

# 1. Einleitung

## 1.1 Der Homöobox-Transkriptionsfaktor Lbx1

Die Transkriptionsfaktoren der Homöobox-Familie steuern unterschiedliche Prozesse in der Embryogenese, wie z.B. Musterbildung, Segment- oder Zellidentität und Proliferation. Viele der klassischen Homöobox-Gene sind in Gruppen, sogenannten Clustern, organisiert. Die Position der Gene innerhalb eines solchen Clusters reflektiert ihre räumliche und zeitliche Aktivierung entlang der anterior-posterioren Körperachse und legt funktionelle Hierarchien fest. Homöobox-Gene sind im Tierreich weit verbreitet und ihre Organisation in Clustern sowie ihre Expression evolutiv konserviert (Übersicht in McGinnis und Krumlauf, 1992). Darüber hinaus existieren Homöobox-Gene, die außerhalb dieser Cluster verstreut im Genom lokalisiert sind.

Die benachbarten Homöobox-Gene *ladybird early* und *ladybird late* gehören zum zweitgrößten Cluster in *Drosophila* (Jagla *et al.*, 1994). Die Sequenz beider Gene ist zu 91% innerhalb der Homöobox identisch. Die *ladybird*-Homöobox weicht allerdings stark von der anderer Mitglieder der Homöobox-Genfamilie ab. Zusätzlich besitzen alle Mitglieder des *ladybird*-Clusters am Aminoterminal eine Domäne mit hoher Homologie zu den Transkriptionsrepressoren der *engrailed1*-Familie (Smith und Jaynes, 1996). Dieses spezifische Merkmal deutet darauf hin, daß auch die Mitglieder des *ladybird*-Clusters ihre Zielgene negativ regulieren. In *Drosophila* sind die *ladybird*-Gene an der Entwicklung der Epidermis beteiligt (Jagla *et al.*, 1997a) und kontrollieren Zellschicksale in Herz- und Muskelzellen (Jagla *et al.*, 1997b; Jagla *et al.*, 1998).

Aufgrund ihrer charakteristischen Homöobox-Sequenz wurden zwei *ladybird*-homologe Gene *Lbx1* und *Lbx2* in der Maus isoliert (Jagla *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu *Drosophila* liegen bei der Maus diese Gene weit voneinander entfernt auf verschiedenen Chromosomen und zeigen völlig unterschiedliche Expressionsmuster. *Lbx1* wird in der Myogenese ausschließlich in migrierenden hypaxialen Muskelvorläuferzellen exprimiert (Jagla *et al.*, 1995). Zusätzlich erfolgt die *Lbx1*-Expression im Rückenmark. Im Gegensatz dazu wird *Lbx2* im Vorderhirn und im Urogenitalsystem exprimiert (Chen *et al.*, 1999).

*Lbx1*-homologe Gene wurden auch im Huhn und im Zebrafisch (*Danio rerio*) identifiziert (Dietrich *et al.*, 1998; Neyt *et al.*, 2000). Die konservierten Expressionsmuster in Fisch, Huhn und Maus deuteten darauf hin, daß *Lbx1* eine wichtige Rolle in der Embryogenese spielen könnte (Jagla *et al.*, 1995; Dietrich *et al.*, 1998; Neyt *et al.*, 2000). Im Rahmen dieser Dissertation wurde daher die Funktion von *Lbx1* durch Geninaktivierung („knockout“) in der Maus untersucht. Dabei konnte die Bedeutung dieses Transkriptionsfaktors für die Myogenese und die Musterbildung im Rückenmark in der Embryonalentwicklung aufgeklärt werden. Im folgenden werden die beiden Entwicklungsprozesse eingeführt, bei denen *Lbx1* eine Rolle spielt.

