

Aus der Klinik für Kardiologie und Pneumologie
(Prof. Dr. med G. Hasenfuß)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die Rolle von *Gse1* in der embryonalen Hämatopoese der Maus

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Kristin Schneider

aus

Bückeburg

Göttingen 2020

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in Prof. Dr. med. E. Zeisberg

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. med. I. Adham

Prüfungskommission

Referent/in Prof. Dr. med. E. Zeisberg

Ko-Referent/in: PD Dr. med. J. Männer

Drittreferent/in: Prof. Dr. mult. T. Meyer

Datum der mündlichen Prüfung: 05.08.2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Die Rolle von *Gse1* in der embryonalen Hämatopoese der Maus" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung	1
1.1 Das Gen <i>Gse1</i>	1
1.1.1 <i>GSE1</i> in der aktuellen Forschung.....	1
1.1.2 Das Hypoplastische Linksherzsyndrom	2
1.1.3 Die Knockout-First-Strategie	3
1.1.4 Struktur des Knockout-First-Allels <i>Gse1^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}</i>	4
1.1.5 Bisherige Ergebnisse bezüglich des <i>Gse1</i> -Knockouts.....	4
1.2 Embryonale und fetale Entwicklung der Maus	6
1.2.1 Präimplantationsphase (Tage 0 bis 4).....	6
1.2.2 Periimplantationsphase (Tage 4.5 bis 8.5)	7
1.2.3 Organogenese (Tage 9-14).....	8
1.2.4 Fetalzeit (Tag 15 bis zur Geburt).....	9
1.3 Embryonale und fetale Sterblichkeit	10
1.4 Embryonale und fetale Hämatopoese.....	12
1.4.1 Hämatopoese im Dottersack.....	13
1.4.2 Hämatopoese in der AGM-Region und den großen Gefäßen.....	15
1.4.3 Hämatopoese in der Plazenta	16
1.4.4 Hämatopoese in der fetalen Leber.....	17
2 Material und Methoden	20
2.1 Material.....	20
2.1.1 Mäuse.....	20
2.1.2 Reagenzien.....	21
2.1.3 Puffer.....	23
2.1.4 Kommerzielle Kits	23
2.1.5 Antikörper	23
2.1.6 PCR Primer	24
2.1.7 Allgemeine Materialien	24
2.1.8 Gerätschaften.....	25
2.2 Methoden.....	26
2.2.1 Genotypisierung	26
2.2.2 Kolorimetrische Bestimmung der Hämoglobinkonzentration in embryonalen Blutproben.....	28
2.2.3 Histologische Färbungen	29
2.2.4 Statistische Auswertung.....	32
3 Ergebnisse.....	33
3.1 Ergebnisse der <i>Gse1</i> -Genotypisierungen	33

3.1.1	Genotypisierungsergebnisse von Embryonen zum Zeitpunkt E18.5.....	33
3.1.2	Genotypisierungsergebnisse von Embryonen zum Zeitpunkt E15.5.....	35
3.2	Ergebnisse der Hämoglobinnmessungen	37
3.3	Vergleich der Verteilung und Morphologie der Blutzellen.....	38
3.3.1	Vergleich der Blutzellmorphologie zum Zeitpunkt E15.5.....	38
3.3.2	Verteilung der Blutzellen zum Zeitpunkt E15.5	40
3.3.3	Vergleich der Blutzellmorphologie zum Zeitpunkt E18.5.....	41
3.3.4	Verteilung der Blutzellen zum Zeitpunkt E18.5	43
3.3.5	Vergleich der Morphologie von Blutzellen zu den Zeitpunkten E15.5 und E18.5.....	45
3.3.6	TER-119-Färbung von Blutzellen in Gefäßen	47
3.4	Immunhistochemische TER-119-Färbungen der Leber.....	49
3.5	Ergebnisse der LacZ-Färbung.....	50
4	Diskussion.....	55
5	Zusammenfassung.....	67
6	Literaturverzeichnis	69

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur des EUCOMM/KOMP-CSD Knockout-first-Allels	3
Abbildung 2: Schema des Allels $Gse1^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}$	4
Abbildung 3: Schema der Vorgänge während der Präimplantationsphase	7
Abbildung 4: Hämatopoetische Organe des Mausembryos	13
Abbildung 5: Hämatopoese und Etablierung von hämatopoetischen Stammzellpools in der Maus.....	13
Abbildung 6: Schema des Allels $Gse1^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}$	20
Abbildung 7: Schema der möglichen Allele ausgehend von dem Allel tm1a	21
Abbildung 9: Schema der Trapping Cassette innerhalb des Gens $Gse1$ sowie der Anlagerungsstellen der benutzten Primer	28
Abbildung 9: Beispiel eines Genotypisierungsergebnisses.....	33
Abbildung 10: Darstellung der Verteilung des Auftretens makroskopischer Auffälligkeiten zwischen den Genotypen bei Entnahme zum Zeitpunkt E18.5.....	35
Abbildung 11: Darstellung der Verteilung des Auftretens makroskopischer Auffälligkeiten zwischen den Genotypen bei Entnahme zum Zeitpunkt E15.5.....	36
Abbildung 12: Kolorimetrisch bestimmte Hämoglobinkonzentrationen von Embryonen unterschiedlicher Genotypen zum Zeitpunkt E18.5.....	37
Abbildung 13: HE-Färbung der thorakalen Aorta in der Transversalebene mit enthaltenen Blutzellen von Embryonen zum Zeitpunkt E15.5.....	39
Abbildung 14: Anteil zellkernhaltiger Blutzellen bei homozygoten und Wildtypembryonen zum Zeitpunkt E15.5	40
Abbildung 15: HE-Färbung der thorakalen Aorta in der Transversalebene mit enthaltenen Blutzellen von Embryonen zum Zeitpunkt E18.5.....	42
Abbildung 16: Blutzellen homozygoter Embryonen zum Zeitpunkt E18.5.....	43
Abbildung 17: Anteil zellkernhaltiger Blutzellen bei homozygoten und Wildtypembryonen zum Zeitpunkt E18.5	44
Abbildung 18: Kolorimetrisch gemessene Hämoglobinkonzentration in g/dl in Abhängigkeit von dem Anteil zellkernhaltiger Blutzellen.....	45
Abbildung 19: Vergleich der Morphologie von Blutzellen zu den Zeitpunkten E15.5 und E18.5 in der HE-Färbung.....	46
Abbildung 20: Immunhistochemische Färbung mit Anti-TER-119, 20x Vergrößerung.....	47
Abbildung 21: Immunhistochemische Färbung mit Anti-TER-119, 60x Vergrößerung.....	48
Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung gegen TER-119 in Schnitten der Leber von Wildtyp- und homozygot mutierten Embryonen zum Zeitpunkt E18.5.....	49
Abbildung 23: LacZ-Färbung von jeweils drei Embryonen der Linie $Gse1^{tm1a}$ mit Wildtyp- und homozygot mutiertem Genotyp zum Zeitpunkt E11.5.....	51
Abbildung 24: Vergleich eines Schnittes in LacZ-Färbung mit einem HE-gefärbten Schnitt eines homozygot mutierten Embryos der Linie $Gse1^{tm1a}$ zum Zeitpunkt E11.5.....	52
Abbildung 25: LacZ-Färbung eines homozygoten Embryos der Linie $Gse1^{tm1a}$ zum Zeitpunkt E11.5 mit vergrößerter Darstellung zweier ausgewählter Bereiche	53
Abbildung 26: LacZ-Färbung eines homozygot mutierten Embryos der Linie $GSE1^{tm1a}$ zum Zeitpunkt E11.5	54
Abbildung 27: Schema der möglichen Allele ausgehend von dem Allel tm1a	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der benutzten Reagenzien, ihrer Hersteller und Bestellnummern.....	21
Tabelle 2: Liste der benutzten Puffer, ihrer Hersteller und Bestellnummern.....	23
Tabelle 3: Liste der benutzten kommerziell erhältlichen Kits, ihrer Hersteller und Bestellnummern	23
Tabelle 4: Liste der benutzten Antikörper, ihrer Hersteller und Bestellnummern sowie der verwendeten Verdünnungen	23
Tabelle 5: Liste der Primer, die für die <i>Gse1</i> -Genotypisierung der Embryonen genutzt wurden, mit ihren Sequenzen und Anlagerungstemperaturen.....	24
Tabelle 6: Liste der allgemeinen Materialien, ihrer Hersteller und Bestellnummern.....	24
Tabelle 7: Liste der benutzten Gerätschaften, ihrer Hersteller und Bestellnummern.....	25
Tabelle 8: Übersicht der <i>Gse1</i> -Genotypisierungen von Würfeln, die zum Zeitpunkt E18.5 entnommen wurden	34
Tabelle 9: Übersicht der <i>Gse1</i> -Genotypisierungen von Würfeln, die zum Zeitpunkt E15.5 entnommen wurden	36

Abkürzungsverzeichnis

AGM	Aorto-gonadal-mesonephrisch
bp	Basenpaare
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
FLP	Flippase
EMP	<i>erythro-myeloid progenitor</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLHS	Hypoplastisches Linksherzsyndrom
microRNA	<i>micro ribonucleic acid</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
qRT-PCR	<i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>

1 Einleitung

1.1 Das Gen *Gse1*

Das murine Gen *Gse1*, kurz für genetic suppressor element 1, ist auf dem Vorwärtsstrang des Chromosom 8 (8 E1) an der Position 120,228,456-120,581,390 lokalisiert und verfügt über 22 Exons (Genome Reference Consortium 2017). Bisher sind von diesem Gen sieben Splicevarianten bekannt, von denen vier für Proteine kodieren. Diese Proteine nehmen als wiederkehrendes Motiv eine *Coiled-coil*-Struktur ein (Ensembl 2020b). *Coiled coils* bestehen dabei aus mindestens zwei α -Helices, die sich wiederum gemeinsam als größere Helix zusammenlagern. Ihre Funktionen sind äußerst vielseitig – es wird berichtet, dass sie als molekulares Wiedererkennungssystem oder als Teil von Signaltransduktionswegen genutzt werden. Auch Proteine, die für Zellstabilität und -motilität zuständig sind, verfügen oftmals über *Coiled-coil*-Domänen (Burkhard et al. 2001).

