

**Die Rolle des Met-Signalübertragungssystems  
bei der  
Muskelentwicklung in der Maus**

Im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin eingereichte Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von

**Michael Strehle**

aus Krumbach (Schwaben)

2004

1. Gutachterin: Prof. Dr. Carmen Birchmeier
2. Gutachter: Prof. Dr. Fritz Rathjen

Disputation am: 23.11.2004

## **Danksagung**

Frau Prof Dr. Carmen Birchmeier danke ich für die Ermöglichung und Betreuung dieser Arbeit und für ihre Unterstützung durch alle Höhen und Tiefen des Projektes.

Herrn Prof. Dr. Fritz Rathjen, Max-Delbrück-Centrum Berlin, danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ausdrücklich möchte ich mich bei Dr. Henning Brohmann für seinen Rat und seine Hilfe bei der Analyse der *Gab1/Met* Mutanten bedanken, bei Dr. Stefan Britsch für seine Ratschläge hinsichtlich *in situ*-Techniken und bei Dr. Ursula Gaio für das Vergnügen, zusammen mit ihr das „Mäusemachen“ von der Pike auf erlernen zu dürfen.

Ein besonderer Dank gilt unseren Technischen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern, die mir durch viele größere und kleinere Hilfestellungen den Laboralltag doch erheblich leichter gemacht haben.

Allen übrigen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit und die ausgesprochen freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die ich in der Arbeitsgruppe erleben durfte.

Und nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Bruder für die Unterstützung und das Interesse bedanken, die sie meiner wissenschaftlichen Arbeit über die Jahre haben zuteil werden lassen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Der <i>Met</i>-Rezeptor und sein Ligand <i>HGF/SF</i> .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Struktur .....	1
1.1.2	Signaltransduktion am <i>Met</i> -Rezeptor .....	3
1.2	<b>Das Adaptorprotein <i>Gab1</i> .....</b>	<b>5</b>
1.3	<b>Das <i>Met</i>-Signalsystem in der Embryonalentwicklung und im adultem Organismus.....</b>	<b>6</b>
1.4	<b>Met und HGF/SF in menschlichen Erkrankungen .....</b>	<b>7</b>
1.5	<b>Entwicklung der Skelettmuskulatur in Wirbeltieren .....</b>	<b>9</b>
1.6	<b>Konditionelles Gene-Targeting .....</b>	<b>12</b>
1.7	<b>Ziel der vorliegenden Arbeit .....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
2.1	<b>Material .....</b>	<b>15</b>
2.1.1	Bakterienstämme .....	15
2.1.2	Vektoren.....	15
2.1.3	Antikörper .....	16
2.1.4	Genomische Klone .....	16
2.1.5	ES Zelllinien.....	16
2.1.6	Mausstämme .....	16
2.1.7	Nährmedien .....	17
2.1.8	Zellkulturmedien .....	17
2.2	<b>Methoden .....</b>	<b>18</b>
2.2.1	Isolierung von Desoxyribonukleinsäuren .....	18
2.2.1.1	Präparation von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten .....	18
2.2.1.2	Isolierung genomischer DNA aus ES-Zellen .....	18
2.2.1.3	Isolierung genomischer DNA aus embryonalem Gewebe, Ohrlöchern bzw. Schwanzstücken .....	19
2.2.2	Restriktionsverdau von Desoxyribonukleinsäuren und Transformation kompetenter Bakterien.....	19
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	19
2.2.4	Sequenzierung .....	23
2.2.5	Radioaktive Markierung von Desoxyribonukleinsäuren .....	24
2.2.6	Synthese Digoxigenin-markierter in vitro-Transkripte .....	24
2.2.7	Southern-Hybridisierung .....	24
2.2.8	Zellkultur.....	25
2.2.8.1	Präparation und Kultur primärer embryonaler Fibroblasten.....	25
2.2.8.2	Kultur, Transfektion und Selektion embryonaler Stammzellen.....	26
2.2.9	Etablierung von "Knockout"-Mäusen.....	27
2.2.9.1	Superovulation und Isolierung von Blastozysten.....	28
2.2.9.2	Injektion embryonaler Stammzellen in Blastozysten .....	28
2.2.9.3	Uterustransfer von Blastozysten.....	29
2.2.10	Histologische Methoden .....	29
2.2.10.1	Herstellung von Gefrierschnitten.....	29
2.2.10.2	Histologische Färbung für $\beta$ -Galaktosidase .....	30
2.2.10.3	Histologische Färbung für Alkalische Phosphatase .....	30
2.2.10.4	Immunhistologie auf Gewebeschnitten.....	31
2.2.10.5	Detektion von Zellproliferation und Apoptosen.....	31