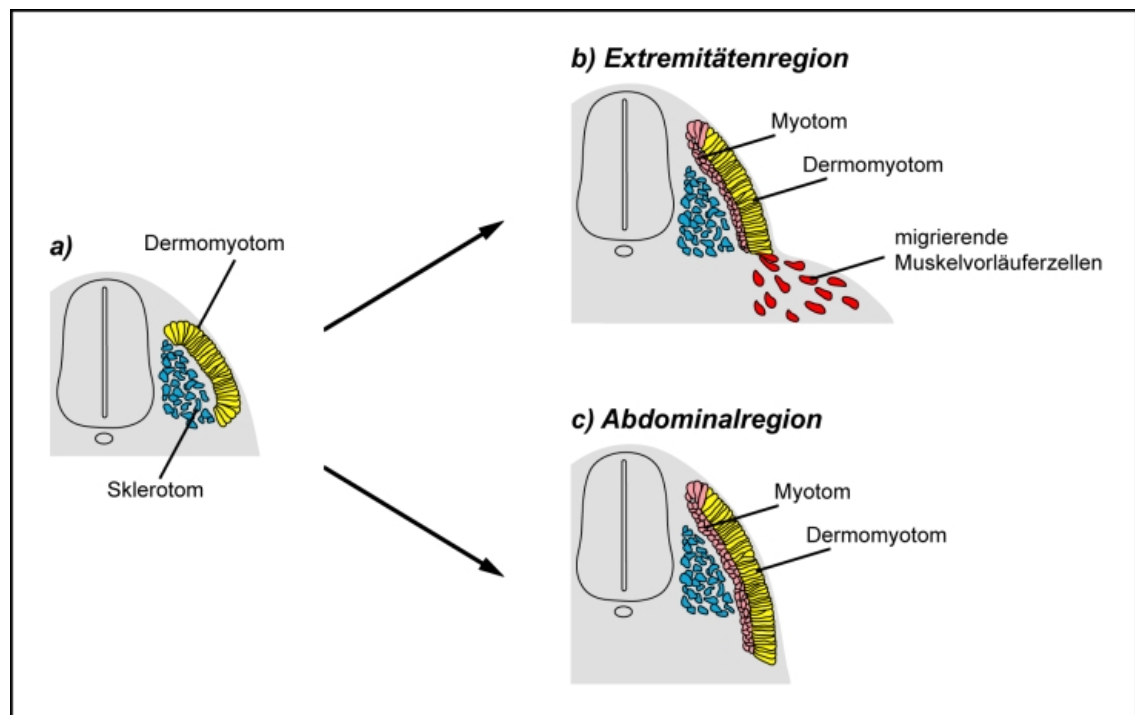
## 1.2 Die Entwicklung der Skelettmuskulatur bei Wirbeltieren

Während der Gastrulation wird bei Wirbeltieren das paraxiale Mesoderm in Form von Streifen auf beiden Seiten des Neuralrohrs gebildet. Daraus entstehen kugelförmige, segmentartig angeordnete, epitheliale Zellstrukturen, die Somiten. Die Somiten differenzieren dorsal zum Dermomyotom, das seine epitheliale Struktur beibehält und ventral in das mesenchymale Sklerotom (Abb.1.1). Aus dem Sklerotom gehen später Knorpel und Knochen des axialen Skeletts hervor. Das Dermomyotom bildet dagegen die Dermis und sämtliche Skelettmuskulatur des Körpers sowie einige Kopfmuskeln (Christ und Ordahl, 1995).

Im weiteren Verlauf der Somiten-Reifung elongiert das Dermomyotom und faltet sich an beiden Enden ein. Vom dorso-medialen Anteil (benachbart zum Neuralrohr) ausgehend, verlassen Muskelvorläuferzellen den epithelialen Zellverband und differenzieren zum epaxialen Myotom (Abb.1.1, siehe auch Kaehn *et al.*, 1988; Denetclaw *et al.*, 1997). Aus dem Myotom entsteht später die Muskulatur des Rückens. Im Gegensatz dazu bildet das ventro-laterale Dermomyotom (angrenzend an das Seitenplattenmesoderm) die hypaxiale Skelettmuskulatur (Ordahl und Le Douarin, 1992).

Die hypaxiale Skelettmuskulatur geht aus zwei verschiedenen Zellpopulationen hervor, einer migrierenden und einer nicht-migrierenden Zellpopulation, die auf verschiedenen axialen Positionen entstehen. Die nicht-migrierenden Zellen verbleiben im Dermomyotom, welches weiter elongiert (Abb.1.1). Sie werden im Abdominalbereich

beobachtet, wo sie zum hypaxialen Myotom differenzieren (Christ *et al.*, 1983; Denetclaw *et al.*, 1997). Aus diesem hypaxialen Myotom entstehen die Intercostal- und die ventrale Rumpfmuskulatur.



**Abb.1.1: Schematische Darstellung der Entwicklung von Muskelvorläuferzellen.**

a) Differenzierung des Somiten in Dermomyotom (gelb) und Sklerotom (blau). Die weitere Entwicklung des Dermomyotoms ist für die Extremitäten- b) und Abdominalregion c) gezeigt. Zellen der epaxialen Dermomyotom-Kante delaminieren und bilden das Myotom (rosa). b) In der Extremitätenregion delaminieren migrierende hypaxiale Muskelvorläuferzellen (rot) vom ventro-lateralen Dermomyotom und wandern in die Extremitätenknospe ein. c) In der Abdominalregion vereinigen sich epaxiales und hypaxiales Myotom.