Das humane Ortholog *GSE1*, auch bekannt als *KLAA0182*, befindet sich auf dem langen Arm des Chromosom 16 (16q24.1) in Vorwärtsrichtung an der Position 85,169,512-85,676,206, verfügt über 28 Exons und ist proteinkodierend. Es wird vermutet, dass dieses Genprodukt eine Untereinheit des BRAF35-Histondeacetylase-Komplex darstellen könnte (Genome Reference Consortium 2019). Insgesamt sind von *GSE1* zum aktuellen Stand 16 Splicevarianten bekannt, von denen acht für Proteine kodieren (Ensembl 2020a).

1.1.1 *GSE1* in der aktuellen Forschung

In jüngeren Studien wurde *GSE1* vor allem im Rahmen der humanen Krebsforschung untersucht. In Mammakarzinomen konnte eine Überexpression von *GSE1* gezeigt werden, durch gezieltes Silencing wiederum konnte eine Suppression der Zellproliferation erzielt werden. Zusätzlich wurde in den Krebszellen ein reduziertes Vorkommen der microRNA (*micro ribonucleic acid*) miR-489-5p festgestellt, deren direktes Target *GSE1* darstellt. Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass mit *GSE1* womöglich ein neues Onkogen für die Entstehung von Mammakarzinomen gefunden wurde, welches durch die genannte microRNA reguliert werden kann (Chai et al. 2016).

Ding und seine Kollegen (2018) konnten bei Vorliegen eines Magenkarzinoms eine positive Korrelation zwischen der Expression von *GSE1* und dem Lymphknotenstatus, dem histologischen Grading, der Tumoreindringtiefe und dem klinischen Stadium von Patienten

zeigen. In vivo führte eine Überexpression zu vermehrter Zellproliferation sowie vermehrter Migration und Invasion der Krebszellen. Auch hier konnte *GSE1* als Target von zwei microRNAs – miR-200b und miR-200c – identifiziert werden.

Abgesehen vom Auftreten bei verschiedenen neoplastischen Erkrankungen konnte eine Neumutation im *KLAA0182*-Gen bei einem Jungen mit Hypoplastischem Linksherzsyndrom (HLHS) festgestellt werden (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Iacone, Bergamo). Diese Arbeit verfolgt demnach das übergeordnete Ziel der AG Zeisberg, die Rolle von *KLAA0182* bei der Entstehung des HLHS zu verstehen.

1.1.2 Das Hypoplastische Linksherzsyndrom

Die Fehlbildungen, die beim HLHS auftreten, umfassen neben einer Obstruktion des linksventrikulären Ausflusstraktes Unterentwicklungen des linken Ventrikels sowie Stenosen oder Atresien der linksseitigen Herzklappen in variabler Ausprägung (Connor and Thiagarajan 2007). Insgesamt treten angeborene Herzfehler in Deutschland etwa bei einer von 100 Geburten auf. Innerhalb der Gesamtheit aller Formen angeborener Herzfehler nimmt das HLHS mit etwa 1,4 % zwar nur einen geringen Anteil an, es stellt aber in fast einem Viertel der kardial bedingten Todesfälle die Ursache dar (Lindinger et al. 2010; Tweddell et al. 2013). Die Ätiologie die HLHS ist bisher nicht abschließend geklärt. Vermutet werden unter anderem maternale Infektionen, teratogene Substanzen und Chromosomenaberrationen (Connor and Thiagarajan 2007; Webster and Abela 2007). Auch hypoxische Zustände während der Entwicklung werden als mutmaßliche Ursache für angeborene Herzfehlbildungen im Allgemeinen angesehen (Webster and Abela 2007). Einen Prozess, der wesentlich an der Entstehung des HLHS beteiligt zu sein scheint, stellt die endokardiale Fibroelastose dar. Diese spezielle Form der kardialen Fibrose konnte im Tiermodell durch einen verminderten Blutfluss durch das linke Herz induziert werden und führte innerhalb kurzer Zeit zu einer Verlegung der Herzhöhlen (Friehs et al. 2013).

Bis kurz nach der meist termingerechten Geburt sind die betroffenen Neugeborenen in vielen Fällen unauffällig. Mit Schluss des Ductus arteriosus Botalli kommt es dann allerdings zu einer akuten Hypoxie und zum kardiogenen Schock (Connor and Thiagarajan 2007). Die Diagnostik erfolgt mittels Echokardiographie und kann auch schon pränatal durchgeführt werden (Tweddell et al. 2013). Als erste Maßnahme sollten postnatal Prostaglandine verabreicht werden, um einen Schluss des Ductus arteriosus zu verhindern. Operative Optionen stellen die primäre Herztransplantation oder die palliative Anlage einer univentrikulären Zirkulation dar (DGPK 2013).

1.1.3 Die Knockout-First-Strategie

Das Ziel des International Mouse Phenotyping Consortium und des International Knockout Mouse Consortium ist es, für alle etwa 20.000 proteinkodierenden Gene des Säugetierge-noms Knockout-Mäuse zu generieren und die daraus resultierenden Phänotypen zu analy-sieren (International Mouse Phenotyping Consortium 2019). Hierfür werden Mäuse des In-zuchtstamm C57BL/6 genutzt, da dieser Stamm sehr gut charakterisiert ist und als Referenz-stamm für die Sequenzierung des murinen Genoms diente (Skarnes et al. 2011).

Eine in den letzten Jahren häufig genutzte Möglichkeit des Knockouts ist die sogenannte „Knockout-first“-Strategie. Durch das Einfügen einer Trapping Cassette, die einen Splice-akzeptor sowie eine Polyadenylierungssequenz enthält, wird das mutierte Allel zu einem Nullallel auf der Expressionsebene, da die Transkription frühzeitig unterbrochen und das aus der somit verkürzten mRNA entstehende Protein im Normalfall damit funktionslos wird. Darüber hinaus verfügt das mutierte Allel, das meist als „tm1a“ bezeichnet wird, über meh-rere Erkennungssequenzen für Cre- und Flp-Rekombinasen (siehe Abbildung 1). Durch Ex-position des tm1a-Allels gegenüber einer Flp-Rekombinase kann der Knockout rückgängig gemacht werden und es entsteht das konditionale Allel tm1c. Durch eine darauffolgende Exposition gegenüber einer Cre-Rekombinase besteht die Möglichkeit, die Genfunktion glo-bal oder gewebespezifisch auf DNA (*deoxyribonucleic acid*)-Ebene durch die Entfernung eines gesamten Exons (des kritischen Exons) zu unterbrechen. Das so entstandene Allel wird als tm1d bezeichnet (Ryder et al. 2013; Skarnes et al. 2011; Testa et al. 2004). Durch eine direkte Exposition des tm1a-Allels gegenüber einer Cre-Rekombinase entsteht durch die Entfer-nung des kritischen Exons das Nullallel tm1b, das im Unterschied zu der Allelvariante tm1d weiterhin den Spliceakzeptor, die Polyadenylierungssequenz sowie einen LacZ-Reporter ent-hält. Somit besteht die Möglichkeit, die Aktivität des Genpromotors nachzuvollziehen (Testa et al. 2004).

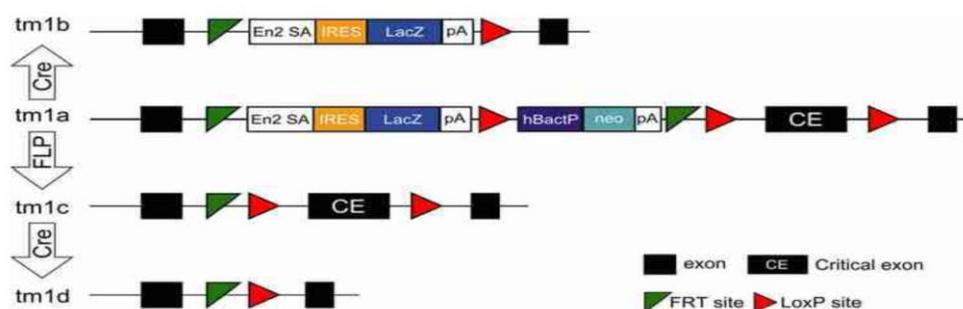


Abbildung 1: Struktur des EUComm/KOMP-CSD Knockout-first-Allels (Ryder et al. 2013: 287) (Creative Commons Lizenz CC-BY 3.0)

1.1.4 Struktur des Knockout-First-Allels $Gse1^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}$

In Abbildung 2 ist das Knockout-first-Allel $Gse1^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}$ schematisch dargestellt. Die Trapping Cassette und die Erkennungssequenzen für Rekombinasen sind dabei in den Introns um das als kritische Exon bezeichnete Exon, in diesem Fall das Exon 3, positioniert.

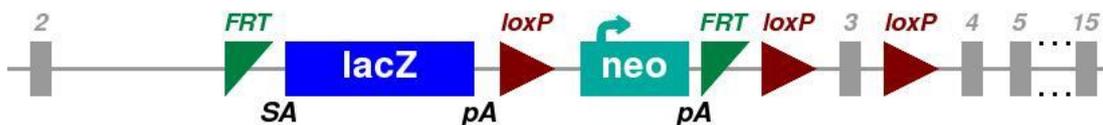


Abbildung 2: Schema des Allels $Gse1^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}$ (International Mouse Phenotyping Consortium 2018). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des International Mouse Phenotyping Consortium.

Als kritisches Exon wird hierbei das Exon gewählt, das allen bekannten Isoformen gemeinsam ist, möglichst weit in 5'-Richtung und innerhalb der ersten 50 % des proteinkodierenden Anteils des Gens lokalisiert ist (Bradley et al. 2012; Skarnes et al. 2011). Im Fall von $Gse1$ sollte dadurch das Protein, das noch translatiert werden kann, auf die ersten 85 Aminosäuren des Wildtypproteins, welches aus der längsten Isoform $Gse1-002$ entsteht, beschränkt sein (Alnour 2016).

1.1.5 Bisherige Ergebnisse bezüglich des $Gse1$ -Knockouts

Zur Erforschung der Rolle des humanen Gens $KLAA0182$ bei der Entwicklung des Hypoplastischen Linksherzsyndroms wurde im Labor der AG Zeisberg das Knockout-first-Mausmodell für das dementsprechende murine Gen $Gse1$ genutzt.