2.2.10.6	Herstellung von Vibratomschnitten .....	32
2.2.11	<i>In situ</i> -Hybridisierung.....	32
2.2.11.1	Whole Mount <i>in situ</i> -Hybridisierung .....	32
2.2.11.2	Präparation von Embryo-Pulver .....	34
2.2.12	Proteinchemische Methoden .....	34
2.2.12.1	Herstellung von Gewebehomogenisaten für den Proteinnachweis	34
2.2.12.2	Immunopräzipitation aus Gewebelysat.....	35
2.2.12.3	Bestimmung des Proteingehalts.....	35
2.2.12.4	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von Proteinen.....	35
2.2.12.5	Western-Blotting-Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembran .....	36
2.2.12.6	Immunodetektion von Proteinen auf Nitrocellulosemembran .....	36
2.2.12.7	Kinase-Assay .....	36
<b>2.3</b>	<b>Konstruktion der Targeting Vektoren .....</b>	<b>37</b>
2.3.1	Konstruktion des $met^{flox}$ -Allels.....	37
2.3.2	Konstruktion des <i>otx1Cre</i> -Allels.....	39
2.3.2.1	Isolierung des genomischen <i>otx1</i> -Lokus .....	39
2.3.2.2	Mutagenese des PGKCrebpA Vektors .....	39
2.3.2.3	Klonierung des <i>otx1Cre</i> -Targeting-Vektors .....	40
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>42</b>
<b>3.1</b>	<b>Konditionelle Mutagenese des <i>Met</i>-Gens.....</b>	<b>42</b>
3.1.1	Klonierung des $met^{flox}$ Targeting-Vektors.....	42
3.1.2	Homologe Rekombination des $met^{flox}$ Targeting-Vektors in embryonalen Stammzellen und Etablierung der $met^{floxneo}$ Mauslinie .....	45
3.1.3	Vorversuche zu Aktivität und induzierter Inaktivierung des $met^{floxneo}$ - Allels.....	45
3.1.4	Phänotyp des $met^{floxneo}$ -Allels .....	47
3.1.5	Entfernung der Neomycin-Resistenzkassette aus dem $met^{floxneo}$ Locus ..	47
3.1.6	Phänotyp des $met^{flox}$ -Allels .....	48
<b>3.2</b>	<b>Funktion von <i>Met</i> in der Entwicklung migratorischer Muskelvorläuferzellen.....</b>	<b>49</b>
3.2.1	Delamination von Muskelvorläuferzellen in Mutanten des <i>Met</i> - Signalsystems .....	50
3.2.2	Defekte in der Myogenese bei <i>Gab1</i> <sup>-/-</sup> / <i>Met</i> <sup>+/-</sup> Embryonen.....	51
3.2.3	Schicksal der Muskelvorläuferzellen in <i>Gab1</i> <sup>-/-</sup> / <i>Met</i> <sup>+/-</sup> Doppelmutanten .....	52
<b>3.3</b>	<b>Konstruktion des <i>otx1Cre</i>-Transgens.....</b>	<b>56</b>
3.3.1	Isolierung des genomischen <i>otx1</i> -Lokus .....	58
3.3.2	Mutagenese des PGKCrebpA Vektors .....	58
3.3.3	Klonierung des <i>otx1Cre</i> Targeting-Vektors.....	59
3.3.4	Homologe Rekombination des <i>otx1Cre</i> Targeting-Vektors in embryonalen Stammzellen und Etablierung der transgenen Mauslinie .	59
3.3.5	Überprüfung der Cre-Rekombinaseaktivität <i>in vivo</i> durch Reporterallel60	
3.3.6	Einkreuzen eines optimierten F <sub>1</sub> p-Deleter Allels .....	61
3.3.7	Analyse der Cre-Rekombinaseaktivität <i>in vivo</i> durch Reporterallele ....	61

---

<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>64</b>
4.1	Etablierung des konditionellen $met^{flax}$ Allels .....	64
4.2	Rolle des <i>Met</i> -Signalsystems in der Wanderung von Muskelvorläuferzellen .....	67
4.3	Etablierung des <i>otx1Cre</i> Transgens .....	72
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>78</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

AP	Alkalische Phosphatase
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
BrdU	5-Brom-2'-desoxy-Uridin
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	Aqua bidestillata
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Embryonalstadium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis (β-Aminoethyläther)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ERK	"Extracellular-Signal-Regulated Kinase"
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
F	Farad
FCS	Fötales Kälberserum
G418	Geneticin
Gab1	"Grb2-Associated Binding Protein 1"
Grb2	"Growth-Factor-Receptor-Bound Protein 2"
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LIF	"Leukemia Inhibitory Factor"
M	Molar
mA	Milliampère

---

MAPK	"Mitogen Activated Protein Kinase"
mCi	Millicurie
MDCK	"Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells"
MEM	"Modified Eagle Medium"
mM	Millimolar
$\mu$ M	Mikromolar
mRNA	"Messenger" Ribonukleinsäure
NaAc	Natriumacetat
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NH <sub>4</sub> Ac	Ammoniumacetat
PAK-1	"p21-Activated Protein Kinase 1"
PCR	"Polymerase Chain Reaction"
PBS	"Phosphate Buffered Saline"
p.c.	post coitum
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potentium hydrogenii</i>
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	"rotations per minute"
RT	Raumtemperatur
Shp2	"SH2-Domain-Containing Protein Tyrosine Phosphatase 2"
SSC	"Standard Saline Citrate"
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	"Tris Buffered Saline"
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
U	"unit" (= Enzymeinheit)
UTP	Uraciltriphosphat
V	Volt
Vol.	Volumen
W	Watt
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid