

2 Material und Methoden

2.1 Material

Alle Chemikalien, Enzyme, Oligonukleotide oder Antikörper stammten, sofern nicht anders vermerkt, von folgenden Unternehmen: Amersham-Pharmacia (Freiburg), Bio-Rad (München), Biotex (Berlin), Biozym (Hess. Oldendorf), Dianova (Hamburg), Gibco/BRL (Karlsruhe), Heraeus-Kulzer (Wehrheim), Invitex (Berlin), MBI-Fermentas (St.Leon-Rot), Merck (Darmstadt), MWG-Biotech (Ebersberg), New England Biolabs (Frankfurt), Pan-Biotech (Aidenbach), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Shandon (Frankfurt), Sigma (Deisenhofen).

2.1.1 Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRF'	(Jerpseth et al., 1992)
<i>Escherichia coli</i> SCS110	Stratagene, La Jolla
<i>Escherichia coli</i> NS3529	(Sternberg und Cohen, 1989)
<i>Escherichia coli</i> NS3516	(Sternberg und Cohen, 1989)

2.1.2 Vektoren

pADSacBII	(Sternberg und Cohen, 1989)
pBluescript-SK II (+/-)	(Sorge, 1988)
pGEM-T bzw. pGEM-T Easy	Promega, Mannheim
pMCS5	MoBiTec, Göttingen
pNASSβ	(MacGregor und Caskey, 1989)
pTV-flox	Riethmacher, MDC Berlin
pGEMFlppGKneo	(Fiering et al., 1995)
phACTB::Flp	(Dymecki, 1996b)
pIC Cre	(Gu et al., 1994)

2.1.3 Antikörper

anti-BrdU (Klon BU-33)	Sigma , Deisenhofen
anti-Maus-Lbx1 (polyklonal, Meerschweinchen)	T. Müller, MDC Berlin
anti-human-Met (Klon C-12)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anti-MyoD (M-318)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anti-Myosin (Klon MY-32)	Sigma, Deisenhofen

2.1.4 Genomische Klone

Als Ausgangsmaterial für den met^{fllox} -Targeting-Vektor wurden die *Met* Subklone λ 2.2M2 und λ 2.2M6.9 von Lambdaphagenklonen aus einer genomischen Bank des Mausstammes SV129/Ola benutzt (Bladt et al., 1995). Die Konstruktion des met^{fllox} -Targeting Vektors ist in 2.3.1 beschrieben.

Zur Isolierung der genomischen *otx1* DNA-Klone wurden zunächst die Bedingungen für eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) etabliert (siehe 2.2.3), welche die Amplifikation von genomischer *otx1*-DNA gestattete. Hiermit identifizierte die Firma Genome Systems Inc. (St. Louis, MO, USA) als Auftragsarbeit zwei Klone in ihrer *P1*-Phagen-Bibliothek (P1 ES 129/Ola; Sternberg und Cohen, 1989). Die Konstruktion des *otx1Cre*-Targeting Vektors ist in 2.3.2 beschrieben.

2.1.5 ES Zelllinien

In der Zellkultur wurde für das met^{fllox} -Allel die embryonale Stammzelllinie E14.1 eingesetzt, die aus einer männlichen 129/Ola Maus-Blastozyste stammt (Kuhn et al., 1991). Für das *otx1Cre*-Allel wurde die 129/SV ES-Zelllinie R1 verwendet (Nagy et al., 1993).

2.1.6 Mausstämme

Die verwendeten C57Bl/6J-Mäuse stammten aus eigener Zucht bzw. wurden wie die CB6F1-Mäuse (F1-Hybrid aus BALB/c x C57Bl/6N) von Charles River (Sulzfeld) oder Bomholtgard (jetzt: M&B A/S, Ry, Dänemark) bezogen.

Der Mx-Cre Stamm wurde von R. Kühn (Universität Köln) zu Verfügung gestellt. Die Flp-Deleter Mäuse stammten von S. Dymecki (Carnegie Institution, Baltimore), die FLPe-Deleter Mäuse von F. Stewart (MPI für Molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden). Der Z/AP Reporterstamm wurde von A. Nagy (MSHRI, Toronto) erhalten, der Indikator-Reporterstamm von H. von Melchner (Universität Frankfurt).

Die Met- und Gab1-Knock-out-Stämme wurden in den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Carmen Birchmeier bzw. Prof. Dr. Walther Birchmeier (Max-Delbrück-Centrum, Berlin) hergestellt.

2.1.7 Nährmedien

Medien und Platten für Anzucht und Kultivierung der *Escherichia coli*-Stämme wurden gemäß Standardprotokollen verwendet (Sambrook und Russell, 2001). Die Konzentration von Ampicillin oder Carbenicillin in Agar und Medien betrug 100µg/ml.

2.1.8 Zellkulturmedien

Fibroblasten-Medium:	500ml	Dulbecco's MEM mit Glutamax-I, 4500mg/l Glucose, mit Pyridoxin, Natriumpyruvat (Gibco BRL)
	60ml	FCS (zuvor 30min bei 55°C inaktiviert, Sigma)
	5,7ml	100x nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco BRL)
	5,7ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000u/ml Penicillin G/10000µg/ml Streptomycin; Gibco BRL)
	1,2ml	50mM β-Mercaptoethanol (Gibco BRL)
ES-Zell-Medium:	500ml	DMEM/Glutamax (siehe oben, Gibco BRL)
	90ml	FCS (zuvor 30min bei 55°C inaktiviert, Sigma)
	6ml	nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco BRL)
	6ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung (Gibco BRL)
	1,2ml	β-Mercaptoethanol (Gibco BRL)
	60µl	LIF ("Leukemia Inhibitory Factor")

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von Desoxyribonukleinsäuren

2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten

Die Mini-Präparationen von Plasmid-DNA erfolgten durch Alkalische Lyse (Birnboim und Doly, 1979). In größerem Maßstab wurde die Isolierung mit dem Plasmid-Maxi-Präparations-Kit der Firma Qiagen durchgeführt (Qiagen, Hilden).

Die präparative Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Elektroelution (McDonell et al., 1977) bzw. mit Hilfe des "QIAEX II Gel Extraction Kit" (Qiagen, Hilden; (Vogelstein und Gillespie, 1979).

2.2.1.2 Isolierung genomischer DNA aus ES-Zellen

Für den Nachweis von homologer Rekombination in embryonalen Stammzell- (= ES-Zell-) Klonen mittels Southern-Hybridisierung wurde die genomische DNA nach (RAMIREZ-SOLIS ET AL., 1992) präpariert. Die auf gelatinisierten 96 Loch-Platten konfluenten ES-Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 50µl ES-Zell-Lyse-Puffer/Well (10mM Tris pH 7,5, 10mM EDTA, 10mM NaCl, 0,5% N-Lauroylsarcosin (= „Sarcosyl“), 200µg/ml Proteinase K) bei 60°C in einer mit Parafilm abgedichteten Feuchtkammer über Nacht inkubiert. Nach Zugabe von 100µl eiskaltem 100% Ethanol mit $\frac{1}{20}$ Vol. 3M Natriumacetat/Loch wurde die DNA für 30 Minuten bei Raumtemperatur gefällt. Anschließend wurden die Überstände abgegossen, die DNA dreimal mit 70% Ethanol gewaschen und für etwa 20min leicht luftgetrocknet, bevor der Restriktionsverdau in 50µl Restriktionsmix (1x Restriktionspuffer, 100µg/ml BSA, 50µg/ml RNase, 10 - 15u Restriktionsenzym) bei 37°C über Nacht unter leichtem Schütteln erfolgte. Die Hälfte dieses Ansatzes wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und das Gel zur Southern-Hybridisierung eingesetzt.

2.2.1.3 Isolierung genomischer DNA aus embryonalem Gewebe, Ohrlöchern bzw. Schwanzstücken

Dottersäcke oder andere embryonale Gewebe bis zum Stadium E14,5 der Embryogenese wurden in Embryonen-Lyse-Puffer (10mM Tris pH 8,9, 50mM KCl, 3mM MgCl₂, 0,01% Gelatine, 0,45% Nonidet P40, 0,45% Tween 20, 100µg/ml Proteinase K), Ohrlöcher und Schwanzstücke junger oder adulter Mäuse dagegen in Ohr-/Schwanz-Lyse-Puffer (100mM Tris pH 8,5, 200mM NaCl, 5mM EDTA, 0,2% SDS, 100µg/ml Proteinase K) für 1h oder über Nacht bei 55°C inkubiert. Darauf erfolgte die Inaktivierung der Proteinase K für 10min bei 95°C. Nach Zugabe von 300µl H₂O wurde je 1µl dieser verdünnten Lösung für die Genotypisierung in einer PCR-Reaktion eingesetzt.

