

...und wenn sie nicht gestorben wären,
verträgen sie sich heute.

Über die heterogene Herkunft des Lymphgefäßsystems

K. Mattonet, M. Jeltsch

Wihuri Research Institute und Translational Cancer Biology Program,
Biomedicum Helsinki, Universität Helsinki, Finnland

Zusammenfassung

Die Beantwortung der Frage nach dem embryonalen Ursprung des Lymphgefäßsystems ist fundamental für unser Verständnis von Fehlentwicklungen des Systems bei Kindern und seiner Regeneration bei Erwachsenen. Doch neu ist die Frage keineswegs und sorgte bereits im frühen 20. Jahrhundert für vehemente Diskussionen. Bis heute ist diese Debatte nicht beigelegt, doch das Interesse am Lymphgefäßsystem hat aufgrund seiner Bedeutung für eine große Zahl verschiedenster Erkrankungen in den letzten Jahren stark zugenommen. Mehrere diesjährige Publikationen zur Heterogenität der Entwicklung von Lymphendothelzellen scheinen nun die Vielzahl bislang kontrovers diskutierter Studien zusammenzuführen und zu einem schlüssigen Modell zu vereinen. Diese bemerkenswerten Ergebnisse, wie auch die Studien, die ihnen den Weg bereitet haben, werden in dieser Übersichtsarbeit dargestellt.

Schlüsselwörter: Embryonalentwicklung, Lymphgefäßsystem, Lymphendothelzelle, Lymphvaskulogenese, Lymphangiogenese, zentrifugal, zentripetal

Heterogeneity of the origin of the lymphatic system

Summary

The question "How does the lymphatic system develop?" may be a simple one, but it is fundamental to our understanding of lymphatic malformations in children and the regeneration of lymphatics in adults. The question is by no means new and was already explored in the early 20th century. This resulted in a long-lasting controversy, which until recently had been far from being settled. The interest in the lymphatic system has greatly increased in recent years due to its implications in a variety of diseases. Several studies published this year address the heterogeneity of lymphatic endothelial cell development and unite previous controversially discussed data in a coherent model. These remarkable results, as well as the studies that paved their way, are discussed in this review.

Keywords: embryonic development, lymphatic system, lymphatic endothelial cells, lymphvasculogenesis, lymphangiogenesis, centrifugal, centripetal

Wie entwickelt sich das Lymphgefäßsystem? Diese Frage ist ebenso einfach wie fundamental für das Verständnis des Lymphgefäßsystems (LS) unter physiologischen und pathologischen Bedingungen sowie auch der Schlüssel zu einer therapeutischen Intervention.

Im Jahr 1902 veröffentlichte die Anatomin *Florence Sabin* ihre Studien über die Entwicklung der ersten Lymphgefäße bei Schweinen [1] und legte dadurch die

Grundlage für eine mehr als ein Jahrhundert andauernde Kontroverse. Ihre durch Farbstoffinjektionen in lebende Embryonen gewonnenen Erkenntnisse implizierten, dass bereits die frühesten Lymphgefäße mit dem venösen System verbunden sind, von vier Zentren des bestehenden Venensystems radiär aussprossen und im Verlauf der Entwicklung ein zusammenhängendes System bilden. Sie lieferte damit experimentelle Belege für die von

Ranvier [2] stammende Theorie der zentrifugalen Entwicklung des LS, die dieser jedoch selbst nie belegen konnte.

