

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die Funktion des Transkriptionsfaktors Olig3 in der Entwicklung des dorsalen Rhombencephalons untersucht. Ich zeige, dass Olig3 für die Spezifizierung von Neuronen und damit für die Entstehung von spezifischen Kernen im dorsalen Rhombencephalon notwendig ist.

Weiterhin wurde das *c-Maf*-Gen in ES-Zellen mutiert.

Die Ergebnisse gliedern sich daher wie folgt:

- Charakterisierung der Olig3-Vorläuferdomäne und der daraus entstehenden neuronalen Populationen im siebten Rhombomer des dorsalen embryonalen Rhombencephalons (3.1.1 bis 3.1.3)
- Analyse der Funktion von Olig3 in der Bildung von Kernen im siebten Rhombomer des embryonalen Rhombencephalons (3.1.4 bis 3.1.11)
- Analyse der Funktion von Olig3 in der Bildung von Kernen im ersten bis dritten Rhombomer des embryonalen Rhombencephalons (3.2.1 bis 3.2.2)
- Mutagenese des *c-Maf*-Gens (3.3.1 bis 3.3.4)

3.1 Olig3 in der Entwicklung neuronaler Zellpopulationen im siebten Rhombomer

3.1.1 Expression von Olig3 während der Embryonalentwicklung des Rhombencephalons

Der Transkriptionsfaktor Olig3 wird im dorsalen Rückenmark und im dorsalen Rhombencephalon ab Tag 9,25 der Embryonalentwicklung (E9,25) nachweisbar (Takebayashi *et al.*, 2002). Die Abbildungen 3.1.1A und B zeigen *in situ*-Hybridisierungen mit einer Probe spezifisch für Olig3 an Geweben von heterozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryos (E11,5). Die Abbildung 3.1.1A zeigt eine *in situ*-Hybridisierung an einem Rhombencephalon. Deutlich zu sehen, ist die Expression von Olig3 in einer dorsalen Region in der Flügelplatte längs des gesamten Rhombencephalons. Eine genauere Analyse des Expressionsmusters entlang der antero-posterioren Körperachse in

Abbildung 3.1.1B zeigt ein Rhombencephalon, an der dorsalen Mittellinie geöffnet und aufgeklappt, in einer so genannten “open book preparation”. Olig3 wird in einem longitudinalen breiten Streifen in der dorsalen Flügelplatte und in einem schmalen Streifen in der Basalplatte exprimiert. Die Expression beginnt im ersten Rhombomer und erstreckt sich über das gesamte Rhombencephalon bis ins Rückenmark.

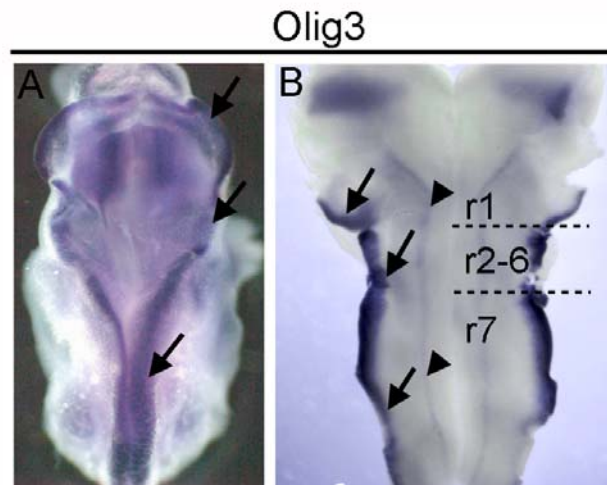


Abb. 3.1.1 Olig3 wird im Rhombencephalon und Rückenmark exprimiert. (A,B) *In situ*-Hybridisierung mit einer Olig3-spezifischen Sonde im Rhombencephalon (E11,5). (A) Olig3-Expression in der dorsalen Flügelplatte durch Pfeile markiert. (B) Abbildung zeigt Rhombencephalon, das in einer “open book preparation” dargestellt ist. Olig3 wird im gesamten Rhombencephalon in der dorsalen Flügelplatte (Pfeile) und in der Basalplatte (Pfeilköpfe) exprimiert.

Für die Durchführung dieser Arbeit wurde eine *Olig3^{GFP}*-Mauslinie verwendet, in der das *Olig3*-Gen, bestehend aus einem Exon, durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen spezifisch mutiert wurde. Die *Olig3*-kodierende Sequenz wurde in einer essentiellen Domäne durch eine *EGFP-nlsLacZ*-Genkassette ersetzt (Müller *et al.*, 2005). Um die Expression von Olig3 entlang der dorso-ventralen Achse zu charakterisieren, wurden transversale Gewebeschnitte der einzelnen Rhombomere angefertigt. Die Olig3-Vorläuferdomäne und die von ihr gebildeten neuronalen Populationen wurden systematisch untersucht. Dazu wurden Antikörper gegen GFP, Olig3 und weitere Marker für Vorläuferzellen und differenzierte Nervenzellen eingesetzt.

3.1.2 Verschiedene neuronale Populationen werden in der Olig3- Vorläuferdomäne im siebten Rhombomer spezifiziert

Olig3 wird in der Vorläuferdomäne der dorsalen Flügelplatte im Rhombencephalon exprimiert (Abb. 3.1.2A). Die Markierung mit BrdU zeigt, dass Olig3-exprimierende Zellen BrdU inkorporieren und damit replizierenden Zellen entsprechen (Abb. 3.2B). In *Olig3^{GFP}*-Embryonen wird das Olig3-Protein im Bereich der dorsalen Flügelplatte ausschließlich in Vorläuferzellen exprimiert, während GFP in Vorläuferzellen und in postmitotischen Neuronen nachweisbar ist (Abb. 3.1.2C). Es wird deutlich, dass Olig3 in postmitotischen Zellen nicht exprimiert wird, denn weder Transkripte noch Proteine des *Olig3*-Gens sind in Neuronen der Mantelzone nachweisbar. Hingegen ist GFP stabiler als Olig3 und persistiert in differenzierten Neuronen, die den Bereich der Vorläuferdomäne verlassen haben und in der Mantelzone lokalisiert sind.

Ventral zur Olig3-Domäne entstehen Lbx1-exprimierende Neurone, die hier als Klasse B-Neurone bezeichnet werden (Abb. 3.1.2A,D,G). Klasse A werden die Neurone genannt, die aus der Olig3-Vorläuferdomäne stammen und dorsal der Lbx1⁺ Neurone entstehen (Müller *et al.*, 2002, 2005; Sieber *et al.*, Manuskript eingereicht). Die neuronalen Zellpopulationen, die aus der Olig3-Vorläuferdomäne hervorgehen, sind nicht einheitlich, wie die folgende Analyse darlegen wird.

Im siebten Rhombomer entstehen vier verschiedene neuronale Zelltypen aus der Olig3-Vorläuferdomäne (Abb. 3.1.2A'). Die am ventralsten geborene neuronale Population A4 exprimiert die Transkriptionsfaktoren Lhx1/5, Foxd3 und Brn3a (Abb. 3.1.2D-F). Unmittelbar dorsal von den A4-Neuronen wird die neuronale Population A3 gebildet, welche die Transkriptionsfaktoren Phox2b und Brn3a aufweist (Abb. 3.1.2E,H,I). Daran schließen A2-Neurone an, die mithilfe der Transkriptionsfaktoren Lhx1/5 und Brn3a identifiziert werden (Abb. 3.1.2C,E-J). Dorsal davon, an die Deckenplatte angrenzend, werden A1-Neurone geboren, die Lhx2/9 und Brn3a exprimieren (Abb. 3.1.2I,J).

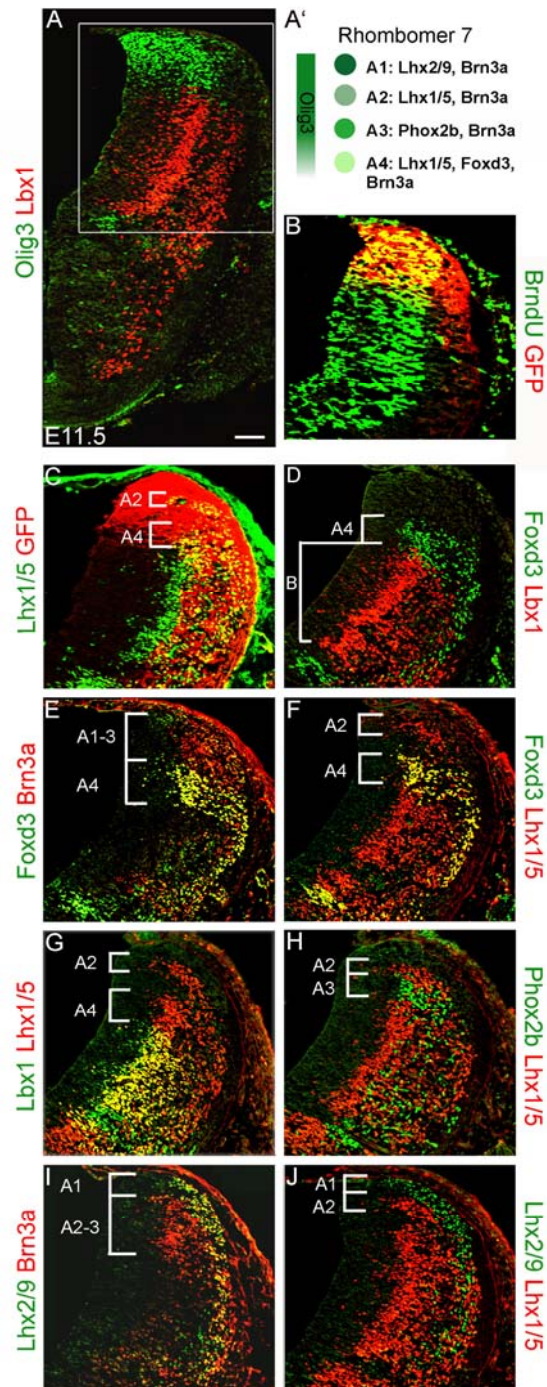


Abb. 3.1.2 (A-J). Vier neuronale Zellpopulationen gehen aus der Olig3-Vorläuferdomäne im siebten Rhombomer hervor. Immunhistologische Analyse von Transversalschnitten der Flügelplatte im siebten Rhombomer von heterozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen (E11,5). (A') Zusammenfassende Darstellung der Klasse A-Neurone im siebten Rhombomer. Antikörper gegen: (A) Olig3 (grün) und Lbx1 (rot); (B) BrdU (grün) und GFP (rot); (C) Lhx1/5 (grün) und GFP (rot); (D) Foxd3 (grün) und Lbx1 (rot); (E) Foxd3 (grün) und Brn3a (rot); (F) Foxd3 (grün) und Lhx1/5 (rot); (G) Lbx1 (grün) und Lhx1/5 (rot); (H) Phox2b (grün) und Lhx1/5 (rot); (I) Lhx2/9 (grün) und Brn3a (rot); (J) Lhx2/9 (grün) und Lhx1/5 (rot). Die Klammern verdeutlichen die neuronalen Zellpopulationen. Balken: 50 μ m.

Es können daher vier neuronale Zelltypen unterschieden werden, die aus der Olig3-Vorläuferdomäne in der dorsalen Flügelplatte im siebten Rhombomer entstehen. Die Abbildung 3.1.2K fasst schematisch die neuronalen Populationen der Olig3- und der Lbx1-Domäne zusammen, die im siebten Rhombomer nachweisbar sind. Die Neurone der Lbx1-Domäne wurden erstmals von Martin Sieber beschrieben (Sieber *et al.*, Manuskript eingereicht).