Die DNA aus Schwanzstücken wurde für die genomische Southern-Analyse präpariert und daher Phenol/Chloroform-extrahiert. Nach Fällung und Waschen der DNA wurde das Präzipitat in 100µl H₂O/50µg/ml RNase A aufgenommen.

2.2.2 Restriktionsverdau von Desoxyribonukleinsäuren und Transformation kompetenter Bakterien

Restriktionsverdau von Plasmid- und genomischer DNA wurden mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen gemäß Standardmethoden durchgeführt (Berger und Kimmel, 1987; Sambrook und Russell, 2001).

Die Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien erfolgte nach Inoue et. al., 1990.

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al., 1985) wurde zur Genotypisierung von präparierten Maus-Embryonen bzw. Jungtieren aus der Nachzucht eingesetzt. Die Etablierung der verwendeten PCR-Programme erfolgte dabei in Anlehnung an Standard-PCR-Methoden (Innis et al., 1989). Hier die Liste der verwendeten Genotypisierungs-PCR-Programme inklusive der eingesetzten Primer und MgCl₂-Konzentrationen:

1. otx1

a) Primer, 3mM MgCl₂

otxu: 5'-AAGCCGGCCGGTCAAGAAGAAG-3'

otxl: 5'-GTGCGGGTGGTGTGATGAGAGTGC-3'

b) Programm

95°C	2min	} 30x
95°C	30s	
70°C	30s	
4°C	∞	

c) Produkt

490bp

2. lacZ

a) Primer, 3mM MgCl₂

lacZ-a: 5'-TCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATG-3'

lacZ-b: 5'-ATATCCTGATCTTCCAGATAACTGCCG-3'

b) Programm

94°C	35s	} 38x
65°C	30s	
72°C	45s	
.....+2s/Zyklus		
4°C	∞	

c) Produkt

463bp

3. FlpE Deleter

a) Primer, 4mM MgCl₂

81L: 5'-CCCGCAGAGGTATATTGTGTTGTCC-3'

82W: 5'-CTGTTCTGATACACCTGTTGGCAC-3'

b) Programm

94°C	45s	} 40x
70°C	30s	
72°C	15s	
.....+1s/Zyklus		
4°C	∞	

c) Produkte

600 bp

4. Met

a) Wildtyp-Primer, 3mM MgCl₂

Wmet8S: 5'-CTTTTCAATAGGGCATTGGCTGTG-3'

Wmet10: 5'-GTACACTGGCTTGTACAATGTACAGTTG-3'

b) Mutante-Primer, 4mM MgCl₂

Wmet5: 5'-CACTGAGCCCAGAAGAGCTAGTGG-3'

neo1L: 5'-CCTGCGTGCAATCCATCTTGTTC AATG-3'

c) Programm

94°C	45s	} 40x (Wildtyp), 35x (Mutante)
70°C	30s	
72°C	30s	
.....+1s/Zyklus		
4°C	∞	

d) Produkte

Wildtyp: 520bp

Mutante: 310bp

5. met^{flax}a) Primer, 1,5mM MgCl₂

metmut1: 5'-AGTGGAAGCAAGCAGTCTC-3'

metmut2: 5'-TCTGGAAAAGTAGCTCTGTAG-3'

b) Programm

95°C	2min	} 35x
95°C	30s	
60°C	30s	
72°C	30s	
4°C	∞	

c) Produkte

Wildtyp: 440bp

Mutante: 302bp

6. Gab1

a) Wildtyp-Primer, 2mM MgCl₂

Gab-Wt1: 5'-CCCTTTGTGGATGGCTTCTTTGT-3'

Gab-Wt2: 5'-TTCTTGGCATGATCGTTTTTGTA-3'

b) Mutante-Primer, 2mM MgCl₂

Gab-Wt1: 5'-CCCTTTGTGGATGGCTTCTTTGT-3'

NLS-as2: 5'-TTGTTTTTCGAGCTTCAAGGTTTCAT-3'

Wildtyp- und Mutante-Primer wurden in einer kombinierten PCR-Reaktion eingesetzt.

c) Programm

95°C	2,30min	} 40x
95°C	30s	
60°C	30s	
72°C	40s	
4°C	∞	

d) Produkte

Wildtyp: 336bp

Mutante: 280bp

7. Cre

a) Primer, 1,5mM MgCl₂

cre1: 5'-TAATCGCCATCTTCCAGCAG-3'

cre2: 5'-CAATTTACTGACCGTACAC-3'

b) Programm

94°C	2min	
94°C	45s	} 35x
58°C	45s	
72°C	2min	
4°C	∞	

c) Produkt

1032bp

8. Neomycin-Resistenzgen

a) Primer, 1,5mM MgCl₂

neo19: 5'-GGCGCGGTCCCAGGTCCAC-3'

neo23: 5'-CTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCC-3'

b) Programm

95°C	2min	
94°C	45s	} 35x
66°C	30s	
72°C	30s	
4°C	∞	

c) Produkt

373bp

2.2.4 Sequenzierung

Sequenzierungen erfolgten nach dem Kettenabbruchverfahren (Sanger et. al., 1977, modifiziert von Tabor und Richardson, 1987) mit dem "Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing"-Kit der Firma Amersham. Neben fluoreszenzmarkierten sequenzspezifischen Primern kamen Standard-Sequenzier-Oligonukleotide (MWG-Biotech) bei der PCR in folgendem Sequenzier-Programm zum Einsatz:

Sequenzier-Programm

95°C	3min	
95°C	35s	} 30x
53°C	35s	
70°C	1min	
95°C	3min	

Die Reaktionen wurden auf 6% Sequagel XR-Sequenziergelen (Biozym) in 1x TBE-Laufpuffer mit Hilfe des Li-Cor-Sequenzierautomaten (Model 4000L bzw. 4200, MWG-Biotech) bei 1500V, 37mA, 50W, 50°C analysiert.

2.2.5 Radioaktive Markierung von Desoxyribonukleinsäuren

Zur Southern-Hybridisierung wurden die DNA-Proben mit Hilfe des "Prime-It RmT Random Primer Labeling Kits" (Stratagene) durch Einbau von α -³²P-dCTP radioaktiv markiert (Feinberg und Vogelstein, 1983). Die Proben wurden mit Sephadex G50-Mikrosäulen (Probe Quant G50, Amersham-Pharmacia) aufgereinigt und vor Beginn der Hybridisierung denaturiert.

2.2.6 Synthese Digoxigenin-markierter *in vitro*-Transkripte

Für die Whole Mount *in situ*-Hybridisierung wurden Digoxigenin-markierte *in vitro*-Transkripte eingesetzt. Zunächst wurde die Plasmid-Matrize zur Transkriptbegrenzung linearisiert und danach Phenol/Chloroform-extrahiert, gefällt, gewaschen, getrocknet und in ddH₂O aufgenommen. Danach erfolgte die *in vitro*-Transkription mit Hilfe des „DIG-RNA-Labeling-Kits“ der Firma Roche.

2.2.7 Southern-Hybridisierung

DNA wurde gemäß Standard-Methoden auf Nylonmembranen (Hybond-N, Amersham-Pharmacia) transferiert (Sambrook und Russell, 2001; Southern, 1975). Bei sehr großen

Fragmenten (> 8kb), wurde dabei vor dem Denaturieren ein Depurinierungsschritt mit 0,2M HCl für 10 min gesetzt.

Die Vorhybridisierung erfolgte gemäß eines nach (Denhardt, 1966) modifizierten Verfahrens in 5x SSC, 5x Denhardt's, 0,5%SDS und 100µg/ml denaturierter Lachsspermien-DNA für 2h bei 65°C in einem Rollerofen (Biometra). Die Hybridisierung wurde daraufhin bei gleicher Temperatur durchgeführt. Nach 16-24h Hybridisierung wurde die Membran aufeinanderfolgend zweimal mit 2x SSC für je 5min und je einmal mit 1x SSC/0,1% SDS und 0,1x SSC/0,1% SDS für jeweils 30 min bei Hybridisierungstemperatur gewaschen. Abschließend wurde die Membran auf einem Röntgenfilm (Kodak Biomax MR) bei -80°C exponiert oder mit Hilfe des "Phospho-Imagers" (Fujix, BAS 2000, Raytest Isotopenmeßgeräte, Straubenhardt) entwickelt.

