

3. Ergebnisse

3.1 *Lbx1* Expression im sich entwickelnden Rhombenzephalon

Das *Lbx1* Gen wird während der Entwicklung im dorsalen Rückenmark und im Rhombenzephalon exprimiert (Abb. 3.1). Diese Expression kann erstmals am Tag 10 der Embryonalentwicklung (E10) beobachtet werden. Mittels *in-situ* Hybridisierung wurde das Expressionsmuster von *Lbx1* im Rhombenzephalon genauer bestimmt. Abb. 3.1b zeigt eine *open book preparation* des Rhombenzephalons (E11), d.h. das Rhombenzephalon wurde auf der dorsalen Seite geöffnet und aufgeklappt. *Lbx1* wird in einem longitudinalen Streifen entlang der anterior-posterioren Achse exprimiert. Die rostrale Grenze der Expression entspricht der Grenze zwischen dem ersten und dem zweiten Rhombomer, und die Expression erstreckt sich über das gesamte Rhombenzephalon bis ins Rückenmark.

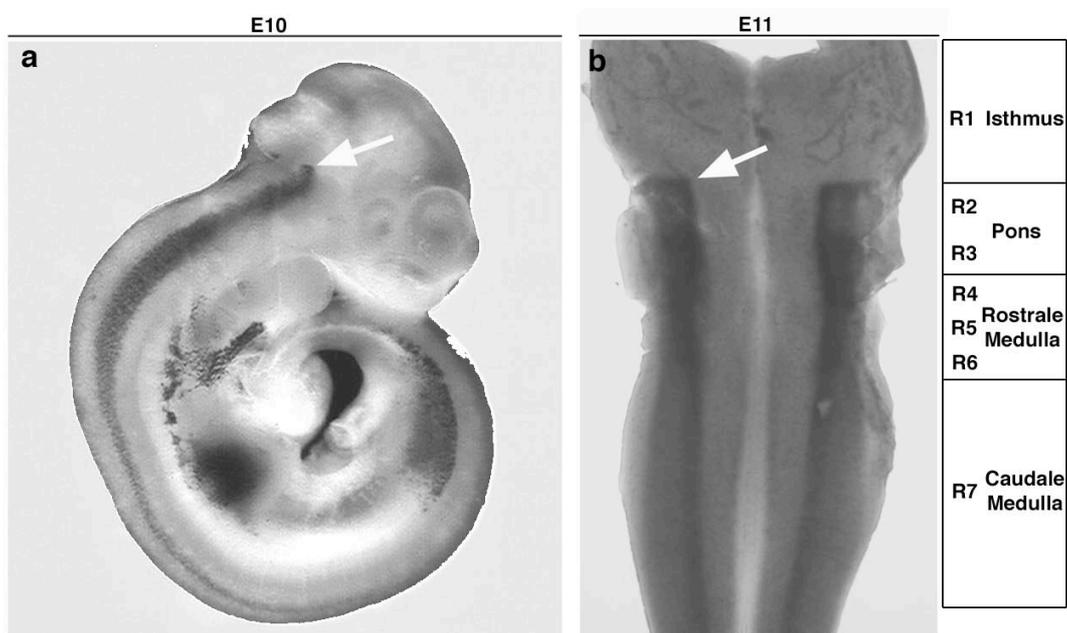


Abb. 3.1: *Lbx1* ist im ZNS in der ventralen Flügelplatte des Rhombenzephalon exprimiert. *In-situ* Hybridisierung mit einer *Lbx1* spezifischen Probe (a) an einem Embryo (E10) und (b) an einer „open book preparation“ des Rhombenzephalons (E11). Der Pfeil markiert die Grenze zwischen erstem und zweitem Rhombomer. *Lbx1* wird caudal der Grenze zwischen erstem und zweitem Rhombomer exprimiert.

Zur Charakterisierung der *Lbx1* Expression entlang der dorso-ventralen Achse wurden Schnitte durch das vierte Rhombomer mit Hilfe von Antikörpern gegen *Lbx1*, *Pax7* und *Mash1* gefärbt (Abb. 2). *Lbx1*-positive Zellen befinden sich außerhalb der Ventrikularschicht, d.h. *Lbx1* wird in postmitotischen Neuronen exprimiert. *Lbx1*+ Neurone entstehen in der Flügelplatte des Rhombomers und liegen lateral von *Pax7*+ Vorläuferzellen. Das bedeutet, daß *Lbx1*+ Neurone aus einer *Pax7*+ Vorläuferdomäne im Rhombenzephalons hervorgehen. Abb. 2b zeigt auch, dass ein Teil der *Lbx1*+ Neurone aus einer Vorläuferdomäne entstehen, die *Mash1*+/*Pax7*+ ist. *Lbx1*+ Zellen entstammen also keiner einheitlichen Vorläuferdomäne. Weitere Untersuchungen zeigen, dass die *Lbx1*+ Zellen nicht einheitlich sind (siehe unten). Dies gilt auch für die *Lbx1*+ Neurone, die in anderen Rhombomeren entstehen (Daten nicht gezeigt). Analog zu der im Rückenmark verwendeten Nomenklatur bezeichne ich die *Lbx1*+ Neurone der ventralen Flügelplatte als Klasse B Neurone und die *Lbx1* Neurone der dorsalen Flügelplatte als Klasse A Neurone.

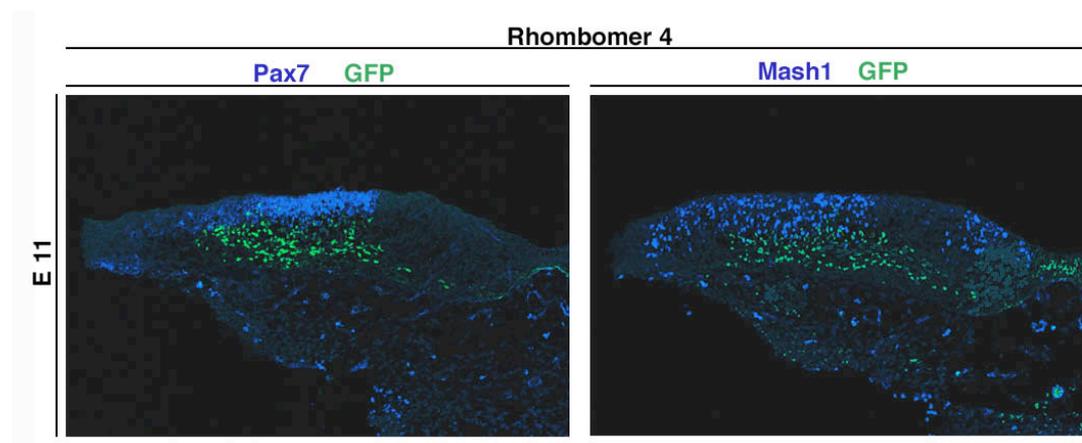


Abb. 3.2: *Lbx1* positive Zellen sind postmitotisch und entstammen *Pax7* positiven Vorläuferzellen. Immunhistologische Analyse der *Lbx1* Expression auf Transversalschnitten durch das vierte Rhombomer (E10,5). (a) Doppelfärbungen mit *Lbx1* (grün) und *Pax7* (blau) bzw. (b) *Lbx1* (grün) und *Mash1* (blau).

Mit Hilfe weiterer Marker wurden die unterschiedlichen Neuronenpopulationen, die im dorsalen Rhombenzephalon generiert werden, systematisch analysiert. Dies war wichtig, um später die Veränderungen im Rhombenzephalon von *Lbx1*^{-/-} Tieren genau definieren zu können. Zu diesem Zweck wurden die neugeborenen Neurone der Rhombomere zwei, vier, sechs und sieben mit Antikörpern gegen die Transkriptionsfaktoren *Lmx1b*, *Phox2b*, *Lim1/2* und *Brn3a* immunhistologisch untersucht (Abb. 3).

In den Rhombomeren zwei bis sechs konnten die Lbx1+ Neurone, während der frühen Neurogenese am Tag E10 in vier Subtypen unterteilt werden (Abb. 3.3). Von dorsal nach ventral wurden die so charakterisierten Neurone der Klasse B von eins bis vier durchnummeriert (B1-B4). Die Lbx1+ Neurone des B1 Subtyps ko-exprimieren Lim1/2 und Pax2. Die sich an diese ventral anschließenden B2 Zellen sind Phox2b+. B3 Neurone exprimieren dagegen Lmx1b+. Die ventralen Lbx1+ Neurone, der B4 Subtyp, ko-exprimieren Lim1/2 und Pax2. Wie im Rückenmark können auch im siebten Rhombomer nur drei Subtypen von Lbx1+ Nervenzellen unterschieden werden. Es werden keine Neurone des B2 Subtyps geboren, und die Region, aus der B1 Neurone entstehen, ist verbreitert.