Lewis, der mit den Hauptargumenten dieser Theorie übereinstimmte, ergänzte 1905 durch seine Experimente mit seriellen Schnitten von Hasenembryonen, dass die Lymphgefäße zwar venösen Ursprungs seien, sich jedoch im Verlaufe der Entwicklung von den Venen lösen, geschlossene Lymphsäcke im Mesenchym bilden und erst später permanente Öffnungen in das Blutgefäßsystem ausbilden [3]. Zudem beschrieb er die Existenz von nicht vier, sondern weit mehr venösen Auswüchsen, von denen aus das LS zentrifugal wächst. Etwa 70 Jahre später wurde diese Sicht der Entwicklung der Lymphgefäße von *van der Putte* in Embryonen der Maus [4] und des Menschen [5] durch detaillierte Histologie weitgehend bestätigt. Dennoch wurden fast zeitgleich zu den Studien von *Sabin* und *Lewis* verschiedene Alternativtheorien aufgestellt, von denen die heute bekannteste von *Huntington* und *McClure* im Jahr 1908 veröffentlicht wurde [6]. Sie vertraten die sogenannte zentripetale Theorie, die davon ausgeht, dass Lymphendothelzellen direkt dem Mesenchym entstammen, indem sich freie Räume bilden, mit Lymphflüssigkeit füllen und im Verlauf der Entwicklung miteinander fusionieren, um letztendlich ein kontinuierliches Gefäßsystem zu bilden. Ihre Ergebnisse stützten sich auf serielle Parafinschnitte früher Katzenembryonen, in denen sie beispielsweise nachweisen konnten, dass Teile des Ductus thoracicus in der frühen Entwicklung des Lymphgefäßsystems nicht mit venösen Gefäßen verbunden sind.

Zwei verschiedene Anlagen

Eine Theorie, die bis zu einem gewissen Punkt eine Synthese zwischen diesen beiden sehr gegensätzlichen Denkweisen bot, wurde von *van der Jagt* im Jahre 1932 vorgeschlagen [7]. Er schlussfolgerte aus seinen Arbeiten an Schildkrötenembryonen, dass die vorderen Lymphsäcke dieser Tiere sich aus zwei ganz verschiedenen Anlagen entwickeln, einer mesenchymalen und einer venösen Ursprungs, die miteinander fusionieren und beide zur Aus-



Abb. 1
Mit Beginn der molekularbiologischen Ära wurde die seit über 100 Jahren andauernde Kontroverse zwischen zentrifugaler und zentripetaler Theorie der Entwicklung des Lymphgefäßsystems wiederbelebt. Nach anfänglicher Überinterpretation von experimentellen Daten zugunsten der zentrifugalen Theorie scheint eine Synthese beider Theorien greifbar nah. Hier ein Vergleich der Visualisierung der Lymphgefäße nach Florence Sabin (Farbstoffinjektion bei Schweineembryonen, links) mit der XGal-Färbung von heterozygoten VEGFR-3+/LacZ-Mausembryonen (rechts). Wir danken Lotta Jussila für die Bereitstellung der Fotografie der XGal-Färbung.

bildung des LS beitragen. Dass eine solche heterogene Entwicklung des LS der Realität tatsächlich am nächsten kommt, sollte sich allerdings erst mehr als acht Jahrzehnte später bestätigen. Denn trotz der bis heute beeindruckenden Akkuratess und minutiösen Darstellung ihrer Studien, waren die damaligen Kontrahenten durch die technischen Limitierungen ihrer Zeit in ihren Möglichkeiten begrenzt. Während beispielsweise Sabin nur funktionelle Lymphgefäße beobachten konnte, die sie dafür aber sehr spezifisch injizieren konnte (Abb. 1), waren Huntington und McClure mangels einer verfügbaren lymphendothelspezifischen Färbemethode auf die Untersuchung der Entwicklung von Gefäßen mit bekannter Lokalisation beschränkt [6]. Sie argumentierten jedoch, dass die Befürworter der zentrifugalen Entwicklung des LS lediglich Derivate bereits existierender lymphatischer Strukturen in ihre Studien einbezogen [8]. Die Gegenseite konterte wiederum, dass es sich bei den beobachteten Hohlräumen im Mesoderm höchstwahrscheinlich um Artefakte handele [4]. Eine Gemeinsamkeit aller hier vorgestellten historischen

Studien ist jedoch, dass sie nur die Entwicklung lumensierter Strukturen beurteilen konnten, nicht aber deren Vorläufer.