2.2.8 Zellkultur

2.2.8.1 Präparation und Kultur primärer embryonaler Fibroblasten

Primäre embryonale Fibroblasten ("Feeder-Zellen") wurden aus Embryonen präpariert, die aus Kreuzungen von Wildtyp-Tieren mit transgenen Neomycin-homozygoten Mäusen stammten (Joyner, 1999). Diese Neomycin-resistenten Fibroblasten bilden die ideale Matrix für das Wachstum embryonaler Stammzellen.

Maus-Embryonen der Stadien E13,5 - E16,5 wurden steril entnommen, Kopf, Leber und innere Organe entfernt und die übrigen Gewebe mehrfach in PBS⁺⁺ (1,47mM KH₂PO₄, 8,1mM Na₂HPO₄, 137mM NaCl, 2,68mM KCl, 0,9mM CaCl₂, 0,5mM MgCl₂, pH 7,2) gewaschen. Anschließend wurden die Gewebe weiter zerkleinert und durch ein Sieb in einen mit Glasperlen gefüllten Erlenmeyerkolben gepreßt. Gleichzeitig erfolgte die Zugabe von 50ml 0,05% Trypsin/0,02% EDTA- sowie einiger Tropfen DNase-Lösung und die Inkubation der Zellsuspension unter Rühren für 30min bei 37°C. Daraufhin wurde erneut 50ml Trypsin/EDTA-Lösung hinzugegeben, die Inkubation fortgesetzt und dieser Vorgang wiederholt. Nach Dekantieren der Glasperlen wurde die Zellsuspension bei 1500rpm für 5min abzentrifugiert. Die Präzipitate wurden zweimal mit PBS⁺⁺ gewaschen, und in 5ml PBS (1,47mM KH₂PO₄, 8,1mM Na₂HPO₄, 137mM

NaCl, 2,68mM KCl, pH 7,2) resuspendiert. Im Anschluß daran erfolgte das Ausplattieren in Fibroblasten-Medium mit einer Dichte von $5 \cdot 10^6$ Zellen/150mm Schale. Nach zwei bis drei Tagen konnten die konfluent gewachsenen Fibroblasten eingefroren werden.

Dazu wurden die abzentrifugierten Zellen in kaltem Einfriermedium A (ES-Zell-Medium/50% FCS) resuspendiert, langsam das gleiche Volumen kaltes Einfriermedium B (ES-Zell-Medium/20% DMSO) hinzugegeben und die Suspension auf Kryoröhrchen (Nalgene) aufgeteilt. Der Einfrierprozess wurde langsam bei -20°C für mehrere Stunden begonnen und die Röhrchen daraufhin kurzfristig bei -70°C oder aber für längere Zeit in flüssigem Stickstoff gelagert.

Das Auftauen der Zellen erfolgte dagegen durch schnelles Erwärmen bei 37°C . Zu den Zellen wurden langsam Fibroblasten-Medium hinzugegeben, gemischt und die Suspension bei 1100rpm, 4°C abzentrifugiert. Die Zellpräzipitate wurden wiederum in Fibroblasten-Medium aufgenommen und ausplattiert.

Die Fibroblasten mußten vor der Kultur mit ES-Zellen wachstumsinaktiviert werden. Dazu wurde zu 10ml Medienvolumen/150mm Schale $100\mu\text{l}$ Mitomycin C-Lösung hinzupipettiert (1mg/ml Mitomycin C in PBS, 5% DMSO, Sigma). Nach 2h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und auf neue Zellkulturschalen transferiert. Die wachstumsinaktivierten Fibroblasten konnten etwa zwei bis drei Wochen in Kultur gehalten werden.

2.2.8.2 Kultur, Transfektion und Selektion embryonaler Stammzellen

Nach schnellem Auftauen wurden die ES-Zellen sorgfältig vereinzelt in ES-Zell-Medium aufgenommen und ihrer Anzahl entsprechend auf Fibroblasten in 35 oder 60mm Schalen kultiviert. Dieses Medium wurde jeden Tag gewechselt und die Zellen bei Erreichen einer geeigneten Dichte (viele einzelne Zellklone, jedoch keine Konfluenz) auf 100mm Schalen kultiviert.

Für die Transfektion wurden $1 \cdot 10^7$ ES-Zellen/ $800\mu\text{l}$ in PBS eingesetzt, in einer Elektroporationsküvette (Gene-Pulser Küvette 0,4cm, Bio-Rad, München) mit 20-25 μg linearisiertem Targeting-Vektor gemischt und bei 300V, 1200 μF mit einem Impuls von 2ms elektroporiert (L. Fischer, Heidelberg). Im Anschluß wurden die ES-Zellen in der Küvette resuspendiert und direkt auf vier dicht mit Fibroblasten bewachsenen 100mm Schalen ausplattiert.

Am zweiten Tag nach der Elektroporation wurde die Selektion auf homolog rekombinante ES-Zellklone mit Hilfe von 400µg/ml Geneticin (= G418) in ES-Zell-Medium begonnen. Ab dem vierten Tag wurde zusätzlich mit 2µM Gancyclovir doppelselektioniert. Die resistenten Zellklone konnten sieben bis acht Tage nach der Transfektion isoliert werden. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und die Klone daraufhin mit einer Pipettenspitze in etwa 25µl PBS auf eine unbehandelte 96 Loch-Platte überführt. Danach wurden die ES-Zellen durch Zugabe von 25µl 0,05% Trypsin/0,02% EDTA bei 37°C vereinzelt, 50µl ES-Zell-Medium hinzupipettiert und die Zellen auf eine neue mit Fibroblasten dicht bewachsene 96 Loch-Platte transferiert. Etwa zwei Tage später wurden die Zellen gewaschen, trypsinisiert und ES-Zell-Medium hinzugegeben. Die eine Hälfte dieser Zellsuspension wurden auf eine mit 0,5% Gelatine/ H₂O vorbehandelte 96 Loch-Platte, die andere Hälfte auf eine mit „Feeder“-Zellen bewachsene 96 Loch-Platte überführt. Auf der „Feeder“-Platte wurden die Stammzellklone bis zur Ausbildung von ausreichend großen Einzelkolonien kultiviert und anschließend folgendermaßen eingefroren: Die Klone wurden mit PBS/5mM EDTA gewaschen, trypsinisiert und 75µl eiskaltes Einfriermedium (ES-Zell-Medium/30% FCS/ 13,3% DMSO) hinzugegeben. Die in Papiertücher eingewickelte 96 Loch-Platte wurde unmittelbar bei -70°C eingefroren.

Auf der gelatinisierten 96 Loch-Platte ohne Fibroblasten wurden die ES-Zellen bis zur Konfluenz hochgezogen, da hier vorwiegend eine ausreichende Zellzahl zur Isolierung genomischer DNA aus den Klonen wichtig war, und eine frühzeitige Differenzierung in Kauf genommen werden konnte. ES-Zellklone, in denen das Targeting-Konstrukt homolog integriert hatte, wurden mittels Southern-Hybridisierung identifiziert, dann aufgetaut und der Zellzahl entsprechend auf Fibroblasten in einem 96 Loch oder auf einer 35mm Schale kultiviert.

Für die transiente Expressierung von Cre in ES Zellen wurde 10 µg zirkuläres pIC Plasmid unter Standardbedingungen in ES Zellen elektroporiert. Die Zellen wurden in Verdünnungen von 100, 500 und 1000 Zellen pro 10cm Schale ausplattiert und ohne G418 für 6-8 Tage bis zum Erscheinen von Kolonien kultiviert. Die weitere Analyse mittels Southern-Hybridisierung erfolgte wie oben beschrieben.