Hierfür wurden Mäuse verwendet, die aus den embryonalen Stammzellressourcen von EUCOMM/KOMP-CSD gezüchtet wurden und in deren $Gse1$ Gen durch homologe Rekombination eine Trapping Cassette eingefügt worden ist. Zusätzlich zu mehreren Qualitätskontrollen des Anbieters konnte anhand verschiedener Genotypisierungsprotokolle die richtige Position, Spezifität und Vollständigkeit dieser Trapping Cassette bestätigt werden. Unter den insgesamt 134 Embryonen aus 23 Würfen der darauffolgenden Verpaarung von für das Allel $Gse1^{tm1a}$ heterozygoter Tiere befanden sich allerdings keinerlei Nachkommen, die homozygot für das mutierte Allel waren, sodass man von einer embryonalen Letalität dieses Genotyps ausgehen konnte. Das Verhältnis zwischen heterozygoten und Wildtypembryonen entsprach annähernd dem daraus folgenden erwarteten Verhältnis von 2:1. Hieraus konnte geschlossen werden, dass heterozygote Embryonen durch den Knockout nicht in einer Weise

beeinträchtigt waren, die ein embryonales oder fetales Versterben nach sich ziehen würde (Alnour 2016).

Im Rahmen dieser Studie wurden auch Mäuse mit dem konditionalen Allel $Gse1^{tm1c}$ durch Verpaarung mit FLP positiven Mäusen erzeugt. Durch Verpaarung anfangs entstandener Mosaik-Mäuse mit Wildtypmäusen entstanden Neugeborene, die zum einen in allen Körperzellen das Allel $Gse1^{tm1c}$ enthielten und zum anderen negativ für die FLP-Rekombinase waren und somit für die zukünftige Zucht von Mäusen mit dem Allel $Gse1^{tm1d}$ zur Verfügung standen. Aus dem Allel $Gse1^{tm1a}$ konnte in vitro in einigen Nierenfibroblasten, die aus Wildtyp- und heterozygoten Mäusen isoliert worden waren, durch Transduktion eines Cre-Rekombinase-Virus das Allel $Gse1^{tm1b}$ erzeugt werden (Alnour 2016).

Über *KLA0182* ist außerdem bekannt, dass es eine zirkuläre RNA (*ribonucleic acid*) bilden kann, die aus nur einem Exon besteht (Jeck et al. 2013). Nach Bestätigung der Zirkularität der entsprechenden RNA in Proben von Mäuseembryonen konnte nachgewiesen werden, dass diese zirkuläre RNA in Proben von Embryonen, die homozygot für das mutierte Allel $Gse1^{tm1a}$ waren, im Vergleich zu Wildtypembryonen vermehrt zu finden war (Alnour 2016).

Zur Erforschung des Phänotyps, der die beobachtete embryonale Sterblichkeit zur Folge hat, wurde ein besonderer Schwerpunkt auf die Auswirkungen des Knockouts auf die Herzentwicklung gelegt. Hier konnten am Herz zum Zeitpunkt E13.5 Unterschiede zwischen homozygoten und Wildtypembryonen der Linie $Gse1^{tm1a}$ bezüglich Myokarddicke und Kompaktierung gezeigt werden (Baier (in Vorbereitung)). Bei homozygoten Embryonen der Linie $E2a Cre Gse1^{tm1d}$ konnte bei ebenfalls auftretender embryonaler Sterblichkeit hingegen nur bei einem Teil der gleiche kardiale Phänotyp in darüber hinaus geringerer Ausprägung festgestellt werden (unveröffentlichte Daten der AG Zeisberg).

Neben der Begutachtung von Embryonen mit einem globalen Knockout von $Gse1$ wurde auch der Einfluss von spezifischen Knockouts in Kardiomyozyten und Endothelzellen auf das Überleben der Embryonen betrachtet. Während sich bei einem Knockout von $Gse1$ in Kardiomyozyten keine Sterblichkeit der mutierten Embryonen zeigen ließ, wurden bei einem Knockout von $Gse1$ in Endothelzellen Abweichung von der Mendel'schen Verteilung sichtbar. Eine grundsätzliche Sterblichkeit homozygot mutierter Embryonen konnte bei diesem speziellen Knockout allerdings nicht nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten von Dr. Alnour).

¹ Mit freundlicher Genehmigung von Eva Baier

Aus den bisherigen Ergebnissen folgt, dass der kardiale Phänotyp, der sowohl bei homozygot mutierten Embryonen der Linie *Gse1^{tm1a}* als auch der Linie *Gse1^{tm1d}* beobachtet wurde, nicht die ausschlaggebende Todesursache darstellen kann, da nicht alle Embryonen diesen Phänotyp aufwiesen, der homozygot mutierte Genotyp aber in allen Fällen zu einer Letalität führte. Zur Aufklärung eines anderen womöglich verantwortlichen Phänotyps soll in den folgenden Kapiteln auf die embryonale Entwicklung sowie die embryonale Hämatopoese der Maus eingegangen werden.

1.2 Embryonale und fetale Entwicklung der Maus

Bei den häufig für Forschungszwecken verwendeten C57BL/6N Mäusen dauert eine Schwangerschaft durchschnittlich 19-21 Tage und führt im Mittel zu sechs Jungen (Croy et al. 2014).

Die folgenden Unterkapitel sollen einen groben Überblick über die wesentlichen Prozesse der embryonalen und fetalen Entwicklung der Maus geben. Dabei werden ausschließlich die physiologischen Abläufe und Stadien, wie sie in den Atlanten zur Entwicklung der Maus von K. Theiler (1989) und M.H. Kaufmann (2010) beschrieben sind, zusammengefasst. In beiden Werken wurde das Auftreten eines Vaginalpropfes bei dem verpaarten Weibchen als Zeichen der Begattung zu Hilfe genommen. Aufgrund der Tatsache, dass die Begattung bei Mäusen normalerweise in der Nacht bzw. der Dunkelzeit des Labors stattfindet, wurde die Mitte der vorangegangenen Nacht bzw. Dunkelzeit als Tag 0 definiert.

1.2.1 Präimplantationsphase (Tage 0 bis 4)

Die Befruchtung der Eizelle findet in der Ampulle des Eileiters statt. Bis zum Ende des ersten Tages vollzieht sich die erste Teilung und die Zygote verlässt langsam ihren Ort der Befruchtung. Im Laufe des zweiten Tages kommt es zu weiteren Zellteilungen, sodass bis zum Ende dieses Tages eine Morula aus bis zu 16 Blastomeren entsteht. Am folgenden Tag erreicht die Morula den Uterus. Inzwischen ist ab etwa einer Blastomerenzahl von 35 und der Bildung der Blastozystenöhle eine Differenzierung der Zellen in Embryoblast und Trophoblast möglich. Bis zum Tag 4 sind schließlich durch weitere Teilungen nahezu 100 Zellen entstanden. Die Zellen des Trophoblasten bilden dabei ein einschichtiges Epithel, während die Zellen des Embryoblasten eine kubische Form annehmen und sich am embryonalen Pol der Blastozyste sammeln (Theiler 1989). Diese ersten Tage der murinen Embryonalentwicklung sind in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

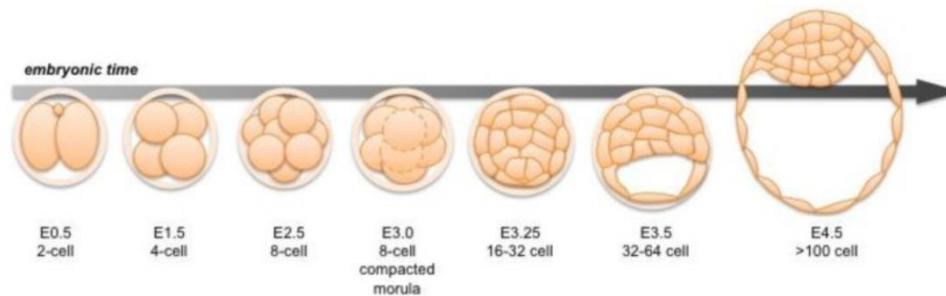


Abbildung 3: Schema der Vorgänge während der Präimplantationsphase (Bergsmedh et al. 2011) (Creative Commons Lizenz CC-BY 3.0)

1.2.2 Periimplantationsphase (Tage 4.5 bis 8.5)

Die Implantation des Embryos in die Uterusschleimhaut des Muttertiers beginnt an Tag 4.5. Die sich dem Uterusepithel anlagernden Zellen des Trophoblasten differenzieren sich zu trophoblastischen Riesenzellen, während im Uterusepithel große Deziduazellen entstehen. Zu diesem Zeitpunkt sind auch die ersten entodermalen Zellen abgrenzbar. Mit Beginn der Invasion in die Uterusschleimhaut nimmt der Embryoblast an Tag 5 an Masse zu, wölbt sich vor und wird von einer Auswachsung des Trophoblasten kappenförmig überspannt. Durch weiteres Wachstum bildet dieser schließlich den ekto-plazentalen Kegel. Der sogenannte Eizylinder beginnt sich zu bilden. Am folgenden Tag 6 differenziert sich dieser weiter. Innerhalb des Embryoblasten bildet sich eine proamniotische Höhle als zentrales Lumen. In der zweiten Hälfte des Tages kommt es zu fortgeschrittenen Reaktionen des Endometriums auf die Einnistung des Embryos. So bilden sich zum Beispiel vermehrt Kapillare rings um den aufgenommenen Embryo, die wahrscheinlich für eine ausreichende Energiebereitstellung benötigt werden. Erstmals in der embryonalen Entwicklung wird nun auch die embryonale Achse durch eine kranial gelegene Furche festgelegt. Darur hinaus beginnt sich der Primitivstreifen zu bilden. An Tag 7 geht aus der proamniotischen Höhle durch die Verschmelzung zweier Furchungen die Amnionhöhle sowie das Amnion selbst hervor. Innerhalb des posterior gelegenen und in dieser Phase neu entstandenen Mesoderms entsteht als weitere Höhle das Coelom. Gegen Ende des 7. Tages kann die Bildung der Neuralplatte beobachtet werden. Ein Kopfvorsprung ist nun bereits abgrenzbar. Die Organogenese beginnt mit der Bildung des Vorderdarms und eines kleinen HerZRudimentes. Außerdem startet die Bildung der Chorda dorsalis in der Mittellinie des Embryos. Die ersten Somiten entstehen ab Tag 8 und ermöglichen eine noch genauere Einordnung der Entwicklungsstufen (Theiler 1989). Zu diesem Zeitpunkt nimmt der Embryo noch eine Position mit starker Lordose ein, der spätere Rücken befindet sich bei dieser U-förmigen Körperhaltung demnach auf der konkaven Seite (Kaufman 2010). Die benötigte Drehung

wird in den folgenden Stunden ablaufen. Die Herzentwicklung macht währenddessen große Fortschritte und es kommt zur Bildung eines endokardialen Schlauches. Als weitere sich entwickelnde Organanlagen sind zu diesem Zeitpunkt die Schilddrüse sowie die Leber zu nennen. Ein nächster Meilenstein wird im Bereich der Hirn- und Nervensystementwicklung erreicht. So kommt es ab einer Somitenanzahl von etwa sieben zum Schluss der Neuralfalten auf Höhe des Halses und setzt sich von dort aus nach kranial und kaudal fort. Das hervorstehende Ereignis während der zweiten Hälfte des 8. Tages bzw. ab etwa 8 Somiten stellt die Drehung des Embryos dar, die zu einer Änderung der lordotischen in eine kyphotische Körperhaltung führt. Die Drehung erfolgt im Uhrzeigersinn und beginnt sowohl in der Kopf- als auch in der Schwanzregion (Theiler 1989). Durch die sich anschließende Drehung der Körpermitte hüllt der Embryo sich in das Amnion und den Dottersack ein (Kaufman 2010).