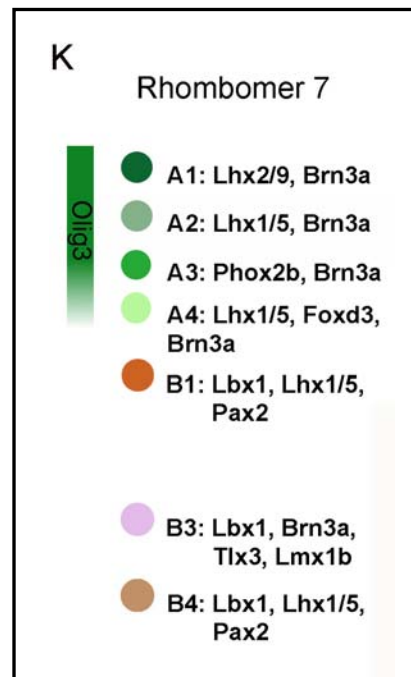


Abb. 3.1.2 (K). Neuronale Zellpopulationen in der Flügelplatte des siebten Rhombomers. Schematische Darstellung der Klasse A- und B-Neurone in der Flügelplatte des siebten Rhombomers. Die neuronalen Populationen weisen verschiedene Kombinationen von Transkriptionsfaktoren auf.

3.1.3 Die Olig3-Vorläuferdomäne im siebten Rhombomer gliedert sich in unterschiedliche Domänen

Vorläuferzellen, die den Transkriptionsfaktor Math1 exprimieren, liegen nah am Bereich der Deckenplatte (Abb. 3.1.3A,B). Nervenzellen, die lateral von Math1⁺ Vorläuferzellen auftreten, exprimieren Brn3a, jedoch nicht Lhx1/5 und entsprechen den zuvor definierten A1-Neuronen (Abb. 3.1.3A,B). Der Transkriptionsfaktor Ngn1 ist in einem Bereich ventral zur Math1-Domäne nachweisbar. Lateral von Ngn1-Vorläuferzellen liegen Lhx1/5⁺ Neurone, die hier als A2-Neurone bezeichnet werden (Abb. 3.1.3C,D). Um zu

zeigen, dass die beiden neuronalen Populationen A1 und A2 aus einer Wnt1-exprimierenden Keimzone stammen, habe ich eine Wnt1^{Cre}-Mauslinie und Antikörper gegen Cre verwendet (Abb. 3.1.3E,F). Im Gegensatz dazu, treten die A3- und A4-Neurone lateral einer Wnt1-negativen Domäne auf. Der Transkriptionsfaktor Mash1 wird in einer breiteren Domäne in der Keimzone der Flügelplatte exprimiert (Abb. 3.1.3G,H). Ein dorsaler Anteil der Mash1⁺ Keimzone bildet Phox2b-exprimierende Neurone (Pattyn et al., 2006), die den zuvor definierten A3-Neuronen entsprechen. In der dorsalen Keimzone kann man darüber hinaus die Expression des Transkriptionsfaktors Ptf1a beobachten, die teilweise mit der Expression von Mash1 überlappt (Abb. 3.1.3H). A3-Neurone sind lateral zu einem Mash1-positiven und Ptf1a-negativen Bereich der Keimzone lokalisiert, während A4-Neurone lateral zu einer Mash1- und Ptf1a-positiven Vorläuferdomäne auftreten (Abb. 3.1.3G-I).

Aus diesen Ergebnissen schlussfolgere ich, dass sich der Olig3-exprimierende Teil der Keimzone in der Flügelplatte des siebten Rhombomers anhand molekularer Marker in vier Vorläuferdomänen gliedert. Diese Ergebnisse sind in der Abbildung 3.1.3J schematisch zusammengefasst.

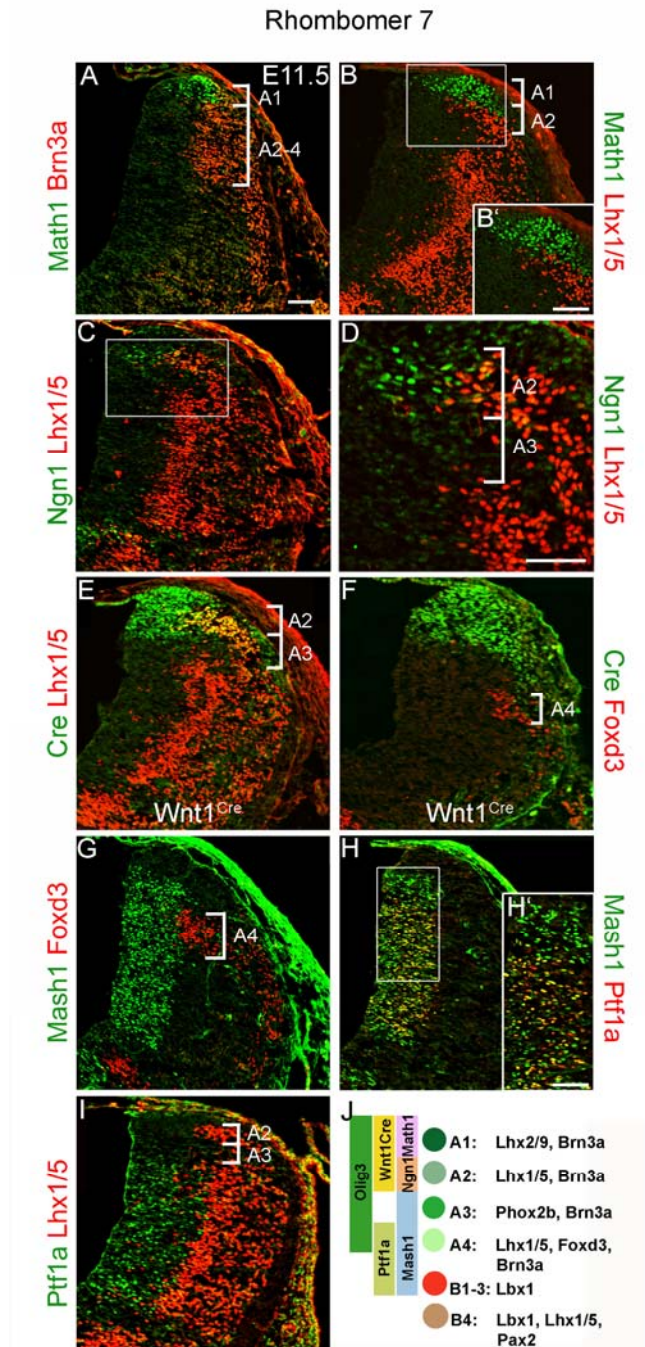


Abb. 3.1.3 (A-J). Die Olig3-Domäne im siebten Rhombomer umfasst vier Vorläuferzelltypen. Immunhistologische Analyse von Transversalschnitten der Flügelplatte im siebten Rhombomer von (A-D,G-I) Kontroll- und (E,F) *Wnt1^{Cre}*-Mäusen (E11,5). Antikörper gegen: (A) Math1 (grün) und Brn3a (rot); (B,B') Math1 (grün) und Lhx1/5 (rot); (C,D) Ngn1 (grün) und Lhx1/5 (rot); D zeigt eine Vergrößerung von C; (E) Cre (grün) und Lhx1/5 (rot); (F) Cre (grün) und Foxd3 (rot); (G) Mash1 (grün) und Foxd3 (rot); (H,H') Mash1 (grün) und Ptf1a (rot); (I) Ptf1a (grün) und Lhx1/5 (rot). Die Klammern verdeutlichen die neuronalen Zellpopulationen. (J) Schematische Darstellung der Vorläuferdomänen und ihrer Derivate in der Flügelplatte des siebten Rhombomers. Balken: 50 μ m.

3.1.4 Eine Subpopulation des Nucleus olivaris inferior stammt aus der Wnt1-Vorläuferdomäne

Um das Schicksal von Neuronen zu analysieren, die aus Wnt1-Keimzonen stammen, hat sich die genetische Untersuchung mithilfe des $Wnt1^{Cre}$ -Allels als hilfreich erwiesen (Rodriguez und Dymecki, 2000; Machold und Fishell, 2005; Wang *et al.*, 2005; Landberg *et al.*, 2005; Nichols und Bruce, 2006). Wnt1-exprimierende Keimzonen im Rhombencephalon erzeugen Neurone, die an der Bildung des Nucleus olivaris inferior oder des Nucleus cuneatus externus beteiligt sind.

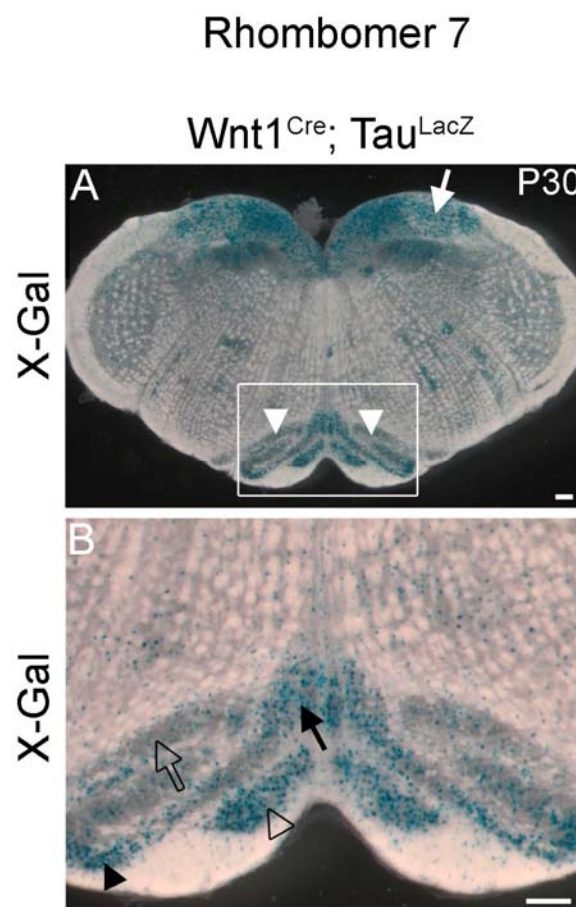


Abb. 3.1.4 (A,B). Eine Subpopulation von Neuronen im Nucleus olivaris inferior entsteht in der Wnt1-Vorläuferdomäne. (A,B) Genetische Abstammungsanalyse mithilfe von $Wnt1^{Cre}; Tau^{lacZ}$ -Indikatormäusen (P30). (A) X-Gal-Färbung auf transversalen Schnitten der Flügelplatte im siebten Rhombomer zeigt β -Galaktosidase⁺ Neurone im Nucleus cuneatus externus (Pfeil) und im Nucleus olivaris inferior (Pfeilköpfe). (B) Neurone im dorsalen (leerer Pfeil), dorso-medialen (Pfeil), medialen (leerer Pfeilkopf) und principalen Teil des Nucleus olivaris inferior (Pfeilkopf) sind mit X-Gal gefärbt. Balken: 100 μ m.

Die Analyse von $Wnt1^{Cre};Tau^{LacZ}$ -Reportermäusen ergab, dass nicht alle Neurone im Nucleus olivaris inferior mit β -Galaktosidase markiert sind: Neurone im medialen, dorso-medialen und principalen Bereich des Nucleus olivaris inferior waren markiert, während Neurone im dorsalen Bereich des Nucleus olivaris inferior nur selten eine Markierung aufwiesen (Abb. 3.1.4A,B).

3.1.5 Mis-Spezifizierung der A2-, A3- und A4-Neurone im siebten Rhombomer von homozygoten *Olig3*-mutierten Mäusen

Ich untersuchte in *Olig3^{GFP}*-Mäusen die Entwicklung von Klasse A-Neuronen, die aus der *Olig3*-Vorläuferdomäne entstehen. Zum Zeitpunkt E11,5 treten in Kontrollembryonen A1-Neurone nah der Deckenplatte auf und exprimieren *Lhx2/9* (Abb. 3.1.5A). In homozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen waren *Lhx2/9*-exprimierende Neurone nachweisbar, jedoch war ihre Anzahl signifikant verringert (Abb. 3.1.5B, siehe auch Abb. 3.1.10). A2-Neurone (*Lhx1/5⁺* und *Brn3a⁺*), A3-Neurone (*Phox2b⁺* und *Brn3a⁺*) und A4-Neurone (*Lhx1/5⁺*, *Foxd3⁺* und *Brn3a⁺*) wurden in homozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen nicht spezifiziert. Stattdessen wurde an ihrer Stelle ein neuronaler Zelltyp nachgewiesen, der die Transkriptionsfaktoren *Lbx1*, *Pax2* und *Lhx1/5*, jedoch nicht *Brn3a* exprimierte (Abb. 3.1.5C-H). Die mis-spezifizierten neuronalen Populationen werden hier als A2/A3/4* bezeichnet. Der Transkriptionsfaktor-Code, den A2/A3/4* aufwiesen, entsprach dem von B1-Neuronen. In Kontrollembryonen exprimieren B1-Neurone überdies Glutamatdecarboxylase 1 (*Gad1*, auch als *Gad67* bekannt) und können daher als Zellen mit GABAergem Differenzierungspotential betrachtet werden (Abb. 3.1.5I). Die mis-spezifizierten A2/A3/4*-Neurone in homozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen exprimierten ebenfalls *Gad1* (Abb. 3.1.5J). Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass A2/A3/4*-Neurone ihr Zellschicksal veränderten.