2.2.9 Etablierung von "Knockout"-Mäusen

2.2.9.1 Superovulation und Isolierung von Blastozysten

Um eine große Anzahl von Blastozysten zur Injektion der rekombinanten ES-Zellklone isolieren zu können, wurden 20-23 Tage alte C57Bl/6J-Weibchen superovuliert (nach Hogan et. al., 1994). Dazu wurden den Weibchen zuerst 100µl 50u/ml PMS in PBS („Pregnant Mare's Serum“ = Intergonan, Intervet GmbH, Tönisvorst) intraperitoneal injiziert. Dieses Serum enthält Follikel-Stimulierendes Hormon (FSH). Zwei Tage später erfolgte die intraperitoneale Injektion von 100µl 50u/ml hCG in PBS („humanes Chorion-Gonadotropin“ = Ovogest, Intervet GmbH, Tönisvorst) und die Verpaarung der Weibchen mit C57Bl/6J-Männchen. Am Morgen danach wurde das Auffinden eines Vaginalpfropfs mit einer erfolgreichen Kopulation gleichgesetzt. Dieser Tag wird allgemein als Tag 0,5 post coitum (p.c.) gezählt. Am Tag 3,5 p.c. wurden die Uteri zusammen mit Eierstöcken und Eileitern präpariert und die Blastozysten durch Einstechen einer Mundkapillare kurz unterhalb der Eileiter mit Blastozysten-Medium (Fibroblasten-Medium mit 30mM HEPES pH 7,2) aus den Uteri herausgespült. Die gesammelten Blastozysten wurden bis zur Injektion der ES-Zellen in Blastozysten-Medium unter Silikonöl DC200 (Serva, Heidelberg) bei 37°C inkubiert.

2.2.9.2 Injektion embryonaler Stammzellen in Blastozysten

nach (Bradley und Robertson, 1986)

In der Injektionskammer wurden ca. 2000-2500 zu injizierenden ES-Zellen in einem Tropfen Blastozysten-Medium vorgelegt, mit Silikonöl DC200 (Serva, Heidelberg) überschichtet und mit einer Mundkapillare 20 bis 30 Blastozysten hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Injektion der Blastozysten an einem Axiovert 10 Mikroskop (Zeiss) mit seitlich befestigtem Mikromanipulator (Brindi AG, Basel bzw. Eppendorf, Hamburg). Halte- und Injektionsnadeln wurden von Eppendorf (Hamburg) bezogen. Gelegentlich mußte dabei die Injektionsnadel durch Behandlung mit 300u/ml DNase I bzw. Proteinase K gereinigt werden. Der Transfer der injizierten Blastozysten in die Ammen wurde im Anschluß an eine mehrstündige Inkubation bei 37°C unter Silikonöl und nach der Bestätigung ihrer Weiterentwicklung durchgeführt.

2.2.9.3 Uterustransfer von Blastozysten

Injizierte Blastozysten wurden in 8-35 Wochen alte scheinchwangere CB6F1-Weibchen transferiert (Hogan et al., 1994). Dabei wurden die Weibchen mit sterilen, vasktomierten Männchen verpaart. Nach einer solchen Verpaarung durchlaufen die Weibchen alle hormonellen Veränderungen einer normalen Schwangerschaft und sind deshalb für die transferierten Blastozysten empfänglich. Da die Blastozysten (Tag 3,5 p.c.) durch die *in vitro*-Manipulation eine Entwicklungsverzögerung erfahren, wurden sie in Tag 2,5 p.c. scheinchwangere Weibchen transferiert. Für den Uterustransfer wurden die Weibchen durch intraperitoneale Injektion von 50µl Rompun/ Ketamin-Lösung/25g Körpergewicht (120µl Rompun [Wirkstoff: Xylazin, Methylhydroxybenzoan], 340µl Ketamin [Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid], 540µl NaCl [physiol. Kochsalzlösung] auf 1ml; Pharmazeutische Handelsgesellschaft mbH, Garbsen) betäubt und die Uteri operativ freigelegt. Am Übergang zum Infundibulum wurden sechs bis acht injizierte Blastozysten mit einer Mundkapillare in jede Uterusseite transferiert. Abschließend wurde das Peritoneum (Bauchfell) genäht und das Fell mit Autoclips geklammert (9mm Wundclips; Becton Dickinson, Sparks, MD, USA).

2.2.10 Histologische Methoden

2.2.10.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Immunhistologien oder *in situ*-Hybridisierungen wurden auf Gefrierschnitten durchgeführt. Nach dem Spülen in PBS wurden die präparierten Embryonen entweder in 4% PFA für mehrere Stunden oder über Nacht fixiert (für den immunhistologischen Einsatz) oder die Gewebe unfixiert (für *in situ*-Hybridisierungen) direkt eingefroren. Dieses Einfrieren erfolgte in „Tissue Tec“ (= „OCT-Compound“; Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) in einer Einbettform („Peel-Away“; Shandon, Frankfurt) oder in Aluminiumhütchen in einer Alkohol/Trockeneis-Mischung. In Abhängigkeit von Gewebeart bzw. dem Embryonalstadium wurden die Schnitte im Kryostaten (Leica, Bensheim bzw. Microm HM560, Walldorf) bei einer Blocktemperatur zwischen -10°C und -20°C angefertigt, wobei die Schnittdicke bei 10-20µm lag. Die Schnitte wurden auf Adhäsions-Objekträger (Histobond, Marienfeld) aufgezogen, bei 37°C (Immun-

histologie) bzw. 46°C (*in situ*-Hybridisierung) getrocknet und dann feuchtigkeitsgeschützt eingefroren. Wie die gefrorenen Präparate konnten auch die Schnitte über mehrere Wochen bei -80°C aufbewahrt werden.

2.2.10.2 Histologische Färbung für β -Galaktosidase

Der β -Galaktosidase-Nachweis wurde sowohl auf Gefrierschnitten (Hogan et al., 1994), als auch als Whole Mount-Färbung angewendet. Die Kryotomschnitte wurden in 0,2% Glutaraldehyd für 10min auf Eis postfixiert, dreimal mit PBS/2mM MgCl₂ gespült und dann in Detergenz-Lösung (0,1M Phosphat-Puffer pH 7,3, 2mM MgCl₂, 0,01% Natriumdesoxycholat, 0,02% Nonidet P-40) für 10min inkubiert. Danach schloß sich die Färbung für 2-3h bei 37°C an (Detergenz-Lösung mit 1mg/ml X-Gal, 5mM Kaliumferricyanid, 5mM Kaliumferrocyanid). Abschließend wurden die Schnitte in PBS gewaschen, kurz in dH₂O gespült, wenn notwendig gegengefärbt und eingedeckelt.

Für die Färbung intakter Embryonen (Sham et al., 1993) wurden die Stadien zunächst je nach Alter (E9,5-E12,5) für 10-30min in einer Lösung aus 1% PFA/0,2% Glutaraldehyd, 2mM MgCl₂, 5mM EGTA in PBS bei 4°C fixiert. Darauf folgte ein dreimaliges Waschen unter Schütteln in PBS/0,2% Nonidet P-40 bei 4°C und schließlich die Färbung (5mM K₃Fe(CN)₆, 5mM K₄Fe(CN)₆, 10mM MgCl₂, 0,01% Natriumdesoxycholat, 1mg/ml X-Gal in PBS) bei 37°C oder bei RT über Nacht. Die Färbung wurde durch Waschen mit 0,1% PBT abgestoppt, die Embryonen postfixiert und in PBS aufbewahrt.

2.2.10.3 Histologische Färbung für Alkalische Phosphatase

Der Nachweis von Alkalischer Phosphatase wurde als Whole Mount-Färbung bei Z/AP-Reporter-mäusen angewendet (Lobe et al., 1999). Die Embryonen wurden für 30 min bei 4°C in Fixierungspuffer (2% PFA, 0,2% Glutaraldehyd, 0,02% NP-40, 0,01% Natriumdesoxycholat in PBS) fixiert, ältere Embryonen ab E11,5 wurden vor der Fixierung mit einer Rasierklinge sagittal geteilt. Anschließend wurden die Embryonen für 3x5 min in PBS gewaschen, und endogene Phosphatasen durch Hitzebehandlung bei 70°C für 30 min im Wasserbad inaktiviert. Nach der Wärmebehandlung wurden die Embryonen kurz in PBS gewaschen und für 10 min in AP-Puffer (100 mM Tris-HCl ph

9.5, 100mM NaCl, 10 mM MgCl₂) inkubiert. Die Färbung wurde mit "BM Purple AP Substrat" (Roche) bei 4°C über Nacht durchgeführt. Nach Abschluß der Färbung wurden die Embryonen mehrfach mit PBS gewaschen, postfixiert und in PBS aufbewahrt.

2.2.10.4 Immunhistologie auf Gewebeschnitten

Die Gefrierschnitte wurden für 10min in 4% PFA in PBS postfixiert, dreimal für je 5min in PBT (PBS mit 0,1% Tween 20) gewaschen und danach für 1h bei RT in 10% Ziegen Serum/PBT blockiert. Alternativ wurde bei Einsatz sekundärer Esel-Antikörper Pferdeserum verwendet. Im Anschluß erfolgte die Inkubation mit dem Primär-Antikörper für 1h bei 37°C, für mehrere Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C. Hierauf wurden die Schnitte dreimal für je 5min mit PBT gewaschen und dann für 1h mit dem Sekundär-Antikörper in Blockierungslösung inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in PBT zur Reduktion des unspezifischen Hintergrunds wurden die Schnitte in "Immu-Mount" (Shandon, Frankfurt) eingedeckelt.

2.2.10.5 Detektion von Zellproliferation und Apoptosen

Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurde BrdU (= 5-Brom-2'-desoxy-uridin) intraperitoneal in schwangere Maus-Weibchen injiziert (75µg/g Körpergewicht in 0,9% NaCl) und die Embryonen drei Stunden nach der Injektion präpariert. BrdU, welches als Thymidin-Analogon nur in die DNA mitotisch aktiver Zellen inkorporiert wird, wurde danach immunhistologisch auf Embryonalschnitten mit einem anti-BrdU-Antikörper (Sigma) nachgewiesen.

Die Detektion von Apoptosen erfolgte anhand der DNA-Fragmentierung (= TUNEL-Färbung; Gavrieli et al., 1992) mit Hilfe des „Apop Taq Plus, Fluorescein *in situ* Apoptosis Detection Kits“ (Intergen, Gaithersburg, USA).

2.2.10.6 Herstellung von Vibratomschnitten

Mit Hilfe des Vibratoms (Leica VT1000S, Bensheim) wurden Schnitte von 20-50µm Dicke zur histologischen Analyse von Embryonen angefertigt, die zuvor in einer *Whole Mount* Alkalische Phosphatase-Färbung (siehe 2.2.10.3) gefärbt wurden. Dazu erfolgte das Einbetten der fixierten Embryonen in 20% Gelatine/PBS. Auf das Trimmen folgte die Fixierung des Blocks über Nacht in 4% PFA, worauf eine Lagerung bis zum Schneiden in PBS bei 4°C möglich war. Nach dem Schneiden in PBS wurden die Schnitte bei RT getrocknet und in 85% Glyzerol/PBS oder in "Immu-Mount" (Shandon, Frankfurt) eingedeckelt.

2.2.11 *In situ*-Hybridisierung

2.2.11.1 Whole Mount *in situ*-Hybridisierung

Die Detektion der Expression bestimmter Gene im intakten Maus-Embryo wurde mit Hilfe von Whole Mount *in situ*-Hybridisierungen durchgeführt (nach Wilkinson, 1992). Hierzu wurden E9,0 bis E12,5 Maus-Embryonen in kaltem DEPC-PBS aus dem Uterus präpariert und dabei sorgfältig von der Plazenta sowie umgebenden Geweben getrennt. Die den Embryo umgebenden extraembryonalen Hüllen, der Dottersack und das Amnion, wurden für die Genotypisierung bis zum Stadium E11 benutzt. Bei älteren Embryonen ist die Trennung dieser extraembryonalen Anteile von mütterlichem Gewebe schwieriger, so daß hier ein Stück des Embryos (meistens der Schwanz) zur Genotypisierung verwendet wurde, um Kontaminationen in der PCR zu vermeiden. Ein besserer Zugang für die nachfolgend eingesetzten Lösungen wurde dadurch gewährleistet, indem das Herz, die Hirnvesikel und die Ohranlagen mit einer extrem feinen Wurzelkanalfeile (Hedströmfeile Stärke 08 bzw. K-Flex/Kerr Stärke 06; Altwig Dentaldepot, Berlin) durch Punktion geöffnet wurden.

Die derart präparierten Embryonen wurden über Nacht in 4% PFA/DEPC-PBS bei 4°C fixiert. Am nächsten Tag erfolgte zweimal ein Waschschrift in 0,15% DEPC-PBT (PBS mit 0,15% Tween 20) auf Eis, bevor sich die Dehydratation mittels einer aufsteigenden Methanol-Reihe (25%, 50%, 75% und zweimal 100%) ebenso auf Eis für 5-15min pro Schritt anschloß. Zur Reduktion des Hintergrunds bei der späteren Farbreaktion wurden die Embryonen daraufhin in Methanol:H₂O₂ (4:1) für 1h bei RT gebleicht und im

Anschluß daran dreimal mit 100% Methanol auf Eis gewaschen. An diesem Punkt wurde die Weiterbehandlung in der Regel gestoppt und die vorbehandelten Embryonen bei -20°C u.U. für mehrere Monate bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Für die Hybridisierung wurden die Embryonen auf Eis rehydriert (je 10-15min in 75%, 50%, 25% Methanol), dreimal kurz in 0,15% DEPC-PBT gewaschen und dann abhängig vom embryonalen Alter und der Lokalisation des erwarteten Signals für 10-30min mit 20µg/ml Proteinase K in 0,15% DEPC-PBT bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Dieser Verdau wurde durch Fixation in 4% PFA/0,2% Glutaraldehyd in DEPC-PBS für 20min bei RT beendet, die stabilisierten Embryonen dreimal kurz in 0,15%-DEPC-PBT gewaschen und in Hybridisierungspuffer präinkubiert (50% entionisiertes Formamid, 5x SSC, 40µg Heparin, 100µg denaturierte Lachsspermien-DNA, 50µg tRNA, 0,1% Tween 20, pH 4,5-5 mit 1M Zitronensäure). Anschließend erfolgte die Prähybridisierung für 1-3h bei Hybridisierungstemperatur (65-70°C) in einem Schüttelwasserbad. Die Hybridisierung wurde mit der zuvor für 5-10min bei 80°C denaturierten Digoxigenin-markierten Sonde über Nacht durchgeführt.

Am nächsten Tag erfolgte das Waschen der Embryonen bei Hybridisierungstemperatur zweimal in Lösung I (50% Formamid, 5x SSC, 0,1% Tween 20) für je 30min und einmal in Lösung I/II für 10min. Hierauf schlossen sich drei kurze Waschschrte in Lösung II (10mM Tris pH 7,5, 0,5M NaCl, 0,1% Tween 20) bei RT an, sowie im Fall der *Lbx1*-Sonde der Verdau mit 50µg/ml RNase A in Lösung II für zweimal je 30min bei 37°C auf einem Schüttler. Anschließend wurden die Embryonen dreimal je 1h in Lösung III (50% Formamid, 2x SSC, 0,1% Tween 20) im Schüttelwasserbad gewaschen, wobei die Temperatur 5°C unter Hybridisierungsbedingungen gehalten wurde. Nach dreimaligem kurzen Waschen in TBST bei RT erfolgte die Inkubation der Embryonen unter Schütteln mit 10% Ziegen Serum für 1h.

Währenddessen wurde eine Spatelspitze Embryo-Pulver in 2ml TBST (2,5mM Tris pH 7,4, 13,7mM NaCl, 0,27mM KCl, 0,15% Tween 20) für 30min bei 70°C inaktiviert, 10min bei 5000rpm, 4°C abzentrifugiert, das Präzipitat pro Ansatz in 0,5ml TBST/1% Ziegen Serum mit 1µl Anti-Digoxigenin-Antikörper (Roche) resuspendiert und bei 4°C für 1h inkubiert. Im Anschluß daran wurde die Antikörper-Lösung für 10min bei 5000rpm, 4°C abzentrifugiert und der Überstand vierfach mit TBST/1% Ziegen Serum verdünnt (endgültige Antikörper-Verdünnung 1:2000). 2ml dieser Lösung wurden zu jedem Ansatz gegeben und die Embryonen über Nacht bei 4°C inkubiert.

Den gesamten dritten Tag erfolgte das Waschen der Embryonen in TBST bei RT auf einem Schüttler, wobei die Lösung etwa stündlich gewechselt wurde. Das Waschen mit TBST wurde über Nacht bei 4°C fortgesetzt.

Am vierten Tag wurden die Embryonen zweimal für je 20min in Alkalische Phosphatase-Puffer (100mM Tris pH 9,5, 0,1M NaCl, 50mM MgCl₂, 0,15% Tween 20) bei RT leicht schüttelnd inkubiert und darauf in 2ml Alkalische Phosphatase-Puffer mit je 7µl NBT und BCIP für mehrere Stunden (je nach Signal) bei RT oder 4°C im Dunkeln gefärbt. Dabei wurde die filtrierte Färbelösung alle 20-30min gewechselt. Abschließend erfolgte das Stoppen der Farbreaktion durch mehrmaliges Waschen mit 0,15-0,3% PBT bis ein zufriedenstellendes Signal erreicht war. Die Embryonen wurden daraufhin mit 4% PFA postfixiert und dann in sterilem PBS bei 4°C aufbewahrt. In besonderen Fällen wurde 0,1% Natriumazid zugesetzt, um ein Verkeimen zu verhindern. Für oberflächlich lokalisierte Expression verblieben die Embryonen in PBS, die photographische Dokumentation machte jedoch besonders bei tiefliegenden Signalen das vorherige Klären mit 100% Glycerol erforderlich.

2.2.11.2 Präparation von Embryo-Pulver

Das Embryo-Pulver diente zum Blockieren in der Whole Mount *in situ*-Hybridisierung. Präparierte Maus-Embryonen wurden in einem möglichst kleinen Volumen eiskaltem PBS homogenisiert, 4 Vol. eiskaltes Aceton hinzugegeben und diese Mischung für 30min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 10000g für 10min, 4°C erfolgte ein Waschen des Präzipitats mit eiskaltem Aceton und eine erneute Zentrifugation. Hierauf wurde das Präzipitat fein zermörsert, luftgetrocknet und dieses Pulver bei 4°C aufbewahrt.

2.2.12 Proteinchemische Methoden

2.2.12.1 Herstellung von Gewebhomogenisaten für den Proteinnachweis

Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und die Leber entnommen. Das Gewebe wurde mit einer Schere grob zerkleinert, und 300-500 mg Gewebe wurden in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff zu Pulver zerrieben. Das Pulver wurde quantitativ in einen Glas-Homogenisator (Glas-Col, Terre Haute USA) überführt und

auf Eis in 1-2 ml Lysispuffer (50 mM Hepes pH 7.5, 50 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 10% Glycerol, 1% Triton X-100 mit 100 mM NaF, 1 mM Natriumorthovanadat, 10 mM Natriumpyrophosphat, 0,1 mM Ammoniummolybdat, 1 mM PMSF, 2 µg/ml Leupeptin, 2µg/ml Aprotinin) mit etwa 10 Stößen homogenisiert.

2.2.12.2 Immunopräzipitation aus Gewebelysat

Das Homogenisat wurde für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C und 13.000rpm in einer Eppendorffzentrifuge für 30 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem primären Antikörper anti-human-c-Met (Verdünnung 1:100; siehe 2.1.3) über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Dann wurde das Lysat 5 min bei 4°C abzentrifugiert und für 90 min mit 75 µl Protein A-gekoppelter Agarose (Roche) bei 4°C inkubiert. Der Ansatz wurde abzentrifugiert, das Pellet dreimal mit Waschpuffer (50 mM Hepes, pH7,5, 50 mM NaCl) gewaschen, mit Probenpuffer (30% Glycerin, 0,3 M DTT, 6% SDS, 0.05% Bromphenolblau in 0,5 M Tris-Hcl pH 6,8) versetzt und für 5 min bei 95°C aufgeköcht.

2.2.12.3 Bestimmung des Proteingehalts

Der Proteingehalt der Proben wurde mit einem kommerziellen Kit (Protein-Assay, Bio-Rad; Bradford, 1976) nach Angaben des Herstellers photometrisch bestimmt (Ultrospec 2100 Pro, Amersham-Pharmacia).

2.2.12.4 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese von Proteinen

SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach Standard-Protokollen durchgeführt (Laemmli, 1970; Sambrook und Russell, 2001). Die Proben (jeweils 30 mg Protein) wurden mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE (5% Sammelgel, 7.5% Trenngel) in einer Gelelektrophoresekammer (Mini Protean II; Bio-Rad) bei 35 mA Stromstärke aufgetrennt. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde ein Molekulargewichtsmarker im Bereich von 16-220 kDa mit auf das Gel aufgetragen (SDS-PAGE Protein Standard Broad; Bio-Rad).

2.2.12.5 Western-Blotting-Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembran

Der Western-Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembran wurde nach Standard-Protokollen durchgeführt (Sambrook und Russell, 2001). Die Proteine wurden über Nacht bei 4°C und 30V in einer Western-Blotting-Kammer (Mini Trans-Blot; Bio-Rad) auf Nitrocellulosemembran (Protran; Schleicher&Schüll, Dassel) transferiert. Nach dem Transfer wurde die Membran kurz mit TBST (10 mM Tris-HCL pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) gespült, um anhaftende Gelreste zu entfernen.

2.2.12.6 Immunodetektion von Proteinen auf Nitrocellulosemembran

Nach dem Western-Blotting wurde die Membran auf dem Schüttler für 1 h in Blockierungsreagenz (5% Milchpulver in TBST) blockiert. Die Inkubation mit dem primären anti-human-c-Met Antikörper (1:100 in Blockierungsreagenz) erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler. Nach dreimaligem Waschen mit TBST für jeweils 5 min wurde die Membran mit sekundärem anti-mouse-IgG gekoppelt an Meerrettichperoxidase (1:5000 in TBST) inkubiert und anschließend für 3x 5 min mit TBST gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte nach einem Chemolumineszenzverfahren gemäß den Anweisungen des Herstellers (ECL-Kit; Amersham-Pharmacia).

2.2.12.7 Kinase-Assay

Für den Kinase-Assay wurde 100-500 mg Gewebe mit einem Glashomogenisator auf Eis in 1-2 ml Lysispuffer (50 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100 mit 1 mM PMSF, 2 µg/ml Leupeptin, 2µg/ml Aprotinin) homogenisiert. Das Lysat wurde für 5 min auf Eis inkubiert, und bei 4°C und 13.000rpm in einer Eppendorffzentrifuge für 30 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem primären Antikörper anti-human-c-Met (Verdünnung 1:100) für 2h bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Dann wurde das Lysat für 5 min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand für 90 min mit 75 µl Protein A-gekoppelter Agarose (Roche) bei 4°C inkubiert. Der Ansatz wurde abzentrifugiert und das Pellet mit Waschpuffer (20mM Hepes pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100), Waschpuffer mit 0,5 M NaCl, wieder Waschpuffer und schließlich Kinasepuffer (50 mM Hepes pH 7,5, 5 mM MnCl₂, 0,1% Triton X-100) gewaschen. Das Pellet wurde in 15 µl

Kinasepuffer resuspendiert und die Phosphorylierungsreaktion durch Zugabe von 5 μ l Startmix (2,5 μ l 2x Kinasepuffer, 0,5 μ l 2 mM ATP, 2 μ l 32 P- γ -ATP [0.74 MBq]) gestartet. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von Probenpuffer gestoppt und der Ansatz bei 95°C für 5 min gekocht.

Die Proben wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 2.2.12.4), das Gel wurde getrocknet (Maxi Dry Plus Gelrockner; Heto Lab Equipment S/A, Dänemark) und auf Röntgenfilm (Kodak Biomax MR) exponiert.

2.3 Konstruktion der Targeting Vektoren

2.3.1 Konstruktion des *met*^{flox}-Allels

Als Ausgangsmaterial für den Targeting-Vektor wurden die *Met* Subklone λ 2.2M2 und λ 2.2M6.9 von Lambdaphagenklonen aus einer genomischen Bank des Mausstammes SV129/Ola benutzt (Bladt et al., 1995). Die humane *Met* cDNA und der murine genomische Klon 6.1 wurden von M. Weidner zur Verfügung gestellt, die *Met* cDNA der Maus von F. Bladt. Als Grundgerüst des Targeting-Vektor wurde das Plasmid pBluescript II SK - verwendet.

