

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Konditionelle Mutagenese des *Met*-Gens

Die Mutation von *Met* in der Maus hatte gezeigt, daß diesem Signalsystem essentielle Bedeutung während der Embryogenese zukommt (Bladt et al., 1995; Maina et al., 1996). Aufgrund der embryonalen Letalität der Nullmutation um Tag E12,5-16,5 der Embryonalentwicklung konnten jedoch vermutete Funktionen des Rezeptors während später embryonaler Stadien und im adulten Organismus nicht analysiert werden. Diese Limitierung sollte durch die Etablierung eines konditionellen *Met*-Nullallels mittels Cre/loxP Technik überwunden werden.

Als Strategie für die Konstruktion des konditionellen *Met*-Allels wurde zuerst ein Fusionsgen aus muriner und menschlicher *Met* cDNA konstruiert, das von LoxP Sequenzen umgeben wurde. Genauer wurde an ein Exon, das für die Transmembrandomäne des murinen *Met* kodiert, eine cDNA fusioniert, die für die intrazellulären Domänen des humanen Rezeptors kodiert (Abb. 3.1). Diese Klonierungsstrategie wurde aus mehreren Gründen gewählt. Erstens war bereits in einer Arbeit publiziert worden, daß ein so konstruiertes Fusionsgen voll funktionsfähig ist (Maina et al., 1996). Zweitens kann in einem Tier, das ein solches Konstrukt trägt, das Produkt des endogenen *Met*-Gens vom Produkt des Fusionsgens unterschieden werden, da sich die zytoplasmatische Domäne von humanem und murinem *Met* unterscheiden und Antikörper existieren, die eine differentielle Darstellung der Rezeptoren ermöglichen. Und drittens können von einem derartigen Fusionsgen Varianten konstruiert werden, die für leicht veränderte Rezeptoren kodieren und zum Beispiel Punktmutationen in wichtigen Substratbindungsstellen enthalten.

#### 3.1.1 Klonierung des *met*<sup>lox</sup> Targeting-Vektors

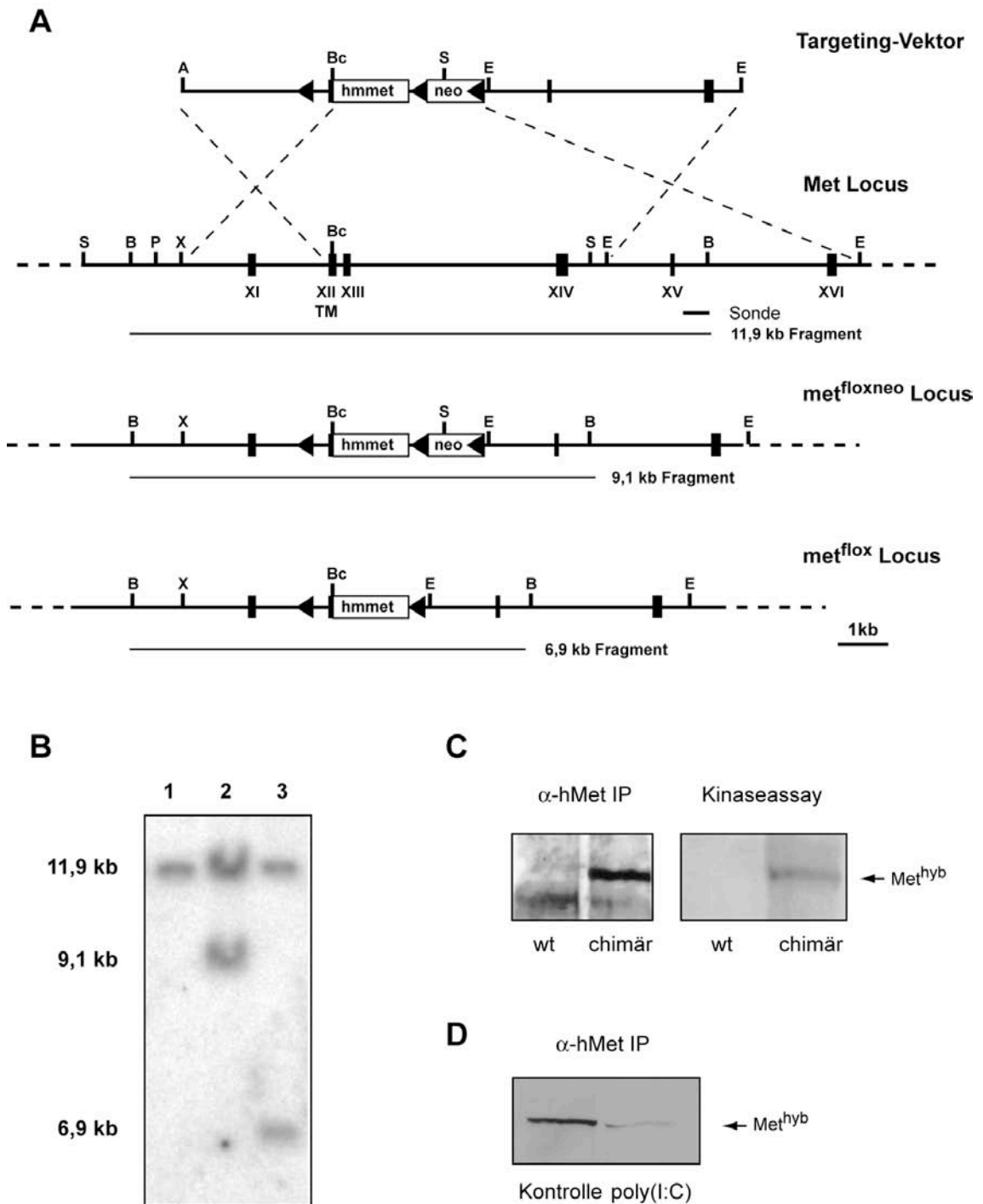
Ausgangsmaterial für den Targeting-Vektor waren Subklone genomischer *Met* DNA des Mausstammes SV129/Ola sowie humane und murine *Met* cDNA (F. Bladt, M. Weidner). Der Vektor wurde in zwei Teilen konstruiert, die den kurzen und langen Arm enthielten (für eine detaillierte Beschreibung der Klonierung siehe Kap. 2.3.1).

Die genomische DNA aus der Maus und die cDNA aus dem Menschen konnten aus Mangel an kompatiblen Restriktionsschnittstellen nicht direkt fusioniert werden. Deshalb wurde zunächst eine Fusion von muriner und humaner cDNA vorgenommen. Die Fusion erfolgte in einer AccI Schnittstelle, die sich 3' des Exons befindet, das für die Transmembrandomäne kodiert. Die hybride cDNA wurde nun in einer BclI Schnittstelle, die im für die Transmembrandomäne kodierenden Exon liegt, mit einem etwa 3,2 kb großen genomischen Subklon fusioniert. Etwa 0,7 kb 5' dieses Exons wurde eine synthetisch hergestellte loxP Sequenz mit einer zusätzlichen EcoRV Schnittstelle in die genomische Sequenz eingefügt. Die Sequenz und Orientierung der inserierten loxP Erkennungssequenz wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Die verwendete cDNA enthielt kein Polyadenylierungssignal. Deshalb wurde 3' der cDNA das 200 bp lange SV40-Polyadenylierungssignal aus dem Expressionsvektor pNASS $\beta$  einkloniert. Damit war der Vektor fertiggestellt, der kurzen Arm und cDNA des Targeting Vektors vereinigte.

Parallel wurde der Teil des Targeting Vektors kloniert, der den langen Arm enthielt. Dazu wurde zunächst ein 5 kb langes genomisches Fragment in pBluescript SK - subkloniert. Eine im genomischen Fragment vorhandene XhoI-Schnittstelle wurde zuvor durch Auffüllen entfernt, zudem wurde in das Plasmid eine AscI Schnittstelle für die spätere Linearisierung des Targeting-Vektors eingefügt. Das von loxP-Elementen flankierte Neomycin-Resistenzgen aus dem Vektor pTV-flox wurde 5' vor das genomische 5 kb Fragment kloniert.

Im finalen Schritt wurde das DNA Fragment, das den kurzen Arm, die cDNA und das Polyadenylierungssignal umfaßte, 5' vor dem Neomycin-Resistenzgen eingefügt, und der met<sup>flox</sup> Targeting-Vektor damit fertiggestellt (Abb. 3.1a).