Zusammenfassend schlussfolgere ich, dass die Mutation des Transkriptionsfaktors *Olig3* zur Mis-Spezifizierung von drei neuronalen Zellpopulationen führt, die aus der *Olig3*-Vorläuferdomäne hervorgehen. Diese Ergebnisse sind schematisch in der Abbildung 3.1.5K dargestellt.

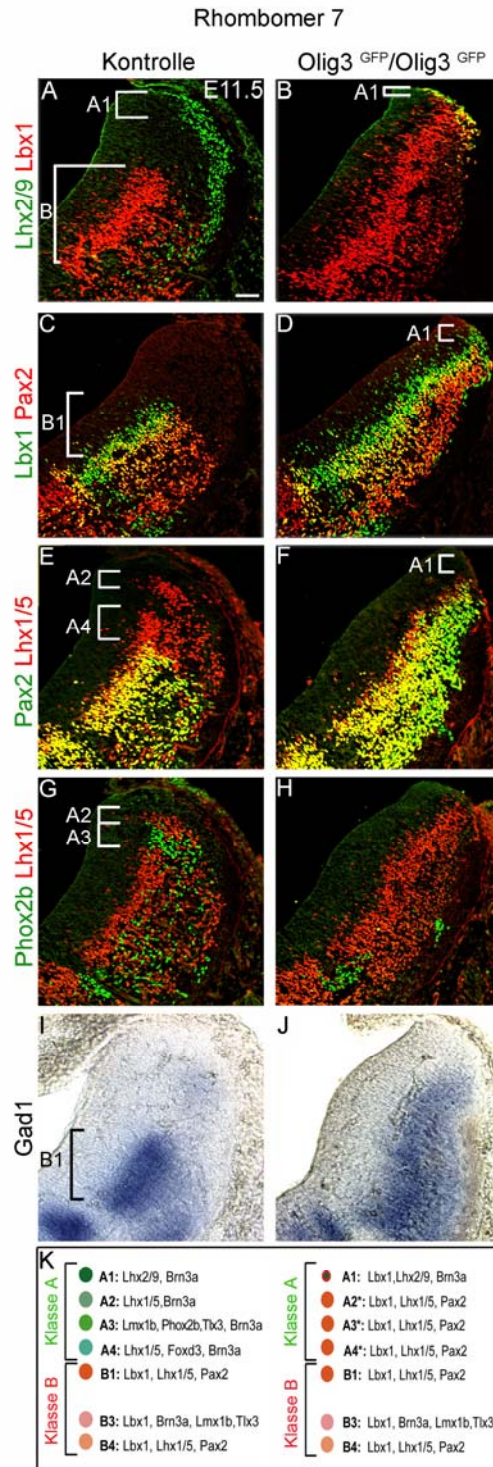


Abb. 3.1.5 (A-K). Entwicklung der Klasse A-Neurone im siebten Rhombomer. Untersuchung von Transversalschnitten der Flügelplatte im siebten Rhombomer von (A,C,E,G,I) heterozygoten und (B,D,F,H,J) homozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen (E11,5). Antikörper gegen: (A,B) Lhx2/9 (grün) und Lbx1 (rot); (C,D) Lbx1 (grün) und Pax2 (rot); (E,F) Pax2 (grün) und Lhx1/5 (rot); (G,H) Phox2b (grün) und Lhx1/5 (rot). (I,J) *In situ*-Hybridisierung mit einer Probe spezifisch für Gad1. Klammern verdeutlichen die neuronalen Zellpopulationen. (K) Schematische Darstellung der Entwicklung von Klasse A- und B-Neuronen in der Flügelplatte des siebten Rhombomers von heterozygoten (links) und homozygoten (rechts) *Olig3^{GFP}*-Embryonen. Balken: 50 μ m.

3.1.6 Olig3 ist für die Entwicklung des Nucleus olivaris inferior im siebten Rhombomer notwendig

Neurone, die den Nucleus olivaris inferior bilden, wandern während der Embryonalentwicklung (E11, E12) entlang des submarginalen Migrationstroms von der dorsalen Flügelplatte in den Bereich der Bodenplatte. Dort siedeln sie sich in der ventralen Medulla oblongata an, ohne die Mittellinie zu durchqueren (Altman und Bayer, 1980,1987; Bourrat und Sotelo, 1988, 1991; Ono und Kawamura, 1990). In Kontrollembryonen formen Brn3a-exprimierende Nervenzellen einen Migrationsstrom, der sich E12,5 von der dorsalen Flügelplatte bis in den ventralen Bereich der Medulla oblongata erstreckt (Abb. 3.1.6A,B; Pfeilköpfe markieren den Migrationsstrom). Nervenzellen, die Foxd3 exprimieren (A4-Neurone), beteiligen sich an dem Brn3a⁺ Migrationsstrom (Abb. 3.1.6A,B). Neurone, die diesen Migrationsstrom bilden, migrieren ventral und sammeln sich zum Zeitpunkt E12,5 in der ventralen Medulla oblongata, wobei sie sowohl Brn3a als auch Foxd3 exprimieren (Pfeil in Abb. 3.1.6B). In homozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen (E11,5) trat eine verringerte Anzahl von Brn3a⁺ Neuronen auf (Abb. 3.1.6D). Zum Zeitpunkt E12,5 war weder der Migrationsstrom aus Brn3a⁺ und Foxd3⁺ Neuronen noch ihre Ansammlung in der ventralen Medulla oblongata nachweisbar (Abb. 3.1.6E). Die *in situ*-Hybridisierung auf einem Rhombencephalon (E15,5) mit einer Sonde spezifisch für Foxd3 zeigt, dass auch zu einem späteren Zeitpunkt der Embryonalentwicklung Nervenzellen im Nucleus olivaris inferior Foxd3 exprimieren (Pfeile in Abb. 3.1.6C). In homozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen wurden diese Neuronen nicht detektiert (Pfeile in Abb. 3.1.6F). Die immunhistochemische Analyse zu einem späteren Zeitpunkt der Embryonalentwicklung (E18), wenn der Nucleus olivaris inferior seine charakteristische Faltung ausgeprägt hat, zeigt, dass die Mehrheit seiner Neuronen Brn3a und Foxd3 ko-exprimiert (Abb. 3.1.6G). Im Gegensatz dazu waren Brn3a und Foxd3 doppel-positive Neurone in der ventralen Medulla oblongata von homozygoten *Olig3^{GFP}*-Mäusen nicht nachweisbar (Abb. 3.1.6I). Die histologische Untersuchung mithilfe von Hämatoxylin auf transversalen Plastikschnitten durch die caudale Medulla oblongata am 18. Tag der Embryonalentwicklung lässt erkennen, dass der Nucleus olivaris inferior in homozygoten *Olig3^{GFP}*-Mäusen nicht gebildet wurde (Abb. 3.1.6H,J).

Aus diesen Ergebnissen ziehe ich die Schlussfolgerung, dass der Nucleus olivaris inferior von Klasse A-Neuronen gebildet wird, die aus der Olig3-Vorläuferdomäne stammen.

Rhombomer 7

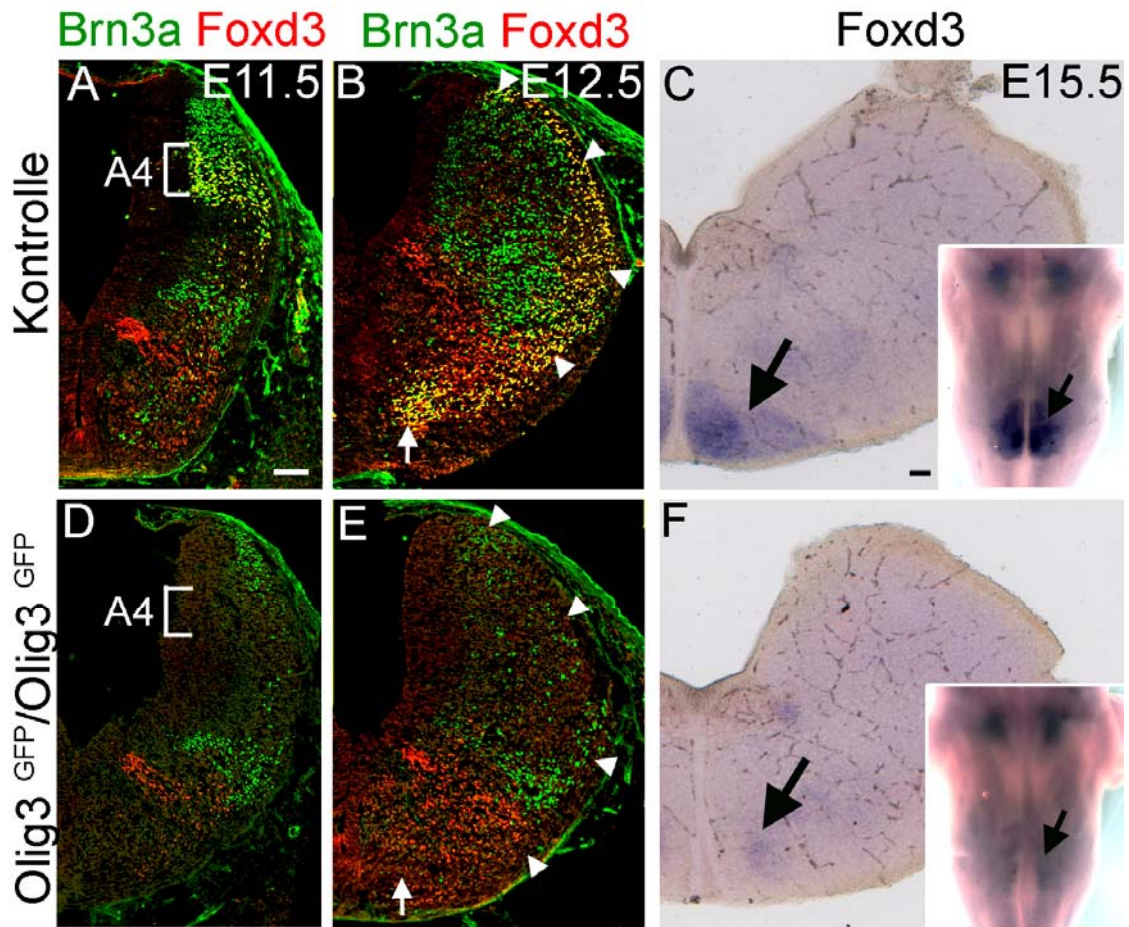


Abb. 3.1.6 (A-F). Entwicklung des Nucleus olivaris inferior in *Olig3*-mutierten Mäusen. Analyse von Transversalschnitten der Flügelplatte im siebten Rhombomer von (A-C) heterozygoten und (D-F) homozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung: (A,D) Immunhistologische Untersuchung mit Antikörpern gegen Brn3a (grün) und Foxd3 (rot) (E11,5); Klammern zeigen auf die Position des neuronalen Zelltyps A4. (B,E) Antikörper gegen Brn3a (grün) und Foxd3 (rot) (E12,5). Der submarginale Migrationsstrom (Pfeilköpfe) und die Anlage des Nucleus olivaris inferior (Pfeil) sind dargestellt. (C,F) *In situ*-Hybridisierung mit einer Probe spezifisch für Foxd3. Die Abbildungen zeigen transversale Schnitte; die kleinen Bildeinfügungen stellen ventrale Aufsichten auf das Rhombencephalon (E15,5) dar. Pfeile markieren die Stelle, an welcher der Nucleus olivaris inferior in heterozygoten Tieren vorhanden ist. Balken: 50 μ m.