Zunächst wurde eine Fusion von muriner und humaner cDNA vorgenommen. Die Fusion erfolgte in einer *AccI* Schnittstelle, die sich 3' des Exons befindet, das für die Transmembran-Domäne kodiert. Das resultierende Plasmid, *phmMet*, wurde auf seine Sequenz hin kontrolliert (Abb. 2.1a). Das Plasmid *phmMet* wurde nun in einer *BclI* Schnittstelle, die im für die Transmembrandomäne kodierenden Exon liegt (Position 2798 der murinen cDNA), mit dem genomischen Subklon *pMet3* fusioniert. *pMet3* umfaßt etwa 3,2 kb genomische Sequenz 5' des Exons, das für die Transmembrandomäne kodiert. In eine *MscI* Schnittstelle, die 0,7 kb 5' dieses Exons liegt, wurde ein *NdeI*-Linker eingefügt. In die so eingeführte *NdeI*-Schnittstelle wurde dann eine synthetisch hergestellte *loxP* Erkennungssequenz, die zusätzlich eine *EcoRV* Schnittstelle enthielt, kloniert; Sequenz und Orientierung der inserierten *loxP* Sequenz wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Die verwendete cDNA enthielt keine polyA-Sequenz, und auch kein Polyadenylierungssignal. Deshalb wurde in eine BamHI Schnittstelle 3' der cDNA das 200 bp lange SV40-Polyadenylierungssignal aus dem Expressionsvektor pNASS β kloniert. Das resultierende Plasmid wurde p9_16paNot genannt (Abb. 2.1c).

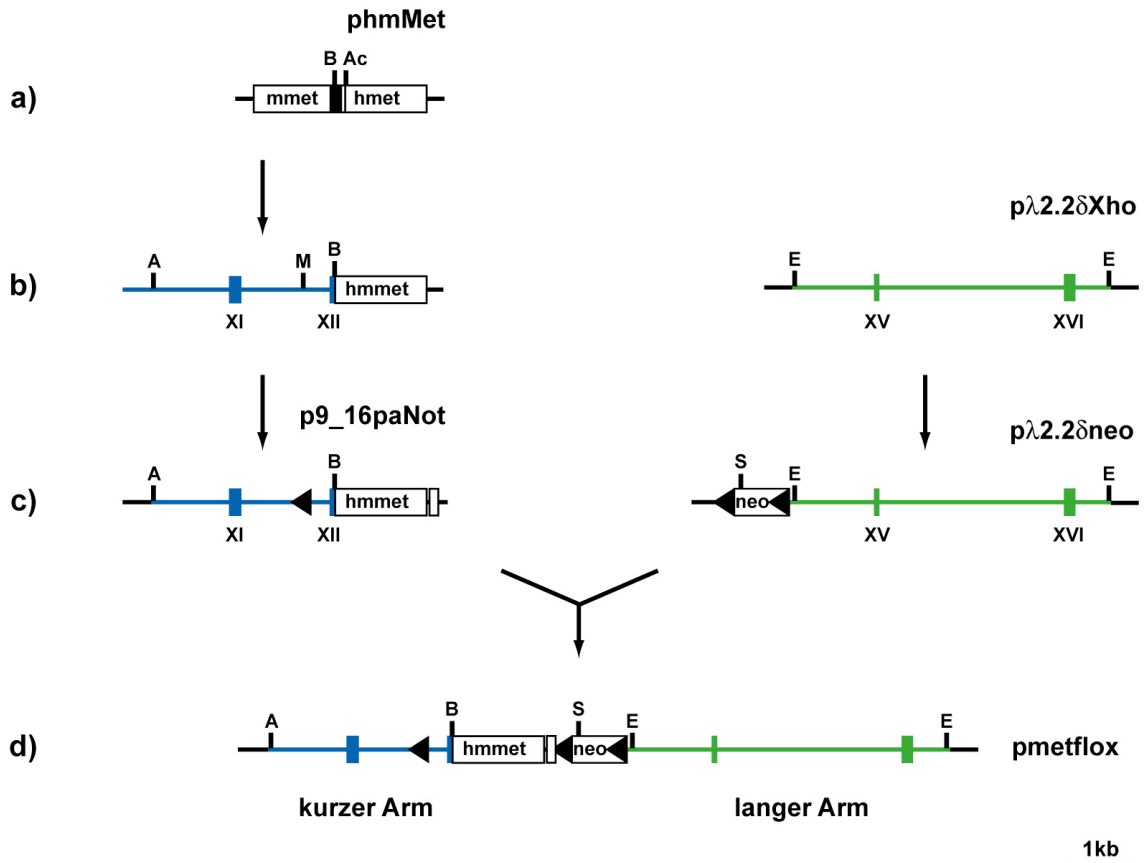


Abb.2.1: Klonierungsstrategie für den met^{lox} Targeting-Vektor

(a) Im Plasmid **phmMet** sind murine und humane *Met* cDNA im ersten cytoplasmatischen Exon fusioniert
 (b) Die hybride cDNA wird im Transmembranexon an genomische *Met* DNA des kurzen Armes (blau) fusioniert. Der lange Arm (grün) wird subkloniert
 (c) Die 5'loxP Sequenz sowie ein Polyadenylierungssignal werden in den kurzen Arm eingefügt. Eine loxP-flankierte Neomycinresistenz-Kassette wird 5' des langen Armes gesetzt
 (d) Der kurze Arm wird 5' des langen Armes einkloniert und der Targeting Vektor **pmetflox** damit fertiggestellt. A: AscI, Ac: AccI, B: BclI, E: EcoRI, M: MscI, StuI. Römische Ziffern: Nummern der Exone

Parallel wurde der Teil des Targeting-Vektors kloniert, der den langen Arm enthielt. Dazu wurde aus dem genomischen Klon λ 2.2M2 ein 5 kb langes Fragment isoliert und in die KpnI Schnittstelle von pBluescript II SK- subkloniert. Eine im genomischen Fragment vorhandene XhoI-Schnittstelle war zuvor durch Auffüllen entfernt worden; zudem wurde in dieses Plasmid eine AscI Schnittstelle für die spätere Linearisierung des Targeting-Vektors eingefügt. Das von loxP-Elementen flankierte Neomycin-Resistenzgen aus dem Vektor pTV-flox (D. Riethmacher) wurde nun über ClaI/XhoI vor das genomische 5 kb Fragment kloniert. Der resultierende Vektor wurde

ploxP λ neo genannt. Im finalen Schritt wurde in die NotI-Schnittstelle dieses Vektors das Insert aus Plasmid p9_16paNot eingefügt, d.h das Fragment, das den kurzen Arm, die cDNA und das Polyadenylierungssignal umfaßt. Das resultierende Plasmid entspricht dem met^{flox} Targeting-Vektor (Abb.2.1d).

2.3.2 Konstruktion des otx1Cre-Allels

2.3.2.1 Isolierung des genomischen otx1-Lokus

Ausgehend von publizierten Informationen über den genomischen Locus von *Otx1* der Maus und der cDNA Sequenz der Ratte (GenBank Nummer L32602) wurde eine PCR-Reaktion auf genomischer DNA etabliert, die mit den Primern otxu und otxl 440 Basenpaare von Exon 3 des murinen *Otx1* amplifiziert. Die Primer wurden an die Firma Genome Systems Inc (St. Louis, MO USA) gesandt, die damit zwei *Otx1*-Klone aus einer murinen genomischen P1 Phagen-Bank isolierte. Die P1-Klone #12756 und #12757 hatten eine Länge von je etwa 80 Megabasen; sie wurden mittels Restriktionsverdau und Southern-Hybridisierung zunächst grob kartiert und subkloniert. Die hierbei gewonnenen Subklone otx57BX (Xba I/BamH I Subklon 5 kb), otx56Hd (Hind III/Hind III, 7 kb), otx56B (BamH I/BamH I, 5 kb) und otx57Acc (Acc I/Acc I, 8 kb) wurden restriktionskartiert und für die weitere Konstruktion des Targeting Vektors verwendet (Abb. 2.2).