1.2.3 Organogenese (Tage 9-14)

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird im Folgenden nicht auf die Entwicklung des Gehirns, der Sinnesorgane, der Mundhöhle einschließlich der Zähne sowie endokriner und immunologischer Organe eingegangen. Insgesamt kann in diesem Rahmen nur ein grober Überblick über die wesentlichen Meilensteine der Organentwicklungen gegeben werden.

Nach Beendigung der Drehung verfügt der Embryo an Tag 9 über 13-20 Somiten. Erste Gefäße sind nun auch makroskopisch sichtbar. Direkt ventral der Somiten verläuft die paarig angelegte dorsale Aorta. Das Herz, das bisher noch über jeweils gemeinsame Vorhöfe und Kammern verfügt, ist nun in der Lage einen Blutkreislauf aufrechtzuerhalten. Im Gastrointestinaltrakt entwickelt sich der Vorderdarm weiter und ventral davon bildet sich die erste Lungenanlage. Auch erste Vorläufer des späteren Urogenitalsystems werden erkennbar. Während sich das Neuralrohr am kranialen Ende zu schließen beginnt, findet sich am kaudalen Ende noch eine eher flache Neuralrinne, die sich erst in der zweiten Hälfte des Tages zu einem posterioren Neuroporus verengt. Während dieser zweiten Tageshälfte fängt die zu Beginn des Tages entstandene Lungenanlage an, sich vom Gastrointestinaltrakt zu lösen. In diesem wächst nun auch die Magenanlage sowie das Pankreas. Als externe Auffälligkeit ist die Ausknospung der Vordergliedmaßen zu erwähnen (Theiler 1989). Die Knospen für die zukünftigen Hintergliedmaßen sowie den Schwanz, welche im weiteren Verlauf des Tages stark wachsen werden, sind ebenso wie die Differenzierung von Unter- und Oberkiefer ab Tag 10 sichtbar. Weitere Neuheiten an diesem Tag sind die Ausbildung zweier Hauptbronchien in der Lunge und die Vereinigung der paarig angelegten Aorten zu einer gemeinsamen Aorta abdominalis. Außerdem sind ab diesem Zeitpunkt die ersten

Keimzellen abgrenzbar (Theiler 1989). Darüber hinaus zeigen sich typischerweise bereits die ersten Anzeichen für den vorübergehenden physiologischen Nabelbruch (Kaufman 2010). An Tag 11 verfügt der Embryo über etwa 40-44 Somiten, die im Halsbereich zunehmend schlechter erkennbar werden. Die Leber ist nun einem starken Wachstum unterlegen und wenige Stunden später sind dort erste hämatopoetische Bereiche abgrenzbar. In der zweiten Tageshälfte bildet sich im bisherigen Herzschlauch das Vorhofseptum, während die Ventrikel immer noch verbunden sind. Aus den Hauptbronchien der Lunge sprießen Lobärbronchien aus. In den Nieren werden die ersten Glomeruli angelegt (Theiler 1989). Durch das Einwachsen eines Septums in den gemeinsamen Ausflusstraktes des primitiven Herzens ab Tag 12 entsteht die Aufspaltung in die spätere Aorta ascendens und den Truncus pulmonalis (Kaufman 2010). Diese Aufspaltung ist am folgenden Tag 13 vollendet, außerdem sind nun alle Herzklappen in ihrer primitiven Form ausgebildet. Die Lunge kann nun klar in ihre zukünftigen Lappen unterteilt werden. Als wichtiger Meilenstein sei auch die nun sichere Möglichkeit der Geschlechtsdifferenzierung zu nennen (Theiler 1989). Außerdem erfolgt an diesem Tag die Trennung der ehemaligen Kloake in das zukünftige Rektum und den Urogenitalsinus durch ein Septum (Kaufman 2010). Am Ende der zweiten Woche sind im Herzen auch die Ventrikel endgültig voneinander getrennt. Ein Großteil des Darms befindet sich zu diesem Zeitpunkt noch im Bruchsack des physiologischen Nabelbruchs (Theiler 1989).

1.2.4 Fetalzeit (Tag 15 bis zur Geburt)

Auch hier kann aus Gründen der Übersichtlichkeit nur auf die weiteren wichtigen Meilensteine in der restlichen Entwicklung bis zum Zeitpunkt der Geburt eingegangen werden.

Ab Tag 15 ist die Entwicklung der Extremitäten soweit fortgeschritten, dass bereits Finger und Zehen makroskopisch abgrenzbar sind. In den ersten Teilen des Skeletts beginnt die Ossifikation. Das Herz sowie das Gefäßsystem haben bis zu diesem Zeitpunkt ihre endgültige fetale Konfiguration erreicht. Bis zum Tag 16 hat sich die Bauchhöhle ausreichend vergrößert, sodass sich der physiologische Nabelbruch zurückbilden und die Darmanteile nach und nach rückverlagert werden können. In diesen kann nun auch eine fortschreitende Differenzierung der Oberflächenepithelien beobachtet werden. Die wachsende Leber übernimmt zunehmend die Hämatopoese. Am Tag 17 hat sich der Nabelbruch vollständig zurückgebildet. Die Haut erscheint dicker und weniger transparent (Theiler 1989). Das bisher eher kompakt wirkende Lungengewebe imponiert nun mit ersten Alveolargängen, von denen innerhalb eines Tages zahlreiche Alveolen aussprießen und die Lungenstruktur auflockern (Kaufman 2010; Theiler 1989). Zur Geburt kommt es nach etwa 19 Tagen. Die

Neugeborenen haben zu diesem Zeitpunkt eine Größe von 23-27 mm erreicht, Augen und Ohren sind noch geschlossen und das Fell wird erst in den nächsten paar Tagen wachsen (Theiler 1989).

1.3 Embryonale und fetale Sterblichkeit

Für das Überleben und die gesunde embryonale und später auch fetale Entwicklung können verschiedene Kontrollpunkte beschrieben werden. Erforderlich ist demnach vor allem, dass folgende Prozesse ungestört ablaufen können: Die Bildung der Blastozyste, deren Implantation in den maternalen Uterus sowie dessen Erkennen der Schwangerschaft und der damit verbundenen Veränderungen beispielsweise des Blutflusses, die Bildung einer funktionierenden Plazenta und letztendlich die Entwicklung eines funktionierenden embryonalen kardiovaskulären Systems (Cross 2001).

Zusätzlich zu einem Prozentsatz von etwa 20-25 % sporadisch auftretender Aborte bei Labormäusen können nach Copp (1995) Todesursachen zum einen in intra- und extraembryonale Ursachen und zum anderen aufgrund ihres zeitlichen Auftretens in der embryonalen und fetalen Entwicklung in drei Phasen eingeteilt werden:

Die Letalität in der Periimplantationsphase bis zum Tag 8 nach Befruchtung ist in einer Großzahl der Fälle auf fundamentale Störungen der Zellfunktion und des Zellüberlebens zurückzuführen. So führt beispielsweise eine homozygote *Os*-Mutation bereits zu einem Stopp der embryonalen Entwicklung nach der sechsten Spaltung der Morula bei gleichzeitigem Auftreten von Metaphasefiguren in den betroffenen Zellen. Bei heterozygot mutierten Mäusen kam es hingegen zu Abnormalitäten der Extremitäten. Diese Phänomene können vermutlich durch eine durch die Mutation gestörte Funktion des Spindelapparats erklärt werden (Epstein 1986). Auch inaktivierende Mutationen von Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche wie des Moleküls E-Cadherin und dem daraus folgenden Unvermögen der Epithelbildung (Larue et al. 1994) oder der fehlenden Ausbildung von extraembryonalen Gewebe und einem damit verbundenen Tod der Embryonen kurz nach Einnistung in das Uterusepithel (Spyropoulos und Capecchi 1994) sind bekannt. Nach erfolgter Einnistung des Embryos können Störungen der Gastrulation, also der Bildung der drei Keimblätter, für die Sterblichkeit von Embryonen verantwortlich sein. Gemeinsam ist diesen Störungen meistens eine fehlende Bildung des Mesoderms, deren frühe Konsequenz eine fehlende Blutzirkulation und damit verbundene Minderversorgung des Embryos darstellt (Copp 1995).

Die Haupttodesursachen in der sich anschließenden Phase der Organogenese stellen Wachstumsverzögerungen, Versagen der axialen Rotation, Schwellungen des Perikards als Hinweis auf ein osmotisches Ungleichgewicht im Embryo und Versagen bei der Bildung kaudaler embryonaler Strukturen dar (Copp 1995). Während dieser Entwicklungsphase ist der Embryo vor allem von einer funktionierenden Zirkulation im Dottersack abhängig. Embryonen mit einem homozygoten Knockout von Gata-2 (Tsai et al. 1994) oder einem homozygoten Knockout der DNA-Methyltransferase (Li et al. 1992) zeigten beispielsweise Entwicklungsverzögerungen ab Tag 10 sowie blässere, kleinere und anscheinend blutleere Dottersäcke. Bei einem homozygoten Knockout des als Onkogen bekannten C-myc fiel ebenfalls eine verzögerte Entwicklung des Dottersackes auf (Davis et al. 1993). Ein Versagen der adäquaten Bildung kaudaler embryonaler Strukturen, aus denen sich auch die Allantois entwickelt, und der damit verbundenen mangelhaften Entwicklung einer chorioallantoischen Plazenta kann über die daraus folgende Minderversorgung des Embryos zu dessen Tod ab Tag 10-11 nach Empfängnis führen (Copp 1995).