### Abb.3.1: Herstellung des met<sup>flox</sup> Allels

(A) Targeting-Strategie. Der met<sup>flox</sup> Targeting-Vektor wird durch homologe Rekombination in das Genom von ES Zellen eingebracht. Exons XII-XIV werden durch den Targeting-Vektor entfernt (B) Southern-Blot-Analyse der ES Zellen. Spur 1: Wildtyp-DNA Spur 2,; met<sup>floxneo</sup>-Allel; Spur 3: met<sup>flox</sup>-Allel ohne Neomycinresistenz-Kassette (C) Expression und Aktivität des met<sup>floxneo</sup>-Allels. links: Western-Blot einer Immunpräzipitation des hybriden Met-Rezeptors aus Leberlysaten eines Wildtyp- und eines chimären Tieres mit Antikörper gegen humanes Met. rechts: Autokinaseassay nach Immunpräzipitation des hybriden Rezeptors aus Leberlysaten der gleichen Tiere. (D): Westernblot auf Leberlysaten von met<sup>floxneo</sup>/mx-Cre Tieren, die mit Saline bzw. poly(I:C) behandelt wurden.

### 3.1.2 Homologe Rekombination des $met^{flox}$ Targeting-Vektors in embryonalen Stammzellen und Etablierung der $met^{floxneo}$ Mauslinie

Der  $met^{flox}$  Targeting-Vektor wurde mit AscI linearisiert und in E14.1 ES Zellen elektroporiert (siehe 2.2.8.2). Nach Selektion mit G418 wurden resistente ES-Zellklone isoliert und durch Southern-Hybridisierung auf homologe Rekombination geprüft. Als Sonde diente ein 2 kb BamHI/BamHI Fragment aus dem genomischen Met Klon  $\lambda$ 2.2M6.9, das außerhalb des Targeting-Vektors lag. Unter 200 analysierten ES-Zellklonen konnten neun Klone identifiziert werden, bei denen der  $met^{flox}$  Targeting-Vektor durch homologe Rekombination in das Genom integriert worden war.

Drei unabhängige Klone F8, G3 und H11 wurden in Blastozysten von C57Bl/6 Mäusen injiziert, und die Blastozysten in den Uterus von scheinchwangeren CB6F1 Ammenmüttern transferiert (siehe 2.2.9). Da die verwendeten ES-Zellen aus agoutifarbenen 129/Ola Mäusen, die Blastozysten jedoch aus C57Bl/6 Mäusen mit schwarzer Fellfarbe stammen, kann man anhand der Fellfarbe der chimären Nachkommen auf den Beitrag der ES-Zellen zu den somatischen Geweben schließen. Eine Fellfarbe mit hohem Agouti-Anteil deutet auf einen starken Beitrag der ES-Zellen zum somatischen Gewebe, und damit häufig auch zu den Keimzellen, hin. Hochchimäre Männchen wurden mit C57Bl/6 Weibchen verpaart. Die Keimbahngängigkeit der eingeführten Mutation konnte an der braunen Fellfarbe der F1-Nachkommen erkannt werden, die sich aus der Kombination der Erbinformation für Agouti und Schwarz in den Keimzellen der Elterntiere ergibt. Das Vorhandensein des  $met^{floxneo}$ -Allels in der F1 Generation wurde mittels Southern-Hybridisierung und PCR verifiziert (siehe 2.2.3 und 2.2.7). Die heterozygoten Tiere waren gesund und fertil.

### 3.1.3 Vorversuche zu Aktivität und induzierter Inaktivierung des $met^{floxneo}$ -Allels

Um die Aktivität des hybriden murin-humanen *Met* Rezeptors zu testen, wurde einem sechs Wochen alten hochchimären Weibchen und einem Kontrolltier die Leber entnommen und für die Immunpräzipitation aufgearbeitet (siehe 2.2.12ff). Hierbei wurde ein Antikörper verwendet, der gegen eine Domäne im C-Terminus des Rezeptors gerichtet ist und spezifisch und ausschließlich mit humanem *Met* Protein reagiert. Ein Teil des immunpräzipitierten Rezeptors wurde mit SDS-PAGE und Western Blot analysiert (siehe 2.2.12ff). Um die Aktivität des hybriden Rezeptors zu testen, wurde

mit einem Teil des Immunpräzipitats ein radioaktiver Autokinase-Assay mit anschließender SDS-PAGE und Autoradiographie durchgeführt. Der hybride *Met* Rezeptor konnte im Western-Blot im chimären Tier, jedoch nicht im Kontrolltier detektiert werden (Abb. 3.1c). Das Autoradiogramm des Kinase-Assays zeigte, daß der Rezeptor aktiv ist und sich autophosphoryliert (Abb 3.1c).

Da einer der geplanten Schwerpunkte der Phänotypanalyse auf der Funktion von *Met* bei Homöostase und Regeneration der adulten Leber liegen sollte, wurden mit heterozygoten  $met^{floxneo}$ -Tieren Vorversuche zur leberspezifischen Inaktivierung des Allels unternommen. Dabei wurde das Mx-Cre Transgen verwendet, um die Deletion des  $met^{floxneo}$  Allels *in vivo* durchzuführen (Kuhn et al., 1995). *Mx1* ist ein Interferon-induzierbares Gen, das bei viralen Infektionen aktiviert wird (Arnheiter et al., 1990; Hug et al., 1988). Expression des Mx-Cre Transgens kann in vielen Zelltypen durch Interferon oder durch Agenzien, die eine virale Infektion vortäuschen (doppelsträngige Nukleinsäuren wie poly(I:C)), induziert werden. Eine effektive Cre-vermittelte Rekombination wird bei induzierten Mäusen in verschiedenen Organen und Zelltypen beobachtet, und in den Zellen der Leber wird eine fast vollständige Rekombination erzielt (Kuhn et al., 1995).

Zwei adulte, 8 Wochen alte heterozygote  $met^{floxneo}/Mx-Cre$  Männchen wurden dreimal im Abstand von jeweils zwei Tagen mit poly(I:C) bzw. Saline injiziert, um Expression von Mx-Cre zu induzieren. Zwei Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet und die Lebern entnommen. Das Gewebe wurde für Immunpräzipitation des *Met* Rezeptors aufgearbeitet. Bei dem mit poly(I:C) induzierten Tier war die Menge des detektierten Rezeptors stark reduziert (Abb. 3.1d).

Mit Hilfe der oben beschriebenen Experimente konnte gezeigt werden, daß das  $met^{floxneo}$ -Allel für einen funktionsfähigen hybriden *Met* Rezeptor kodiert. Durch Expression der Cre-Rekombinase in der Leber kann das Allel mit hoher Effizienz deletiert werden, so daß nur noch Spuren von hybridem *Met* Protein detektiert werden können.

### 3.1.4 Phänotyp des $met^{floxneo}$ -Allels

Initiale Verpaarungen von heterozygoten  $met^{floxneo}$ -Tieren brachten keine homozygoten Nachkommen hervor. Die Beobachtung von trächtigen Muttertieren zeigte dann, daß alle homozygoten  $met^{floxneo}$ -Jungtiere unmittelbar nach der Geburt starben. Offenbar war das  $met^{floxneo}$ -Allel hypomorph, was zu Defekten während der Embryonalentwicklung und so zum Tod der neugeborenen homozygoten  $met^{floxneo}$  Tiere führte. Im besonderen fiel bei diesen Tieren auf, daß die Arme und Beine sehr dünn waren, was auf eine schwache Ausprägung der Extremitätenmuskulatur hindeutet. Dissektion der mutanten Tiere zeigte weiterhin, daß nur Reste einer normalen Zwerchfellmuskulatur vorhanden waren. Die Zwerchfellmuskulatur ist essentiell für eine normale Atmung, und die schwache Ausprägung dieser Muskeln könnte für den beobachteten Phänotyp verantwortlich sein. Im Gegensatz zu diesen Muskeln waren andere Organe, die *Met* für eine normale Entwicklung benötigen, offenbar nicht beeinträchtigt. So wurde keine offensichtliche Veränderung in der Größe der Leber oder der Plazenta festgestellt. Zusammengekommen deuten diese Beobachtungen darauf hin, daß das  $met^{floxneo}$ -Allel hypomorph ist. Seine Anwesenheit führt zu Phänotypen, die auf eine abgeschwächten Aktivität des *Met* Rezeptors in Muskelvorläuferzellen schließen lassen. Für die konditionelle Mutagenese des Rezeptors war dieses Allel deshalb nicht zu gebrauchen.