Rhombomer 7

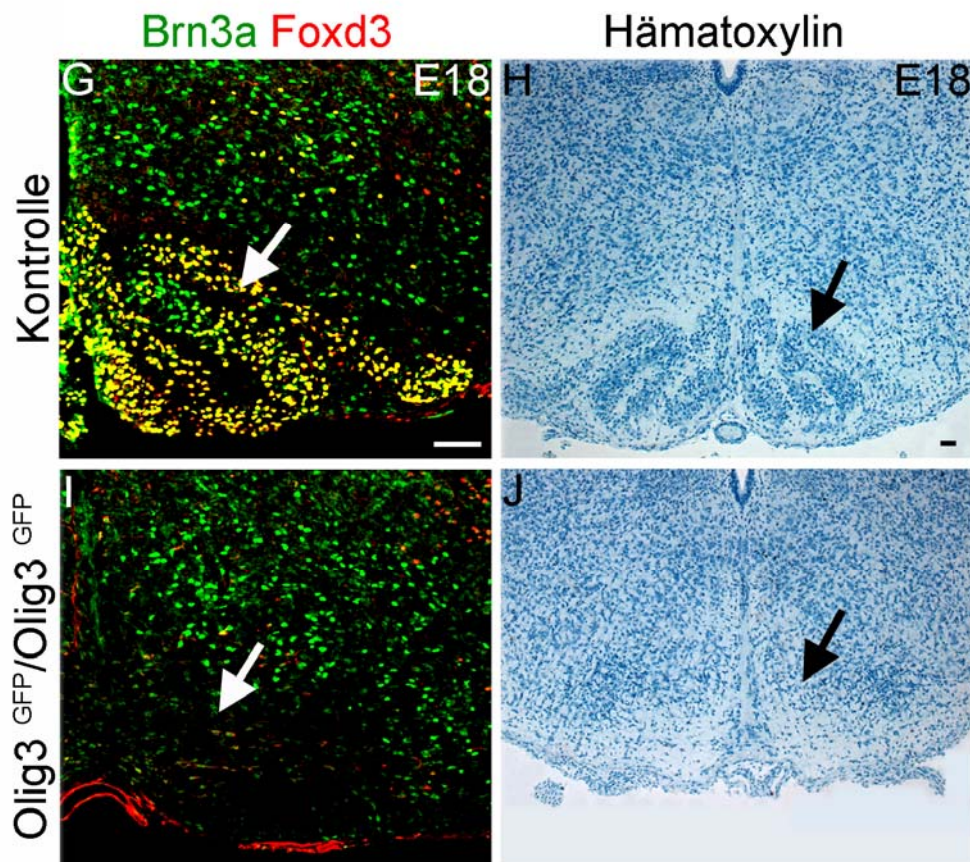


Abb. 3.1.6 (G-J). Entwicklung des Nucleus olivaris inferior in *Olig3*-mutierten Mäusen während der späten Embryogenese (E18). Analyse von Transversalschnitten der Flügelplatte im siebten Rhombomer von (G,H) heterozygoten und (I,J) homozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen. (G,I) Antikörper gegen Brn3a (grün) und Foxd3 (rot). Die Pfeile markieren die Position, an welcher der Nucleus olivaris inferior in heterozygoten Tieren liegt. (H,J) Hämatoxylin-Färbung auf Plastikschnitten durch die caudale Medulla oblongata. Die Pfeile zeigen auf die Stelle, an welcher der Nucleus olivaris inferior in heterozygoten Tieren vorhanden ist. Balken: 50 µm.

3.1.7 Analyse des Zelltods in *Olig3*-mutierten Mäusen

Um herauszufinden, ob in homozygoten *Olig3^{GFP}*-Mäusen vermehrt Zelltod auftritt, habe ich die TUNEL-Analyse auf transversalen Schnitten durch die caudale Medulla oblongata im siebten Rhombomer zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung durchgeführt. Zu keinem Zeitpunkt (E10,5; E11,5; E12,5; E14,5) konnte ich beim Vergleich von Kontrolltieren und homozygoten *Olig3^{GFP}*-Mäusen verstärkten Zelltod detektieren. Die

Abbildung 3.1.7A-E zeigt exemplarisch die Ergebnisse der TUNEL-Analyse an den embryonalen Stadien E11,5 und E12,5. Als Positivkontrolle dienten transversale Gewebeschnitte des Rückenmarks (E18). Die immunhistochemische Analyse mithilfe des Antikörpers Caspase 3 zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung bestätigte das Ergebnis der TUNEL-Analyse und ist daher aus Platzgründen hier nicht weiter dargestellt.

Insgesamt unterstützen die Ergebnisse dieser Untersuchungen die Hypothese, dass Neurone, die an der Bildung des Nucleus olivaris inferior oder Neurone, die zur Entwicklung des Nucleus tractus solitarii und der Area postrema beitragen (siehe 3.1.8), in homozygoten *Olig3^{GFP}*-Mäusen nicht sterben, sondern ein verändertes Zellschicksal durchlaufen.

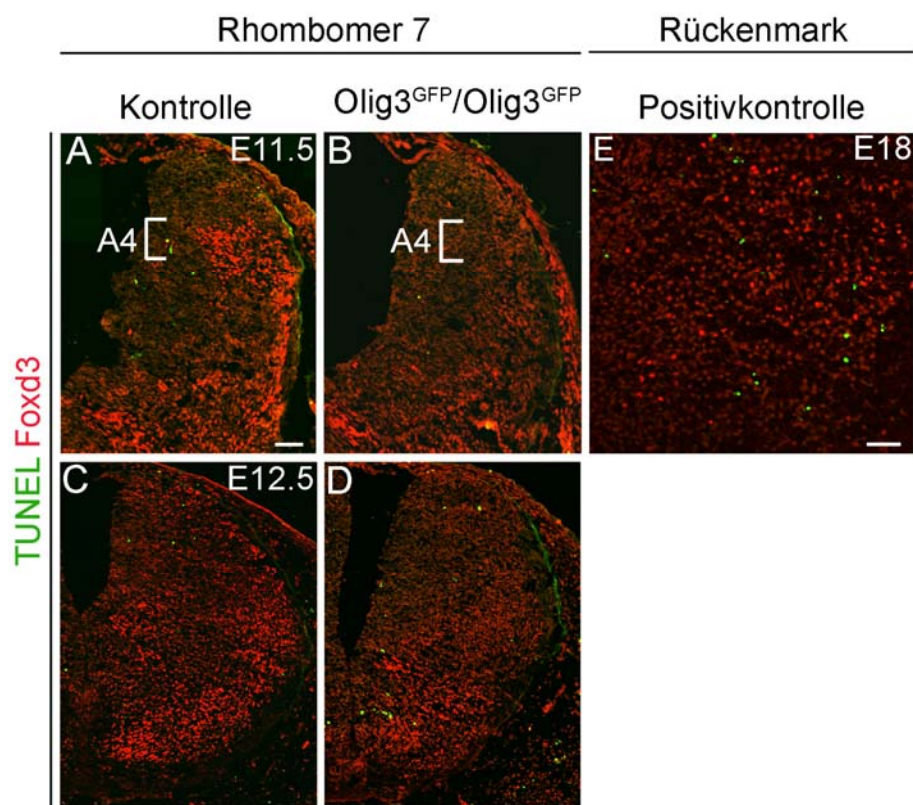


Abb. 3.1.7 (A-J). Untersuchung des Zelltods in *Olig3*-mutierten Mäusen. Analyse von Transversalschnitten der Flügelplatte im siebten Rhombomer von (A,C) heterozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen, (B,D) homozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen und (E) Wildtypen zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung: (A,B) E11,5; (C,D) E12,5. (E) zeigt die Positivkontrolle, einen transversalen Schnitt durch das Rückenmark (E18). Antikörper gegen: TUNEL (grün) und Foxd3 (rot). Balken: 50 μ m.

3.1.8 Die Entwicklung des Nucleus tractus solitarii und der Area postrema im siebten Rhombomer ist von *Olig3* abhängig

Eine neuronale Zellpopulation in der dorsalen Flügelplatte ist entscheidend an der Bildung des Nucleus tractus solitarii und der Area postrema beteiligt. Diese Zellpopulation exprimiert die Transkriptionsfaktoren *Phox2b*, *Tlx3* und *Lmx1b* (Qian *et al.*, 2002; Dauger *et al.*, 2003) und entspricht A3-Neuronen (siehe Abschnitt 3.2). Auf dieser Grundlage habe ich die Entwicklung des Nucleus tractus solitarii und der Area postrema in hetero- und homozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen untersucht. In Kontrollembryonen (E11,5) migrieren *Phox2b⁺/Tlx3⁺* Neurone ventral (Abb. 3.1.8A). Zum Zeitpunkt E13,5 der Embryonalentwicklung hat sich die Population *Phox2b*-exprimierender Nervenzellen ausgedehnt und nimmt bereits eine Form ähnlich der des vollständig entwickelten Nucleus tractus solitarii an (Pfeil in Abb. 3.1.8B). Zu einem späteren Zeitpunkt der Embryogenese (E18) zeigen immunhistochemische Analysen auf Schnitten durch die caudale Medulla oblongata eine Ansammlung von Neuronen, von denen ein Teil *Phox2b* und *Tlx3* ko-exprimiert (Übersichtsschema verdeutlicht die Position des Bildausschnitts in Abb. 3.1.8C; Pfeilköpfe zeigen die Area postrema, Pfeile zeigen den Nucleus tractus solitarii). In homozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen waren zum Zeitpunkt E11,5 keine *Phox2b⁺/Tlx3⁺* A3-Neurone nachweisbar (Abb. 3.1.8D). Zum Zeitpunkt E13 waren überdies keine *Phox2b⁺* Neurone in der Anlage des Nucleus tractus solitarii detektierbar (Abb. 3.1.8E) und auch zu einem späteren Zeitpunkt der Embryogenese (E18) waren im Vergleich zu Kontrolltieren keine *Phox2b* und *Tlx3* doppel-positiven Neurone in den Bereichen der Area postrema (Pfeilköpfe in Abb. 3.1.8F) und des Nucleus tractus solitarii nachweisbar (Pfeile in Abb. 3.1.8F).