Dorsal der Lbx1 Domäne lassen sich mit Hilfe der oben genannten Transkriptionsfaktoren maximal 4 unterschiedliche Subtypen unterscheiden. Sie wurden ebenfalls von dorsal nach ventral durchnummeriert (A1 - A4).

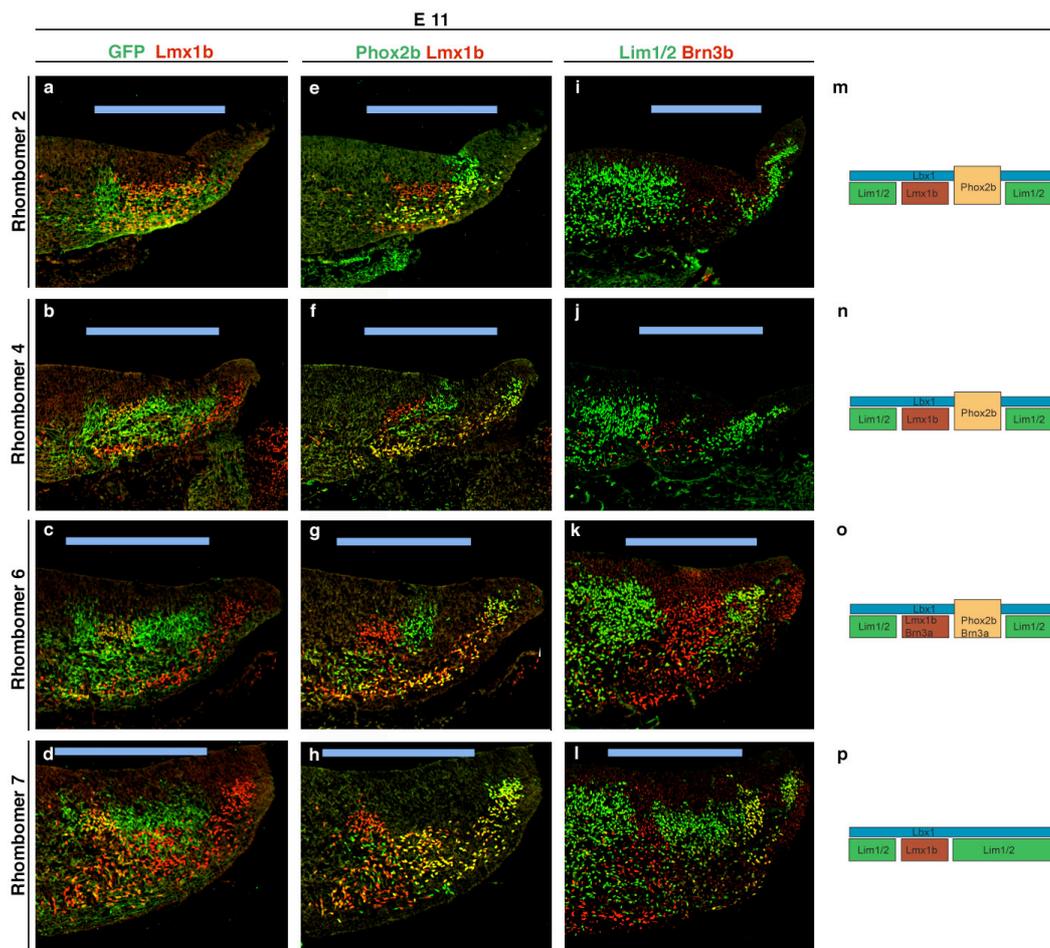


Abb. 3.3: Im zweiten bis sechsten Rhombomer lassen sich vier Lbx+ Subtypen und im siebten Rhombomer drei Lbx1+ Subtypen unterscheiden. Immunhistologie auf Transversalschnitten durch das zweite (a,e,i), das vierte (b,f,g), das sechste Rhombomer (c,g,k) und das siebte Rhombomer (d,h,i) - mit Antikörpern gegen (a-d) GFP (grün) und Lmx1b (rot); (e-h) Phox2b (grün) und Lmx1b (rot) (i-l)

Lim1/2 (grün) und Brn3a (rot) eines $Lbx^{Gfp/wt}$ Tieres (E11). Der Bereich, in dem Lbx1+ Neurone geboren werden, ist durch einen blauen Balken markiert (m-p) schematische Darstellung der neuronalen Subtypen in den einzelnen Rhombomeren am Tag E11.

3.2 *Lbx1* als transkriptioneller Regulator

In der Arbeitsgruppe von Prof. Carmen Birchmeier wurden durch Dr. Henning Brohman und Elena Vasyutina zwei Mauslinien etabliert, in denen das *Lbx1* Gen durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen spezifisch mutiert wurde. In beiden Linien sind *Lbx1* Sequenzen durch das bakterielle β -Galaktosidase Gen ($Lbx1^{LacZ}$ Allel) bzw. durch Sequenzen, die für das *green fluorescent protein* (GFP) ($Lbx1^{GFP}$ Allel) kodieren, ersetzt. Beide Mauslinien wurden zur Untersuchung der *Lbx1* Funktion in der Entwicklung des Rhombenzephalon verwendet. Sowohl das LacZ als auch das GFP Reportergen zeigen im Rhombenzephalon Expressionsmuster, die denen von *Lbx1* mRNA oder Protein entsprechen.

Die Expression von $Lbx1^{LacZ}$ wurde untersucht, indem die kodierte β -Galaktosidase mittels einer enzymatischen Farbreaktion nachgewiesen wurde. Die Intensität der Färbung war stark abhängig von der Kopienzahl von LacZ. Durch Verpaarung der $Lbx1^{LacZ}$ und $Lbx1^{GFP}$ Linien wurden $Lbx1^{LacZ}/Lbx1^{GFP}$ und $Lbx1^{LacZ}/Lbx1^{wt}$ Embryonen hergestellt, d.h. hetero- und homozygot mutante Embryonen, die jeweils eine Kopie des LacZ-Gens aufweisen. Damit besitzen beide Genotypen die gleiche Kopienzahl des LacZ-Gens. Nach Färbung mit X-Gal, einem Substrat für β -Galaktosidase, wird in $Lbx1^{LacZ}/Lbx1^{GFP}$ Embryonen (Abb. 3.4b) eine schwächere Färbung als in den $Lbx1^{LacZ}/Lbx1^{wt}$ Tieren beobachtet. Dies zeigt, dass in Tieren ohne *Lbx1* der *Lbx1*-Locus mit geringerer Effizienz transkribiert wird. *Lbx1* ist also für die Aufrechterhaltung der Transkription des eigenen Gens notwendig. Das generelle Expressionsmuster ist in den homozygot mutanten Tieren allerdings ähnlich dem in den heterozygoten Kontrolltieren beobachteten Muster (Abb. 3.4a/b). Das weist darauf hin, daß *Lbx1* nicht zur Spezifizierung der *Lbx1* Expression, sondern nur zu deren Aufrechterhaltung benötigt wird.