### 3.1.5 Entfernung der Neomycin-Resistenzkassette aus dem $met^{floxneo}$ Locus

Der hypomorphe Phänotyp, der mit diesem Allel einherging, war unerwartet. Von einem ganz ähnlichen Konstrukt war nämlich publiziert worden, daß es keinen Phänotyp besitze (Maina et al., 1996). In den letzten Jahren wurden jedoch gehäuft hypomorphe Phänotypen beschrieben, die auf das Vorhandensein eines Neomycin-Resistenzgens in einem mutanten Locus zurückgeführt werden konnten. Die Anwesenheit dieser Resistenzkassette kann offensichtlich mit der Expression des endogenen Locus interferieren. Aus diesem Grund mußte die Neomycin-Resistenzkassette aus dem  $met^{floxneo}$ -Locus entfernt werden.

Dazu wurden die Embryonalen Stammzellen, die das  $met^{floxneo}$  Allel tragen, transient mit dem Cre-Expressionplasmid pIC Cre transfiziert (siehe 2.2.8.2). ES Zellklone wurden dann mit Hilfe der Southern-Hybridisierung auf den Verlust der Neomycin-

Resistenzkassette hin überprüft. Das gewünschte Allel ist in Abb. 3.1a schematisch gezeigt, und wurde  $met^{lox}$  genannt. Wie oben beschrieben wurden embryonale Stammzellen, die dieses Allel tragen, in Blastozysten injiziert. Chimäre Tiere wurden identifiziert, die das mutante Allel an ihre Nachkommen weitergaben, und so der  $met^{lox}$ -Stamm etabliert.

### 3.1.6 Phänotyp des $met^{lox}$ -Allels

Tiere mit dem  $met^{lox}$ -Allel wurden untereinander und mit heterozygoten *Met*<sup>+/-</sup>-Mäusen verpaart, um Nachkommen mit den Genotyp  $met^{lox}/met^{lox}$  oder  $met^{lox}/Met$ - zu erhalten. Dabei stellte sich heraus, daß einige Tiere mit einem  $met^{lox}/Met$ - Genotyp eine reduzierte Vitalität zeigten, sie waren kleiner als Tiere aus dem gleichen Wurf und wirkten hinfällig. Offenbar erreicht das  $met^{lox}$ -Allel nicht ganz die Aktivität des Wildtyp-Allels, was bei Experimenten mit  $met^{lox}$ -Tieren berücksichtigt werden muß.

### 3.2 Funktion von *Met* in der Entwicklung migratorischer Muskelvorläuferzellen

In Nullmutanten von *Met* und *HGF/SF* wurde neben Defekten in der Entwicklung von Plazenta und Leber auch das Fehlen von Muskeln in Extremitäten, Zwerchfell und Zunge beobachtet worden (Bladt et al., 1995; Schmidt et al., 1995). Die Analyse der Mutanten zeigte, daß sich diese Muskelgruppen aus wandernden Vorläuferzellen entwickeln. Die Muskelvorläuferzellen entstehen im Dermomyotom und wandern über festgelegte Routen an ihre Ziele. In den *Met* und *HGF/SF* Mutanten ist die Delamination der Zellen vom Dermomyotom gestört, so daß die Zellen nicht auswandern können (Bladt et al., 1995).

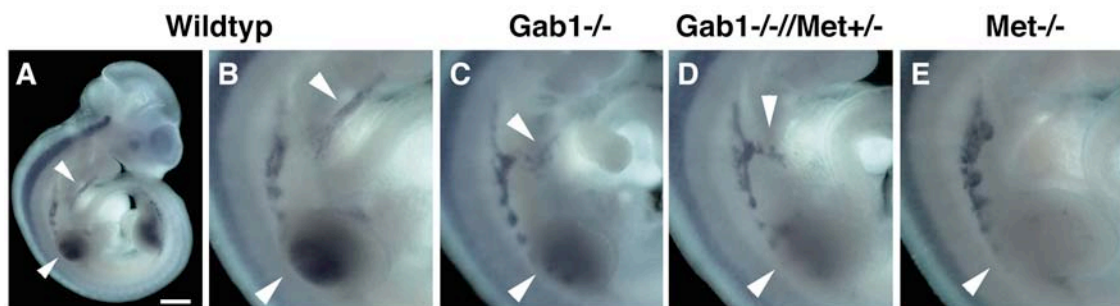
Die migrierenden Muskelvorläuferzellen exprimieren während der gesamten Wanderung *Met*, und der Ligand *HGF/SF* wird vom Mesenchym entlang des Migrationspfades sezerniert (Dietrich et al., 1999). Dies läßt vermuten, daß *HGF/SF* und *Met* nicht nur für die Delamination der Vorläuferzellen, sondern auch für die Wanderung an ihre Zielorte wichtig sein könnten: für die Zielfindung der Zellen, als Überlebensfaktor oder um vorzeitige Differenzierung zu verhindern. Diese Hypothesen konnten in den Nullmutanten nicht überprüft werden, da in *Met*<sup>-/-</sup> oder *HGF/SF*<sup>-/-</sup> Embryonen keine Delamination der Muskelvorläuferzellen und somit auch keine Wanderung stattfindet.

*Gab1* kodiert für einen Adaptor, der an den aktivierten *Met*-Rezeptor bindet und das Signal weiterleitet. Nullmutanten von *Gab1* in der Maus zeigen alle in der *Met*-Mutante beobachteten Veränderungen, allerdings nicht so stark ausgeprägt (Sachs et al., 2000). In den *Gab1*-Mutanten delaminieren weniger Zellen vom Dermomyotom, und Muskeln, die sich aus den wandernden Zellen entwickeln, sind abwesend oder zumindest in ihrer Größe reduziert. Der genaue Mechanismus ist allerdings noch nicht bekannt. Die *Gab1*-Mutanten und Doppelmutanten mit dem Genotyp *Gab1*<sup>-/-</sup>/*Met*<sup>+/-</sup> boten somit die Möglichkeit, das Wanderungsverhalten von Muskelvorläuferzellen zu untersuchen, in denen die Dosis des *Met* Signals reduziert ist. Dies sind Zellen, die zwar vom Dermomyotom delaminieren können, denen aber nur ein reduziertes *Met* Signal für die Wanderung an ihre Zielorte in den Extremitäten, im Zwerchfell und in der Zunge zur Verfügung steht.



### 3.2.1 Delamination von Muskelvorläuferzellen in Mutanten des *Met*-Signalsystems

In einem ersten Experiment wurde die Delaminationseffizienz in Embryonen mit den Genotypen *Gab1*<sup>-/-</sup>, *Gab1*<sup>-/-</sup>/*Met*<sup>+/-</sup> und *Met*<sup>-/-</sup> mit denen von Kontrollembryonen verglichen. Dazu wurde *in situ* Hybridisierung von ganzen Embryonen mit einer *Lbx1* Sonde durchgeführt. *Lbx1* kodiert für einen Homöodomain-Transkriptionsfaktor, der während der Muskelentwicklung ausschließlich in wandernden Vorläuferzellen exprimiert wird (Jagla et al., 1995). Verglichen wurden Embryonen in einem Stadium, in dem die Delamination vieler Zellen bereits stattgefunden hatte, d.h. Tag E10,5 (Somiten-Stadium 34-37).