2.3.2.2 Mutagenese des PGKCrebpA Vektors

Als Ausgangsmaterial für die Cre-cDNA diente der Expressionsvektor PGKCrebpA (W. Müller, Köln). Dieser Expressionvektor enthält Cre unter der Kontrolle eines PGK-Promoters sowie ein Spleißakzeptor- und Polyadenylierungssignal. Da die Kodierungssequenz von Cre kryptische Spleißstellen enthält (R. Kühn, persönliche Mitteilung), wurde sie mit einem Programm zur Vorhersage von Spleißdonor- und -akzeptorstellen analysiert (Lawrence Berkeley National Lab HGIG, Splice Site Prediction Program , http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html; Reese et al., 1997). Das Programm sagt in Kodon 145 von Cre mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Spleißdonorstelle voraus: 143-gac cag GTt cgt -146, wobei agGT die Konsensussequenz für einen Spleißdonor darstellt (Breathnach et al., 1978). Das Kodon gtt steht für Valin und kann nicht mutagenisiert werden, ohne die kodierte Aminosäure

zu verändern. Das unmittelbar vorhergehende Kodon *cag* jedoch kodiert für Glutamin und kann in der dritten Base in *caa* mutiert werden, ohne die kodierte Aminosäure zu verändern. Durch diese Veränderung wäre der potentielle Spleißdonor zerstört.

Die Mutagenese wurde über ein kurzes Stück synthetisierter DNA durchgeführt, das über zwei Restriktionsstellen *BstBI* 5' und *SgfI* 3' in der Nachbarschaft von Kodon 145 in den Vektor kloniert werden konnte. Zu diesem Zweck wurden die komplementären Oligomere *Cre1* und *Cre2* synthetisiert (*Cre1*: 5'-*cga acg cac tga ttt cga agt tcg ttc act cat gga aaa tag cga t-3'*; *Cre2*: 5'-*cgc tat ttt cca tga gtg aac gaa ctt ggt cga aat cag tgc gtt-3'*; MWG Biotech, München), die die gewünschte Mutation *cag->caa*, und zu *SgfI* und *BstBI* kompatible Enden enthielten; die Oligomere wurden hybridisiert, um das DNA-Fragment *Cre1/2* zu erhalten. Um das resultierende Fragment in die kodierende *Cre*-Sequenz einzuführen, wurde die Sequenz zunächst zusammen mit dem Polyadenylierungssignal aus dem Plasmid *PGKCREbpA* über *PstI/NotI* in den Vektor *pBluescript SK-* subkloniert. Aus dem Plasmid *PGKCrebpA:Pst/Not* wurde der DNA-Abschnitt um Kodon 145 dann mit *BstBI* und *SgfI* ausgeschnitten, und das aufgereinigte Plasmid mit dem mutanten doppelsträngigen Oligomer *Cre1/2* ligiert. Nach Transformation des Ligationsansatzes in kompetente Bakterien wurden Klone isoliert und durch DNA-Sequenzierung auf Anwesenheit der Mutation geprüft. Das erhaltene Plasmid wurde *pCremutbpA* genannt.

2.3.2.3 Klonierung des *otx1Cre-Targeting-Vektors*

Für das Grundgerüst des *otx1Cre-Targeting-Vektors* wurde ein *pBluescript II SK-* Vektor mit einer modifizierten Multi-Klonierungssequenz hergestellt, *pPolySK*. Dabei wurde die *Multiple-Cloning-Site* (MCS) von *pBluescript* entfernt und durch eine MCS mit den Schnittstellen *SacI-HindIII-BamHI-Sal-Not-BsiW-BamHI-Sse838-KpnI* ersetzt.

Als Selektionsmarker für die ES-Zellkultur wurde ein mit FRT-Erkennungssequenzen flankiertes Neomycin-Resistenzgen mit PGK-Promotor gewählt (Fiering et al., 1995). Der *otx1Cre-Targeting* Vektor würde somit aus einem kurzen 5'-Arm von 3 kb, der mutierten *Cre*-Rekombinase mit Polyadenylierungssignal, einem FRT-PGKneo Resistenzmarker, einem langen 3'-Arm von 5 kb und einer *Sse 8387* Schnittstelle für die Linearisierung bestehen (siehe Abb. 2.2).

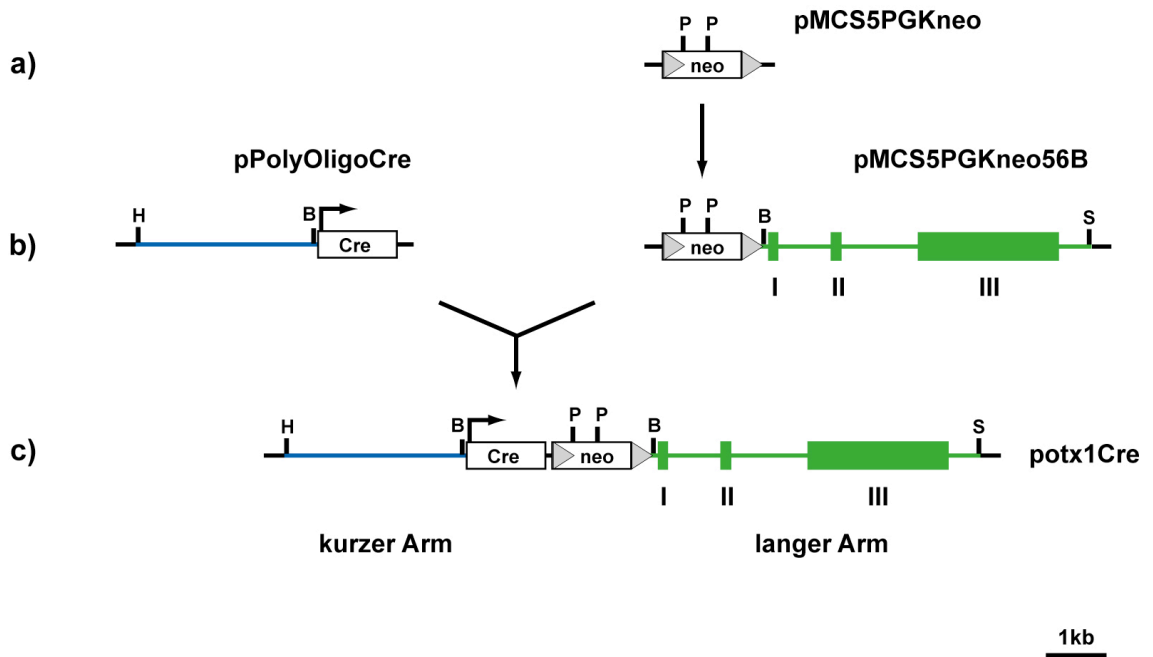


Abb.2.2: Klonierungsstrategie für den *otx1Cre* Targeting-Vektor

(a) Eine FRT-flankierte Neomycinresistenz-Kassette wird in pMCS5 subkloniert (b) Die cDNA für die optimierte Cre-Rekombinase wird 3' der genomischen *Otx1* DNA des kurzen Armes (blau) inkloniert. Die Resistenzmarker-Kassette wird 5' der genomischen DNA des langen Armes (grün) kloniert (c) Kurzer und langer Arm des *potx1Cre* Targeting Vektors werden zusammengefügt. B: BamHI, H: HindIII, P: PstI, S: Sall. Römische Ziffern: Nummern der Exone

Zunächst wurde ein 3 kb Fragment aus dem genomischen *otx1*-Subklon *otx57BX* über HindIII und BamHI als kurzer Arm in pPolySK kloniert. Die mutierte Cre-Kodierungssequenz mit dem Polyadenylierungssignal wurde 3' zum kurzen Arm über XhoI und NotI in pPolySK eingefügt; das resultierende Plasmid wurde pPolyOligoCre genannt (Abb. 2.2b). Parallel dazu wurde aus dem Vektor pGEMFlppGKneo das FRT-flankierte PGK-Neomycin-Resistenzgen ausgeschnitten und in die PmeI Restriktionsschnittstelle des Vektors pMCS5 kloniert; 3' von PGKneo wurde dann der 5 kb große lange Arm aus dem genomischen Subklon *otx56B* eingesetzt. Schließlich wurde der Targeting-Vektor *potx1Cre* dadurch fertiggestellt, daß das Fragment mit PGKneo und langem Arm über BsiW und Sse8387 aus pMCS5 ausgeschnitten und 3' der Cre-Rekombinase in pPolyOligoCre kloniert wurde (Abb. 2.2c).