Während der abschließenden Fetalzeit muss differenziert werden zwischen Defekten, die zwar offensichtliche Phänotypen nach sich ziehen, oftmals aber nicht unmittelbar eine Letalität in utero erklären können, und solchen, die direkt zum Tode des betroffenen Fötus führen. Mutationen, die für Fehlbildungen des Zentralen Nervensystems, der Extremitäten, der Lungen, des Darms oder auch des Urogenitaltraktes verantwortlich gemacht werden können, führen oftmals erst zum Zeitpunkt der Geburt oder kurz danach zu einem Versterben des Fötus (Copp 1995). So werden Föten mit einem homozygoten Knockout des Onkogens c-ret zwar unauffällig geboren, versterben allerdings innerhalb der ersten 24 Stunden nach Geburt. Auffällig war bei diesen zum einen eine Agenesie oder starke Dysplasie der Nieren und Ureteren und zum anderen eine fehlende Peristaltik des Magen-Darm-Traktes aufgrund nicht vorhandener Neurone des Plexus myentericus (Schuchardt et al. 1994). Im Allgemeinen lässt sich aber erkennen, dass in der Fetalzeit tatsächlich zum Tode in utero führende Ursachen in den meisten Fällen durch Störungen des kardiovaskulären Systems, der Leberhämatopoese oder durch Kombinationen dieser beiden bedingt sind, wobei Störungen im kardiovaskulären System zu einem früheren Tod zu führen scheinen als Störungen der Leberhämatopoese (Copp 1995).

Abgesehen von den oben beschriebenen Todesursachen, die zeitlich in der embryonalen und fetalen Entwicklung eingeordnet werden können, werden auch Faktoren beschrieben, die während der gesamten Schwangerschaft einen Abort erklären können. Zu diesen gehören unter anderem immunologische Inkompatibilitäten sowie chromosomale Anomalien.

Ausgehend von Untersuchungen an humanen Aborten hinsichtlich der Karyotypen kann angenommen werden, dass im Vergleich eher frühe Aborte durch chromosomale Anomalien bedingt sind als solche zu späteren Zeitpunkten in der Schwangerschaft (Alberman and Creasy 1977). Aus dem Vergleich vieler verschiedener Maus-Knockout-Modelle lässt sich allerdings erkennen, dass aufgrund häufig vorkommender redundanter Genfunktionen Knockouts in als elementar angesehenen Genen nicht immer zu einem Phänotyp führen müssen (Copp 1995).

1.4 Embryonale und fetale Hämatopoese

Rote Blutzellen sind die ersten spezifizierbaren Zellen in der embryonalen Entwicklung (Baron et al. 2012) und ihre Entstehung ist ein Bereich, der schon seit Jahrzehnten umfangreich erforscht wurde.

Die embryonale Hämatopoese beginnt nach der Gastrulation, wobei sich die ersten Blutzellen aus spezialisierten mesodermalen Vorläuferzellen entwickeln (Mikkola and Orkin 2006; Palis 2014). Prinzipiell kann die embryonale und fetale Hämatopoese in zwei übergeordnete Phasen eingeteilt werden: Die primitive Hämatopoese und die definitive, adulte Hämatopoese (Baron et al. 2012; Lacaud und Kouskoff 2017; Palis 2014). Unterschiede zwischen diesen beiden Formen der Hämatopoese sind beispielsweise die Zellgröße, das Auftreten als zellkernhaltige rote Blutzellen im Blutkreislauf, die Verteilung embryonaler und adulter Hämoglobine sowie die ihnen zukommende Funktion. Während die im Rahmen der primitiven Hämatopoese gebildeten primitiven Erythrozyten vor allem das rapide Wachstum in der Embryonalzeit unterstützen, ermöglichen die während der definitiven Hämatopoese gebildeten definitiven Erythrozyten den Übergang vom Fetus zur neonatalen Maus. Zusätzlich kann die Hämatopoese in mehrere Wellen eingeteilt werden, die sich zeitlich und in ihrer Lokalisierung im Embryo unterscheiden. Die erste Welle findet ausschließlich im Dottersack statt und entspricht der primitiven Hämatopoese (Palis et al. 1999). Die folgende zweite Welle findet weiterhin vor allem im Dottersack statt, führt allerdings zu der Entwicklung von ersten definitiven Erythrozyten, Megakaryozyten und Zellen myeloischer Herkunft. Definitive Blutzellen, die während der dritten und letzten Wellen gebildet werden, entstammen hämatopoetischen Stammzellen, die im Dottersack, in der Plazenta und in der aortogonadomesonephrischen (AGM) Region gebildet wurden. Zu diesem Zeitpunkt können alle Blutzellen inklusive T- und B-Lymphozyten gebildet werden (Baron et al. 2012; Lacaud und Kouskoff 2017). Abbildung 4 und Abbildung 5 sollen einen ersten Überblick über die hämatopoetischen Organe des sich entwickelnden Mausembryos sowie die Entwicklung von

hämatopoetischen Stammzellpools geben. Die einzelnen hämatopoetischen Organe und ihre Beiträge zur embryonalen und fetalen Hämatopoese werden in den folgenden Unterkapiteln im Näheren beschrieben.

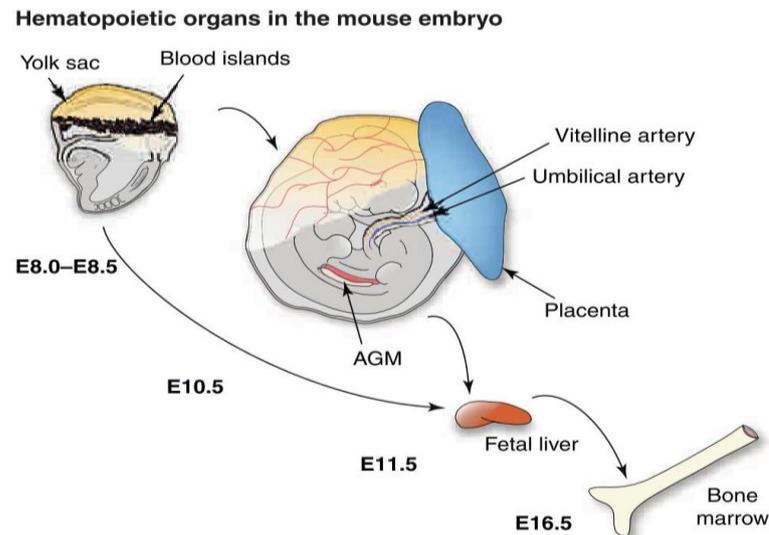


Abbildung 4: Hämatopoetische Organe des Mausembryos (Costa et al. 2012). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

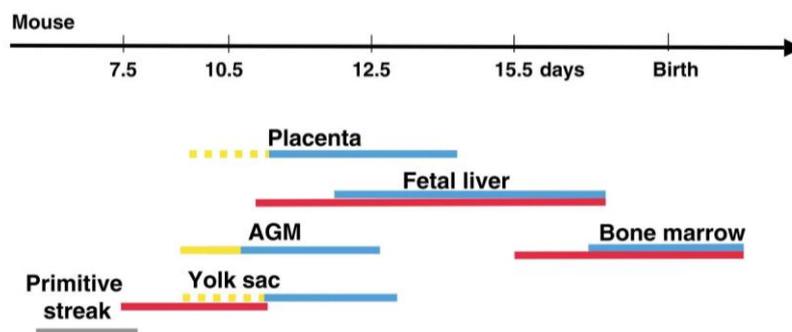


Abbildung 5: Hämatopoese und Etablierung von hämatopoetischen Stammzellpools in der Maus. Graue Linie: Mesoderm; rote Linie: Hämatopoetische Aktivität; gelbe Linie: Generierung von Stammzellen; unterbrochene gelbe Linie: de novo Generierung von Stammzellen zum damaligen Stand noch nicht experimentell bewiesen; blau: Präsenz von funktionierenden definitiven hämatopoetischen Stammzellen (Modifiziert nach (Mikkola and Orkin 2006: 3734)). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von The Company of Biologists Ltd.

1.4.1 Hämatopoese im Dottersack

Der Dottersack, der sowohl aus mesodermalen als auch aus endodermalen Zellen gebildet wird, wurde schon zu Anfang des vergangenen Jahrhunderts als Quelle embryonaler

Blutbildung beschrieben (Palis und Yoder 2001). Dort entstehen ab Tag 7, ausgehend von mesodermalen Vorläuferzellen mit begrenztem hämatopoetischen Potential, die ersten roten Blutzellen, die sich der primitiven Erythropoese zuordnen lassen (Baron et al. 2012; Palis et al. 1999). Diese Vorläuferzellen gehen von Zellen aus, die Endothelmarker wie CD31 (*cluster of differentiation*), CD34, Tie2 und VE-Cadherin exprimieren (Ema et al. 2006). Als primitive zellkernhaltige Erythroblasten gelange diese ab Tag 8.5 in den sich entwickelnden Blutkreislauf, wo sie sich weiter differenzieren und bis zum Tag 13 Zellteilung betreiben (Palis et al. 1999; Palis und Yoder 2001). Charakterisiert werden diese ersten roten Blutzellen vor allem durch ihre Größe, die mit einem Zellvolumen von 300-750 fl das durchschnittliche Zellvolumen definitiver Erythrozyten von etwa 70 fl um ein Vielfaches überragt (Kingsley et al. 2004). Darüber hinaus findet während ihrer Reifung in der Blutbahn neben einem Wechsel der Expression von embryonalen Globinen zu adulten Globinen (Kingsley et al. 2006) auch eine Kernpyknose und schließlich die E nukleation der primitiven roten Blutzellen statt (Kingsley et al. 2004).