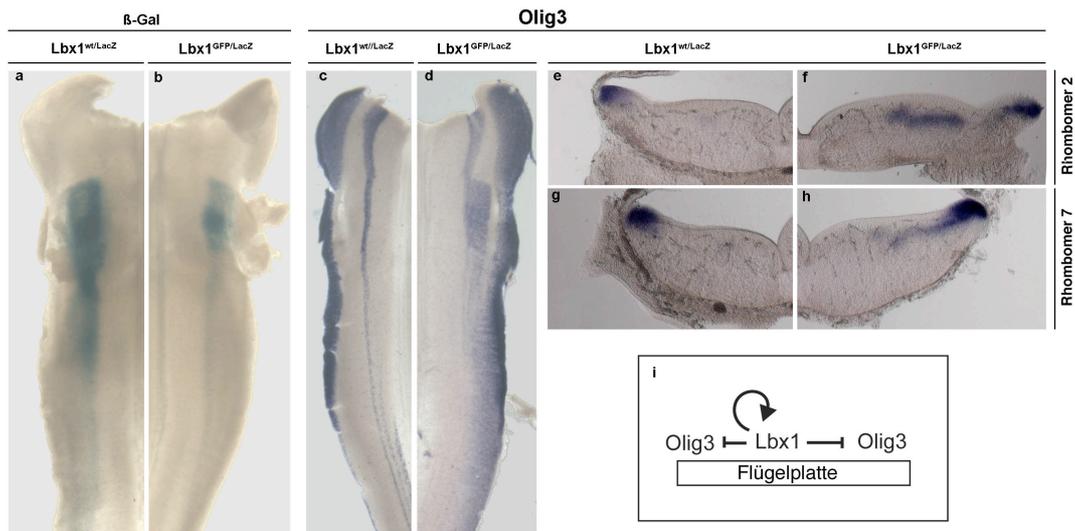


Abb. 3.4: Lbx1 als transkriptioneller Regulator. *Lbx1* ist zur Aufrechterhaltung der eigenen Expression notwendig und reprimiert gleichzeitig die Expression von *Olig3*. (a, b) LacZ-Färbung an einer „open book preparation“ des Rhombenzephalons (E11,5). (a) $Lbx1^{LacZ}/Lbx1^{wt}$ (b) $Lbx1^{LacZ}/Lbx1^{GFP}$. Die X-gal Färbung im *Lbx1*^{-/-} Rhombenzephalon ist deutlich schwächer (c-h). *In-situ* Hybridisierung des Rhombenzephalons (E11,5) von *Lbx*^{+/-} (c,e,f) und *Lbx*^{-/-} (d,g,h) Embryonen mit einer *Olig3* spezifischen Sonde; (c/d) „open book“ Präparat (e/g) Transversalschnitte durch das zweite und (f/h) das siebte Rhombomer. (i) Schematische Darstellung der Funktion von *Lbx1*.

Die Neurone des dorsalen Rhombenzephalons lassen sich in die Klassen A und B einteilen. Klasse A exprimiert *Olig3*, und Klasse B *Lbx1*. *Olig3* wird in der Ventrikularschicht dorsal der *Lbx1*⁺ Neurone in allen Rhombomeren exprimiert. Zusätzlich wird *Olig3* in eine zweiten Vorläuferdomäne, ventral der *Lbx1*⁺ Neurone in einem schmalen Streifen an der Grenze zwischen Basal- und Flügelplatte transkribiert. In Abb.3.4 wurde die *Olig3* Expression durch *in-situ* Hybridisierung im Rhombenzephalon von Kontroll- und *Lbx1*^{-/-} Tieren verglichen. An einer *open book preparation* ist zu erkennen, dass in den *Lbx1*^{-/-} Mutanten auch Klasse B Neurone *Olig3* exprimieren (Abb. 3.4d). Der dorsale *Olig3*⁺ Streifen expandiert dabei nach ventral, und der ventrale nach dorsal. Die ektopische Expression von *Olig3* in *Lbx*^{-/-} Tieren wird nur außerhalb der Ventrikularschicht in postmitotischen Neuronen beobachtet (Abb.3.4.g.h). Daraus lässt sich schließen, daß *Lbx1* die Expression von *Olig3* reprimiert.

3.3 Die Rolle von *Lbx1* bei der Differenzierung früher Interneurone

Zur weiteren Analyse der Rolle von *Lbx1* bei der neuronalen Determination wurden die Expressionsmuster von verschiedenen in Interneuronen exprimierten Genen im Rhombenzephalon von Kontroll- und *Lbx1*^{-/-} Tieren untersucht. Dabei zeigte sich, dass *Lbx1* für die korrekte Differenzierung von B1, B2 und B3 Neuronentypen notwendig ist. Die B4 Neurone exprimieren ektopisch *Olig3*. Weitere Änderungen in der Spezifizierung von B4 Neuronen konnte ich nicht beobachten.

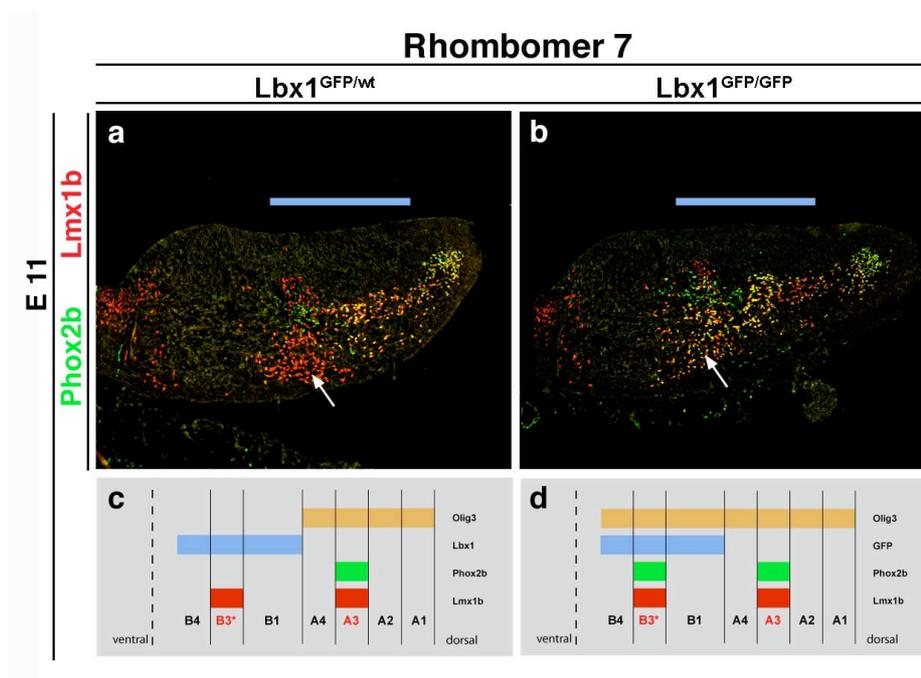


Abb. 3.5: *Lbx1* ist essentiell für die korrekte Differenzierung der B3 Zellen. Transversaler Schnitt durch das 7. Rhombomer von Kontroll- (a) und *Lbx1*^{-/-} (b) Embryonen (E11). Immunhistologie mit Antikörpern gegen Phox2b (grün) und Lmx1b (rot). In *Lbx1*^{-/-} Embryonen exprimieren die B3 Zellen ektopisch Phox2b (Pfeil). (c/d) Schematische Darstellung des Identitätswechsel der B3* Zellen. Der blaue Balken zeigt die Domäne, in der *Lbx1*+ (bzw. β-gal+) Neurone entstehen

3.3.1 Entwicklung der B3 und B2 Interneurone

Am Tag E11 können im siebten Rhombomer und im dorsalen Rückenmark drei unterschiedliche Subtypen von *Lbx1*+ Neuronen identifiziert werden (B1-B3). B3 Neurone exprimieren *Lmx1b* und *Rnx* (Abb. 3.5 siehe auch Abb. 4.1). In *Lbx1*^{-/-} Tieren exprimieren diese Zellen zusätzlich den Transkriptionsfaktor *Phox2b* und nehmen also eine abnorme Charakteristik an (B3*). Dieser Identitätswechsel wird in

den Rhombomeren vier bis sieben beobachtet. Im Rhombenzephalon existiert in Kontrolltieren ein Nervenzelltyp, der *Lmx1b+*, *Rnx+* und *Phox2b+* exprimiert (A3 Subtyp). Die abnorm differenzierten B3* Neurone ähneln in ihrem Expressionsmuster also A3 Neuronen.

Im zweiten bis sechsten Rhombomer können vier *Lbx1+* Subtypen unterschieden werden. Der zusätzliche Subtyp B2 entsteht dorsal der B3 Neurone und exprimiert neben *Lbx1* auch *Phox2b* (Abb. 3.6). Im sechsten Rhombomer migrieren diese Zellen erst lateral und dann ventral in Richtung Basalplatte (Abb. 3.6a Pfeilspitze). Im zweiten bis sechsten Rhombomer der *Lbx1*^{-/-} Tiere differenzieren die B3 und B2 Subtypen abnormal und exprimieren zusätzlich *Phox2b* (B3*) und *Lmx1b* (B2*) (Abb. 3.6b). Die B3* und B2* Neurone exprimieren damit einen Transkriptionsfaktor-Kombination wie Neurone des A3 Subtyps.