Die migrierenden Muskelvorläuferzellen lösen sich von der ventro-lateralen Dermomyotom-Kante ab (Abb.1.1). Ihre Bildung erfolgt ausschließlich vom ventro-lateralen Dermomyotom der occipitalen und cervikalen Somiten und von den Somiten, die an die vordere und hintere Extremitätenanlage angrenzen. Diese Zellen wandern über weite Distanzen im Organismus, ehe sie ihre Zielorte erreichen, wo sie zu Muskulatur differenzieren. Migrierende Vorläuferzellen bilden die Extremitätenmuskeln und die mit ihnen assoziierte Muskulatur der Schulter, einen Teil der Zungenmuskeln sowie die Zwerchfellmuskulatur bei Säugetieren (Nishi, 1967; Grim, 1970; Christ *et al.*, 1977; Jacob *et al.*, 1978 und 1979).

Die Entwicklung migrierender Muskelvorläuferzellen ist ein junger Mechanismus in der Evolution und konnte erstmals bei der Ausbildung der Flossenmuskulatur im Zebrafisch

(*Danio rerio*), einem Knochenfisch (*Teleost*), nachgewiesen werden (Neyt *et al.*, 2000). Der evolutiv ältere Mechanismus ist dagegen bei Knorpelfischen (*Chondrichthyes*), wie z.B. dem Katzenhai (*Scyliorhinus canicula*), vorhanden. Hier erfolgt die Bildung der Flossenmuskeln durch ventro-laterale Elongation des Myotoms (Neyt *et al.*, 2000; zur Übersicht siehe Galis, 2001).

### **1.3 Die genetische Kontrolle der Entwicklung migrierender hypaxialer Muskelvorläuferzellen**

Die Entwicklung der hypaxialen Muskulatur aus den migrierenden Muskelvorläuferzellen hängt von mehreren Schritten ab: Erstens, von der Bildung und Spezifizierung der Vorläuferzellpopulation im Dermomyotom. Zweitens, von der Delamination und Wanderung dieser Zellen zu ihren Zielorten. Drittens, von der Proliferation und viertens, von der Differenzierung zu Muskulatur am Zielort. Diese Prozesse werden von externen Signalen der umgebenden Gewebe und von verschiedenen Faktoren innerhalb der Vorläuferzellen gesteuert.

#### **1.3.1 Pax3 und die Bildung der hypaxialen Muskelvorläuferzellpopulation**

*Pax3* codiert für einen Transkriptionsfaktor der *Pax*-Genfamilie, deren Mitglieder Homologien zum *Drosophila*-Gen *paired* zeigen und durch eine Paired- und eine Homöobox gekennzeichnet sind (Goulding *et al.*, 1991). *Pax3* ist anfänglich im gesamten paraxialen Mesoderm und in den epithelialen Somiten exprimiert. Im Verlauf der Somitogenese beschränkt sich die Expression dann auf das Dermomyotom-Kompartiment und wird schließlich in der ventro-lateralen Dermomyotom-Kante verstärkt. *Pax3* wird auf allen axialen Niveaus exprimiert und damit in migrierenden und nicht-migrierenden hypaxialen Muskelvorläuferzellen (Bober *et al.*, 1994; Goulding *et al.*, 1994; Williams und Ordahl, 1994). Migrierende Zellen exprimieren *Pax3* auch während des Wanderungsprozesses.

Es existieren mehrere natürlich vorkommende Mutationen im *Pax3*-Gen der Maus, welche die Genfunktion eliminieren. Diese *Pax3*-Allele werden „Spotch“ genannt, weil

die Tiere auf Grund eines Defektes in der Melanozyten-Entwicklung durch einen weißen Bauchfleck charakterisiert sind (Epstein *et al.*, 1991; Franz *et al.*, 1993). Die Analyse der „Spotch“-Embryonen zeigte, daß *Pax3* für die korrekte Bildung und Spezifizierung der hypaxialen Muskelvorläuferzellpopulation im ventro-lateralen Dermomyotom notwendig ist. Diese Population war durch gesteigerte Apoptose in den *Pax3*-Mutanten reduziert. Außerdem fand kein Auswandern von Muskelvorläuferzellen auf Höhe der Gliedmaßenknospen statt, so daß Extremitäten- und Zwerchfellmuskulatur vollständig fehlten (Bober *et al.*, 1994; Goulding *et al.*, 1994; Daston *et al.*, 1996; Tremblay *et al.*, 1998). Zusätzlich war das Dermomyotom im Abdominalbereich und die sich daraus entwickelnde Rumpfmuskulatur beeinträchtigt. *Pax3* ist also für die Entwicklung von migrierenden und nicht-migrierenden hypaxialen Muskelvorläuferzellen essentiell.