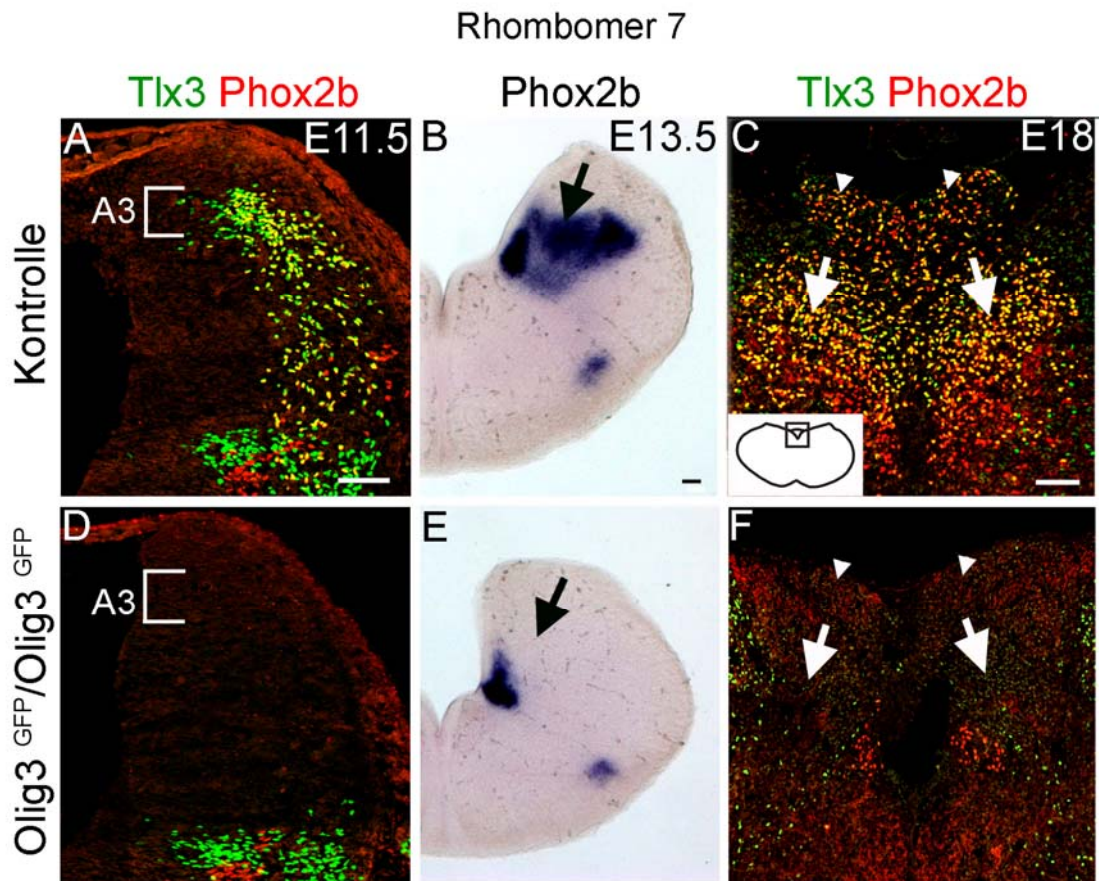


Abb. 3.1.8 (A-F). Entwicklung des Nucleus tractus solitarii und der Area postrema. Untersuchung transversaler Schnitte der Flügelplatte im siebten Rhombomer von (A-C) heterozygoten und (D-F) homozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien. (A,D) Antikörper gegen Tlx3 (grün) und Phox2b (rot) (E11,5); Klammern zeigen auf die Position von A3-Neuronen. (B,E) *In situ*-Hybridisierung mit einer Probe spezifisch für Phox2b auf transversalen Schnitten; Pfeile zeigen auf die Stelle, an welcher sich der Nucleus tractus solitarii in heterozygoten Mäusen befindet. (C,F) Antikörper gegen Tlx3 (grün) und Phox2b (rot) (E18); Pfeile weisen auf den Nucleus tractus solitarii, Pfeilköpfe auf die Area postrema. Balken: 50 μ m.

3.1.9 Die Area postrema ist in *Olig3*-mutierten Mäusen verkleinert

Die Histologische Untersuchung von transversalen Schnitten durch die caudale Medulla oblongata ergab darüber hinaus, dass die Struktur der Area postrema in homozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen (E18) im Vergleich zu Kontrolltieren hypoplastisch war (Abb. 3.9A-D).

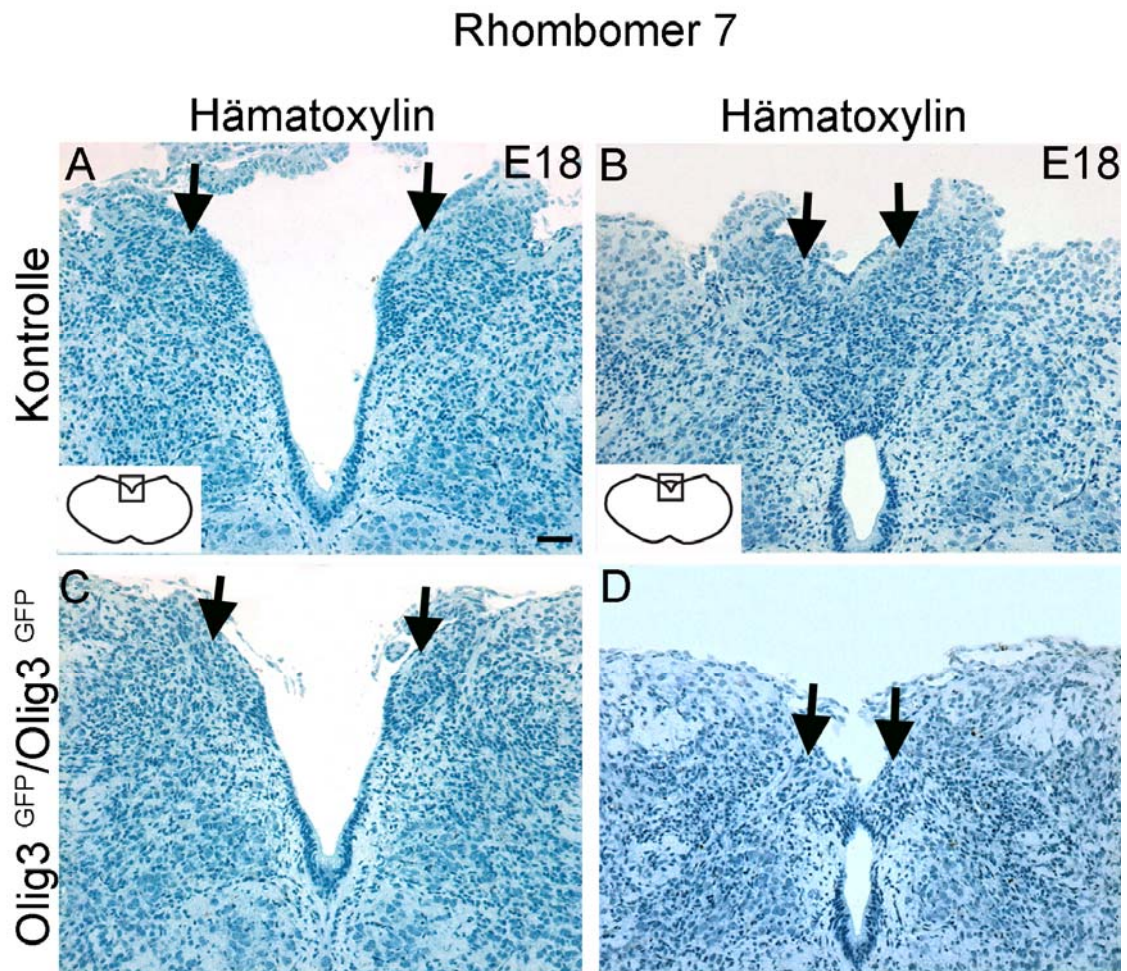


Abb. 3.1.9 (A-D). Entwicklung der Area postrema in *Olig3*-mutierten Mäusen. Histologische Analyse von Transversalschnitten der Flügelplatte im siebten Rhombomer von (A,B) heterozygoten und (C,D) homozygoten *Olig3^{GFP}*-Mäusen. (A-D) Hämatoxylin-Färbung auf Plastikschnitten durch die caudale Medulla oblongata (E18); Pfeile markieren die Area postrema. Die Schnitte zeigen (A,C) einen axialen Bereich rostral des Obex und (B,D) den Bereich am Obex, wo die Area postrema den Nucleus tractus solitarii bedeckt. (A,B) Die linke Bildeinfügung zeigt einen schematischen Transversalschnitt durch die caudale Medulla oblongata. Balken: 50 μ m.

Um die in homozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen auftretende Hypoplasie genauer zu untersuchen, habe ich die neuronalen Populationen in der Area postrema analysiert. Zusätzlich zu den *Tlx3*-exprimierenden Neuronen existiert in der Area postrema eine bisher nicht beschriebene neuronale Population, die *Pax2* exprimiert (Abb. 3.1.9F). Weitere immunhistochemische Untersuchungen zeigen, dass in der Struktur der Area postrema Neurone vorkommen, die als solche mithilfe des molekularen neuronalen Markers NeuN identifizierbar sind, jedoch nicht *Phox2b* exprimieren (Abb. 3.1.9G). In

homozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen (E18) sind auch in der hypoplastischen Struktur der Area postrema Pax2-exprimierende Neurone vorhanden (Abb. 3.1.9H).

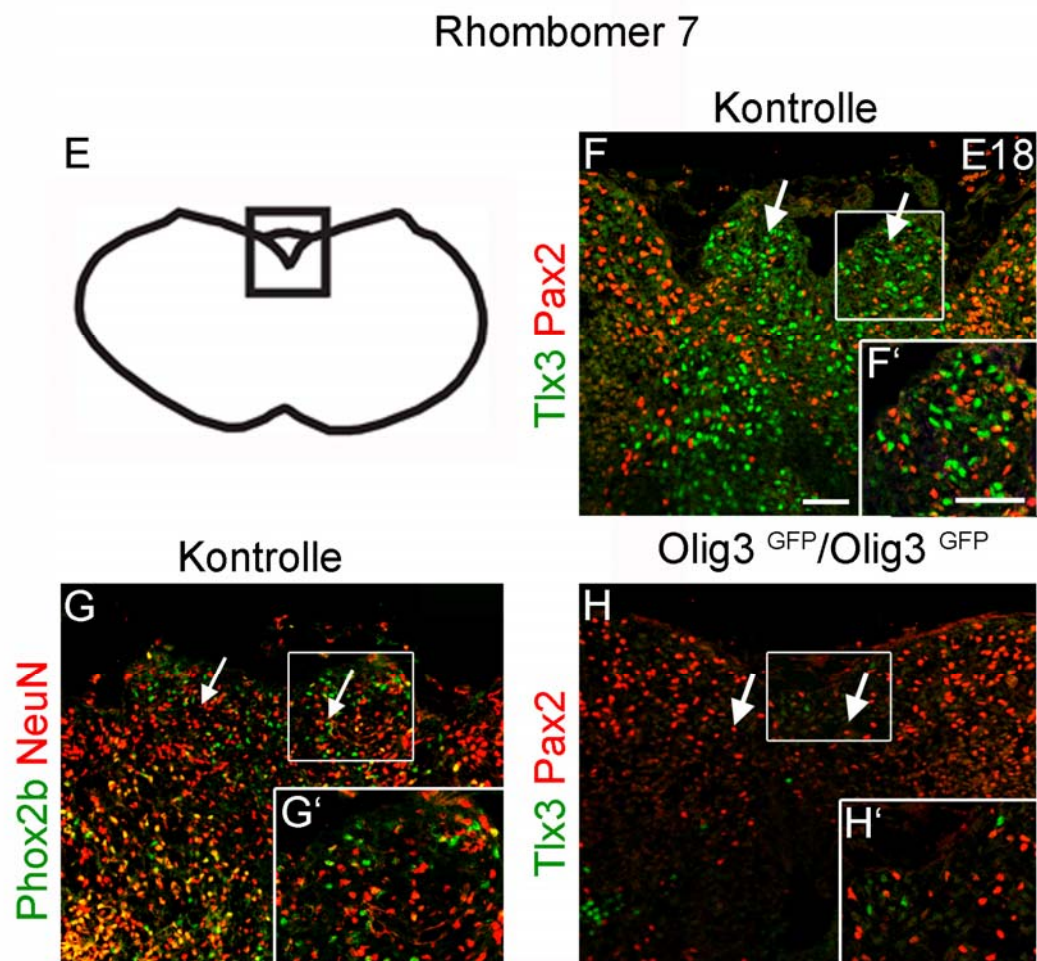


Abb. 3.1.9 (E-H). Entwicklung der Area postrema in *Olig3*-mutierten Mäusen. Immunhistochemische Analyse von Transversalschnitten der Flügelplatte im siebten Rhombomer von (F,G) heterozygoten und (H) homozygoten *Olig3^{GFP}*-Mäusen. (E) zeigt Übersicht eines transversalen Schnittes durch die caudale Medulla oblongata. (F,F',H,H') Analyse des Hirnstamms (E18) mit Antikörpern gegen Tlx3 (grün) und Pax2 (rot); Pfeile zeigen auf die Area postrema. (F',H') Die Bildeinfügung zeigt vergrößerten Ausschnitt. (G) Antikörper gegen Phox2b (grün) und NeuN (rot); Pfeile zeigen auf die Area postrema. (G') Die Bildeinfügung zeigt vergrößerten Ausschnitt. Balken: 50 μ m.

Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass die Area postrema wenigstens zwei neuronale Zellpopulationen enthält, die an ihrer Entwicklung beteiligt sind. Eine der neuronalen Populationen exprimiert Phox2b und/oder Tlx3 zu denen A3-Neurone gehören, während die andere Population Pax2 exprimiert.