Erst um die Jahrtausendwende standen die Techniken und spezifischen Marker zur Verfügung, um dieses Problem anzugehen (Abb. 2) und belebten die Debatte mit neuen Erkenntnissen. Durch Transplantationsexperimente in Hühnerembryonen konnte nachgewiesen werden, dass in Vögeln zumindest einige Lymphgefäße Endothelzellen beinhalten, die nicht venösen Ursprunges sind [9]. Dies sprach für eine wie von van der Jagt vorgeschlagene, heterogene Entwicklung des LS. In Folgestudien zeigte sich zudem, dass Lymphangioblasten zur Bildung des lymphatischen Systems der Vögel beitragen [10]. Diese

und ähnliche Beobachtungen in Krallenfroschkaulquappen [11] und Mäusen [12] legten nahe, dass mehrere komplexe Mechanismen bei der Entwicklung des LS eine Rolle spielen.

Theorie der zentrifugalen Entwicklung

Zur selben Zeit sprachen die Daten anderer Studien jedoch für die weitaus populärere Theorie der zentrifugalen Entwicklung des LS. Wigle und Oliver zeigten 1999, dass der Homeobox-Transkriptionsfaktor Prox1 unabdingbar für die Lymphendothelentwicklung ist [13]. Die Gruppe fand zudem heraus, dass diese Entwicklung in Mäusen am embryonalen Tag E9,5 mit dem Erscheinen von Prox1-positiven Zellen in den jugulären Regionen der vorderen Kardinalvenen beginnt, die von dort in das umliegende Mesenchym sprossen und frühe Lymphgefäße bilden [14]. Diese Migration ist abhängig von verschiedenen Signalmolekülen wie VEGF-C [15], CCBE1 [16] und weiteren molekularen Markern wie beispielsweise Podoplanin

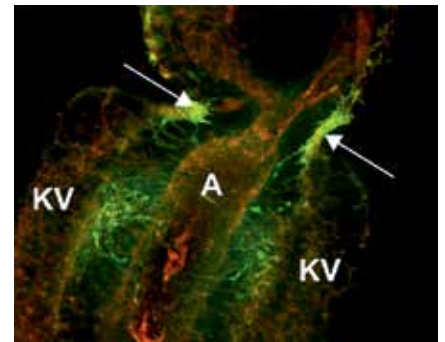


Abb. 2
Zentripetale Entwicklung der Lymphsäcke und der benachbarten lymphatischen Strukturen in der Maus (am Tag E11,5). Die Art und Weise, wie die Emigration der LEZ-Vorläuferzellen aus den primitiven Venen zu erfolgen scheint (als Einzelzellen, als Zellenstrang oder als lumensierte Gefäßsprosse), erscheint heterogen und unter anderem abhängig von Untersuchungsmethode und untersuchter Spezies. In dieser Immunofluoreszenz sind Blutgefäßendothelzellen mit PECAM-1 rot und Lymphendothelzellen und deren Vorläufer mit LYVE-1 grün dargestellt. Die weißen Pfeile weisen auf die sich entwickelnden jugulo-axillären Lymphsäcke hin. A, Aorta; KV, Kardinalvene. Wir danken Marika Kärkkäinen für die Bereitstellung dieser Abbildung.

[17]. Durch die Fluoreszenzmarkierung von Prox1-exprimierenden Zellen im Jahr 2007 wurde im Mausmodell zudem in verschiedenen Entwicklungsstadien minutiös verfolgt, wie bestimmte venöse Endothelzellen beginnen, den Marker Prox1 zu exprimieren und wie diese dann in das umliegende Mesoderm auswandern, um in der Nähe der Vene Lymphgefäße zu bilden [18]. Mit diesen Daten, die durch Experimente in Zebrafischen bestätigt wurden [19], sah man weithin die zentrifugale Theorie von Sabin als erwiesen und die embryonalen Venen als hauptsächlichen und wahrscheinlich einzigen Ursprung der Lymphendothelzellvorläufer an. Dies bestimmte die vorherrschende Lehrmeinung der nächsten Jahre [20]. Die Beteiligung von Lymphangioblasten und anderen Quellen an der Entwicklung des LS wurde allgemein als ein Phänomen angesehen, das bei Vögeln und Fröschen eine Rolle spielt, nicht jedoch bei Säugetieren.