**Abb.3.2: Migratorische Muskelvorläuferzellen in Mutanten des *Met*-Signalsystems**

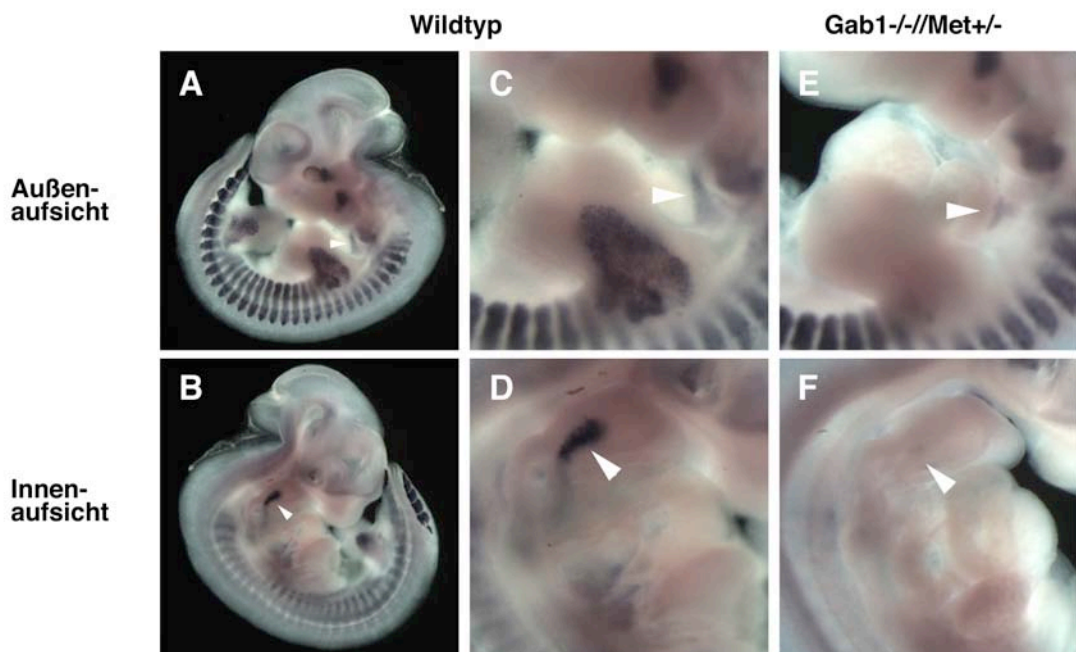
*Whole-mount in situ* Hybridisierung mit einer *Lbx1*-Sonde auf E10,5 Embryonen (A,B) Kontrolle. Darstellung der *Lbx1*-positiven Muskelvorläuferzellen; B zeigt eine Detailansicht des Zungenstroms sowie der Vorderextremität (Pfeile) (C) *Gab1*<sup>-/-</sup> Embryo; Wanderung der Vorläuferzellen in Extremität und Zunge ist sichtbar reduziert (D) *Gab1*<sup>-/-</sup>/*Met*<sup>+/-</sup> Embryo; weiter reduzierte Auswanderung der Vorläuferzellen (E) *Met*<sup>-/-</sup> Embryo; keine Delamination der Muskelvorläuferzellen vom Dermomyotom. Balken entspricht 500µm.

In Kontrollembryonen war zu diesem Stadium der hypoglossale Strom (=Zungenstrom) von Muskelvorläuferzellen schon gut ausgeprägt, die Zellen erreichten bereits den Branchialbogen. In ihrer Wanderung bewegen sie sich zuerst in eine ventrale Richtung, um dann in einem Bogen in okzipitale Richtung zum ersten Branchialbogen zu migrieren (Abb. 3.2 A,B). In den Kontrollembryonen waren nur wenige *Lbx1*-positive Zellen im Dermomyotom von okzipitalen Somiten zurückgeblieben. Auch in *Gab1*<sup>-/-</sup> Embryonen ist der hypoglossale Strom der wandernden Zellen zu erkennen, die Zellen haben allerdings eine kleinere Distanz zurückgelegt. Zudem sind in diesen Embryonen im Vergleich mehr *Lbx1*-positive Zellen in der Dermomyotomkante der okzipitalen Somiten zu erkennen (Abb. 3.2 C). In Embryonen mit dem Genotyp *Gab1*<sup>-/-</sup>/*Met*<sup>+/-</sup> ist in diesem Stadium der hypoglossale migratorische Strom nur sehr schwach ausgeprägt, und sehr viele *Lbx1*-positive Zellen haben sich nicht aus dem Dermomyotom abgelöst.

Offensichtlich ist, daß die Zellen, die sich abgelöst haben, nur eine geringe Distanz gewandert sind. Sie sind auch nicht in Richtung der Branchialbögen abgebogen, was den Eindruck eines kaudal weisenden "Hakens" aus *Lbx1*-positiven Zellen entstehen läßt (Abb. 3.2 D). In *Met*<sup>-/-</sup> Embryonen findet keine Delamination der Muskelvorläuferzellen statt (Abb. 3.2 E).

### 3.2.2 Defekte in der Myogenese bei *Gab1*<sup>-/-</sup>/*Met*<sup>+/-</sup> Embryonen

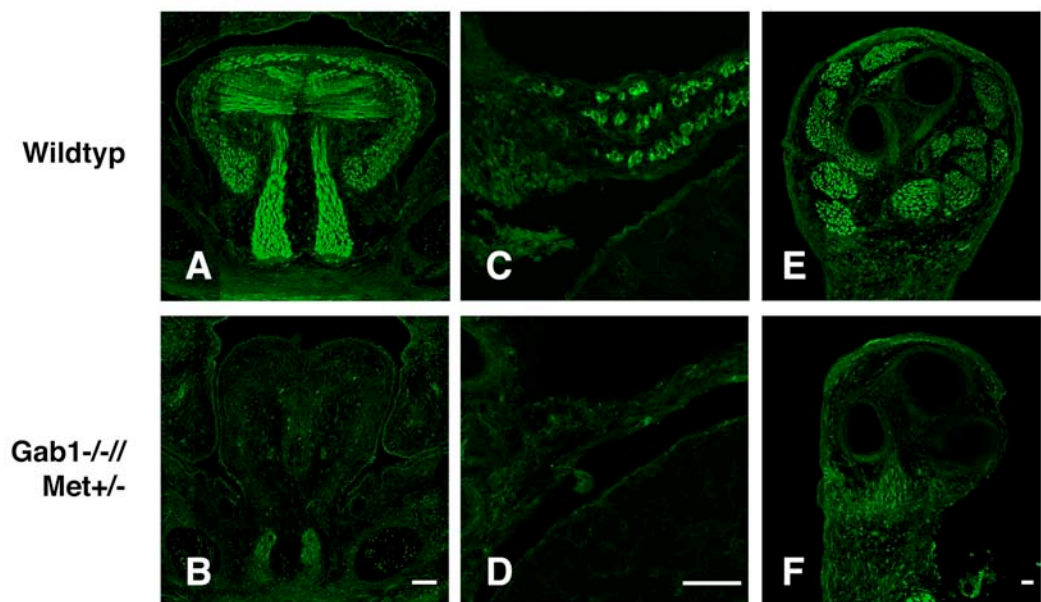
*In situ* Hybridisierung mit dem Muskeldifferenzierungsmarker *Myf5* im Entwicklungsstadium E11 zeigt, daß in *Gab1*<sup>-/-</sup>/*Met*<sup>+/-</sup> Embryonen nur wenige wandernde Vorläuferzellen in der Zungenanlage angekommen sind (Abb 3.3). Dieser Befund wird durch Immunhistologie mit einem anti-*Myosin*-Antikörper an Tag E14,5 bestätigt. In *Gab1*<sup>-/-</sup>/*Met*<sup>+/-</sup> Tieren fehlt der Anteil der Zungenmuskulatur, der von wandernden Vorläuferzellen abstammt. Die Zunge ist signifikant kürzer und weist einen geringeren Durchmesser auf (Abb. 3.4. A,B).



#### Abb.3.3: Expression von *Myf5* in migrierenden Muskelvorläuferzellen

*Whole-mount in situ* Hybridisierung auf E11 Embryonen mit einer *Myf5* Sonde; die Embryonen wurden entlang des Medians sagittal geteilt (A,B) Kontrolle. A zeigt eine Aufsicht, B eine Sicht auf das Innere des geteilten Embryos (C,D) Kontrolle. Detail des Zungenstroms (Pfeil) und der Vorderextremität (C) sowie des Zungenstroms in Innenaufsicht (D). (E, F) *Gab1*<sup>-/-</sup>/*Met*<sup>+/-</sup>. Detail des Zungenstroms (Pfeil) und der Vorderextremität (E) sowie Innenaufsicht auf die Zunge (F)

Immunhistologie mit dem Antikörper gegen *Myosin* an Tag E14,5 zeigt auch, daß im Zwerchfell von *Gab1*<sup>-/-</sup>/*Met*<sup>+/-</sup> Tieren so gut wie keine Muskelzellen vorhanden sind (Abb. 3.4 C,D). Obwohl an Tag E10,5 *Lbx1*-positive Muskelvorläuferzellen beobachtet werden können, die in Richtung Zwerchfell wandern, erreichen diese Zellen ihren Zielort offenbar nicht. Dieser Befund war zu erwarten, da in *Gab1*-Mutanten ebenfalls keine Muskelzellen im Zwerchfell gefunden werden (Sachs et al., 2000). Entsprechend fehlt in den *Gab1*<sup>-/-</sup>/*Met*<sup>+/-</sup> Doppelmutanten auch die distale Extremitätenmuskulatur, auch proximal sind nur sehr wenige Muskelzellen zu finden (Abb. 3.4 E,F).