3.1.10 Für die Entwicklung des Nucleus reticularis lateralis und des Nucleus cuneatus externus im siebten Rhombomer ist Olig3 notwendig

Der Nucleus reticularis lateralis und der Nucleus cuneatus externus gehen aus der Domäne Math1-exprimierender Vorläuferzellen hervor (Wang *et al.*, 2005; Machold und Fishell, 2005; Landsberg *et al.*, 2005). Lateral zu Math1⁺ Vorläuferzellen treten A1-Neurone (Lhx2/9⁺ und Brn3a⁺) auf, deren Anzahl in homozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen (E11,5) reduziert war (siehe Abschnitte 3.1.3, 3.1.5 und Abb. 3.1.10A-C). Die quantitative Analyse von A1-Neuronen in mindestens 3 Tieren jedes Genotyps ergab folgende Ergebnisse: 138 +/- 31 A1-Neurone in heterozygoten und 40 +/- 11 in homozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen (p-Wert < 0,0001) (Abb. 3.1.10C).

Aufgrund dieser Ergebnisse untersuchte ich, ob der Nucleus reticularis lateralis und der Nucleus cuneatus externus in homozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen wegen der verringerten Anzahl von A1-Neuronen hypoplastisch waren. Diese Hypothese konnte mithilfe des Markers Barhl1 bestätigt werden. Barhl1 markiert die Neurone im Nucleus reticularis lateralis und im Nucleus cuneatus externus (Li *et al.*, 2004). Es wurde deutlich, dass sich in homozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen weniger Barhl1⁺ Neurone in den Anlagen des Nucleus reticularis lateralis und des Nucleus cuneatus externus zum Zeitpunkt E16 ansiedelten (Abb. 3.1.10D-G; Pfeil zeigt zum Nucleus reticularis lateralis, Pfeilkopf zeigt zum Nucleus cuneatus externus). Zusammenfassend schlussfolgerte ich, dass Olig3 für die korrekte Entwicklung des Nucleus reticularis lateralis und des Nucleus cuneatus externus im siebten Rhombomer notwendig ist.

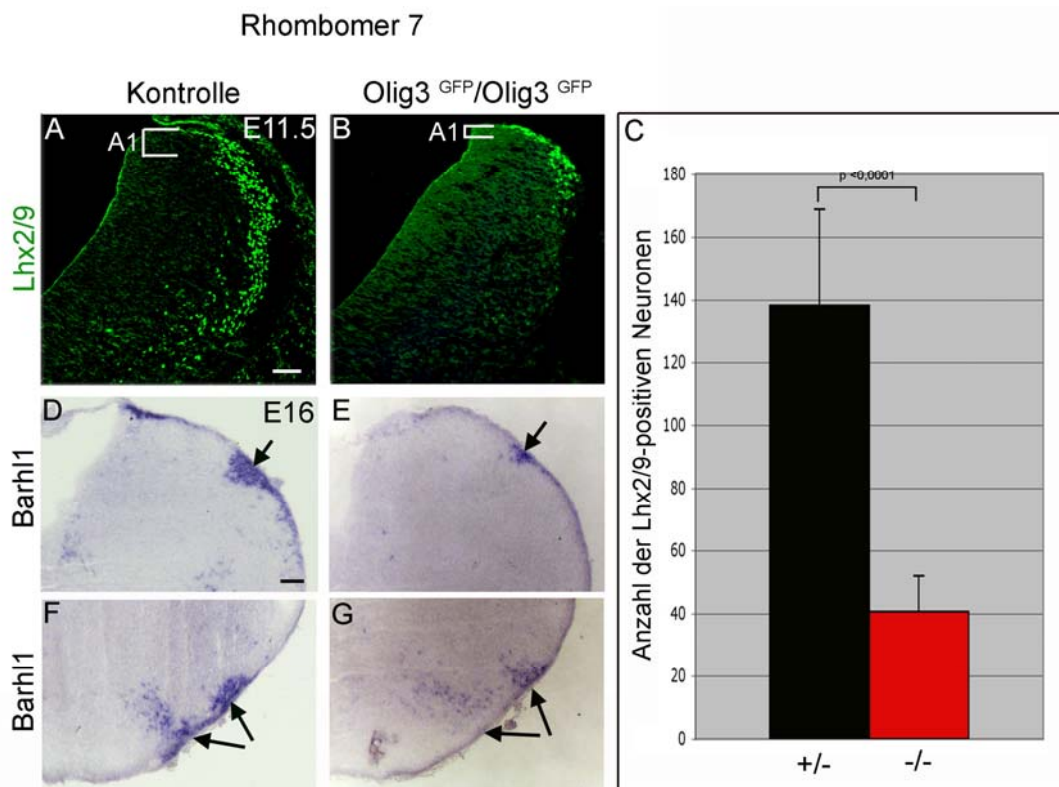
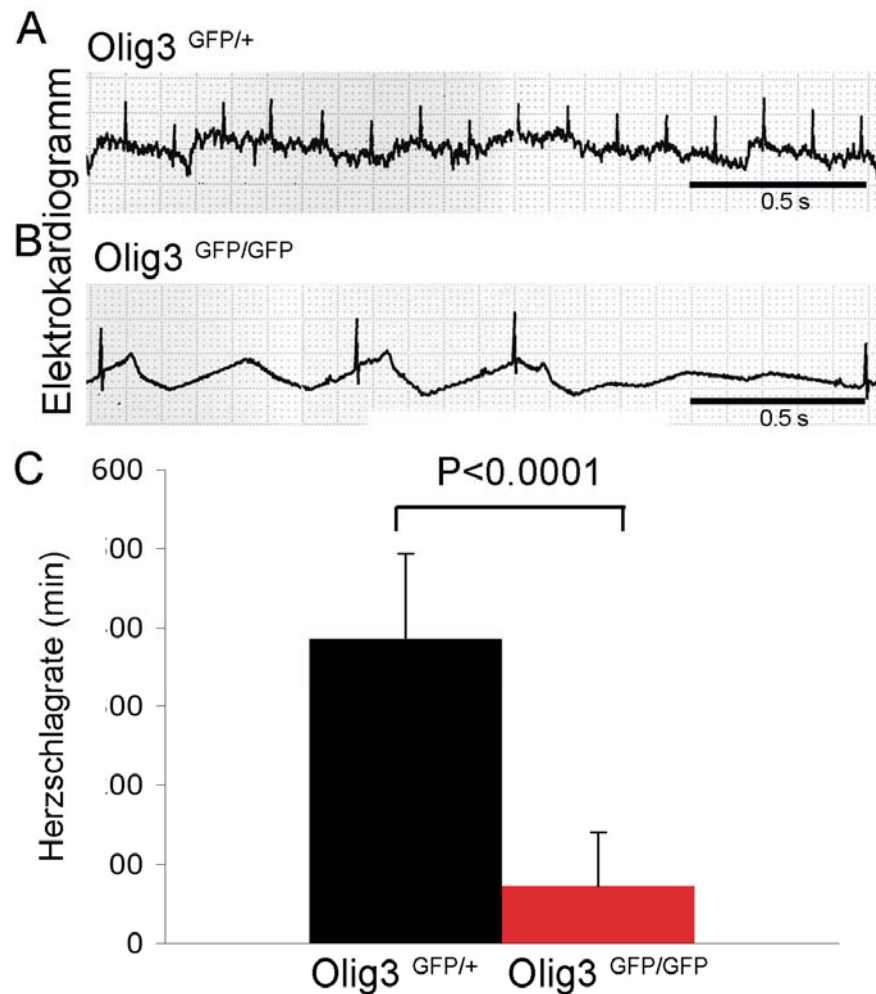


Abb. 3.1.10 (A-G). Entwicklung des Nucleus reticularis lateralis und des Nucleus cuneatus externus in *Olig3*-mutierten Mäusen. Analyse von Transversalschnitten der Flügelplatte im siebten Rhombomer von (A,D,F) heterozygoten und (B,E,G) homozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen. (A,B) Antikörper gegen: Lhx2/9 (grün) (E11,5). Klammern verdeutlichen die Position von A1-Neuronen. (C) Diagramm stellt quantitative Analyse der Lhx2/9-exprimierenden Zellen zum Zeitpunkt E11,5 in heterozygoten (+/-) und homozygoten (-/-) *Olig3^{GFP}*-Embryonen dar. (D-G) *In situ*-Hybridisierung mit einer Probe spezifisch für Barhl1. Der Nucleus cuneatus externus (Pfeil in D,E) und der Nucleus reticularis lateralis (Pfeil in F,G) sind markiert. Balken: 50 μ m.

3.1.11 Die Fehlentwicklung des Nucleus tractus solitarii führt zu abnormalen Herzkontraktionen und Herzrhythmusstörungen

Das Rhombencephalon ist an der Regulation von sowohl respiratorischen als auch kardio-vaskulären Systemen beteiligt. Dabei stellen kardio-vaskuläre Regulationseinheiten in der Medulla oblongata wichtige Schaltstellen dar (Dampney, 1981; Übersichtsartikel von Millhorn und Eldridge, 1986; Schneider-Maunoury *et al.*, 1998). Zu ihnen gehört der Nucleus tractus solitarii (Übersichtsartikel von Borday *et al.*, 2004). Homozygote *Olig3^{GFP}*-Embryonen sterben wenige Stunden nach der Geburt. Überdies ist die Entwicklung des Nucleus tractus solitarii in homozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen

beeinträchtigt (siehe 3.1.8). Daher habe ich die Herzschlagrate von heterozygoten und homozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen zum Zeitpunkt E18 mithilfe des Elektrokardiogramms untersucht. Ich konnte nachweisen, dass die Herzschlagfrequenz in homozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant verringert sowie der Rhythmus gestört war (Abb. 3.1.11A,B,C).



3.1.11 Homozygote *Olig3^{GFP}*-Embryonen weisen abnormale Herzkontraktionen und Herzrhythmusstörungen auf. Elektrokardiogramm von (A) heterozygoten und (B) homozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen (E18). (C) Diagramm stellt quantitativen Vergleich von heterozygoten und homozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen dar. Es wurden 24 heterozygote (Kontrolltiere) und 21 homozygote *Olig3^{GFP}*-Embryonen untersucht.

3.2 Olig3 in der Entwicklung neuronaler Zellpopulationen im ersten bis dritten Rhombomer

3.2.1 Die Bildung von Derivaten der Rautenlippe ist im zweiten bzw. dritten Rhombomer von *Olig3*-mutierten Mäusen beeinträchtigt

Zu den Derivaten der Math1-Vorläuferdomäne im zweiten bzw. dritten Rhombomer gehören der Nucleus pontis und der Nucleus reticularis tegmenti pontis (Wang *et al.*, 2005; Machold und Fishell, 2005, Landsberg *et al.*, 2005).

Wie die *in situ*-Hybridisierung mit einer Probe spezifisch für Math1 zeigt, wird Math1 zum Zeitpunkt E11,5 in einer Vorläuferdomäne entlang des gesamten Rhombencephalons exprimiert (Abb. 3.2.1A). In homozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen war die Expression von Math1 reduziert (Abb. 3.2.1B). Da die verminderte Expression von Math1 auch im zweiten und dritten Rhombomer auftrat, untersuchte ich, ob die Kerne Nucleus pontis und Nucleus reticularis tegmenti pontis in homozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen hypoplastisch waren. Diese Hypothese konnte mithilfe des molekularen Markers *Zic1* bestätigt werden. *Zic1* markiert Zellen im Nucleus pontis (Aruga *et al.*, 2000). Es zeigte sich, dass im Vergleich zu Kontrolltieren in homozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen weniger *Zic1⁺* Zellen im Nucleus pontis und Nucleus reticularis tegmenti pontis zum Zeitpunkt E18 angesiedelt waren (Abb. 3.2.1C,D; Pfeil zeigt zum Nucleus pontis, Pfeilkopf zeigt im Nucleus reticularis tegmenti pontis).

Zusammenfassend schlussfolgerte ich, dass *Olig3* für die Entwicklung von Math1-Derivaten im zweiten bzw. dritten Rhombomer und damit für die Bildung des Nucleus pontis und des Nucleus reticularis tegmenti pontis notwendig ist.