Trotzdem zeigten verschiedene Studien der darauffolgenden Jahre Phänomene, die mit einem ausschließlich venösen Ursprung des Lymphendothels nicht zufriedenstellend erklärt werden konnten.

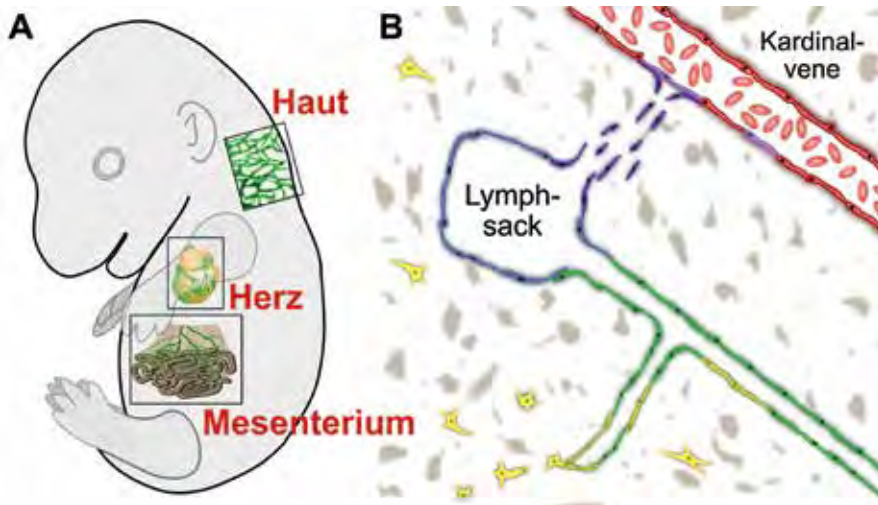


Abb. 3

A) In diesem Jahr veröffentlichte Studien an Mäusen zeigen, dass die Lymphgefäße des Mesenteriums, der Haut und des Herzens nicht nur durch lymphangiogenes, zentrifugales Wachstum aus den embryonalen Lymphsäcken gebildet werden, sondern auch aus Vorläuferzellen, die unter anderem im Mesenchym zu finden sind. B) Die Lymphgefäßsysteme der Haut und des Mesenteriums (grün) entwickeln sich durch Lymphangiogenese aus den embryonalen Lymphsäcken (blau) und aus Vorläuferzellen im Mesenchym (gelb). Die embryonalen Lymphsäcke wiederum bilden sich aus Endothelzellen der großen embryonalen Venen (z.B. der Kardinalvenen, rot), die lymphatischen Charakter annehmen und aus den Venen auswandern (violett). Überdies wird vermutet, dass eine alternative, nicht-venöse Quelle lymphatischer Endothelzellen des Herzens im hämogenen Endothel des Dottersacks zu finden ist.

So wurde beispielsweise von Hägerling *et al.* in Mausembryonen zwischen Tag E10,0 und E10,5 ein massiver Anstieg der Prox1-positiven Lymphendothelzell (LEZ)-Vorläufer außerhalb der Venen beobachtet, obwohl sich die Teilungsraten der Zellpopulation während dieser Zeit nicht nennenswert änderte [21]. Der Ursprung dieser plötzlich auftauchenden Prox1-positiven Zellen konnte nicht endgültig geklärt werden, obwohl mit den Hautvenen erstmalig eine zweite, bis dahin unbekannt venöse Region identifiziert wurde, aus der LEZ-Vorläufer auswandern. Solche Vorläuferzellen wurden in diesem Venenbett jedoch nur in Lymphmutanten gefunden, in denen die Migration von LEZ-Vorläufern aus der Vene gestört ist. Dies impliziert sowohl eine massive, synchrone Auswanderung von LEZ-Vorläufern zwischen Tag E10,0 und E10,5 sowie die Existenz weiterer, den Autoren zufolge wahrscheinlich venöser, Quellen von Vorläuferzellen, die jedoch nicht identifiziert wurden. Teilweise könnte dieser plötzliche Anstieg von Prox1-positiven Zellen vielleicht durch eine Differenzierung von Zellen im Mesenchym erklärt werden.