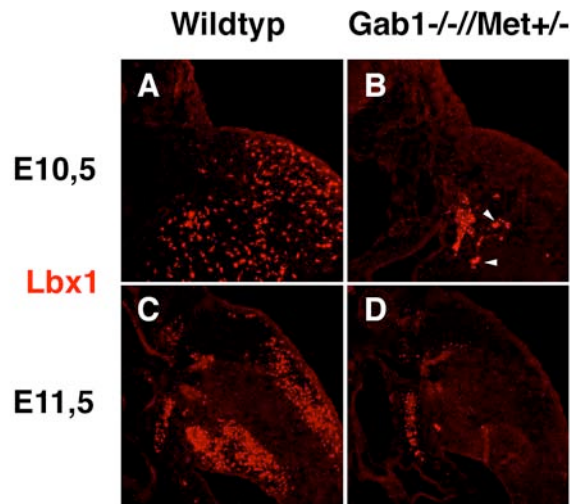
**Abb.3.4: Muskelentwicklung in *Gab1*<sup>-/-</sup>/*Met*<sup>+/-</sup> Embryonen an E14,5**

Immunfärbung mit anti-Myosin-Antikörper. (A,B) Koronalschnitt durch die Zungenbasis (C,D) Sagittalschnitt durch das Diaphragma (E,F) Transversalschnitt durch die hintere Extremität. Balken entspricht 100µm.

### 3.2.3 Schicksal der Muskelvorläuferzellen in *Gab1*<sup>-/-</sup>/*Met*<sup>+/-</sup> Doppelmutanten

Immunhistologie mit einem anti-*Lbx1*-Antikörper zeigt, daß in *Gab1*<sup>-/-</sup>/*Met*<sup>+/-</sup> Doppelmutanten an E10,5 einige wenige Zellen aus dem Dermomyotom in die Extremität einwandern (Abb. 3.5 A,B). Im Vergleich zur Kontrolle ist ihre Zahl sehr gering, zudem fällt auf, daß die Zellen in der Kombinationsmutante in kleinen Gruppen und nicht vereinzelt migrieren (Abb. 3.5 B, Pfeil). An Tag E11,5 sind in Kontrollembryonen die Anlagen für dorsale und ventrale Muskelmasse gut ausgepägt, während sich in den Mutanten nur einige Zellen in der Extremität finden

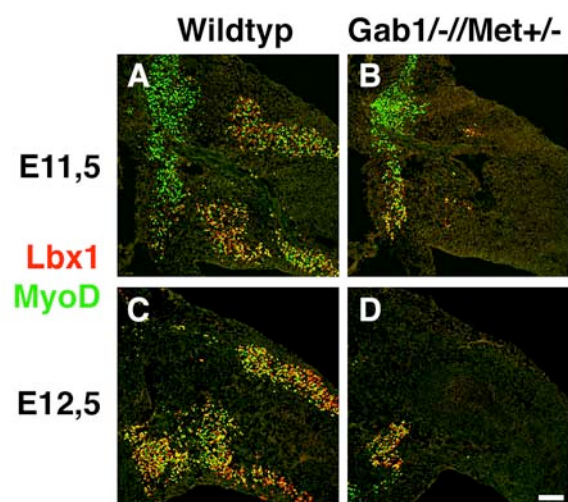
(Abb. 3.5 C,D); der größte Teil der Muskelvorläuferzellen verbleibt jedoch im Bereich der Dermomyotomkante (Abb.3.5 B).



**Abb.3.5: Migration Lbx1-positiver Muskelvorläuferzellen in die Extremität**

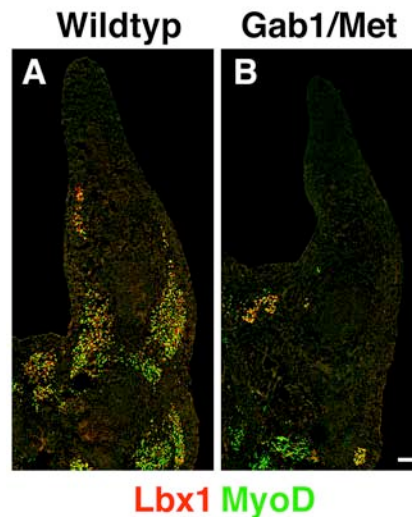
Transversalschnitte durch die vordere Extremität (A, B) An E10,5 wandern in der *Gab1-/-/Met+/-* Mutante nur wenige Zellen aus; die Zellen bilden kleine Gruppen (Pfeile) (C,D) An E11,5 sind in der Kontrolle die Anlagen für ventrale und dorsale Muskelmasse gut zu erkennen. In der Mutante sind so gut wie keine Lbx1-positiven Zellen in der Extremität zu finden.

Die in die Extremität eingewanderten Zellen initiieren allerdings ebenso wie die Muskelvorläuferzellen in den Kontrolltieren das muskuläre Differenzierungsprogramm, wie Doppelimmunhistologie mit *Lbx1* und dem Muskelmarker *MyoD* an Tag E11,5 und E12,5 zeigt (Abb. 3.6 B,D, Abb. 3.7 B).



**Abb.3.6: Muskeldifferenzierung in *Gab1-/-/Met+/-* Embryonen**

Immunfärbung gegen *Lbx1* (rot) und *MyoD* (grün); Transversalschnitt durch die Vorderextremität (A, B) Kontrolle an Tag E11,5 (A) und E12,5 (B) (C, D) *Gab1-/-/Met+/-* an Tag E11,5 (C) und E12,5 (D). Balken entspricht 200µm,



**Abb.3.7: Muskeldifferenzierung in *Gab1*<sup>-/-</sup>/*Met*<sup>+/-</sup> Embryonen**

Immunfärbung gegen *Lbx1* (rot) und *MyoD* (grün); Transversalschnitt durch die Vorderextremität an E12,5 (A) Kontrolle (B) *Gab1*<sup>-/-</sup>/*Met*<sup>+/-</sup>. Balken entspricht 200  $\mu$ m

Um das weitere Schicksal der Muskelvorläuferzellen in den *Gab1*<sup>-/-</sup>/*Met*<sup>+/-</sup> Doppelmutanten aufzuklären, wurden Experimente zu Zellproliferation und Apoptose durchgeführt (Abb. 3.8; siehe 2.2.10.5). Die Quantifizierung der Proliferation an Tag E10,5 und E11,5 durch BrdU-Inkorporation ergab eine um 25% verringerte Proliferationsrate *Lbx1*-positiver Vorläuferzellen in *Gab1*<sup>-/-</sup>/*Met*<sup>+/-</sup> Embryonen im Vergleich zu Kontrolltieren (Tab. 3.1).

	Proliferation		Apoptose	
	Kontrolle	<i>Gab1</i> <sup>-/-</sup> / <i>Met</i> <sup>+/-</sup>	Kontrolle	<i>Gab1</i> <sup>-/-</sup> / <i>Met</i> <sup>+/-</sup>
E10,5	45,7 +/-6,3%	34,6 +/-4,7%	4,6 +/-0,7%	16,4 +/-3,5%
E11,5	49,7 +/-3,9%	32,5 +/-8,4%	2,0 +/-0,1%	2,2 +/-0,7%

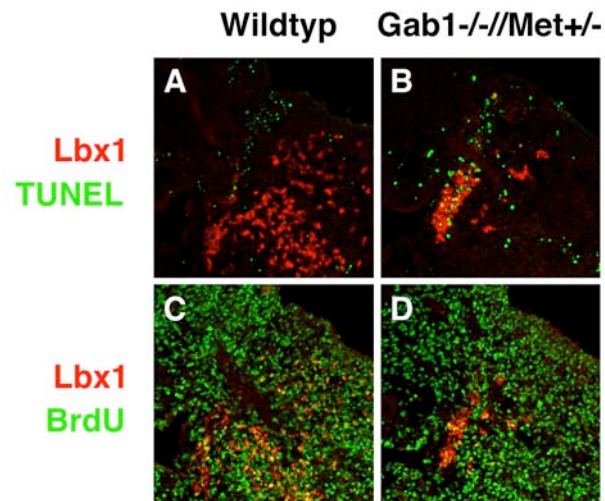
**Tab.3.1: Proliferation und Apoptose wandernder Muskelvorläuferzellen**

Proliferations- und Apoptoserate *Lbx1*-positiver Muskelvorläuferzellen der Vorderextremität in den Entwicklungsstadien E10,5 und E11,5 (n=3).