Im weiteren untersuchte ich, welchen Effekt die Änderung der neuronalen Identität auf das weitere Verhalten der Zellen ausübt. Von A3 Neuronen in den Rhombomeren vier bis sechs ist bekannt, dass sie (nor-)adrenerge Nervenzellen bilden. Ich untersuchte deshalb, ob die falsch spezifizierten B3* und B2* Zellen ektopische (nor)adrenerge Nervenzellen bilden. A3 Neurone migrieren anfangs lateral und verbleiben dann in der Flügelplatte (Abb. 3.6a Pfeil). Die normal spezifizierten B3 migrieren nur wenig und bleiben nah an dem Ort ihrer Geburt liegen. Im Gegensatz dazu migrieren die normal spezifizierten B2 Neurone erst lateral, dann aber ventral in Richtung Basalplatte. In den *Lbx1*^{-/-} Tieren verhalten sich die abnorm spezifizierten B3* und B2* Neurone abnorm. Sie migrieren nach ihrer Geburt erst lateral und verbleiben dann aber in der Flügelplatte. Sie nehmen also nicht nur den Transkriptionsfaktor-Kode von A3 Zellen an, sondern verhalten sich in ihrer weiteren Wanderung auch wie A3 Zellen (Abb. 3.5b Pfeil).

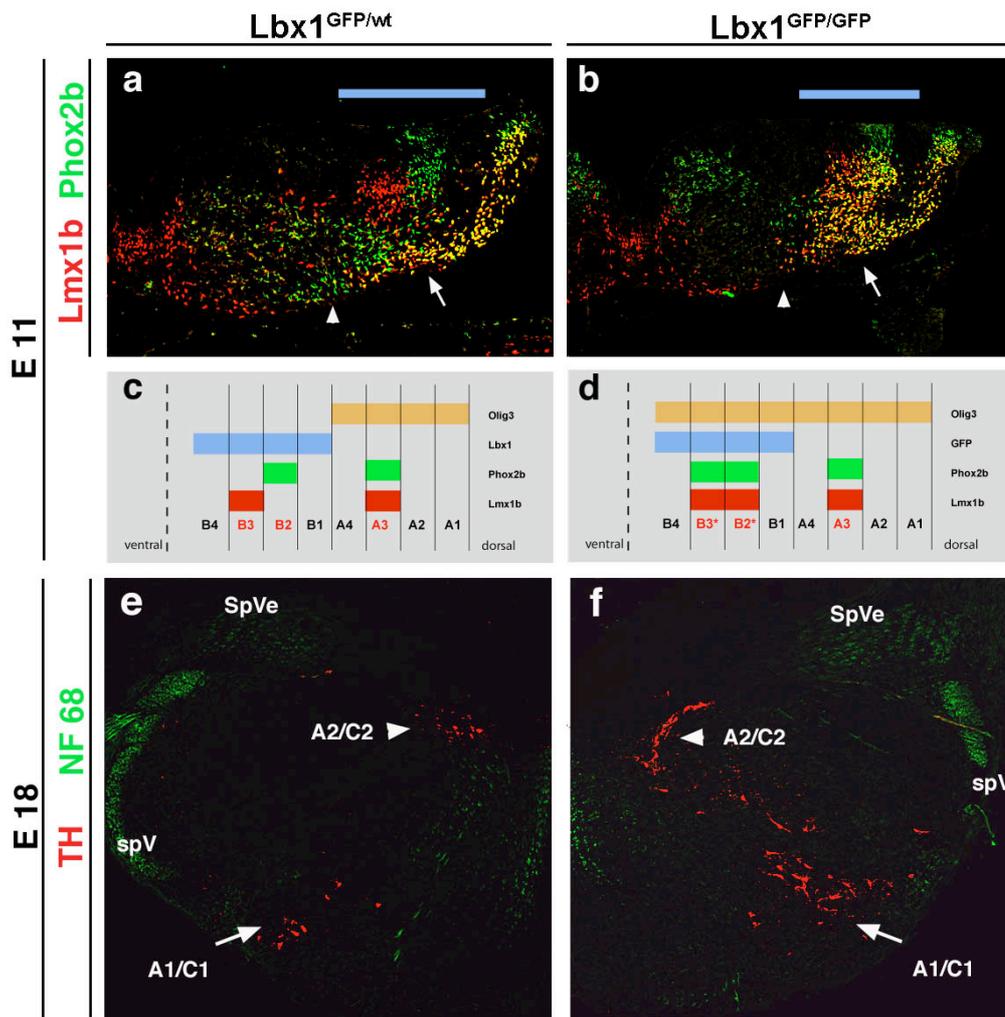


Abb. 3.6: Lbx1 ist essentiell für die korrekte Differenzierung von B2 und B3 Neurone. (a/b) Schnitte durch das sechste Rhombomer von (a) Kontroll- und (b) *Lbx1*^{-/-} Embryonen (E11) wurden mit Antikörpern gegen Phox2b (grün) und Lmx1b (rot) immunhistologisch untersucht. (c/d) Schematische Darstellung des beobachteten Identitätswechsels der Nervenzellen im sechsten Rhombomer am Tag E11. Der Bereich, in dem *Lbx1*⁺ Neurone geboren werden ist durch einen blauen Balken markiert. (e/f) Schnitte durch die Medulla oblongata von (e) Kontroll- und (f) *Lbx1*^{-/-} Tieren wurden mit Antikörpern gegen TH (rot) und Neurofilament 68 (grün) immunhistologisch untersucht. Der Pfeil weist auf die A2/C2 und die Pfeilspitze auf die A1/C1 (nor)adrenergen Zentren. In den *Lbx1*^{-/-} Tieren nehmen die B2* und B3* Zellen eine ähnliche Identität wie A3 Zellen an und differenzieren zu ektopischen (nor)adrenergen Zellen. Dies wird in den Rhombomeren vier bis sechs beobachtet (Daten nicht gezeigt). SpVe Nucl. spinalis vestibulares, spV tractus spinalis n. trigeminalis.

Die A3 Neurone in den Rhombomeren vier bis sechs exprimieren neben Phox2b und Lmx1b auch Dopamin Beta Hydroxylase (DBH) und Tyrosin Hydroxylase (TH), und die Expression dieser beiden Enzyme wird während der weiteren Reifung der Neurone aufrecht erhalten. DBH- und TH-Expression markieren (nor)adrenerge Nervenzellen. Ich untersuchte deshalb, ob die falsch spezifizierten B2* und B3*

Zellen auch zu (nor)adrenergen Nervenzellen differenzieren. In Kontroll- und Lbx1^{-/-} Tieren wurde mittels *in-situ* Hybridisierung mit einer TH-spezifischen Probe die Anzahl (nor)adrenerger Neurone im Rhombenzephalon verglichen. In den Lbx1^{-/-} Tieren sind deutlich mehr TH⁺ Zellen in den (nor)adrenergen Zentren am Tag 18 der Embryonalentwicklung zu beobachten (Abb. 3.5 e/f); Pfeilspitzen weisen auf das (nor)adrenerge Zentrum A1/C1 und Pfeile auf das (nor)adrenerge Zentrum A2/C2. Die B2* und B3* Zellen haben demnach nicht nur das Transkriptionsfaktor-Profil und das Migrationsmuster der A3 Neurone angenommen, sondern sie differenzieren nun auch wie A3 Zellen zu (nor)adrenergen Nervenzellen. Andere (nor)adrenerge Zentren, z.B. *Locus ceruleus*, sind in den Lbx1 mutanten Mäusen durch nicht ektopischer Nervenzellen vergrößert (Daten nicht gezeigt).

3.3.2 Entwicklung der B1 und der B4 Neurone im Rhombenzephalon

Der B1 Subtyp ist eine weitere Lbx1⁺ Neuronenpopulation, die in Lbx1^{-/-} Tieren abnormal spezifiziert wird. B1 Zellen exprimieren neben Lbx1, Lim1/2 und auch Pax2 (Abb. 3.7). Besonders offensichtlich wird die abnorme Spezifizierung dieses Neuronentyps im Rhombomer sieben von Lbx1^{-/-} Tieren, da in diesem Rhombomer diese Zellen ektopisch Brn3a (Abb. 3.7) und Olig3 (Abb. 3.4 c/d) exprimieren und sie die Expression von Pax2 und Gad67 (Glutamat Decarboxylase) verlieren. In den Rhombomeren zwei bis sechs verlieren diese B1 Zellen ebenfalls die Expression von Pax2 aber nicht von Gad67 und exprimieren ektopisch Olig3, aber nicht Brn3a (Abb. 3.9; siehe auch Zusammenfassung in Abb. 4.1).

Im weiteren werden diese abnormal spezifizierten Neurone als B1* Neurone bezeichnet. Die abnorm spezifizierten B1* Neurone ähneln in ihrem Expressionsmuster also A2 Neuronen.