Heterogene Herkunft

Experimentelle Belege für eben solche eine heterogene Herkunft des lymphatischen Systems wurde in mehreren in diesem Jahr publizierten Studien erbracht. Durch Zelllinienverfolgung zeigten Martinez-Corral *et al.*, dass ein bedeutender Teil der dermalen Lymphgefäße sich nicht aus venösen Endothelzellen entwickelt, sondern aus Zellen des Mesenchyms, die negativ für den Endothelzellmarker Tie2 sind [22]. Diese Zellen bilden Aggregate, die sich durch einen als Lymphvaskulogenese bezeichneten Prozess zu Lymphgefäßen entwickeln. Die so entstandenen, isolierten Gefäßfragmente fusionieren mit den Lymphgefäßen venösen Ursprungs und bilden somit eine funktionelle Einheit. Bemerkenswert ist auch, dass damit zum ersten Mal der direkte Nachweis einer Lymphvaskulogenese gelungen ist – ein Vorgang, der zuvor vergleichbar nur in der kardiovaskulären Entwicklung beobachtet worden war. Parallel dazu wurde eine zweite Publikation von der selben Arbeitsgruppe veröffentlicht. Stanczuk *et al.* zeigten, dass auch die Lymphgefäße des

Mesenteriums dualen Ursprungs sind [23]. Die Studie belegt, dass sich hämogene Vorläuferzellen aus c-Kit-positiven Zelllinien im Mesenterium bündeln, durch Lymphvaskulogenese Gefäße bilden und sich in Lymphgefäße integrieren, die durch Sprossung aus dem venösen System entstanden sind. Ein weiteres Organ, für dessen LEZ-Vorläufer mittlerweile alternative Quellen vermutet werden, ist das Herz [24, 25], in dem bei Vögeln sogar lympho-venöse Anastomosen gefunden wurden [25].

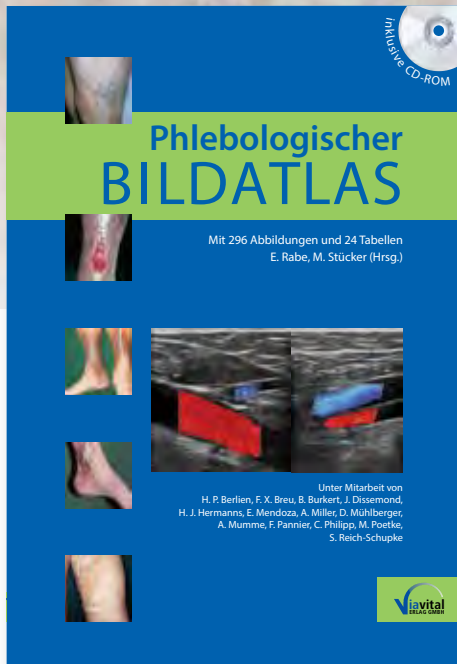
Neues Licht auf die Lymphgefäßentwicklung

Diese experimentellen Befunde werfen ein neues Licht auf die Lymphgefäßentwicklung (Abb. 3). Sie bestätigen den Kerngedanken des Modells von van der Jagt [7], wonach sowohl die zentrifugale Theorie von Sabin als auch die zentripetale Theorie von Huntington und McClure teilweise zutreffen und beide Mechanismen vereint zur Entwicklung des LS beitragen. Gleichzeitig zeigen sie aber auch, dass das LS der verschiedenen Körperregionen und Organe sich unterschiedlich entwickelt. Dies könnte einen Erklärungsansatz dafür bieten, dass primäre Lymphgefäßerkrankungen wie die Milroy-Krankheit oftmals auf bestimmte Körperregionen oder Organe beschränkt sind [26]. Die Entwicklung des LS ist demnach anscheinend deutlich komplexer als bisher angenommen und ähnelt diesbezüglich der des kardiovaskulären Systems.