Die durch TUNEL-Färbung bestimmte Apoptoserate in den Doppelmutanten an Tag E10,5 ist gegenüber den Kontrolltieren um den Faktor 3,5 erhöht. An Tag E11,5 kann dagegen kein signifikanter Unterschied in der Apoptoserate zwischen Kontrolle und Mutanten mehr beobachtet werden (Tab. 3.1).



Dieser Befund deutet darauf hin, daß die nicht in die Extremität eingewanderten Muskelvorläuferzellen in *Gab1*<sup>-/-</sup>/*Met*<sup>+/-</sup> mutanten Embryonen rasch durch Apoptose eliminiert werden.



**Abb.3.8: Proliferation und Apoptose in Muskelvorläuferzellen im Entwicklungsstadium E10,5**

Transversalschnitte durch die vordere Extremität (A, B) Immunfärbung für *Lbx1* (rot) und TUNEL (grün) (C,D) Immunfärbung für *Lbx1* (rot) und BrdU (grün).

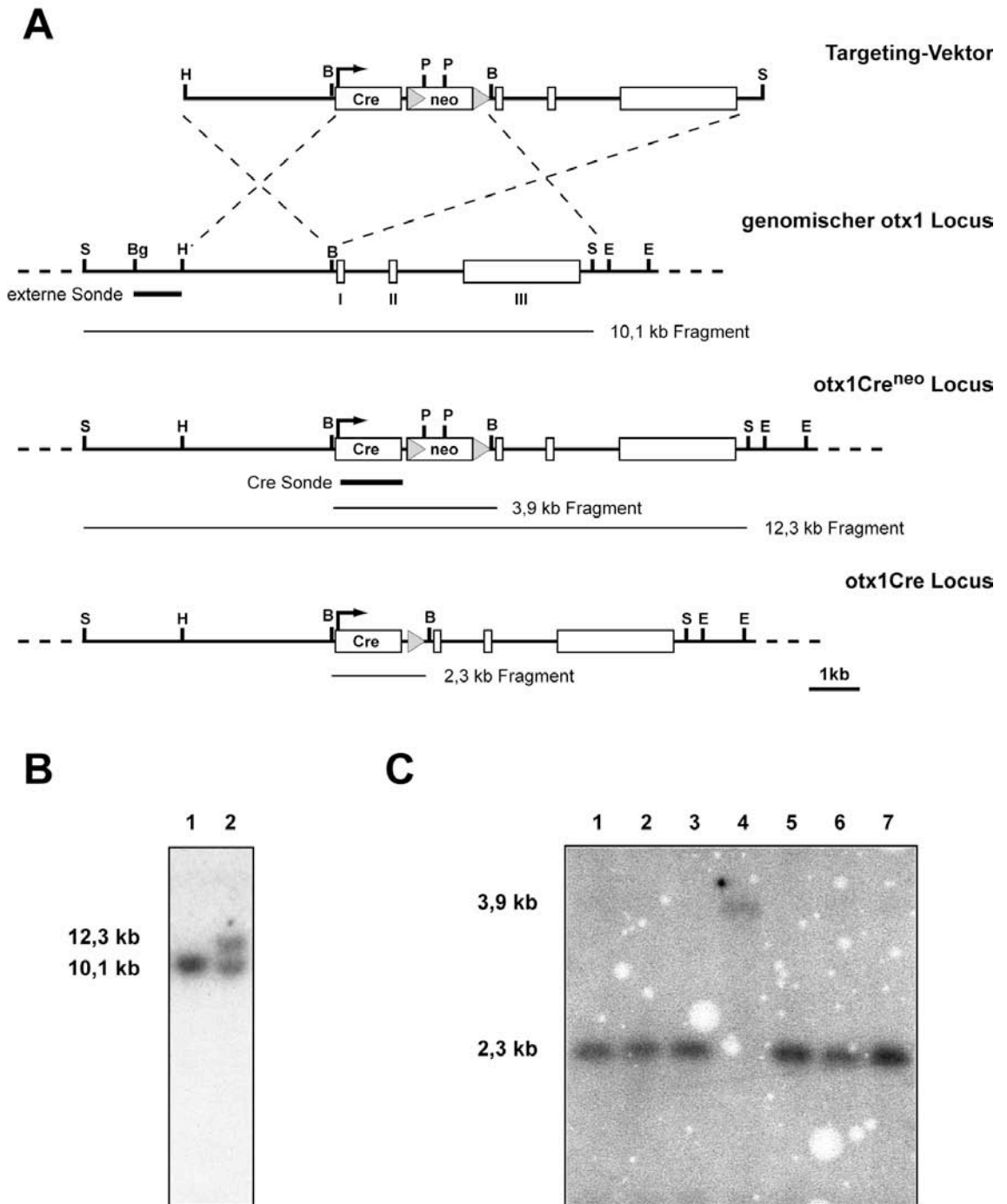
### 3.3 Konstruktion des *otx1Cre*-Transgens

Um die Rolle von *Met* während der Entwicklung des Gehirns zu studieren, wurde ein Mausstamm gesucht, der Cre unter Kontrolle eines ZNS-spezifischen Promotors exprimiert. Da zu dieser Zeit kein geeignetes Cre-Transgen zur Verfügung stand, sollte ein ZNS-spezifischer Cre-Stamm etabliert werden. Die Wahl fiel auf den Homöobox-Transkriptionsfaktor *Otx1*, der in Vorder- und Mittelhirn ab Tag E8,5 der Embryonalentwicklung exprimiert wird.

*Otx1* wurde in der Maus aufgrund seiner Homologie zu dem *Drosophila* Homöobox-Transkriptionsfaktor *orthodenticle* identifiziert (Simeone et al., 1992). Die Expression von *Otx1* beginnt an Tag E8,5 der embryonalen Entwicklung im vorderen Neuralrohr. Im Stadium E9,75 zieht sich die Expressionsdomäne dorsal über einen Teil des Telencephalon und über das Diencephalon hin bis zur Grenze des Mesencephalon. Ventral wird *Otx1* scharf begrenzt in einem Bereich von Diencephalon bis Mesencephalon exprimiert (siehe Abb 3.11c). *Otx1* wird also in vielen Vorläuferzellen des Gehirns exprimiert. Es wurde deshalb ausgewählt, um einen ZNS-spezifischen Cre-Stamm zu etablieren.

Ein mögliches Problem bei der Herstellung von transgenen Mäusen ist die ektopische Expression des Zielgens in anderen als den eigentlich beabsichtigten Geweben. Im Fall von Cre-Transgenen ist dies besonders kritisch, da eine auch nur transiente Cre-Expression zu einem ein dauerhaft deletierten Allel führt, das an Tochterzellen weitergegeben wird. Hier bietet die Konstruktion eines *knock-in* Allels gegenüber einem konventionellen Transgen eine höhere Wahrscheinlichkeit, daß das Transgen in dem gewünschten Muster exprimiert wird. Bei einem derartigen *knock-in* Allel wird die Kodierungssequenz von Cre in ES Zellen mittels homologer Rekombination in einen genomischen Locus eingebracht, wobei regulatorische Sequenzen des Locus möglichst nicht verändert oder deletiert werden.

Für die Konstruktion des *otx1Cre* Transgens wurde aus den genannten Gründen daher die Methodik des *knock-in* gewählt, um eine möglichst authentische Expression der Cre-Rekombinase im transgenen Tier zu gewährleisten



### Abb.3.9: Herstellung des otx1Cre-Allels

(A) Targeting-Strategie. Der otx1Cre Targeting-Vektor wird durch homologe Rekombination in das Genom von ES Zellen eingebracht, die Intron-Exon-Struktur des *Otx1* Locus bleibt dabei erhalten. Durch Einkreuzen eines FlpE-Deleter-Allels wird die Neomycinresistenz-Kassette *in vivo* entfernt (B) Southern-Blot-Analyse der ES Zellen. Spur 1: wt-DNA; Spur 2: ES Zelle mit otx1Cre<sup>neo</sup> Allel (C) Southern-Blot-Analyse der Deletion der Neomycinresistenz-Kassette *in vivo*. Spuren 1-7: F1 Nachkommen aus otx1Cre<sup>neo</sup> x FlpE-Deleter Verpaarung, Nachweis des Allels mit einer internen Cre-Probe. Bis auf Spur 5 zeigen alle Nachkommen eine Deletion der Neomycinresistenz-Kassette.