Die Rolle des Dottersacks in der Generierung definitiver Blutstammzellen sowie dessen Beteiligung an der definitiven Erythropoese wurde in den letzten Jahrzehnten ausgiebig erforscht. Als einziger Ort primitiver Blutbildung (Palis et al. 1999) ist der Dottersack darüber hinaus auch an der Bildung definitiver Erythrozyten beteiligt. Bereits vor der Kolonisation der fetalen Leber durch definitive Blutstammzellen können ab Tag 11.5 kernlose definitive Erythrozyten im Blutkreislauf und sämtliche erythroide Vorläuferzellen in der Leber beobachtet werden. Diese ersten Erythrozyten verfügen über ein Expressionsmuster der β -Globine, das weder dem primitiver Erythroblasten noch dem definitiver Erythrozyten, die den definitiven Blutstammzellen der fetalen Leber entstammen, entspricht. Diese Feststellungen unterstützen die Hypothese, dass es zwischen der primitiven Erythropoese des Dottersacks und der definitiven Erythropoese der fetalen Leber eine transiente Welle der Blutbildung basierend auf erythroiden Vorläuferzellen, sogenannten *erythro-myeloid progenitors* (EMP), aus dem Dottersack gibt (McGrath et al. 2011; McGrath et al. 2015). Ausgehend vom Dottersack siedeln EMPs in die fetale Leber über, bleiben aber bis zum Tag 14.5 noch im Blutkreislauf nachweisbar. Aus diesen EMPs gehen neben überwiegend erythroiden Zellen auch Zellen der myeloischen Zelllinien wie Makrophagen und Granulozyten hervor. Sie sind allerdings nicht in der Lage, Blutzellen mit B-Zell-Potential zu bilden (McGrath et al. 2015).

Während man sich in der Forschung inzwischen sicher ist, dass intraembryonale Areale wie die AGM-Region für die Schaffung definitiver Stammzellen verantwortlich sind (siehe 1.4.2),

ist diese Frage in Bezug auf den murinen Dottersack bisher noch umstritten. Ganuza und seine Kollegen (2018) zeigten in ex vivo Experimenten, dass explantierte, kultivierte Dottersäcke von Embryonen vor oder kurz um den Beginn eines Blutkreislaufes nicht in der Lage waren, definitive Blutstammzellaktivität zu generieren. Aus diesen Versuchen wurde geschlossen, dass der Dottersack allein entweder keine Vorläufer definitiver Blutstammzellen enthalte oder nicht das passende Milieu für die Reifung und Differenzierung solcher aufweise. In Bezug auf die dem Dottersack entstammenden EMPs konnte allerdings gezeigt werden, dass diese in der Lage sind, in einem gewissen Umfang eine kurzfristige Rekonstitution in adulten Empfängermäusen zu bewirken, wobei sich diese vor allem auf die rote Blutzelllinie beschränkte. Langfristige Rekonstitutionen, wie sie durch Zellen der AGM-Region oder aus adultem Knochenmark ermöglicht werden würden, konnten nicht beobachtet werden (McGrath et al. 2015).

Neben seiner essenziellen Rolle in der Erythropoese scheint der murine Dottersack auch Ort der Bildung anderer Blutzelllinien zu sein. Ab Tag 9 konnten so beispielsweise erste primitive Makrophagen (Takahashi et al. 1989), ihre Vorläufer sogar schon ab Tag 7 im Dottersack gefunden werden. Mastzellvorläufer konnten ab dem Tag 8.5 beobachtet werden (Palis et al. 1999). Außerdem konnten neben Vorläufern der oben beschriebenen Blutzelllinien Vorläuferzellen von Mikroglia, also der für das Gehirn spezifischen Makrophagen, identifiziert werden (Alliot et al. 1999).

1.4.2 Hämatopoese in der AGM-Region und den großen Gefäßen

Bis in die 70er Jahre des vergangenen Jahrhunderts bestand die Hypothese, dass auch die definitive Hämatopoese sowie die dafür benötigten Stammzellen ihren Ursprung im extraembryonal gelegenen Dottersack hätten. Durch Experimente an Hühner- und Wachtelembryonen konnte schließlich ein zuvor schon vermuteter intraembryonaler Ursprung dieser belegt werden (Dieterlen-Lievre 1975). Knapp 20 Jahre später konnten in der AGM-Region von Mäusen Blutzellvorläufer identifiziert werden (Medvinsky et al. 1993), für die in späteren Versuchen gezeigt werden konnte, dass sie ab Tag 10 in der Lage sind, in mit einer tödlichen Dosis bestrahlten Empfängermäusen eine langfristige Rekonstitution aller Blutzelllinien zu bewirken (Müller et al. 1994). In dieser Region, zum Tag 10 bestehend aus dorsaler Aorta, Pronephros, Mesonephros und Genitalleiste, werden demnach definitive Blutstammzellen ohne den Einfluss anderer an der Hämatopoese beteiligten Organen ab Tag 10 generiert (Cumano et al. 2001; Medvinsky und Dzierzak 1996). Die Stammzellaktivität in der AGM-Region erreicht an Tag 11 ihr Maximum, sinkt allerdings bereits am folgenden Tag wieder

dramatisch ab und ist ab Tag 13 nicht mehr nachweisbar (Godin et al. 1999; Kumaravelu et al. 2002).

Zusätzlich zu der AGM-Region werden auch in anderen großen Arterien, den Umbilikal- und Vitellinarterien, des sich entwickelnden Embryos definitive Blutstammzellen gebildet (Bruijn et al. 2000). In venösen Gefäßen konnten bisher hingegen keine Blutstammzellen gefunden werden, was vermuten lässt, dass die Generierung dieser vor allem an die arteriellen Spezialisierung von sich entwickelnden Blutgefäßen gekoppelt ist (Orkin und Zon 2008).

Gegenstand der Forschung war in diesem Bereich auch lange die zelluläre Herkunft der definitiven Blutstammzellen in der AGM-Region. Ähnlich der Entstehung primitiver roter Blutzellen im Dottersack aus Vorläuferzellen mit Oberflächenmolekülen, die normalerweise vor allem auf Endothelzellen zu finden sind, konnte man auch bei der Herkunft definitiver Blutstammzellen in der AGM-Region einen endothelialen Ursprung zeigen. Dies konnte zum einen an nicht fixierten Schnitten von Embryonen zum Zeitpunkt E10 durch Zeitrafferaufnahmen konfokaler Bildgebung dargestellt werden (Boisset et al. 2010). Darüber hinaus konnte an transgenen Mäusen, die über ein induzierbares VE-Cadherin Cre verfügten und nach Induktionen von diesem eine positive X-gal-Färbung VE-Cadherin tragender Zellen zeigten, demonstriert werden, dass hämatopoetische Zellen von Endothelzellen der dorsalen Aorta aussprossen. Ausgehend von dieser Möglichkeit der Zellverfolgung konnte außerdem nachgewiesen werden, dass ein Teil dieser so gebildeten Blutzellen später in die Leber und das Knochenmark migrieren (Zovein et al. 2008).

1.4.3 Hämatopoese in der Plazenta

Seit Beginn dieses Jahrtausends konnte ein weiteres Organ als Ursprung definitiver Blutstammzellen bestätigt werden: die Plazenta. Anfangs konnte lediglich durch in vitro Experimenten gezeigt werden, dass die Plazenta über hämatopoetische Vorläuferzellen mit myeloische Potential verfügt, die aus deren embryonalen Anteilen hervorgehen (Alvarez-Silva et al. 2003). Bereits wenige Jahre später konnte darüber hinaus auch ein Stammzellpotential dieser hämatopoetischen Zellen der Plazenta in Transplantationsexperimenten nachgewiesen werden. Ab dem Zeitpunkt E11 aus der Plazenta entnommene Zellen waren in der Lage, in bestrahlten erwachsenen Empfängermäusen alle Blutzelllinien wiederherzustellen (Gekas et al. 2005; Ottersbach and Dzierzak 2005). In Experimenten an Embryonen, die über einen homozygoten Knockout von *Ncx1* verfügten und hierdurch keinen Herzschlag und folglich keinen Blutkreislauf entwickeln, wurde bewiesen, dass die vorher identifizierten definitiven Blutstammzellen ihren Ursprung in der Plazenta selbst haben. Somit konnte die Vermutung,

dass diese über den Blutkreislauf aus anderen hämatopoetischen Geweben in die Plazenta einwandern und diese nur temporär vor ihrer Besiedelung der fetalen Leber nutzen, widerlegt werden. Allerdings fanden sich im Vergleich zu Kontrollembryonen weniger Blutstammzellen in diesen Knockout-Embryonen, was vermuten ließ, dass die Plazenta zusätzlich zu ihren de novo produzierten definitiven Blutstammzellen auch solche aus anderen hämatopoetisch aktiven Organen aufnimmt (Rhodes et al. 2008). Die ersten definitiven Blutstammzellen tauchen in der Plazenta schon ab dem Entwicklungstag 10.5 auf, steigen dann in ihrer Anzahl bis zum Tag 13.5 drastisch an und übersteigen zu diesem Zeitpunkt die definitiven Blutstammzellen in der AGM-Region um das 15-fache. Interessanterweise kommt es während dieser starken Expansion von multilinearen Stammzellen zu einer vergleichsweise nur geringen Steigerung der Anzahl beschränkterer myeloerythroiden Vorläuferzellen. Aufgrund dessen wird vermutet, dass die Plazenta am ehestens die Mikroumgebung für die Entstehung und Expansion definitiver pluripotenter Blutstammzellen bietet, nicht aber deren Differenzierung in weitere, auf bestimmte Blutzelllinien beschränkte, Vorläuferzellen unterstützt (Gekas et al. 2005).

1.4.4 Hämatopoese in der fetalen Leber

Die fetale Leber stellt den Ort gleich mehrerer elementarer Vorgänge der fetalen Hämatopoese dar. So sammeln sich dort zirkulierende, noch kernhaltige primitive Erythrozyten, um ihre Reifung und letztendlich auch E nukleation mithilfe leberständiger Makrophagen fortzusetzen (Isern et al. 2008). Darüber hinaus wird die fetale Leber vermutlich ab Tag 11-12 von definitiven Blutstammzellen besiedelt. Wie bereits in 1.4.1 beschrieben, finden sich bereits am Tag 11.5 kernlose rote Blutzellen im Blutkreislauf, die aus einer transienten Welle im Dottersack generierter myeloerythroider Vorläuferzellen entstehen. Definitive Erythropoese findet also in der fetalen Leber schon vor ihrer Besiedelung mit definitiven Blutstammzellen aus den in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Regionen statt (McGrath et al. 2011). Während in den Regionen der Stammzellgenerierung wie der AGM-Region die Stammzellaktivität ab etwa Tag 12 drastisch abnimmt, steigt die Anzahl definitiver Stammzellen sowohl im Blutkreislauf als auch in der fetalen Leber an (Kumaravelu et al. 2002). In den folgenden Tagen steigt die Stammzellaktivität in der fetalen Leber bis Tag 16 massiv an (Ema und Nakauchi 2000). Dieser Anstieg wird vermutlich vor allem durch eine starke Expansion der bereits vorhandenen definitiven Blutstammzellen und weniger durch eine de novo Generierung solcher zu erklären sein (Lacaud und Kouskoff 2017; Orkin und Zon 2008).