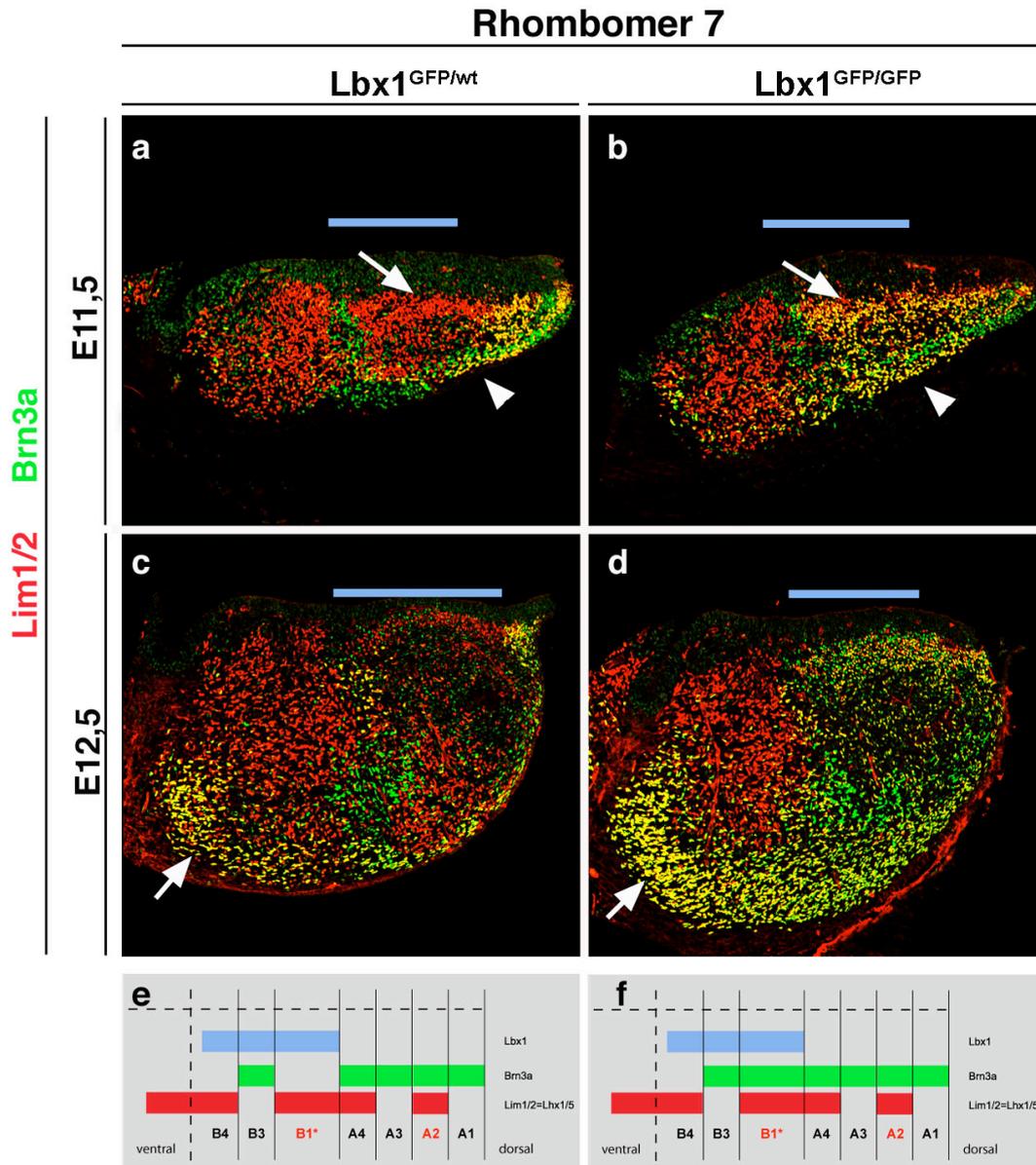


Abb. 3.7: Die Funktion von Lbx1 bei der Differenzierung der B1 Nervenzellen im siebten Rhombomer. (a-d) Immunhistologische Analyse der Neurone im siebten Rhombomer von (a/c) Kontroll- und (b/d) Lbx1^{-/-} Tieren am Tag E11 (a/b) und E12,5 (c/d) mit Antikörpern, die spezifisch Brn3a (grün) und Lim1/2 (rot) erkennen (a/b). Die Pfeilspitzen weisen auf einen Strom von Brn3a⁺/Lim2⁺ A2 Neuronen, die zur Anlage der *Oliva inferior* wandern (Pfeil c/d). In Lbx1^{-/-} Embryonen exprimieren B1* Zellen ektopisch Brn3a (Pfeil a/b). Der Neuronenstrom, der in die Anlage der *Oliva inferior* wandert (Pfeilspitze a/b), und die Anlage der *Oliva inferior* selbst (Pfeil c/d) ist in Lbx1^{-/-} Tieren (b/d) vergrößert.

Die weitere Differenzierung der B1 bzw. B1* Neurone in Kontroll- und Lbx1^{-/-} Tieren wurde weiter untersucht. Postmitotische B1 Neurone im siebten Rhombomer

wandern lateral. Die A2 Neurone wandern lateral und dann ventral in die Basalplatte. Die Brn3a Expression bleibt in A2 Neurone während der weiteren Entwicklung aufrechterhalten, und ihr weiteres Schicksal kann deshalb einfach verfolgt werden. Diese Neurone akkumulieren in der Basalplatte, wo sie die *Oliva inferior* bilden. Die falsch spezifizierten B1* Neurone im Rhombomer sieben der *Lbx1*^{-/-} Tiere verhalten sich in ihrer weiteren Entwicklung wie A2 Neurone, d.h. sie wandern erst lateral, dann ventral und akkumulieren in der Bodenplatte. Auch die weitere Differenzierung und Aggregation in die typische aufgefaltete Struktur der *Oliva inferior* erfolgt. Die Konsequenz dessen ist, daß die *Oliva inferior* eine abnormale Vergrößerung zeigt, ihre typische Gestalt aber beibehält. Die histologische Analyse an postnatalen Tieren zeigt in *Lbx1*^{-/-} Tieren eine korrekte in *Nucl. olivaris accessorius dorsalis* (Abb. 3.8 Pfeil e/f), *Nucl. olivaris accessorius medialis* (Abb. 3.8 Pfeilspitze e/f) und *Nucl. olivaris caudalis* differenzierte *Oliva inferior*. Auch auf molekularer Ebene kann dies gezeigt werden. So werden in *Lbx1*^{-/-} Tieren nicht nur Brn3a, das schon früh in der Entwicklung des Neuronentyps exprimiert wird (Abb 3.9 c/d), sondern auch Rezeptoren wie TrkA, TrkC und mGluR3, die erst während der pränatalen Phase in diesen Neuronen exprimiert werden, in den zusätzlichen Zellen der vergrößerten *Oliva inferior* exprimiert. Die abnorm spezifizierten B1* Zellen des Rhombomers sieben produzieren in ihrer weiteren Entwicklung also Neurone der *Oliva inferior*, die sich weder morphologisch noch molekular von den normalen Neuronen der *Oliva inferior* unterscheiden.

In-situ Hybridisierungen zeigen, daß der Transkriptionsfaktor Pax2 nicht nur in B1 Zellen, sondern zusätzlich auch in einem zweiten longitudinalen Streifen entlang der dorso-ventralen Achse des Rhombenzephalons exprimiert wird (Abb. 3.9). Genauere Immunfluoreszenz-Analysen zeigen, daß dieser Streifen von Pax2⁺ Zellen ebenfalls einer post-mitotischen Neuronenpopulationen entspricht, die *Lbx1* ko-exprimiert. Dabei handelt es sich um B4 Neurone. Während die *Lbx1*⁺/*Pax2*⁺ Neurone des B1 Subtyps in den Rhombomeren zwei bis sieben geboren werden, können B4 Neurone in gesamten Rhombenzephalon beobachtet werden.