### 3.3.1 Isolierung des genomischen otx1-Lokus

Die Intron-Exon-Struktur des murinen otx1 Gens und Teile der cDNA waren aus der Literatur bekannt (Simeone et al., 1992; Simeone et al., 1993); zudem war die vollständige cDNA Sequenz des otx1 Gens der Ratte veröffentlicht worden (GenBank-Nummer L32602). Ausgehend von dieser Information wurde eine PCR-Reaktion auf genomischer DNA etabliert, die 440 Basenpaare von Exon 3 des murinen otx1 Gens amplifiziert (siehe 2.2.3). 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 (P1 ES129/Ola, Sternberg und Cohen, 1989) isolierte. Die P1-Klone wurden verifiziert und für die Konstruktion des Targeting Vektors verwendet (zur Klonierung des Targeting Vektors siehe auch 2.3.2ff).

### 3.3.2 Mutagenese des PGKCrebpA Vektors

Als Quelle für die Cre-cDNA wurde der Expressionsvektor PGKCrebpA verwendet (W. Müller, Universität Köln). Dieser Expressionvektor enthält Cre unter der Kontrolle eines PGK-Promoters, sowie ein Spleißakzeptor- und Polyadenylierungssignal. Nicht publizierte Daten zeigten, daß in bestimmten Konstrukten eine kryptische Spleißdonorstelle in der kodierenden Cre-Sequenz benutzt wird, die zu fehlerhaftem Spleißen und zu verminderter Produktion der Cre-Rekombinase führen kann (R. Kühn, persönliche Mitteilung). Dieses Problem kann bei Kodierungssequenzen aus prokaryontischen Organismen auftreten, die in eukaryontischen Systemen exprimiert werden. Die für Cre kodierende Sequenz wurde deshalb mit einem Programm zur Vorhersage von Spleißdonor- und -akzeptorstellen analysiert (Reese 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 1978). Das Kodon cag kodiert für Glutamin und kann in der dritten Base in caa mutiert werden, ohne die kodierte Aminosäure zu verändern. Diese Veränderung zerstört den potentiellen Spleißdonor.

Diese Mutation wurde über ein kurzes Stück synthetisierter DNA in die Kodierungssequenz von Cre eingeführt, und das resultierende Plasmid pCremutbpA durch Sequenzierung verifiziert.

### 3.3.3 Klonierung des *otx1Cre* Targeting-Vektors

Als Selektionsmarker für die ES-Zellkultur wurde ein mit FRT-Erkennungssequenzen flankiertes Neomycin-Resistenzgen mit PGK-Promotor gewählt (Fiering et al., 1995). Dieses FRT-PGKneo erlaubt die Entfernung der Resistenzkassette durch transiente Expression der Flp-Rekombinase in Zellkultur (Dymecki, 1996b). Der *otx1Cre*-Targeting Vektor sollte somit aus einem kurzen 5'-Arm, der Cre-Rekombinase mit Polyadenylierungssignal, einem FRT-PGKneo Resistenzmarker, einem langen 3'-Arm und einer Sse 8387 Schnittstelle für seine Linearisierung bestehen (siehe Abb. 3.9).

Als Grundgerüst für den *otx1Cre* Targeting Vektor wurde ein modifizierter pBluescript-Vektor, pPolySK, verwendet. Für den kurzen Arm wurde ein 3 kb langes genomisches Fragment, das Promotorsequenzen und 5'UTR von *otx1* enthält, einkloniert; 3' davon wurde die mutierte Cre-kodierende Sequenz mit Polyadenylierungssignal eingefügt. Parallel dazu wurde das FRT-flankierte PGK-Neomycin-Resistenzgen in den pMCS5 Vektor subkloniert, und 3' davon das 5 kb große genomische Fragment des langen Arms eingesetzt. Schließlich wurde der Targeting-Vektor *potx1Cre* dadurch fertiggestellt, daß die beiden Teile fusioniert wurden (Abb. 2.2; siehe auch 2.3.2ff).

### 3.3.4 Homologe Rekombination des *otx1Cre* Targeting-Vektors in embryonalen Stammzellen und Etablierung der transgenen Mauslinie

Der *otx1Cre* Targeting-Vektor wurde mit Sse8387 linearisiert und in R1 ES-Zellen elektroporiert. Nach Selektion mit G418 wurden resistente ES-Zellklone isoliert und durch Southern-Hybridisierung auf homologe Rekombination geprüft. Als Sonde diente ein BglII/HindIII Fragment, das außerhalb des Targeting-Vektors lag. Unter 300 analysierten ES-Zellklonen konnten drei Klone identifiziert werden, in denen der *otx1Cre* Targeting-Vektor durch homologe Rekombination in das Genom integriert worden war.

Die identifizierten Klone 2A7, 2A9 und 2C4 wurden expandiert und für die Entfernung des FRT-flankierten Neomycinresistenzgens mit dem Flp-Rekombinase Expressionsvektor *phACTB::Flp* elektroporiert (siehe 2.2.8.2; Dymecki, 1996b). Nach der Elektroporation wurden Kolonien mittels Southern-Analyse daraufhin getestet, ob die Neomycin-Resistenzkassette deletiert worden war. Trotz mehrfacher Wiederholung der Elektroporation konnten keine Klone identifiziert werden, in denen das

Resistenzgen entfernt worden war. Es wurde daher beschlossen, den Resistenzmarker später *in vivo* durch Einkreuzen eines Flp-Deleter-Allels zu entfernen. Bei diesem Allel wird die Flp Rekombinase unter Kontrolle eines starken Promotors in allen somatischen Zellen und den Keimzellen exprimiert.

Die ES-Zellklone 2A7, 2A9 und 2C4 wurden in Blastozysten von C57Bl/6 Mäusen injiziert, die anschließend in die Uteri von scheinchwangeren CB6F1 Weibchen transferiert wurden. Aus den injizierten Blastozysten hervorgegangene chimäre Männchen wurden mit C57Bl/6 Weibchen verpaart. Von den drei injizierten Klonen konnten zwei, 2A7 und 2A9, zur Keimbahn beitragen. Das Vorhandensein des  $otx1Cre^{neo}$  Allels in der F1 Generation wurde mittels Southern-Hybridisierung und PCR verifiziert.

Um die Neomycin-Resistenzkassette zu entfernen, wurden  $otx1Cre^{neo}$  Mäuse der F1 Generation mit Flp-Deleter Mäusen gepaart (Dymecki, 1996b). Die Analyse von über 100 Nachkommen dieser Verpaarungen ergab jedoch, daß bei keinem Tier das Neomycin-Resistenzgen deletiert worden war. Daher wurden zunächst  $otx1Cre^{neo}$  Tiere verwendet, um die Cre-Rekombinaseaktivität *in vivo* zu bestimmen.

### 3.3.5 Überprüfung der Cre-Rekombinaseaktivität *in vivo* durch Reporterallel

Aktivität und Expressionsdomäne der Cre-Rekombinase im  $otxCre^{neo}$  Stamm wurde durch Einkreuzen eines Reporterallels überprüft. Bei Reporter- oder Indikatorallelen handelt es sich um Gene wie  $\beta$ -Galaktosidase oder Alkalische Phosphatase, deren enzymatische Aktivität leicht nachweisbar ist, und die unter der Kontrolle eines starken ubiquitären Promotors wie z.B.  $\beta$ -Aktin exprimiert werden. Im Grundzustand wird von diesen Allelen kein aktives Enzym produziert, da eine loxP-flankierte Stopkassette zwischen Promotor und Reporter gen eingefügt wurde. Wird diese Stopkassette durch Expression der Cre-Rekombinase entfernt, so kann das Reporter gen exprimiert werden. Gewebe, in denen eine Rekombinase-vermittelte Exzision der Stopkassette stattgefunden hat, können somit durch geeignete histologische Färbetechniken kenntlich gemacht werden. Es sollte jedoch darauf hingewiesen werden, daß der Nachweis der enzymatischen Aktivität in einem bestimmten Gewebe und einem bestimmten Entwicklungsstadium nicht notwendig bedeutet, daß die Cre Rekombinase in diesem Stadium im Gewebe tatsächlich aktiv ist. Vielmehr zeigt die enzymatische Aktivität an, daß Cre zu einem beliebigen Zeitpunkt in der Entwicklung des Gewebes

aktiv war oder ist. Dies bedeutet, daß die Aktivität von Cre in Vorläuferzellen eines bestimmten Organs oder Gewebes ausreicht, um dieses Gewebe mit den histologischen Nachweismethoden für Reporter-genaktivität darstellbar zu machen.