Als eine Nische für definitive Stammzellen konnten die sich entwickelnden portalen Gefäße der fetalen Leber identifiziert werden. Bis zum Zeitpunkt der Geburt und den sich damit ändernden hämodynamischen Verhältnissen exprimieren die portalen Gefäße Oberflächenmarker arterieller Gefäße. Mit einem Wechsel dieser zugunsten eines venösen Gefäßphänotyps wenige Tage nach der Geburt findet auch eine starke Reduktion der in der Leber auffindbaren definitiven Blutstammzellen statt (Khan et al. 2016).

In der fetalen Leber entstandene Erythrozyten zeichnen sich dadurch aus, dass sie bei Eintritt in den Blutkreislauf die Entwicklungsstufe des Retikulozyten erreicht haben, somit über keinen Zellkern mehr verfügen und im Vergleich zu den Erythroblasten des Dottersacks über eine geringere Größe mit einem Durchmesser von etwa 8 μm verfügen (Palis 2014; Steiner and Vogel 1973). Die Erythropoese findet während des Höhepunktes der Leberhämatopoese um den Tag 14 herum hauptsächlich in Blutinseln statt, welche aus jeweils einem zentral gelegenen Makrophagen und den diesen umringenden Erythroblasten bestehen. Der interzelluläre Abstand dieser beiden Zelltypen wird als sehr eng beschrieben. Darüber hinaus konnten mikroskopisch auch vermutlich direkte Zell-Zell-Kontakte beobachtet werden. Die Zentralmakrophagen scheinen demnach eine wichtige Rolle bei der Bildung und dem Erhalt von Blutinseln sowie der Reifung der sie umringenden erythrozytären Vorläufer einzunehmen (Sasaki and Sonoda 2000). Somit kann diese extravaskuläre Form der Reifung definitiver Erythrozyten als weiterer großer Unterschied zur intravasalen Reifung in der primitiven Erythropoese angesehen werden (Palis 2014).

Ab Tag 16.5 migrieren die ersten definitiven Stammzellen ausgehend von der fetalen Leber in das Knochenmark, um dort ab Tag 17.5 eine Aktivität zu erreichen, die schon ausreichend ist, um die Hämatopoese tödlich bestrahlter adulter Empfängermäuse wiederherzustellen. In der fetalen Milz hingegen wird eine solche Aktivität sogar bereits ab Tag 15.5 bis 16.5 erzielt, nachdem deren Besiedelung ab etwa Tag 15 erfolgt (Christensen et al. 2004; Lacaud und Kouskoff 2017). Trotz der Auswanderung von Blutstammzellen in die Milz und das Knochenmark lässt sich die höchste Stammzellaktivität bis mindestens zur Geburt weiterhin in der fetalen Leber nachweisen (Harrison und Astle 1997).

Aus den beschriebenen Forschungsergebnissen bezüglich des Knockouts von *Gse1* bei Mäusen und den Ausführungen über die embryonale Entwicklung und Hämatopoese der Maus ergibt sich die Hypothese, dass eine Störung der Blutbildung mit daraus folgender Anämie die embryonale Letalität homozygot mutierter Embryonen erklären könnte.

Die Zielsetzungen für die vorliegende Arbeit sind demnach zum einen die Untersuchung der Embryonen hinsichtlich der vermuteten Anämie, die der beobachteten embryonalen Letalität homozygot mutierter Embryonen zugrunde liegen könnte. Zum anderen soll die LacZ-Färbung als Möglichkeit der Expressionsdarstellung von *Gse1* etabliert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Mäuse

Für diese Studie wurden, ausgehend von Mäusen, die im Rahmen der Dissertation von Dr. med. Fouzi Alnour generiert worden waren und die über das Allel $Gse1^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}$ verfügen, Mäuse mit dem globalen Knockout-Allel $Gse1^{tm1d}$ generiert. Genetisch handelt es sich um Mäuse der Linie C57BL/6NTac und die internationale Strangbezeichnung lautet C57BL/6N- $Gse1^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}/H$ (Infrafrontier 2019). Ausgehend von der Struktur des Allels $Gse1^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}$ und dessen Funktion als Knockout-first-Allel (siehe Abbildung 6) wurde durch Verpaarungen für dieses Allel heterozygoter Mäuse mit FLP-Rekombinase-positiven Mäusen das konditionale Allel $Gse1^{tm1c}$ erzeugt (siehe Abbildung 7). Um zum einen Mosaik zu vermeiden und zum anderen über Mäuse zu verfügen, die zwar das Allel $Gse1^{tm1c}$ besitzen, selbst aber nicht mehr positiv für die Flippase (FLP)-Rekombinase sind, wurden Verpaarungen von heterozygoten $Gse1^{tm1c}$ FLP-positiven Mäusen mit Wildtypen durchgeführt (Alnour 2016). Die so entstandenen FLP-negativen Mäuse mit global vorhandenem $Gse1^{tm1c}$ wurden daraufhin mit E2a-Cre-positiven Mäusen verpaart, um einen globalen Knockout des $Gse1$ -Gens auf DNA-Ebene durch die Deletion des Exons 3 zu erreichen. Wie bereits für die Generierung des Allels $Gse1^{tm1c}$ beschrieben, wurden die entstandenen $Gse1^{tm1d}$ E2a-Cre-positiven Mäuse darauffolgend erneut mit Wildtyp-Mäusen verpaart, um eine tatsächliche Deletion des kritischen Exons 3 zu bewirken, die nicht durch das Vorhandensein der Cre-Rekombinase zu erklären ist.

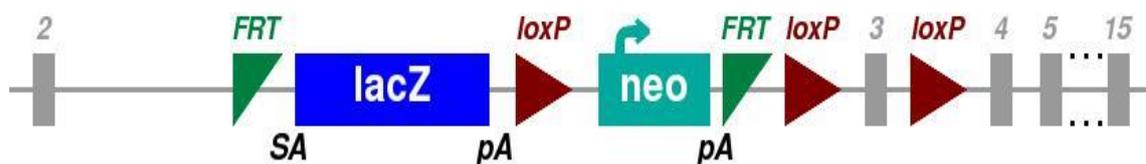


Abbildung 6: Schema des Allels $Gse1^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}$ (International Mouse Phenotyping Consortium 2018). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des International Mouse Phenotyping Consortium.

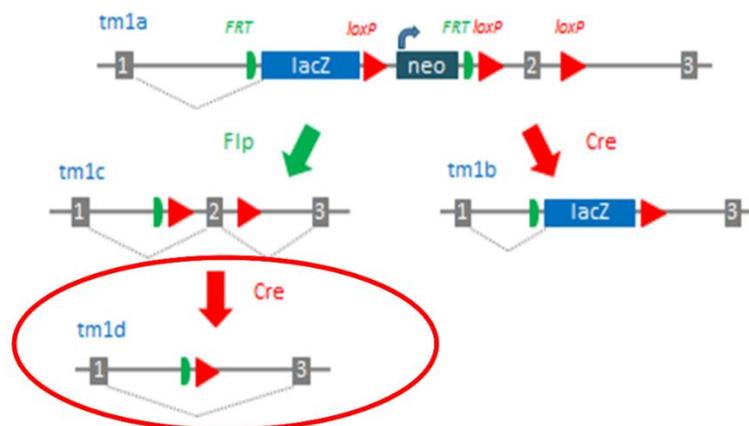


Abbildung 7: Schema der möglichen Allele ausgehend von dem Allel tm1a. Markiert ist das in dieser Arbeit verwendete Allel tm1d (Modifiziert nach International Mouse Phenotyping Consortium (2020)). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des International Mouse Phenotyping Consortium.

Für die Aufklärung des Phänotyps der homozygoten Embryonen wurden heterozygote Männchen und Weibchen der Linie E2a-Cre-*Gse1*^{tm1d} verpaart. Das Alter der Embryonen in Tagen wurde ab dem Zeitpunkt des Auffindens eines Vaginalpfropfs berechnet. Im Weiteren wird dieses wie folgt angegeben: E15.5 entspricht hierbei einem Alter der Embryonen von 15,5 Tagen, E18.5 einem Alter von 18,5 Tagen.

Für die Etablierung der LacZ-Färbung als Methode zur Darstellung der *Gse1*-Expression wurden Embryonen der Linie *Gse1*^{tm1a} benutzt, die aus Verpaarung heterozygoter Männchen und Weibchen hervorgegangen sind und zum Zeitpunkt E11.5 entnommen wurden.