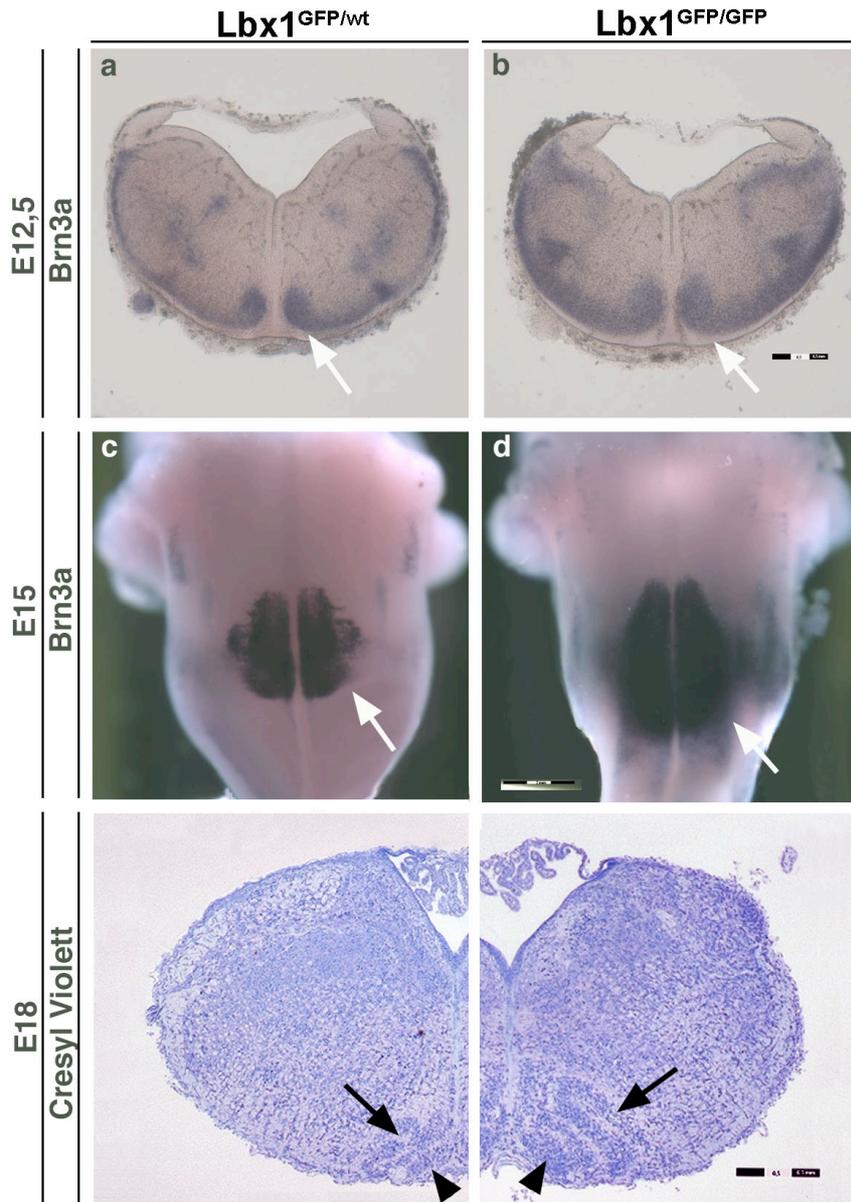


Abb. 3.8: In *Lbx1*^{-/-} Tieren ist die *Oliva inferior* vergrößert. (a/b) *In-situ* Hybridisierung mit einer *Brn3a*-spezifischen Probe. Gezeigt ist ein Schnitt durch das Rhombenzephalon eines Kontroll- (a) und *Lbx1*^{-/-} (b) Tieres (E12,5). Die Anlage der *Oliva inferior* ist in *Lbx1*^{-/-} Tieren (b) stark vergrößert (Pfeil). (c/d) *In-situ* Hybridisierung mit einer *Brn3a*-spezifischen Probe. Gezeigt ist eine ventrale Ansicht des Rhombenzephalons eines Kontroll- (c) und *Lbx1*^{-/-} (d) Tieres (E15). Die *Oliva inferior* ist in (d) stark vergrößert (Pfeil). (e/f) Cresyl-Violett Färbung eines Schnitts durch das Rhombenzephalon des Entwicklungsstadium E18 eines Kontroll- (e) und *Lbx1*^{-/-} (f) Tieres. Die *Oliva inferior* ist korrekt in die Subkerne *Nucl. olivaris accessorius dorsalis* (Pfeil) und *Nucl. olivaris accessorius medialis* (Pfeilspitze) differenziert.

In *Lbx1*^{-/-} Tieren werden, wie schon oben erwähnt, der dorsal gelegene B1 Steifen von *Pax2*⁺ Zellen und in Rhombomer sieben *Gad67*⁺ also GABAerge Neurone nicht

gebildet, während die ventralen B4 Zellen die Pax2 Expression aufrecht erhalten (Abb 3.7b). Die einzige ektopische bzw. abnormale Genexpression, die ich in diesen Zellen der *Lbx1*^{-/-} Tiere identifizieren konnte, war *Olig3*. Auch diese Zellen, im weiteren B4* genannt, scheinen sich in den *Lbx1*^{-/-} Tieren also abnormal zu verhalten, deren weiteres Schicksal nicht weiter verfolgt werden konnte.

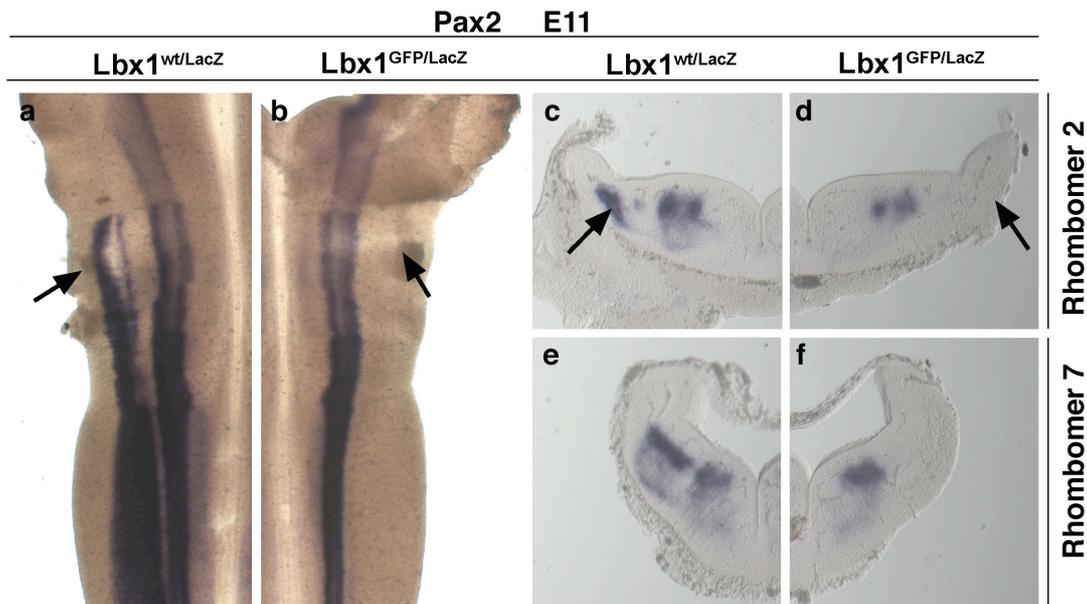


Abb. 3.9: *Lbx1* ist für die Expression von Pax2 in B1 Zellen essentiell. (a-f) *In-situ* Hybridisierungen am Rhombenzephalon von Kontroll- (a,c,e) und *Lbx1*^{-/-} (b,d,f) Embryonen (E11) mit einer Pax2 spezifischen Probe. Gezeigt sind „open-book“ preparationen (a/b) und Schnitte durch das zweite (c/d) und siebte (e/f) Rhombomer. In *Lbx1*^{-/-} Tieren wird Pax2 in B4*, aber nicht in B1* Neuronen (Pfeil) exprimiert

3.4 Die Rolle von *Lbx1* in der Entwicklung spät geborener Neurone, die sensorische Interneurone bilden.

Am Tag E12 lassen sich im siebten Rhombomer nicht mehr drei unterschiedliche *Lbx1*⁺ Subtypen entlang der dorso-ventralen Achse unterscheiden. Stattdessen können zu diesem späteren Zeitpunkt nur zwei *Lbx1*⁺ Subtypen unterschieden werden (LA und LB). Beide Subtypen verteilen sich nahe der Ventrikularzone in einem Salz-und-Pfeffer-Muster und scheinen aus einer breiten Vorläuferdomäne zu entstehen. Zusätzlich zu *Lbx1* exprimieren LA Neurone *Lim1/2* und *Pax2* und LB Neurone *Lmx1b*.