Erste Versuche mit dem Indikator-Stamm (Thorey et al., 1998) zeigten eine ubiquitäre LacZ-Färbung bei allen  $otx1Cre^{neo}$ /Indikator Embryonen. Die Cre-Rekombinase war somit aktiv, das Transgen wurde allerdings nicht spezifisch in Vorder- und Mittelhirn, sondern ubiquitär exprimiert. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden weitere Arbeiten mit dem  $otx1Cre^{neo}$  Stamm vorerst eingestellt.

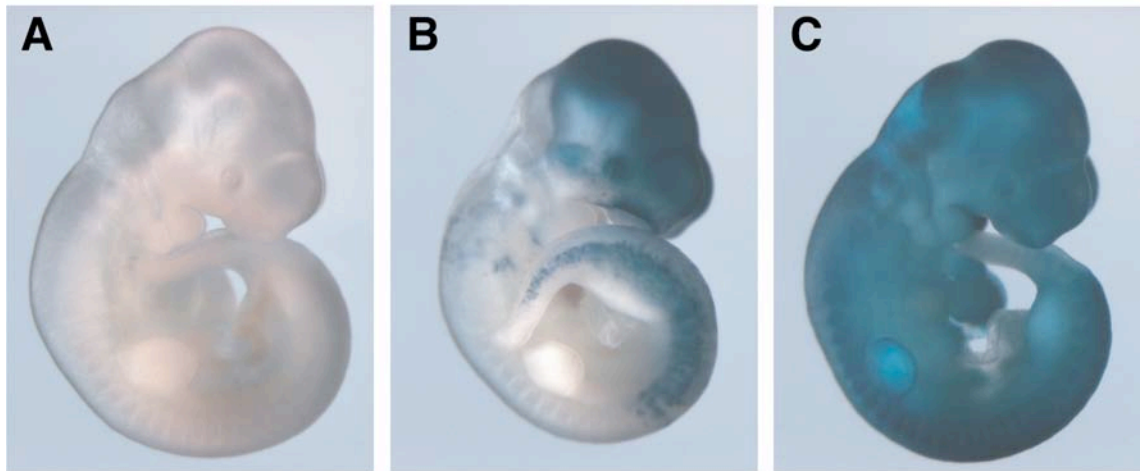
### 3.3.6 Einkreuzen eines optimierten FLP-Deleter Allels

Die aus der Hefe *S.cerevisiae* stammende FLP-Rekombinase arbeitet in eukaryontischen Zellen nicht in ihrem Temperaturoptimum und ist deshalb nicht sehr aktiv. Aus diesem Grund war mit Methoden der molekularen Evolution eine Variante von FLP erzeugt worden, die in Säugerzellen eine höhere Aktivität als das Wildtyp-Enzym aufweist (Buchholz et al., 1998). In der Folge wurde dieses Enzym, FLPe, zur Etablierung einer verbesserten Linie von FLPe-Deleter Mäusen eingesetzt (Rodriguez et al., 2000).

Mit Hilfe des FLPe-Deleter Stammes wurde erneut der Versuch unternommen, die FRT-PGKNeo-Kassette aus dem  $otx1Cre$  Allel zu deletieren. Die Genotypisierung der Nachkommen aus Kreuzungen von FLPe-Deleter Männchen mit  $otx1Cre^{neo}$  Weibchen durch Southern-Hybridisierung zeigte, daß das Resistenzgen in etwa 80% aller Tiere deletiert worden war (Abb 3.9c). Diese Tiere wurden zur weiteren Analyse des  $otx1Cre$  Transgens verwendet.

### 3.3.7 Analyse der Cre-Rekombinaseaktivität *in vivo* durch Reporterallele

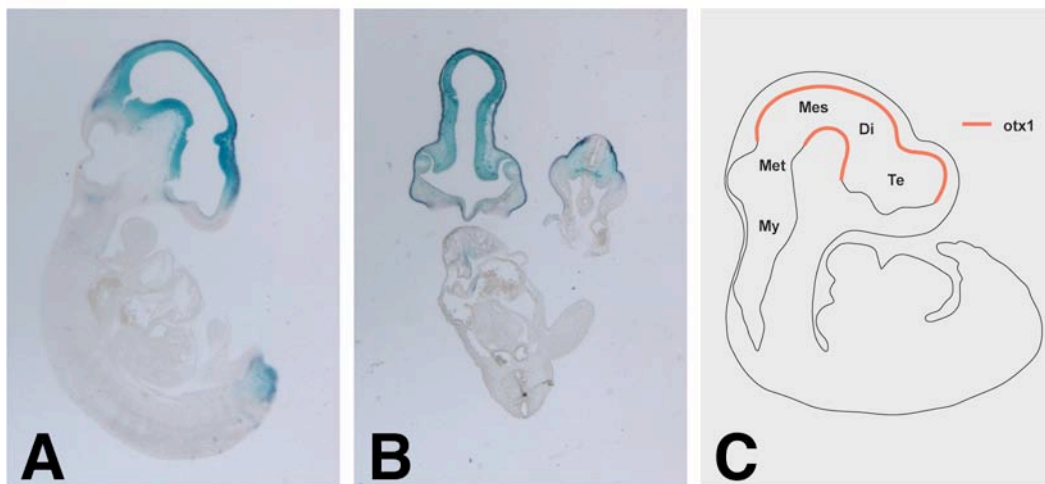
$Otx1Cre$  Mäuse wurden mit Z/AP-Reporter-Mäusen gekreuzt. Im Z/AP Transgen wird durch Cre-vermittelte Rekombination gewebespezifisch eine ubiquitär und konstitutiv exprimierte  $\beta$ -Galaktosidase ( $lacZ$ ) inaktiviert und gleichzeitig das Reporterenzym Alkalische Phosphatase (AP) aktiviert. (Lobe et al., 1999). Cre-Aktivität in einem Gewebe kann somit sowohl durch die Abwesenheit von  $lacZ$ -Reporteraktivität als auch durch das Vorhandensein von AP-Reporteraktivität nachgewiesen werden.



**Abb.3.10: Nachweis von Cre-Aktivität in otx1Cre Mäusen**

Embryonen des Entwicklungsstadiums E10,5 aus einer Verpaarung otx1Cre x Z/AP-Reporter. Färbung auf AP-Aktivität. (A) Kontrolle (B, C) otx1Cre+/-/Z/AP+/- Embryonen. (B) Cre-Aktivität ist im Bereich des Vorder- und Mittelhirns sowie im kaudalen Ektoderm zu beobachten. (C) In einigen Embryonen wird die Cre-Rekombinase ubiquitär exprimiert.

Embryonen aus diesen Verpaarungen wurden an Tag E10,5 durch histologische Färbung für Alkalische Phosphatase analysiert. Neben Embryonen mit einer weitgehend spezifischen Anfärbung im Vorder- und Mittelhirn sowie in kaudalen Somiten und Mesenchym wurden auch Embryonen mit ubiquitärer Färbung beobachtet (Abb 3.10, 3.11).



**Abb.3.11: Lokalisation der Cre-Aktivität in otx1Cre Mäusen**

Färbung auf AP-Aktivität in otx1Cre//Z/AP-Reporter Embryonen des Entwicklungsstadiums E10,5. (A) Vibratomschnitt sagittal (B) Vibratomschnitt koronal. Rekombinaseaktivität kann im Neuroektoderm des Vorder- und Mittelhirns, kranialen Ektoderm, Teilen des Herzens sowie im kaudalen Mesenchym und Ektoderm nachgewiesen werden. (C) Schematische Darstellung der Expressionsdomäne von Otx1 in der Maus an Tag E10,5 der Embryonalentwicklung. (nach Simeone et. al., 1992).

Die Expression von Cre unter der Kontrolle des *Otx1* Promoters entspricht damit nicht in allen Tieren dem erwarteten Muster. Ubiquitäre Färbung wurde in etwa 25% aller analysierten *otx1Cre//Z/AP* doppelheterozygoten Tiere beobachtet (n>50). Diese Frequenz läßt vermuten, daß ein mit mendelscher Häufigkeit vererbter Modifikator vorliegt. Eine ähnliche Heterogenität im Expressionsmuster eines Cre-Transgens war zuvor auch schon bei anderen Stämmen, zum Beispiel im *Foxg1-Cre* Transgen, beobachtet worden (siehe auch Diskussion Abschnitt 4.3).