Unsere Kenntnisse der Entwicklung des LS sind noch immer rudimentär, obwohl es bei vielen wichtigen humanen Erkrankungen eine bedeutende Rolle spielt [27].

Verschiedenste Gruppen und experimentelle Ansätze haben in den letzten 20 Jahren dazu beigetragen, dass wir beginnen, zumindest die grundlegendsten Konzepte der Lymphgefäßentwicklung zu verstehen. Der scheinbare Widerspruch der Ergebnisse vieler Studien zur Entwicklung des LS liegt weitgehend in deren Interpretation, während sich die experimentellen Daten zumeist ergänzen und miteinander vereinbaren lassen. Dies demonstriert eindrucksvoll unsere Abhängigkeit von den

NEU ERSCHEINUNG



Prof. Dr. med. E. Rabe und
Prof. Dr. med. M. Stücker (Hrsg.)

Phlebologischer Bildatlas

mit 294 Abbildungen und 24 Tabellen,
inkl. CD-ROM
191 Seiten, Format: 15,5 x 22,5 cm
ISBN: 978-3-934371-52-1
Best.-Nr. 6830052
Viavital Verlag GmbH, Köln 2015
Preis: 44,50 Euro



Bestellungen über



Tel. 0221/988301-00

Fax 0221/988301-05

E-Mail: info@wpv.de

www.der-niedergelassene-arzt.de

(Bei Bestellungen berechnen wir die Versandkosten.)

ÜBERSICHTSARBEITEN

verschiedenen Modellsystemen und deren Grenzen, die die unerwartete Komplexität der Entwicklung des LS jeweils nur teilweise erfassen können. Die rapide technische Entwicklung und die neuen Denkanstöße zur heterogenen Entwicklung des LS werden jedoch sicher zu einer raschen Erweiterung unserer Kenntnisse der beteiligten Vorgänge und letztendlich auch zu einer besseren Behandelbarkeit von Erkrankungen des LS führen.