### **1.3.2 SF/HGF und c-Met: Kontrolle der Delamination hypaxialer Muskelvorläuferzellen und Bedeutung für die Skelettmuskelentwicklung**

Der Tyrosin-Kinase-Rezeptor *c-Met* und sein Ligand, „Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor“ (SF/HGF), spielen ebenfalls eine wichtige Rolle in der Entwicklung der migrierenden hypaxialen Muskelvorläuferzellen (Park *et al.*, 1986; Stoker *et al.*, 1987; Bottaro *et al.*, 1991; Weidner *et al.*, 1991). In Zellkultur induziert dieses Signalsystem so unterschiedliche biologische Prozesse wie die Dissoziation epithelialer Zellverbände zu Einzelzellen (= „Scattering“, Stoker *et al.*, 1987; Gherardi *et al.*, 1989), das Wachstum von Hepatozyten (Nakamura *et al.*, 1989), wirkt als Morphogen (Montesano *et al.*, 1991; Weidner *et al.*, 1996), inhibiert Tumorwachstum (Shima *et al.*, 1991), stimuliert chemotaktisch Motorneurone (Ebens *et al.*, 1996; Caton *et al.*, 2000) und spielt eine Rolle bei der Infektion von Säugetier-Zellen durch *Lysteria monocytogenes* (Shen *et al.*, 2000).

In der Embryogenese erfolgt die *c-Met*-Expression im dorso-medialen und ventro-lateralen Dermomyotom aller Somiten und unterscheidet daher nicht zwischen der wandernden und nicht-wandernden Muskelvorläuferzellpopulation. *SF/HGF* wird im Gegensatz dazu nur in direkter mesenchymaler Nachbarschaft zu solchen Somiten exprimiert, die migrierende Muskelvorläuferzellen erzeugen (Sonnenberg *et al.*, 1993).

Die bedeutende Rolle, die Rezeptor und Ligand bei der Entwicklung dieser Muskelvorläuferzellen spielen, konnte durch Geninaktivierung in der Maus ermittelt werden. Sowohl in *SF/HGF*-, als auch in *c-Met*-Mutanten wurden die Muskelvorläuferzellen im Dermomyotom gebildet, die Zellen wanderten jedoch nicht aus (Schmidt *et al.*, 1995; Bladt *et al.*, 1995). Als Folge dessen fehlten in *SF/HGF*- und *c-Met*-Mutanten sämtliche Muskeln, die aus der wandernden Zellpopulation hervorgehen, d.h. die Muskulatur der Extremitäten, des Zwerchfells und die intrinsische Zungenmuskulatur. Alle übrigen Muskelgruppen entwickelten sich dagegen normal. Das *SF/HGF/c-Met*-Signalsystem steuert *in vivo* demnach die epithelial/mesenchymale Konversion der Muskelvorläuferzellen, die notwendig ist, um den Zellverband des Dermomyotoms zu verlassen. Die räumliche und zeitliche Kontrolle der Emigration wird dabei offensichtlich durch die lokal begrenzte *SF/HGF*-Expression erreicht.

Untersuchungen im Hühnerembryo bestätigten diese Funktion. Durch Applikation von *SF/HGF* konnte eine ektopische epithelial/mesenchymale Konversion und damit das Auswandern von Muskelvorläuferzellen aus den Abdominalsomiten induziert werden. Von diesen Somiten delaminieren während der normalen Entwicklung keine migrierenden Muskelvorläuferzellen (Brand-Saberi *et al.*, 1996b; Heymann *et al.*, 1996). Die Bedeutung einer streng regulierten *SF/HGF*-Expression für eine geordnete Entwicklung der Skelettmuskulatur konnte besonders eindrucksvoll in transgenen Mäusen demonstriert werden, die *SF/HGF* ektopisch exprimieren (Takayama *et al.*, 1996). Diese Embryonen entwickeln Skelettmuskeln in der *Leptomeninx* (weiche Rückenmark- (*Pia mater*) und Spinnwebenhaut (*Arachnoidea*)) des thorakalen Rückenmarks, wo üblicherweise keine Muskeln existieren. Eine Fehlregulation der Migration von Muskelvorläuferzellen könnte für diesen bemerkenswerten Phänotyp verantwortlich sein.