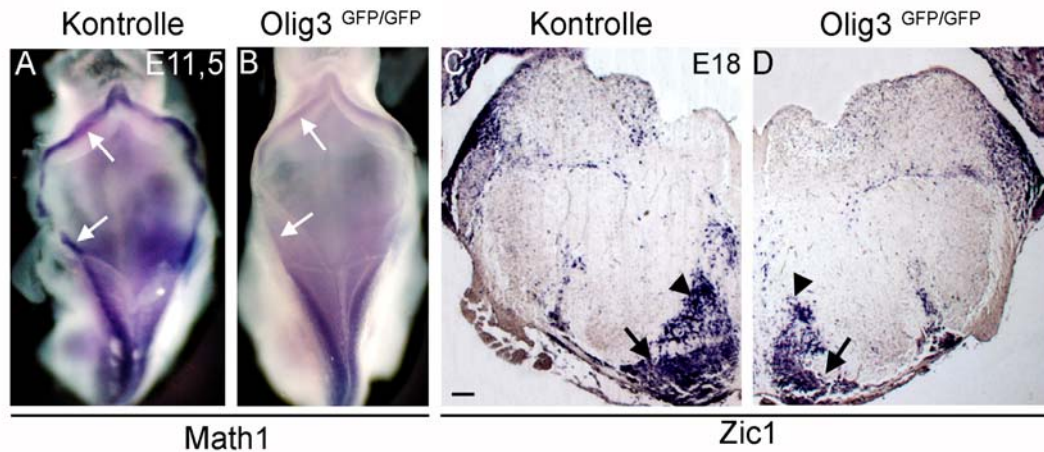


Abb. 3.2.1 (A-D). Entwicklung des Nucleus pontis und Nucleus reticularis tegmenti pontis in *Olig3*-mutierten Mäusen. (A-D) *In situ*-Hybridisierungen auf Rhombencephalon-Gewebe von heterozygoten (A,C) und homozygoten (B,D) *Olig3*^{GFP}-Embryonen (E11,5). (A,B) „Whole mount“ *in situ*-Hybridisierungen mit einer Probe spezifisch für Math1. Gezeigt ist die dorsale Seite des Rhombencephalons (E11,5); Pfeile weisen auf die Math1-Expression in der dorsalen Flügelplatte. (C,D) *In situ*-Hybridisierungen mit einer Probe spezifisch für Zic1 auf Transversalschnitten im zweiten bzw. dritten Rhombomer (E18); Pfeil zeigt zum Nucleus pontis, Pfeilkopf zeigt zum Nucleus reticularis tegmenti pontis). Balken: 150 μ m.

3.2.2 In *Olig3*-mutierten Mäusen ist die Entwicklung von Derivaten der Rautenlippe im ersten Rhombomer verändert

Im ersten Rhombomer sind Math1-exprimierende Vorläuferzellen unter anderem an der Bildung der äußeren Körnerzellschicht im Cerebellum beteiligt. Granuläre Vorläuferzellen wandern ab E13 aus der oberen Rautenlippe aus und bilden die externe Körnerzellschicht des Cerebellums (Wang *et al.*, 2005; Machold und Fishell, 2005, Landsberg *et al.*, 2005, Wingate und Hatten, 1999).

Wie die *in situ*-Hybridisierung mit einer Probe spezifisch für Math1 zeigt, wird Math1 zum Zeitpunkt E11,5 in einer Vorläuferdomäne entlang des gesamten Rhombencephalons exprimiert (siehe Abschnitt 3.2.1). In homozygoten *Olig3*^{GFP}-Embryonen war die Expression von Math1 reduziert (siehe Abschnitt 3.2.1). Da die verminderte Expression von Math1 auch im Bereich des ersten Rhombomers nachweisbar war, analysierte ich die Entwicklung des Cerebellums in *Olig3*^{GFP}-Embryonen. Mithilfe von histologischen Untersuchungen auf sagittalen Plastikschnitten wurde deutlich, dass die Folierung des Cerebellums in homozygoten *Olig3*^{GFP}-Embryonen im Vergleich zu Kontrolltieren zum

Zeitpunkt E18 nicht korrekt vorhanden war (Abb. 3.2.2A,B). Die Schichtung im Cerebellum schien hingegen zum Zeitpunkt E18 in homozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen unverändert zu sein (Abb. 3.2.2A-D).

Aus diesen Ergebnissen schlussfolgerte ich, dass *Olig3* für die Entwicklung des Cerebellums, insbesondere der granulären Vorläuferzellen notwendig ist.

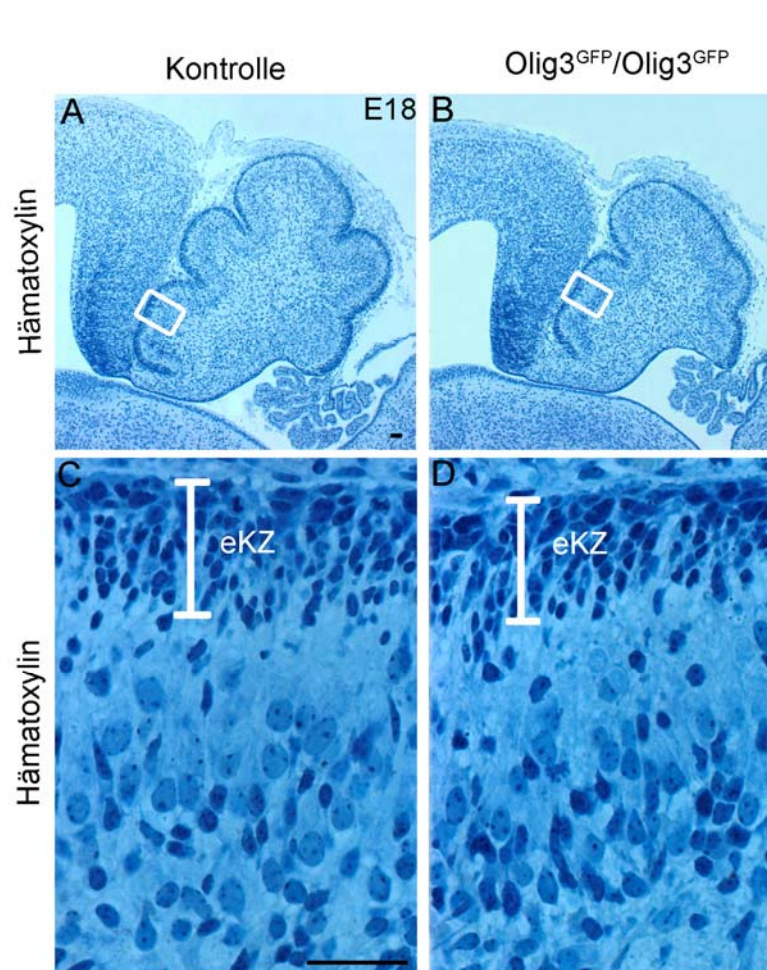


Abb. 3.2.2 (A-D). Entwicklung des Cerebellums in *Olig3*-mutierten Mäusen. (A,B) Hämatoxylin-Färbung auf sagittalen Plastikschnitten von heterozygoten (A,C) und homozygoten (B,D) *Olig3^{GFP}*-Embryonen (E18). (C,D) Vergrößerter Ausschnitt zeigt Schichtung im Cerebellum von Kontrollembryonen und homozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen. Die Schichtung in homozygoten *Olig3^{GFP}*-Embryonen scheint unverändert. (Abkürzung: eKZ, externe Körnerzellschicht.) Balken: 50 μ m.

3.3 Mutagenese des *c-Maf*-Gens

Um die entwicklungsbiologische *in vivo*-Funktion von *c-Maf* zu untersuchen, wurden durch homologe Rekombination in ES-Zellen zwei Mauslinien etabliert, in denen das *c-Maf*-Gen mutiert ist. Für die homologe Rekombination in ES-Zellen werden so genannte „Targeting“-Vektoren verwendet, auf deren Konstruktion in den folgenden Abschnitten eingegangen wird.

3.3.1 Isolierung von genomischen Klonen des *c-maf*-Gens

Anhand der genomischen Sequenz des *c-Maf*-Gens der Maus wurden Primer zur Amplifikation einer DNA-Sonde entworfen. Die mittels PCR amplifizierte Sonde wurde dann zur Hybridisierung einer PAC-Bibliothek mit genomischer DNA der Maus eingesetzt. Auf diese Weise wurden fünf PAC-Klone identifiziert, die das *c-maf*-Gen enthielten. Die Integrität der *c-Maf*-Sequenz in diesen Klonen wurde durch mehrere Southern-Blot-Hybridisierungen mit verschiedenen Sonden überprüft.

3.3.2 Konstruktion der „Targeting“-Vektoren für die *c-Maf*-Mutagenese in ES-Zellen

3.3.2.1 Herstellung eines genomischen Subklons des *c-Maf*-Gens

Als Ausgangspunkt der Konstruktion der „Targeting“-Vektoren diente ein PAC-Klon. Aus diesem Klon wurden mittels homologer Rekombination in Bakterien zwei Subklone des *c-Maf*-Gens isoliert. Hierfür wurde ein DNA-Fragment verwendet, das die Sequenz des Vektors pBluescript II und eine Kassetten zur negativen Selektion in ES-Zellen enthielt. An beiden Enden des DNA-Fragments befanden sich zum *c-Maf*-Gen homologe Sequenzen, die den Ort der Rekombination bestimmten. Auf diese Weise wurden zwei verschiedene genomische Subklone mit einer Größe von 19 kb und 14 kb hergestellt. Beide Klone enthielten die gesamte kodierende *c-Maf*-Sequenz. Der 14 kb große Klon war am 5'-Ende um 5 kb gegenüber dem größeren Klon verkürzt und diente zur Generierung des „Targeting“-Vektors für das *c-Maf*-Reporter-Allel. Der 19 kb große Klon wurde zur Herstellung des konditionalen Allels verwendet.

Die oben erwähnte Kasette zur negativen Selektion enthält die Sequenz des Diphtheria Toxin-A (DT-A) (Yagi *et al.*, 1993). Im Falle einer zufälligen Integration des gesamten Vektors in das Mausgenom während der homologen Rekombination in ES-Zellen führt die resultierende Expression des DT-A-Proteins zum Tod der Zelle.

3.3.2.2 Konstruktion des *c-Maf*-Reporter-Allels

Als Ausgangsvektor zur Herstellung des *c-Maf*-Reporter-Allels, hier als *c-Maf*^{LacZ} bezeichnet, diente der 14 kb große Subklon des *c-Maf*-Gens. In dem Vektor pc-Maf^{LacZ} wurde das offene Leseraster des *c-Maf*-Gens mittels homologer Rekombination in Bakterien durch das offene Leseraster von *Gap43-LacZ* (Zubair *et al.*, 2002) ersetzt. Das Startkodon der *Gap43-LacZ*-Sequenz wurde mit dem endogenen *c-Maf*-Initiationskodon fusioniert. Die endogene *Poly-A*-Sequenz des *c-maf*-Gens blieb erhalten. Die am Startkodon liegenden Nukleotide wurden der Kozak-Sequenz (GCCRCCATGG, R = A oder G) angepasst. Diese Sequenz fördert die Translation in Vertebraten (Kozak *et al.*, 1987).

Der *Gap43-LacZ*-Bereich besteht aus der Sequenz für das N-terminale Peptid des cytoplasmatischen Proteins Neuromodulin Gap43. Diese Sequenz ist mit dem *LacZ*-Gen fusioniert (Zubair *et al.*, 2002), wodurch das β -Galaktosidase-Fusionsprotein in der Zellmembran verankert wird. In Mäusen, die das *Gap43-LacZ*-Reporter gen tragen, ist es möglich, die Expression von *c-Maf* anhand der enzymatischen Aktivität des *LacZ*-Proteins zu untersuchen (X-Gal-Färbung). Dabei wird die gesamte Zelle gefärbt.