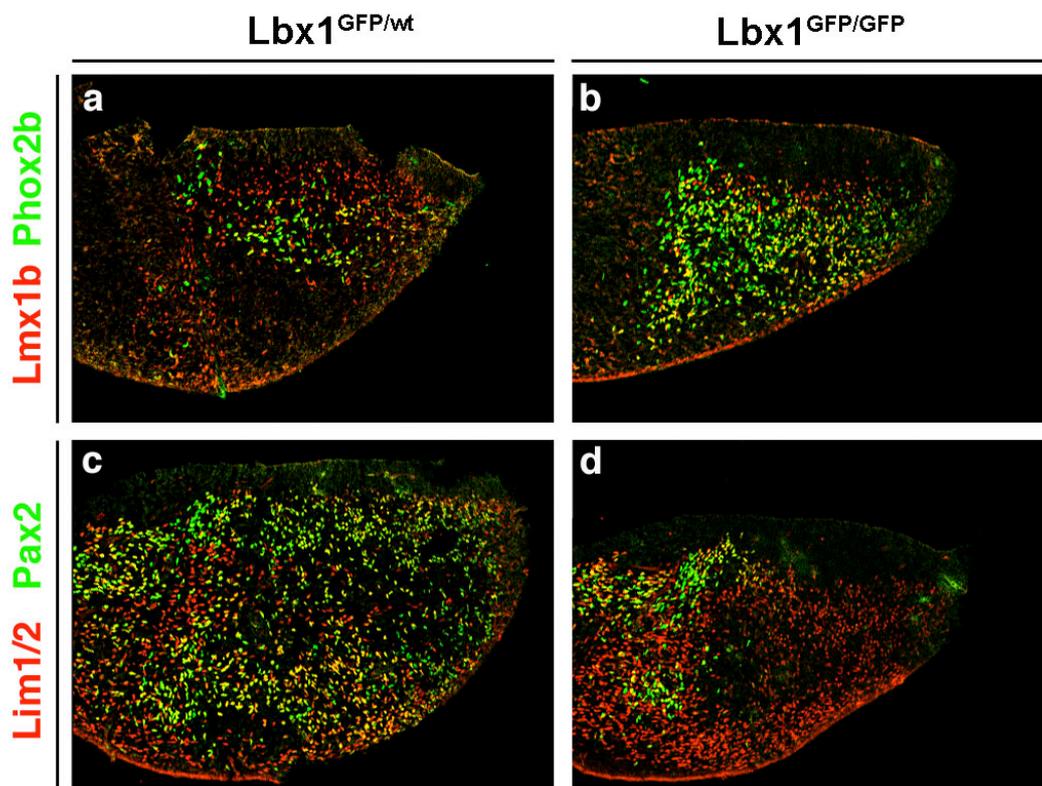


Abb. 3.10: Im siebten Rhombomer können am Tag 12,5 zwei *Lbx1*⁺ Subtypen unterschieden werden. (a-d) Immunhistologische Analyse von Neuronen im siebten Rhombomer in Kontroll- (a/c) *Lbx1*^{-/-} (b/d) Tieren (E12,5). Benutzt wurden spezifische Antikörper gegen *Pax2* und *Lim1/2* (a/b) bzw. gegen *Lmx1b* und *Phox2b* (b/d). Es konnten zwei unterschiedliche *Lbx1*⁺ Subtypen beobachtet werden: LA (*Lim1/2* und *Pax2*) und LB (*Lmx1b*) (a/c). In den *Lbx1*^{-/-} Tieren (b/d) exprimiert der neuronale Subtyp LA* nicht *Pax2* (b). Der Subtyp LB* (*Lmx1b*⁺) exprimiert ektopisch *Phox2b* (d).

Die Neurone, die in dieser Position im Rhombenzephalon von *Lbx1*^{-/-} Tieren geboren werden, sind nicht normal spezifiziert. Ein Neuronentyp kann identifiziert werden, der *Lim1/2*, aber nicht *Pax2* exprimiert (LA*). Das weitere Schicksal dieser Zellen konnte ich nicht verfolgen. Außerdem kann ein zweiter Typ (LB*), der *Lmx1b* und zusätzlich ektopisch *Phox2b* exprimiert, gefunden werden. Die Zellen exprimieren demnach den Homeobox-Faktor-Profil, der dem der frühen A3 Zellen entspricht. A3 Zellen werden aber in diesem Entwicklungsstadium nicht mehr im Rhombenzephalon gebildet. Die *Pax2*⁺ LA Zellen ko-exprimieren *Gad67*. *Gad67* Expression markiert GABAerge Neurone. Während der Entwicklung wandern die LA Neurone in den *Nucl. spinalis caudalis nervus trigemini* (SpVc) ein.

Auf histologischen Schnitten der kaudalen *Medulla oblongata* von *Lbx1*^{-/-} Tieren im Stadium E18 fällt zunächst auf, dass sowohl der (SpVc), als auch das ihn umgebende Faserbündel im Vergleich zu Kontrolltieren deutlich verkleinert ist. In dem SpVc befinden sich eine große Anzahl GABAerger Interneurone, die durch *in-situ* Hybridisierung mit *Gad67*⁻, *Viaat*⁻ (vesicular inhibitory amino acid transporter) oder *Pax2*-spezifischen Proben identifiziert werden können. In *Lbx1*^{-/-} Tieren ist weder die *Gad67*⁻ noch die *Viaat*⁻ oder die *Pax2*- spezifische Färbung im SpVc zu erkennen. Die GABAergen Neurone des SpVc fehlen in den mutanten Tieren. LA Neurone differenzieren also in die GABAergen Neurone des SpVc, und die falsch spezifizierten LA* Neurone können diese nicht bilden.

Sensorische Interneurone im SpVc exprimieren *Lmx1b* in Kontrolltieren (E18). *In-situ* Hybridisierung mit einer *Lmx1b*-spezifischen Probe zeigt, daß in den *Lbx1*^{-/-} Tieren keine *Lmx1b*⁺ Nervenzellen im SpVc beobachtet werden können (Abb. 3.11). Stattdessen können ektopische *Lmx1b*⁺ Neurone in der dorso-medialen *Medulla oblongata* lateral des *Nucl. solitarius* beobachtet werden, die zusätzlich *Phox2b* exprimieren. Diese ektopischen Zellen ko-exprimieren also *Lmx1b* und *Phox2b* und damit den identischen Homeobox-Faktoren-Profil wie LB* Neurone. Die Verteilung der Neurone, die ektopisch *Phox2b* exprimieren, wurde auch in den Stadien E12, 13, 15 untersucht. Sie wandern spät aus der ventralen Flügelplatte aus und verteilen sich in einer Position lateral des *Nucl. solitarius* (Abb. 3.11). Dies weist ebenfalls darauf hin, daß es sich um LB* Neurone handelt. In Kontrolltieren bilden LB Zellen also Neurone des SpVc. In den *Lbx1*^{-/-} Tieren werden diese Neurone (LB*) falsch

spezifiziert und diese abnormen Neurone wandern dann auch ektopisch. Die Zellen, die an ektopische Positionen wanderten, zeigten aufgrund der Transkriptionsfaktoren, die sie exprimieren und in ihrer endgültigen Lage Ähnlichkeit mit Zellen des *Nucl. solitarius*. Mittels Immunhistologie mit spezifischen Calretinin Antikörpern können nicht nur ektopisch lokalisierte Neurone, sondern auch ektopische Projektionen aus der Region des *Nucl. solitarius* beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). LB Neurone bilden also Interneurone im SpVc, während die falsch spezifizierten LB* Neurone Neurone des *Nucl. solitarius* bilden.