Die *c-Met*- und *Pax3*-Expression überlappt im ventro-lateralen Dermomyotom, und *c-Met*- und *Pax3*-mutante Tiere bildeten keine Extremitäten- und Zwerchfellmuskeln. In *Pax3*-Mutanten wurde *c-Met* lediglich schwach im Dermomyotom exprimiert (Daston *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996). Außerdem weist der *c-Met*-Promotor *Pax3*-Bindungsstellen auf, und *Pax3* aktiviert den *c-Met*-Promotor *in vitro* (Epstein *et al.*, 1996). Somit ist *Pax3* oberhalb von *c-Met* in der genetischen Hierarchie einzuordnen, welche die Bildung der migrierenden hypaxialen Muskelvorläuferzellen kontrolliert. Allerdings muß

eingeräumt werden, daß in „Splotch“-Mäusen das Dermomyotom strukturell stark verändert war. Pax3 reguliert deshalb zusätzlich weitere Faktoren, die für eine normale Dermomyotom-Entwicklung essentiell sind (Daston *et al.*, 1996).

Die c-Met-Signale werden durch Adaptermoleküle innerhalb der Zelle weitergeleitet. Diese Adaptermoleküle binden mittels ihrer Src-homologe Domäne 2 (SH2-Domäne) an zwei phosphorylierte Tyrosine, die im cytoplasmatischen Anteil des aktivierten c-Met-Rezeptors lokalisiert sind. Zu diesen Adapterproteinen zählen Gab1, Grb2, Src, Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-Kinase), Shp2, Shc, c-Cbl, Phospholipase C- $\gamma$  und CRKL (Ponzetto *et al.*, 1994; Pelicci *et al.*, 1995; Weidner *et al.*, 1996; Bardelli *et al.*, 1997; Fixman *et al.*, 1997; Nguyen *et al.*, 1997; Sakkab *et al.*, 2000; Schaeper *et al.*, 2000). Durch Mutation der multifunktionalen Bindungsstelle von c-Met in ein selektives Src- bzw. Grb2-Bindungsmotiv konnte die Funktion von *c-Met* bei der Proliferation primärer Myoblasten aufgeklärt werden (Maina *et al.*, 2001). Dadurch wurde offensichtlich, daß für die Weiterleitung des c-Met-Signals in Muskelzellen Src- und Grb2 notwendig sind. Allerdings reichen weder ein selektives Src-, noch ein PI-3-Kinase-Bindungsmotiv für die normale Migration hypaxialer Muskelvorläuferzellen aus (Maina *et al.*, 2001).

In die vorliegende Arbeit flossen auch Untersuchungen zur Funktionsbestimmung von *c-Met* und der Interaktion von c-Met mit Gab1 während des Wanderungsprozesses der Muskelvorläuferzellen ein (siehe auch Dietrich *et al.*, 1999; Sachs, Brohmann *et al.*, 2000).

### **1.3.3 Kontrolle von Determination und Differenzierung migrierender**

#### **Muskelvorläuferzellen durch myogene Regulationsfaktoren (MRFs)**

Nach Erreichen ihrer Zielorte beginnen die migrierenden hypaxialen Muskelvorläuferzellen myogene Regulationsfaktoren (= „Myogenic Regulatory Factors“, MRFs) zu aktivieren, die ihre Differenzierung zu Skelettmuskulatur steuern. Zu diesen Faktoren der Familie der „basischen Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren“ (bHLH) zählen Myf5, MyoD, Myogenin und MRF4 (Davis *et al.*, 1987; Tapscott *et al.*, 1988; Braun *et al.*, 1989a und 1989b; Edmondson und Olson, 1989; Rhodes und Konieczny, 1989;

Wright *et al.*, 1989; Miner und Wold, 1990). Das enorme Potential dieser myogenen Regulationsfaktoren wird durch ihre Fähigkeit verdeutlicht, *in vitro* die Differenzierung verschiedenster Zelltypen zu Muskelzellen zu induzieren (Weintraub *et al.*, 1989; Choi *et al.*, 1990).

In der Myogenese zeigen die MRFs überlappende, aber zeitlich streng regulierte Expressionsmuster. Innerhalb der Somiten werden *Myf5* und *Myogenin* nacheinander im Myotom induziert. Demgegenüber ist *MyoD* auf das Dermomyotom beschränkt (Sassoon *et al.*, 1989; Ott *et al.*, 1991; Cheng *et al.*, 1993; Yee und Rigby, 1993; Smith *et al.*, 1994). Die migrierenden Muskelvorläuferzellen exprimieren bei Erreichen ihrer Zielorte nur *Myf5*, *MyoD* und *Myogenin*, jedoch nicht *MRF4* (Bober *et al.*, 1991). Nach transients Expression im Myotom dominiert *MRF4* dagegen postnatal im adulten Skelettmuskel (Miner und Wold, 1990; Hinterberger *et al.*, 1991).