Neben dem *Gap43-LacZ*-Reporter gen enthielt der „Targeting“-Vektor pc-Maf^{LacZ} eine Exzisionskasette („self excision cassette“) (Abb. 3.3.2A). Sie umfasst das Gen für die *Cre*-Rekombinase unter der Kontrolle eines Testis-spezifischen Promotors und ein *Neomycin*-Resistenz-Gen (Neo-Kasette). Die Kasette wird zudem von zwei *loxP*-Sequenzen flankiert. Das *Neomycin*-Resistenz-Gen ermöglicht die Selektion auf stabile Integration des Vektors in ES-Zellen. Die *Cre*-Rekombinase erkennt die *loxP*-Sequenzen und entfernt durch Rekombination die DNA-Fragmente, die zwischen zwei *loxP*-Sequenzen lokalisiert sind (Sauer und Henderson, 1990). Da die *Cre*-Rekombinase in der Testis exprimiert wird, deletiert sich die Kasette selbst, wenn das Allel über die männliche Keimbahn an die Nachkommen vererbt wird.

3.3.2.3 Konstruktion des konditionalen *c-Maf*-Allels

Der „Targeting“-Vektor $pc-Maf^{fllox}$ für die Herstellung eines konditionalen *c-Maf*-Allels wurde ähnlich dem $pc-Maf^{LacZ}$ -Vektor mithilfe der homologen Rekombination in Bakterien generiert (Abb. 3.3.2B).

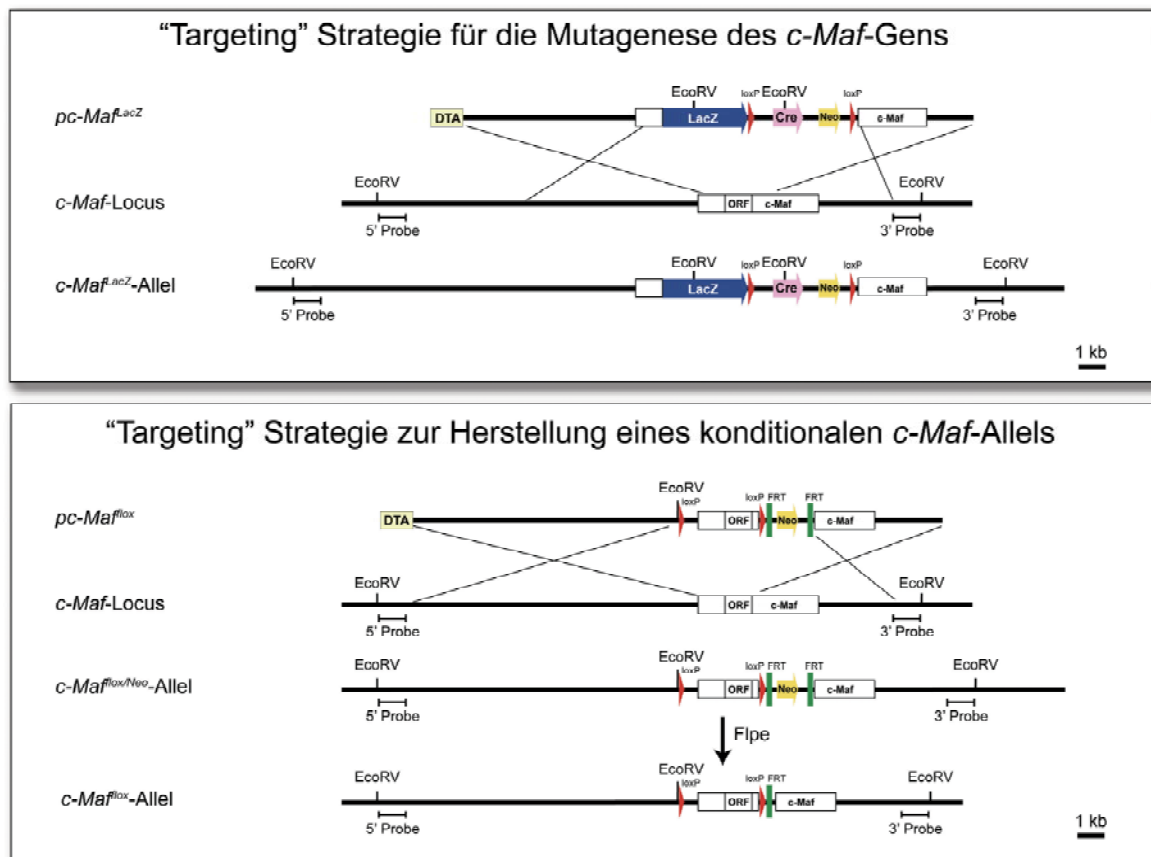


Abb. 3.3.2 (A,B). Strategie zur Mutagenese des *c-Maf*-Gens. (A) Herstellung des *c-Maf*-Reporter-Allels. Schematische Darstellung des „Targeting“-Vektors, der genomischen Struktur des Wildtyp *c-Maf*-Locus sowie des mutierten *c-Maf*-Allels. Zusätzlich zur *c-Maf*-kodierenden Sequenz sind die *LacZ*-kodierende Sequenz (blau), die *loxP*-Sequenzen (rot), das *Cre* Rekombinase-Gen (rosa), die *Neomycin*-Kassette (gelb) und die *DT-A*-Kassette (beige) eingezeichnet. (B) Schema des „Targeting“-Vektors zur konditionalen Mutagenese des *c-Maf*-Gens. Der „Targeting“-Vektor, die genomische Struktur des Wildtyp *c-Maf*-Locus, das Allel nach homologer Rekombination und das mutierte *c-Maf*-Allel sind dargestellt. Der *c-Maf*-Locus sowie die *loxP*-Sequenzen (rot), die *FRT*-Sequenzen (grün), die *Neomycin*-Kassette (gelb) und die *DT-A*-Kassette (beige) sind eingezeichnet. (A,B) Die Lage der für die Southern-Analyse verwendeten Sonden und Restriktionsenzyme sind eingezeichnet.

Hierfür kamen zwei Kassetten zum Einsatz, die vor und hinter der kodierenden Sequenz von *c-Maf* in evolutionär wenig konservierte Bereiche eingeführt wurden. Demnach enthielt der Vektor pc-Maf^{fllox} im 5'-Bereich des offenen Leserasters von *c-Maf* eine loxP-Stelle und im 3'-Bereich des offenen Leserasters eine FRT-Neomycin-FRT-loxP-Kassette (Abb. 3.3.2B). Zusätzlich wurde eine *EcoRV* Schnittstelle nah der 5'-loxP-Sequenz eingeführt, die für die Southern-Blot-Analyse der ES-Zell-Klone benötigt wird. Im mutierten *c-Maf*^{fllox}-Allel wird die kodierende *c-Maf*-Sequenz von zwei loxP-Sequenzen flankiert und kann mittels Cre-Rekombinase-vermittelter Sequenz-spezifischer Rekombination im Zielgewebe deletiert werden.

3.3.3 Mutation des *c-Maf*-Gens in ES-Zellen

Die „Targeting“-Vektoren wurden linearisiert und durch Elektroporation in ES-Zellen der Linie 129/Ola eingebracht. Nach Selektion auf Neomycin wurden resistente ES-Zellklone vereinzelt, expandiert und mittels Southern-Blot-Analyse auf homologe Rekombination überprüft. Für die Southern-Blot-Analyse wurde die 3'-*c-Maf*-Sonde verwendet. Homolog rekombinierte Klone wurden expandiert und die Integrität des *c-Maf*-Allels durch Hybridisierungen mit mehreren Sonden (3'-, 5'- und einer internen DNA-Sonde Neomycin-DNA) überprüft. Exemplarisch sind in der Abbildung 3.3.3 die Ergebnisse der Analyse mittels 3'-Sonde dargestellt. Im Falle des *c-Maf*^{fllox}-Allels wurde anschließend die Flp-Rekombinase in Zellen von drei Klonen transient exprimiert, um die Neomycin-Resistenzkassette zu entfernen. Die transfizierten ES-Zellen wurden vereinzelt, Einzelkolonien expandiert und auf Flp-Rekombination überprüft (Abb. 3.3.3B).

Drei der verifizierten ES-Zellklone wurden in Blastozysten injiziert und die Blastozysten anschließend in scheinchwangere Weibchen des Stammes CB6F1 eingebracht. Von den injizierten Klonen wurden chimäre Mäuse geboren. Mehrere männliche Tiere beider Klone gaben die Mutation an ihre Nachkommen (F1) weiter und wurden zur Etablierung der *c-Maf*-Stämme verwendet. Die Genotypen der Nachkommen wurden mittels PCR und Southern-Blot-Analyse bestimmt.

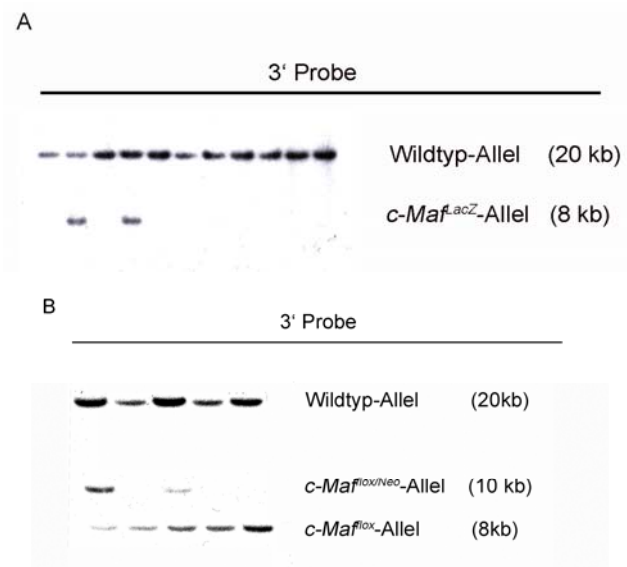


Abb. 3.3.3 Southern-Blot-Analyse von ES-Zell-DNA nach *EcoRV*-Restriktionsverdau. Die Hybridisierung wurde mit der 3'-Sonde (siehe Abb. 3.3.2) durchgeführt. (A) ES-Zellklone nach der Transformation mit dem Vektor pc-Maf^{LacZ}. Homolog rekombinierte Klone sind an der zweiten (~8kb) großen Bande zu erkennen, die dem mutierten *c-Maf*-Allel entspricht. In (B) sind ES-Zellklone des Vektors pc-Maf^{lox} nach der Expression der FLP-Rekombinase dargestellt. Das Wildtyp-Allel zeigt eine 20 kb große Bande, während das *c-Maf*^{lox}-Allel mit Neomycin-Kassette eine 10 kb große Bande aufweist und das Allel ohne Neomycin-Kassette eine 8 kb große Bande zeigt.

3.3.4 Phänotypische Analyse der *c-Maf*-Mutation

Die β -Galaktosidase-Expression des *c-Maf*^{LacZ}-Allels im Rückenmark wurde unter anderem durch immunhistochemische Analysen überprüft. Die Generierung von Antikörpern gegen MafA, MafB und c-Maf ermöglicht eine detaillierte Untersuchung der Expression dieser Mitglieder der *Maf*-Genfamilie im Rückenmark. Die Abbildung 3.3.4 zeigt, dass β -Galaktosidase und MafA im dorsalen Rückenmark nicht ausschließlich kolo-kalisiert sind, und überdies c-maf und MafA in Zellen unterschiedlicher Laminae exprimiert werden. Die weitere phänotypische Analyse der *c-Maf*-Mutation war nicht Bestandteil dieser Promotion.

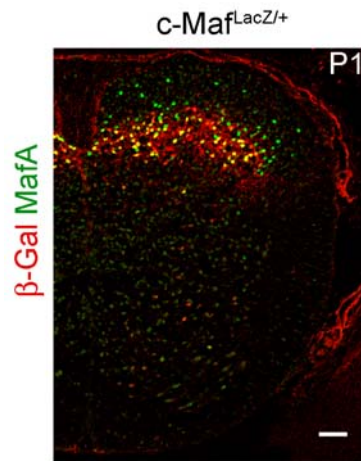


Abb. 3.3.4. β -Galaktosidase-Expression des *c-Maf*-Reporter-Allels im Rückenmark. Immunhistochemische Untersuchung von β -Galaktosidase (rot) und MafA (grün) auf transversalen Schnitten eines *c-Maf*^{LacZ/+}-Embryos (P1). Balken: 50 μ m. Bild: Hagen Wende.