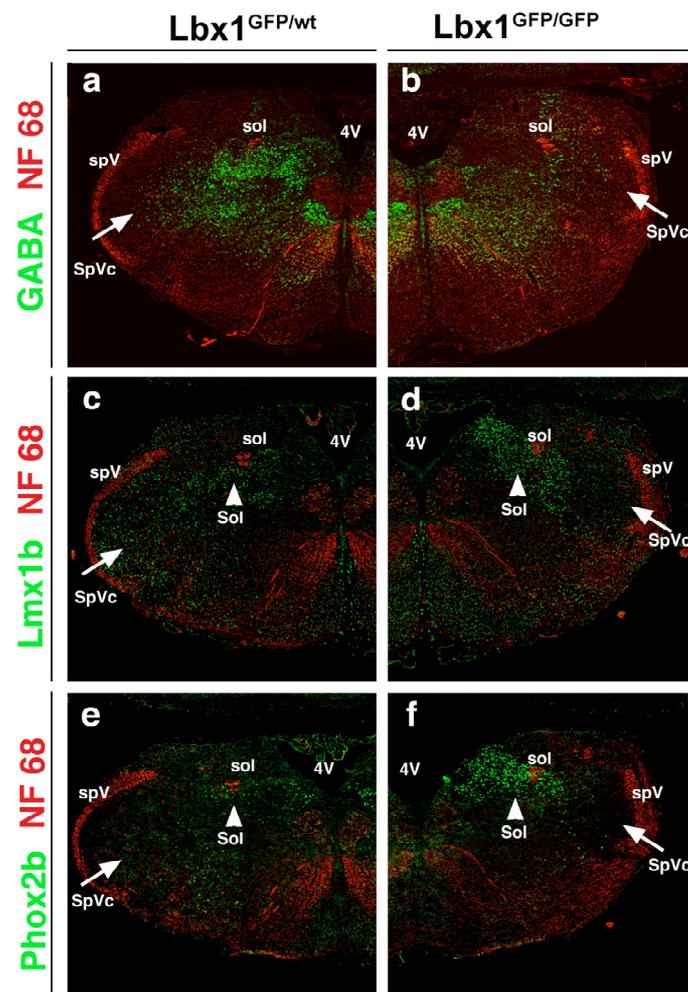


Abb. 3.11: In *Lbx1*^{-/-} Tieren wird der SpVc und *Nucl. solitarius* nicht korrekt gebildet. Immunhistologische Analyse von Neuronen im siebten Rhombomer in Embryonen am Tag E18. Benutzt wurden GABA (a/b) *Lmx1b* (c/d) und *Phox2b* (g/h)-spezifische (grün) und Neurofilament 68 spezifische (rot) Antikörper. In *Lbx1*^{-/-} Tieren werden im SpVc weder GABA noch *Lmx1b*+ Nervenzellen beobachtet (Pfeil b/d); stattdessen sind lateral des *Nucl. solitarius* ektopische *Lmx1b*+ und *Phox2b*+ Neurone lokalisiert (Pfeilspitze d/f). *spV tractus n. trigemialis*, *SpVc Nucl. spinalis caudalis n. trigemini*, *sol tractus nucleus solitarius*, *Sol Nucl. solitarius*, *4V* 4. Ventrikel

3.5 Spät geborene Lbx1+ Neurone im zweiten und dritten Rhombomer

Im zweiten und dritten Rhombomer werden auch spät verschiedene Lbx1+ Neurone in verschiedenen Positionen entlang der dorso-ventralen Achse geboren. Die beiden medialen Subtypen können durch ihre differenzielle Expression von Lmx1b bzw. Phox2b unterschieden werden (LB3 und LB2). Lmx1b ist ausschließlich in den ventralen LB3 Zellen und Phox2b nur in dorsalen LB2 Zellen exprimiert. In Lbx1^{-/-} Embryonen ko-exprimieren beide Subtypen die Transkriptionsfaktoren Lmx1b und Phox2b (Abb. 3.12). Das heißt, daß in Lbx1^{-/-} Tieren an dieser Stelle falsch spezifizierte LB3* bzw. LB2* Neurone entstehen.

Der *Nucl. principalis n. trigeminus* (PrV) ist ein weiterer sensorischer Kern des *Nervus trigeminus* und liegt in der *Pons*. Er wird von Vorläuferzellen des zweiten und dritten Rhombomers gebildet, wie auch die meisten anderen Kerne der Brücke. Die Zellen des PrV werden spät geboren, exprimieren Lmx1b und werden deshalb wahrscheinlich von LB3 Zellen gebildet. Auf histologischen Schnitten und durch *in-situ* Hybridisierungen mit einer Lmx1b spezifischen Sonde konnte ich zeigen, dass der PrV in Lbx1^{-/-} Tieren stark verkleinert ist. Stattdessen konnte ich lateral des *Nucl. motorius n. trigeminus* eine ektopische Lmx1b+ und Phox2b+ Zellpopulation nachweisen.

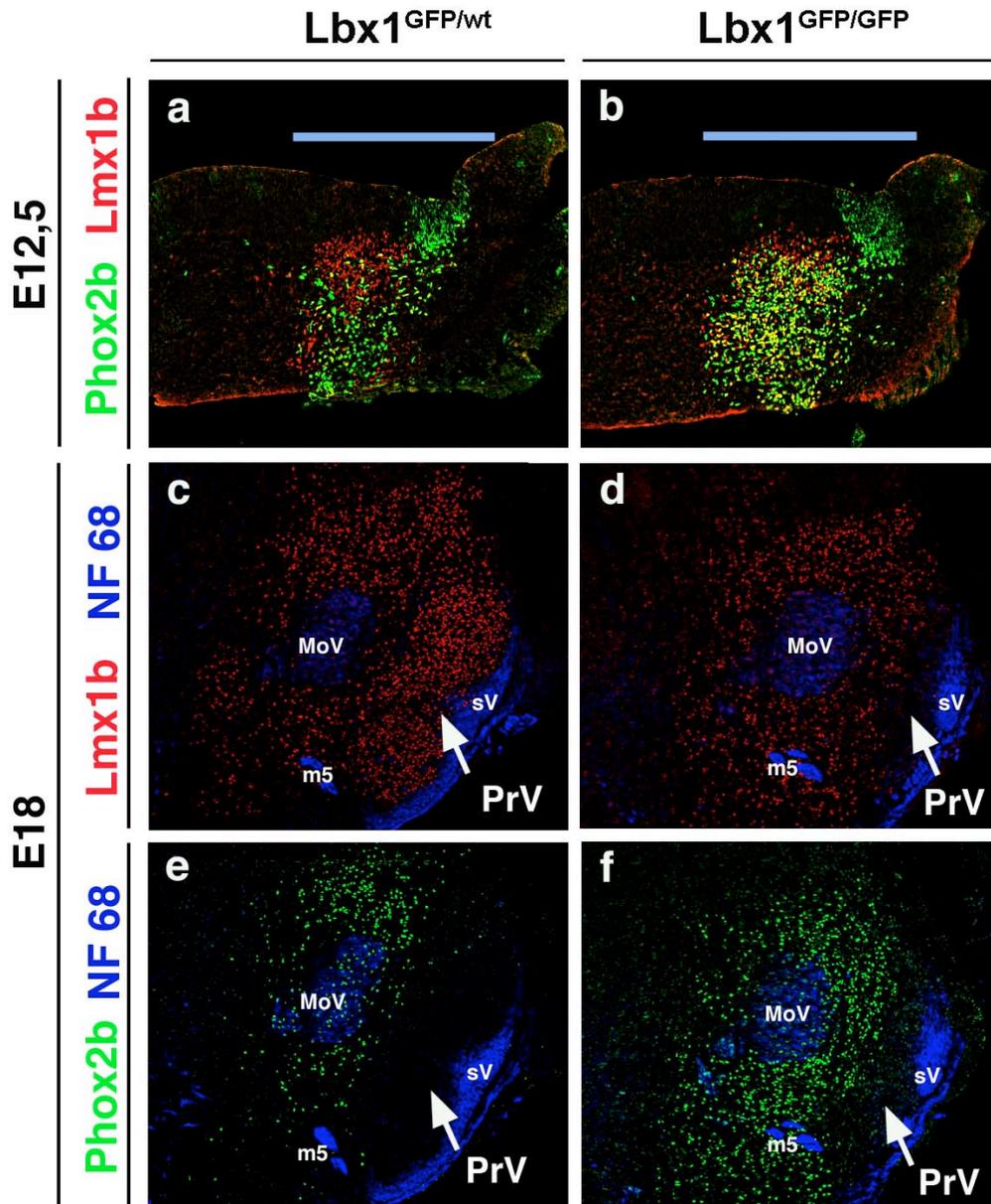


Abb. 3.12: In *Lbx1*^{-/-} Tieren wird der PrV nicht korrekt gebildet
 Immunhistologische Analyse von Neuronen im zweite Rhombomer in Kontroll- (a) und *Lbx1*^{-/-} (b) Embryonen (E12,5). Benutzt wurden *Lmx1b* (rot) und *Phox2b* (grün)-spezifische Antikörper; *Lmx1b* wird in LB3 und *Phox2b* in LB2 exprimiert. In *Lbx1*^{-/-} Tieren exprimieren LB3 Zellen ektopisch *Phox2b*, und LB2 Zellen ektopisch *Lmx1b*. Immunhistologische Analyse mit *Lmx1b*- und *Phox2b*-spezifischen Proben der Pons, einem Derivat des zweiten und dritten Rhombomers von Kontroll (c/e) und *Lbx1*^{-/-} (d/f) Tieren (E18,5). In den *Lbx1*^{-/-} Tieren wird der *Nucl. principalis n. trigemini* fehlerhaft angelegt. Es konnten keine *Lmx1b*⁺ Neurone beobachtet werden (Pfeil d). Allerdings werden ektopischen *Phox2b*⁺ und *Lmx1b*⁺ Nervenzellen lateral des *Nucl. motorius n. trigemini* beobachtet. PrV *Nucl. principalis n. trigemini*, MoV *Nucl. motorius n. trigeminus*, m5 *Radix motoria n. trigeminus*, s5 *Radix sensoria n. trigeminus*