, Stress pathways and heart failure, *Cell.*, 98(5):555-8, Review (1999)

**Franz, T.** Persistent truncus arteriosus in the Splotch mutant mouse, *Anat Embryol (Berl)*. 180, 457- 64 (1989)

**Gilbert, S.F.** *Developmental Biology*, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts (1997)

**Gross, M.K.**, Dottori, M., Goulding, M. Lbx1 specifies somatosensory association interneurons in the dorsal spinal cord, *Neuron*, 16;34(4):535-49 (2002)

**Kardon, G.**, Kloetzli Campbell, G., Tabin, C.J. Local Extrinsic Signals Determine Muscle and Endothelial Cell Fate and Patterning in the Vertebrate Limb, *Developmental Cell*, Vol.3, 533-545 (2002)

**Kirby, M.L.**, Gale, T.F., Stewart, D.E. Neural crest cells contribute to normal aorticopulmonary septation, *Science*, 220, 1059-61 (1983)

**Kirchhoff, S.**, Kim, J.S., Hagendorff , A., Thonnissen, E., Kruger, O., Lamers, W.H., Willecke, K. Abnormal cardiac conduction and morphogenesis in connexin40 and connexin43 double-deficient mice, *Circ Res.*, 87(5):399-405 (2000)

**Kong, Y.**, Shelton, J.M., Rothermel, B., Li ,X., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., Williams, R.S., Cardiac-specific LIM protein FHL2 modifies the hypertrophic response to beta-adrenergic stimulation, *Circulation*, 5;103(22):2731-8 (2001)

**Krüger, M.**, Schäfer, K., Braun, T. The homeobox containing gene Lbx1 is required for correct dorsal-ventral patterning of the neural tube, *J. Neurochem.*, 82, 774-782 (2002)

**Lakkis, M.M.**, Golden, J.A., O'Shea, K.S., Epstein, J.A. Neurofibromin deficiency in mice causes exencephaly and is a modifier for Splotch neural tube defects, *Dev Biol.*, 212(1):80-92, (1999)

**Lance-Johnes, C.**, Van Swearingen, J. Myoblasts migrating into the limb bud at different developmental times adopt different fates in the embryonic chick hind limb, *Developmental Biology* 170, 321-337 (1995)

**Lo, C.W.**, Cohen, M.F., Huang, G.Y., Lazatin, B.O., Patel, N., Sullivan, R., Pauken, C., Park, S.M.

Cx43 gap junction gene expression and gap junctional communication in mouse neural crest cells, *Dev Genet.*, 20(2):119-32 (1997)

**Mankoo, B.S.**, Collins, N.S., Ashby, P., Grigorieva, E., Pevny, L.H., Candia, A., Wright, C.V., Rigby, P.W., Pachnis, V. Mox2 is a component of the genetic hierarchy controlling limb muscle development, *Nature*, 400(6739):69-73 (1999)

**Mennerich, D.**, Braun, T. Activation of myogenesis by the homeobox gene Lbx1 requires cell proliferation, *EMBO Journal*, Vol.20, Nr.24, 7174-7183 (2001)

**Mennerich, D.**, Schäfer, K., Braun, T. Pax3 is necessary but not sufficient for Lbx1 expression in myogenic precursor cells of the limb, *Mechanisms of Development* 73, 147-158 (1998)

**Millonig, J.H.**, Millen, K.J., Hatten, M.E. The mouse Dreher gene Lmx1a controls formation of the roof plate in the vertebrate CNS, *Nature*, 17;403(6771):764-9 (2000)

**Müller, W.A.** *Entwicklungsbiologie*, Fischer-Verlag, Stuttgart; Jena, Germany (1995)

**Muller, T.**, Brohmann, H., Pierani, A., Heppenstall, P.A., Lewin, G.R., Jessell, T.M., Birchmeier, C. The homeodomain factor lbx1 distinguishes two major programs of neuronal differentiation in the dorsal spinal cord, *Neuron*, 16;34(4):551-62 (2002)

**Sachs, M.**, Brohmann, H., Zechner, D., Müller, T., Hülsken, J., Walther, I., Schaeper, U., Birchmeier, C., Birchmeier, W. Essential Role of Gab1 for Signaling by the c-Met Receptor in Vivo, *Journal of Cell Biology*, Vol.150, Nr.6, 1375-1384 (2000)

**Schäfer, K.**, Braun, T. Early specification of limb muscle precursor cells by the homeobox gene Lbx1h, *Nat. Genet.*, 23, 213-216 (1999)

**Schäfer, K.**, Neuhaus, P., Kruse, J., Braun, T. The Homeobox Gene Lbx1 Specifies a Subpopulation of Cardiac Neural Crest Necessary for Normal Heart Development, *Circ. Res.*, 92, 73-80 (2003)

**Tanabe, Y.**, Jessell, T.M. Diversity and pattern in the developing spinal cord, *Science*, 15, 274(5290):1115-23 (1996)

**Waldow, K.**, Zdanowicz, M., Burch, J., Komiski, D.H., Stadt, H.A., Godt, R.E., Creazzo, T.L., Kirby, M.L. A novel role for cardiac neural crest in heart development, *J Clin Invest*, 103, 1499-507 (1999)

**Watson, J.D.**, Gilman, M., Witkowsky, J., Zollner, M. *Rekombinierte DNA*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1993)