Geninaktivierungen in der Maus zeigten, daß die verschiedenen myogenen Regulationsfaktoren auch *in vivo* die Muskeldifferenzierung kontrollieren. *Myf5* und *MyoD* determinieren die anfänglich multipotenten Vorläuferzellen zu Myoblasten (Braun *et al.*, 1992; Rudnicki *et al.*, 1992 und 1993; Tajbakhsh und Buckingham, 1994). *Myogenin* steuert demgegenüber die terminale Differenzierung, d.h. die Bildung von Muskelfasern aus Myoblasten (Hasty *et al.*, 1993; Nabeshima *et al.*, 1993; Venuti *et al.*, 1995). Die Rolle von *MRF4* in der Myogenese ist noch unklar, weil in allen bisher hergestellten *MRF4*-mutanten Allelen auch die Expression des benachbarten *Myf5*-Gens unterschiedlich stark beeinträchtigt ist (Braun und Arnold, 1995; Patapoutian *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1995; Olson *et al.*, 1996; Yoon *et al.*, 1997).

#### **1.4 Neuronale Organisation und Etablierung dorso-ventraler Polarität im embryonalen Rückenmark**

Das dorsale Horn des Rückenmarks dient als erste Station des zentralen Nervensystems zur Verarbeitung externer sensorischer Information. Solche Reize werden zum einen von exterozeptiven Rezeptoren auf der Haut vermittelt, darunter Schmerzrezeptoren für thermische oder chemische Reize und Mechanorezeptoren für Druckempfindung (zur Übersicht siehe Gillespie und Walker, 2001; Julius und Basbaum, 2001). Zum anderen



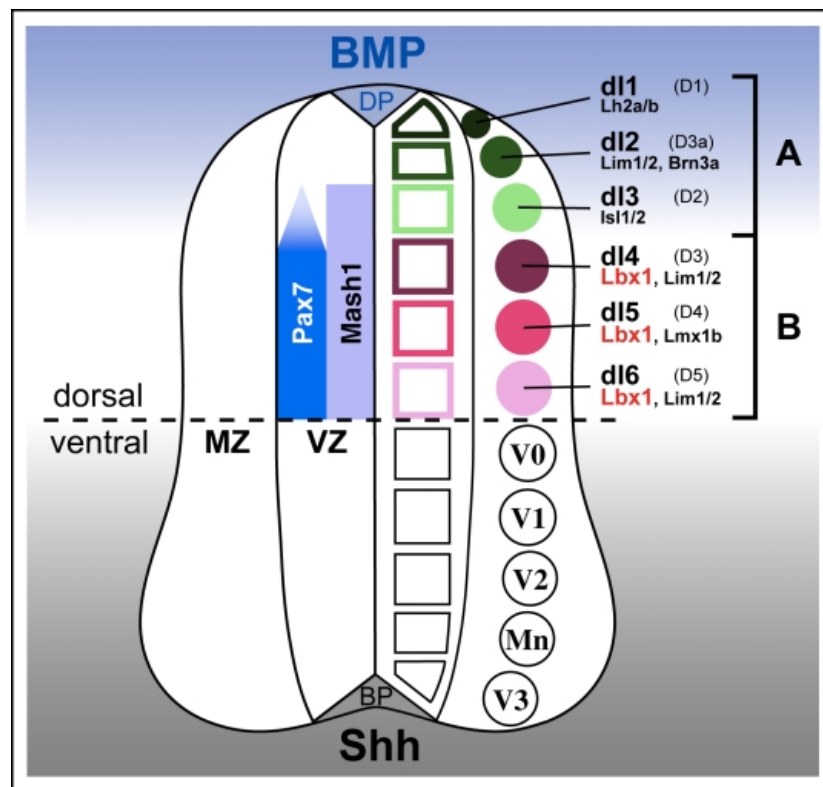
informieren propriozeptive Afferenzen der Haut, der Muskeln, Sehnen und Gelenke über die räumliche Position des Rumpfes und der Extremitäten. Sensorische Nervenzellen leiten die Sinneswahrnehmungen ins dorsale Horn weiter, wo sie einerseits auf Interneurone verschaltet werden, die dann die Information ins Gehirn, an andere Interneurone oder an Motorneurone übermitteln. Andererseits können die sensorischen Nervenzellen aber auch direkt entlang der Hinterstrangbahnen ins Gehirn projizieren oder über Motorneurone einen Reflexbogen ausbilden.