Literatur

1. Sabin FR: On the origin of the lymphatic system from the veins and the development of the lymph hearts and thoracic duct in the pig. *Am J Anat* 1902;1:367-389.
2. Ranvier L-A: Développement des vaisseaux lymphatiques. *C R Acad Sci* 1895;121:1105-1109.
3. Lewis FT: The Development of the lymphatic system in rabbits. *Am J Anat* 1905; 5:95-111.
4. van der Putte SC: The early development of the lymphatic system in mouse embryos. *Acta Morphol Neerl Scand* 1975;13:245-286.
5. van der Putte SC: The development of the lymphatic system in man. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1975;51:3-60.
6. Huntington GS, McClure CFW: The anatomy and development of the jugular lymph sacs in the domestic cat (*Felis domestica*). *Anat Rec* 1908;2:1-18.
7. van der Jagt ER: The origin and development of the anterior lymph-sacs in the sea-turtle (*Thalassochelys caretta*). *Q J Microsc Sci* 1932;75:151-165.
8. Huntington GS, McClure CFW: The anatomy and development of the jugular lymph sac in the domestic cat (*Felis domestica*). *Am J Anat* 1910;10:177-311.
9. Wilting J, Papoutsis M, Schneider M, Christ B: The lymphatic endothelium of the avian wing is of somitic origin. *Dev Dyn* 2000;217:271-278.
10. Wilting J, Aref Y, Huang R, Tomarev SI, Schweigerer L, Christ B, Valasek P, Papoutsis M: Dual origin of avian lymphatics. *Dev Biol* 2006;292:165-173.
11. Ny A, Koch M, Schneider M, Neven E, Tong RT, Maity S, Fischer C, et al.: A genetic *Xenopus laevis* tadpole model to study lymphangiogenesis. *Nat Med* 2005;11:998-1004.
12. Buttler K, Kreysing A, von Kaisenberg CS, Schweigerer L, Gale N, Papoutsis M, Wilting J: Mesenchymal cells with leukocyte and lymphendothelial characteristics in murine embryos. *Dev Dyn* 2006;235:1554-1562.
13. Wigle JT, Oliver G: Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 1999;98:769-778.
14. Wigle JT, Harvey N, Detmar M, Lagutina I, Grosveld G, Gunn MD, et al.: An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *EMBO J* 2002;21:1505-1513.
15. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, et al.: Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 2004;5:74-80.
16. Jeltsch M, Jha SK, Tvorogov D, Anisimov A, Leppänen VM, Holopainen T, Kivela R, et al.: CCBE1 enhances lymphangiogenesis via A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs-3-mediated vascular endothelial growth factor-C activation. *Circulation* 2014;129:1962-1971.
17. Uhrin P, Zaujec J, Breuss JM, Olcaydu D, Chrenek P, Stockinger H, Fuertbauer E, et al.: Novel function for blood platelets and podoplanin in developmental separation of blood and lymphatic circulation. *Blood* 2010;115:3997-4005.
18. Srinivasan RS, Dillard ME, Lagutin OV, Lin FJ, Tsai S, Tsai MJ, Samokhvalov IM, Oliver G: Lineage tracing demonstrates the venous origin of the mammalian lymphatic vasculature. *Genes Dev* 2007;21:2422-2432.
19. Yaniv K, Isogai S, Castranova D, Dye L, Hitomi J, Weinstein BM: Live imaging of lymphatic development in the zebrafish. *Nat Med* 2006;12:711-716.
20. Yang Y, Oliver G: Development of the mammalian lymphatic vasculature. *J Clin Invest* 2014;124:888-897.
21. Hägerling R, Pollmann C, Andreas M, Schmidt C, Nurmi H, Adams RH, Alitalo K, et al.: A novel multistep mechanism for initial lymphangiogenesis in mouse embryos based on ultramicroscopy. *EMBO J* 2013;32:629-644.
22. Martinez-Corral I, Ulvmar MH, Stanczuk L, Tatin F, Kizhatil K, John SWM, Alitalo K, Ortega S, Mäkinen T: Non venous origin of dermal lymphatic vasculature. *Circ Res* 2015;116:1649-1654.
23. Stanczuk L, Martinez-Corral I, Ulvmar MH, Zhang Y, Lavina B, Fruttiger M, et al.: cKit Lineage Hemogenic Endothelium-Derived Cells Contribute to Mesenteric Lymphatic Vessels. *Cell Rep* 2015;10:1708-1721.
24. Klotz L, Norman S, Vieira JM, Masters M, Rohling M, Dube KN, Bollini S, et al.: Cardiac lymphatics are heterogeneous in origin and respond to injury. *Nature* 2015;522:62-67.
25. Wilting J, Buttler K, Schulte I, Papoutsis M, Schweigerer L, Männer J: The proepicardium delivers hemangioblasts but not lymphangioblasts to the developing heart. *Dev Biol* 2007;305:451-459.
26. Mellor RH, Hubert CE, Stanton AW, Tate N, Akhras V, Smith A, Burnand KG, et al.: Lymphatic dysfunction, not aplasia, underlies Milroy disease. *Microcirculation* 2010;17:281-296.
27. Alitalo K: The lymphatic vasculature in disease. *Nat Med* 2011;17:1371-1380.

Korrespondenzadresse

PD Dr. Michael Jeltsch
Wihuri Research Institute and Translational
Cancer Biology Program
Biomedicum Helsinki
Postfach 63 (Haartmaninkatu 8)
FIN-00014 Universität Helsinki, Finnland
E-Mail: michael@jeltsch.org