In der Rückenmarksentwicklung werden viele verschiedene neuronale Zelltypen aus multipotenten Vorläuferzellen gebildet. Diese Zellen wandern aus der Ventrikularzone des Neuralrohrs in die Mantelzone und differenzieren dort zu postmitotischen Neuronen. Dabei bestimmt die Position einer Vorläuferzelle entlang der dorso-ventralen Achse bereits ihr zukünftiges neuronales Zellschicksal (Briscoe *et al.*, 2000). Auf diese Weise entstehen im dorsalen Teil des Neuralrohrs Nervenzellen, die sensorische Information verarbeiten und weiterleiten, während in der ventralen Hälfte Motorneurone und Interneurone differenzieren, die für motorische Reaktionen des Körpers erforderlich sind (zur Übersicht siehe Lee und Jessell, 1999; Briscoe und Ericson, 2001).

Im ventralen Neuralrohr wird die Spezifizierung der neuronalen Zelltypen durch „Sonic hedgehog“ (Shh) dirigiert (Ericson *et al.*, 1995; siehe Abb.1.2). Shh wird vom Notochord und der Bodenplatte des Neuralrohrs synthetisiert und bildet einen Konzentrationsgradienten aus (Roelink *et al.*, 1995; Ericson *et al.*, 1996). Dieses Shh-Signal induziert die Expression von Transkriptionsfaktoren, die in charakteristischen Streifen in der Ventrikularzone exprimiert werden und die neuronalen Zellschicksale determinieren (Briscoe *et al.*, 1999 und 2000; Sander *et al.*, 2000; Mizuguchi *et al.*, 2001; Novitsch *et al.*, 2001; Pierani *et al.*, 2001; Vallstedt *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001). Die unterschiedlichen Shh-Konzentrationen definieren fünf ventrale Vorläuferdomänen, aus denen wiederum fünf verschiedene postmitotische Neuronentypen (Motorneurone und V0-V3 Interneurone) hervorgehen.

Die in den Vorläuferzellen aktiven Transkriptionsfaktoren werden in postmitotischen Neuronen abgeschaltet. Sie induzieren jedoch die Expression anderer, spezifischer Faktoren in diesen Neuronen. Zum Beispiel determiniert der Transkriptionsfaktor *Dbx1* neuronale Vorläuferzellen, die als postmitotische V0 Neurone *Evx1* exprimieren (Pierani

*et al.*, 1999). Die sequentielle Aktivität beider Homöobox-Faktoren ist für die nachfolgende Spezifizierung der Zellen zu V0 Interneuronen notwendig, und in Abwesenheit von *Dbx1* oder *Evx1* änderten V0 Neurone ihr Zellschicksal, d.h. sie entwickelten sich fälschlicherweise zu V1 Interneuronen (Moran-Rivard *et al.*, 2001; Pierani *et al.*, 2001).



**Abb.1.2: Schematische Darstellung der Entwicklung neuronaler Vorläuferzellen und post-mitotischer Neurone im Rückenmark des Stadiums E10,5 der Embryogenese.**

Die neuronalen Vorläuferzellen (dorsal farbig bzw. ventral schwarz umrahmte Kästchen) werden in der Ventrikularzone (VZ) gebildet und wandern im Verlauf der Neurogenese lateral in die Mantelzone (MZ), wo sie sich zu postmitotischen Neuronen (dorsal farbige bzw. ventral schwarz umrandete Kreise) entwickeln. Graduelle BMP- (blau) und Shh-Signale (grau) induzieren die Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren (gezeigt sind dorsal Pax7 und Mash1) in den Vorläuferdomänen entlang der dorso-ventralen Achse, aus denen postmitotische Neuronentypen hervorgehen (dorsal dI1-dI6; ventral V0-V3 und Mn; alte Nomenklatur D1-D5 in Klammern). Die dorsalen Neurone der Klassen A und B exprimieren jeweils charakteristische Kombinationen von Transkriptionsfaktoren. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die dorso-ventrale Grenze. A = Klasse A, B = Klasse B, BMP = „Bone Morphogenetic Proteins“, DP = Deckplatte, BP = Bodenplatte, Mn = Motorneurone, Shh = „Sonic hedgehog“.

Im dorsalen Neuralrohr existiert eine vergleichbare induktive Kaskade, welche die Nervenzellen der Klasse A spezifiziert. Mitglieder der „Bone Morphogenetic Protein“-Familie (BMPs) werden in der Deckplatte des Neuralrohrs und dem Oberflächenektoderm produziert und induzieren die Bildung der dorsalen neuronalen Zelltypen (Liem *et al.*, 1995 und 1997; Lee *et al.*, 1998; siehe Abb.1.2). Möglicherweise wird die

Aktivität der BMPs durch verschiedene Wnt-Moleküle vermittelt, darunter Wnt1 und Wnt3a, welche die Proliferation der dorsalen neuronalen Vorläuferzellen regulieren (Dickinson *et al.*, 1995; Ikeya *et al.*, 1997; Muroyama *et al.*, 2002). Wurde die Deckplatte experimentell eliminiert, wie z.B. in *Lmx1a*-Mutanten oder in Tieren, die Diphtheria-Toxin unter der Kontrolle des BMP-verwandten *GDF7* exprimierten, wurde die Bildung der Klasse A Neurone reduziert oder verhindert (Lee *et al.*, 2000; Millonig *et al.*, 2000).

Die dorsalen BMP-Signale spezifizieren drei Vorläuferdomänen, die Transkriptionsfaktoren der "basischen Helix-Loop-Helix-Familie", *Math1*, *Neurogenin1*, *Neurogenin2* und *Mash1* exprimieren (Johnson *et al.*, 1990; Lo *et al.*, 1991; Ma *et al.*, 1996 und 1997; Helms und Johnson, 1998). Ähnlich wie im ventralen Neuralrohr differenzieren diese Vorläuferzellen gemäß ihrer dorso-ventralen Lokalisation zu postmitotischen Neuronen, dI1, dI2 und dI3, die jeweils durch die Expression von *Lh2a/b*, *Lim1/2-Brn3a* oder *Isl1/2* gekennzeichnet sind (ehemals D1, D3a bzw. D2; Lee und Jessell, 1999; Gowan *et al.*, 2001; siehe Abb.1.2). Diese drei Typen von Neuronen bilden die Klasse A, und wandern in tiefe Schichten des dorsalen Horns.

Die Neurone der oberen Schichten des dorsalen Horns werden dagegen im ventralen Anteil des dorsalen Rückenmarks gebildet (Nornes und Carry, 1978). Die Vorläuferzellen dieser Regionen exprimieren *Pax7* und *Mash1* (Ma *et al.*, 1997; Mansouri und Gruss, 1998). Aus diesen Vorläuferdomänen gehen die postmitotischen dI4-dI6 Neurone der Klasse B hervor, die sich unabhängig von BMP-Signalen entwickeln und jeweils *Lim1/2*- oder *Lmx1b*-positiv sind (ehemals D3-D5; Abb.1.2).

Der Homöobox-Transkriptionsfaktor *Lbx1* markiert postmitotische Nervenzellen der Klasse B (Schubert *et al.*, 2001; Müller, Brohmann *et al.*, 2002). Ebenso wird der Paired-box-Transkriptionsfaktor *DRG11* im dorsalen, jedoch nicht im ventralen Neuralrohr exprimiert und ist für die Ausbildung korrekter Projektionen der sensorischen Neurone im dorsalen Horn des Rückenmarks verantwortlich (Saito *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2001). Verglichen mit den neuronalen Zelltypen im ventralen Neuralrohr ist wenig über die Spezifizierung in der dorsalen Hälfte bekannt. Insbesondere sind bislang kaum Faktoren funktionell charakterisiert worden, welche die Entwicklung dorsaler postmitotischer Nervenzellen steuern.

### **1.5 Ziele der vorliegenden Arbeit**

Der Homöobox-Transkriptionsfaktor *Lbx1* wird in der Embryogenese ausschließlich in migrierenden hypaxialen Muskelvorläuferzellen und im Rückenmark exprimiert (Jagla *et al.*, 1995). Dieses spezifische Expressionsmuster ließ eine bedeutende Funktion des Faktors in diesen Geweben erwarten. Um die Rolle von *Lbx1 in vivo* analysieren zu können, wurde das *Lbx1*-Gen in der Maus gezielt inaktiviert. Zunächst wurden die *Lbx1*-Mutanten auf mögliche Entwicklungsdefekte in der Skelettmuskulatur hin untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die wandernden Muskelvorläuferzellen in *Lbx1*<sup>-/-</sup> Tieren einige Zielorte nicht erreichten, so daß den Mutanten bestimmte Muskelgruppen fehlten. Des weiteren ergab die detaillierte Phänotyp-Analyse, daß *Lbx1* zusätzlich bei der Differenzierung von Nervenzellen im embryonalen Rückenmark eine entscheidende Funktion ausübt.