Die Zucht, gezielte Verpaarungen sowie jegliche für diese Studie verwendete Prozeduren an den Mäusen wurden entsprechend der Vorgaben der Tierschutzkommission der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

2.1.2 Reagenzien

Tabelle 1: Liste der benutzten Reagenzien, ihrer Hersteller und Bestellnummern in alphabetischer Reihenfolge

Name	Hersteller	Bestellnummer
6x Loading Dye	Promega	G1881
99 % Ethanol vollvergällt	Chemsolute	2294.1000
99,8 % Ethanol	Roth	9065.4

Name	Hersteller	Bestellnummer
100bp DNA ladder	Promega	G2101
Aceton \geq 99,5 % zur Synthese	Roth	5025.6
AEC Substrate Chromogen Ready-to-Use	Dako	K3464
Albumin Fraktion V	Roth	8076.3
Di-Kaliumhydrogen-phosphat-Trihydrat	Merck	105099
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Roth	4984.1
DirectPCR Lysis Reagent (Mouse Tail)	Viagen	Cat # 102-T
DMSO	Sigma-Aldrich	D8418
dNTPs 10 mM	Thermo Fisher Scientific	18427013
Entellan [®]	Merck	1.07960.0500
Eosin G-Lösung 0,5 % wässrig	Roth	X883.2
Essigsäure 100 %	Roth	6755.2
Hämalaunlösung sauer nach Meyer	Roth	T865.2
Immu-Mount	Fisher Diagnostics	9990412
Kaliumchlorid	Merck	104936
LE Agarose	Biozym	840004
Natriumchlorid	Roth	9265.2
Nuclear Fast Red Solution	Sigma-Aldrich	N3020-100ML
Nuclease-Free water	Qiagen	129114
Paraffin	Süssellabortechnik	10054
Proteinase K	VWR Life Science	04-1075
SYBR Safe DNA Stain	Thermo Fisher Scientific	S33102
Tissue-Tek [®] O.C.T. Compound	Sakura Finetek	4583
Wasserstoffperoxid 30 %	Roth	8070.4
Xylol (Isomere)	Roth	9713.3

2.1.3 Puffer

Tabelle 2: Liste der benutzten Puffer, ihrer Hersteller und Bestellnummern

Name	Hersteller	Bestellnummer
10x TAE Puffer	Roth	T845.2

2.1.4 Kommerzielle Kits

Tabelle 3: Liste der benutzten kommerziell erhältlichen Kits, ihrer Hersteller und Bestellnummern in alphabetischer Reihenfolge

Kit	Hersteller	Bestellnummer
Hemoglobin Colorimetric Detection Kit	Invitrogen	EIAHGBC
Senescence Detection Kit	Abcam	Ab65351
Taq DNA Polymerase from <i>Thermus aquaticus</i> with 10× PCR reaction buffer without MgCl ₂	Sigma-Aldrich	D4545
Vectastain Universal (Anti-Mouse IgG/Anti Rabbit IgG) Elite ABC Kit	Vector Laboratories	PK-6200

2.1.5 Antikörper

Tabelle 4: Liste der benutzten Antikörper, ihrer Hersteller und Bestellnummern sowie der verwendeten Verdünnungen

Antikörper	Hersteller	Bestellnummer	Verdünnung
Purified Rat Anti-Mouse TER-119 / Erythroid Cells (IHC)	BD Pharmingen TM	550565	1:10 & 1:25

2.1.6 PCR Primer

Tabelle 5: Liste der Primer, die für die *Gse1*-Genotypisierung der Embryonen genutzt wurden, mit ihren Sequenzen und Anlagerungstemperaturen

Primer	Sequenz	Anlagerungs- temperatur
Gse1-5arm-WTF	CCG CAG GTA GCA TGA TTG T	55 °C
Gse1-Crit-WTR	GTG GAT CGG CCA TAT TGA GT	
Tm1a-5mut-R	GAA CTT CGG AAT AGG AAC TTC G	

2.1.7 Allgemeine Materialien

Tabelle 6: Liste der allgemeinen Materialien, ihrer Hersteller und Bestellnummern in alphabetischer Reihenfolge

Name	Hersteller	Bestellnummer
10/20 µl XL TipOne ® XL Spitze	Starlab	S1110-3700
200 µl TipOne ® Pipettenspitzen	Starlab	S1111-0700
1000 µl TipOne ® Pipettenspitzen	Starlab	S1111-6700
Dako Pen	Dako	S2002
Multiply®- µStrip Pro 8er Kette	Sarstedt	72.991.002
Safe-Lock Tubes 1,5 mL	Eppendorf	0030 120.086
Safe-Lock Tubes 2 mL	Eppendorf	0030 120.094
Sarstedt Serological Pipette 5 mL	Sarstedt	86.1253.001
Sarstedt Serological Pipette 10 mL	Sarstedt	86.1254.001
Sarstedt Serological Pipette 25 mL	Sarstedt	86.1685.001

2.1.8 Gerätschaften

Tabelle 7: Liste der benutzten Gerätschaften, ihrer Hersteller und Bestellnummern in alphabetischer Reihenfolge

Funktion	Bezeichnung	Hersteller
Dampfgerar	Dampfgerar	Braun
Gewebeeinbettautomat	Leica TP1020	Leica Biosystems
Heizblock	Mixing Block MB-102	Bioer
Inkubator	Heratherm Incubator	Thermo Scientific
Kamera für das Mikroskop	Olympus SC30	Olympus
Fotografieren von Elektrophoresegelelen	AVT Marlin F-145B2 IRF	adept electronic solutions
Kryostat	Leica CM 3050 S	Leica Biosystems
Mikroskop	Olympus BX43	Olympus
Mikrotom	Autocut 2040	Reichert-Jung
Paraffinausgießstation	Leica EG1160	Leica Biosystems
PCR Cycler	Mastercycler epgradient S	Eppendorf
pH-Messung	FiveEasy TM	Mettler Toledo
Pipettierhilfe	Pipetus [®]	Hirschmann
Plattformschüttler	Rotamax 120	Heidolph
Präzisionswaage	Präzisionswaage TE2101	Sartorius
Spannungsquelle	MP-300V	Major Science
Transilluminator	BioDocAnalyse	Biometra

2.2 Methoden

2.2.1 Genotypisierung

2.2.1.1 DNA-Isolierung für die Genotypisierung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die Genotypisierung der genutzten Embryonen und Mäuse wurden Schwanzproben, gesamte Embryonen sowie Schwanz- oder Gewebeproben des Muttertieres, beispielsweise aus der Leber, benutzt.

Diese wurden jeweils in 1,5 ml Eppendorf Tubes gegeben und mit jeweils 200 μ l DirectPCR Lysis Reagent (Mouse Tail) und 2 μ l Proteinase K befüllt. Die Proben wurden daraufhin über Nacht bei 56 °C und 450 rpm in einem Heizblock lysiert. Am nächsten Morgen wurden die Proben zur Inaktivierung der Proteinase K für 45 Minuten auf 85 °C erhitzt.

2.2.1.2 PCR für die *Gse1*-Genotypisierung

Als Vorbereitung auf die PCR wurden für jede Probe in einem 1,5 ml Eppendorf Tube folgende Substanzen vorgelegt: 13,2 μ l nukleasefreies Wasser; 2,5 μ l 10x PCR Buffer; 2,5 μ l MgCl (25 mM); 1 μ l dNTPs (2 mM, nach fünffacher Verdünnung der 10 mM dNTPs mit nukleasefreiem Wasser); jeweils 1 μ l der Primer *Gse1*-5arm-WTF, *Gse1*-Crit-WTR und *Tm1a*-5mut-R (jeweils 20 μ M); 0,5 μ l DMSO; 0,3 μ l TaqPolymerase. Danach wurden die Reagenzien durch kurzes Vortexen vermischt. Aus den zuvor lysierten Gewebeproben wurden jeweils 2 μ l des die DNA enthaltenden klaren Überstandes zu der beschriebenen Mischung von Reagenzien hinzugegeben. Zusätzlich zu den Proben für die Genotypisierung wurden jeweils eine heterozygote und eine Wildtyp-Kontrolle sowie eine Negativkontrolle bestehend aus nukleasefreiem Wasser nach dem gleichen Verfahren vorbereitet.

Für die PCR wurden jeweils 25 μ l der Proben in 8er PCR Multiply- μ Strip pipettiert. Daraufhin konnte die PCR im Mastercycler egradient S mit folgendem Programm gestartet werden:

Zuerst 95 °C für 10 Minuten, gefolgt von 32 Zyklen bestehend aus jeweils 95 °C für 15 Sekunden, 60 °C für 30 Sekunden und 72 °C für 30 Sekunden, beendet von 72 °C für 8 Minuten. Nach Ablauf dieses Programmes wurden die Proben bis zur Entnahme auf 8 °C gekühlt.

2.2.1.3 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde ein 3 % Agarose-Gel aus 3 g LE Agarose und 100 ml 1x TAE Puffer hergestellt. Nach dem Abwiegen der Agarose und dem Hinzufügen des Puffers

in einem konischen Becherglas wurde dieses geschwenkt und in der Mikrowelle gekocht, bis die Flüssigkeit vollständig klar wurde. Zusätzlich wurden 10 µl SYBR Safe DNA Stain hinzugegeben und durch Schwenken des Becherglases mit der Flüssigkeit vermischt. Danach wurde diese Flüssigkeit in eine Form mit jeweils passenden Kämmen für die gewünschte Anzahl von Taschen gegossen. Eventuelle Luftbläschen wurden zur Seite gedrückt. Für die Aushärtung bei Raumtemperatur wurden ca. 30 Minuten benötigt. Nach der vorsichtigen Entfernung der Kämmen wurde das ausgehärtete Agarose-Gel in die Elektrophorese-Kammer gegeben und mit 1x TAE Puffer bis zum maximalen Füllstand bedeckt.

Den Proben sowie den beschriebenen Kontrollen, die zuvor die PCR durchlaufen hatten, wurde jeweils 5 µl 6x Loading Dye zugegeben. Pro Reihe von Taschen wurde zuerst mit jeweils 15 µl einer 100 Basenpaar (bp) DNA ladder begonnen. Die weiteren Taschen wurden mit je 15 µl der Proben befüllt. Daraufhin wurde die Gelelektrophorese bei 160 V und 700 mA für ca. 20 Minuten durchgeführt.

Nach ausreichender Auftrennung der DNA-Proben wurde die Elektrophorese gestoppt und das Ergebnis mithilfe eines Transilluminators und einer Kamera ausgewertet und dokumentiert.

2.2.1.4 Auswertung der Gelelektrophorese und Bestimmung des Genotyps

Ausgehend von der Lage und dem Aufbau der verwendeten Trapping Cassette sowie der benutzten PCR-Primer entstehen während der PCR zwei verschiedenen Genamplifikate, die beweisend entweder für das Wildtyp- oder das mutierte Allel sind. Bei Vorliegen des Wildtypallels bildet sich ein Genprodukt mit einer Länge von 241 bp begrenzt durch die Primer 1 und 3. Der Primer Gse1-5arm-WTF liegt dabei Richtung 5' Ende vor der Trapping Cassette, der Primer Gse1-Crit-WTR vor dem Exon 3. Dieses Genprodukt wird bei mutierten Allelen während der PCR nicht gebildet, da die benötigte Anlagerungsstelle für den Primer Gse1-Crit-WTR im Zuge der Verpaarung mit Cre-positiven Mäusen mitsamt dem kritischen Exon 3 entfernt worden ist. Anstelle dessen wird beim Vorliegen des mutierten Allels ein Genprodukt mit einer Länge von 127 bp begrenzt durch die Primer 1 und 2 produziert. Der Primer Tm1a-5mut-R lagert sich dabei – universell mutationsspezifisch – vor dem ersten FRT-Bereich der Trapping Cassette an (Alnour 2016).

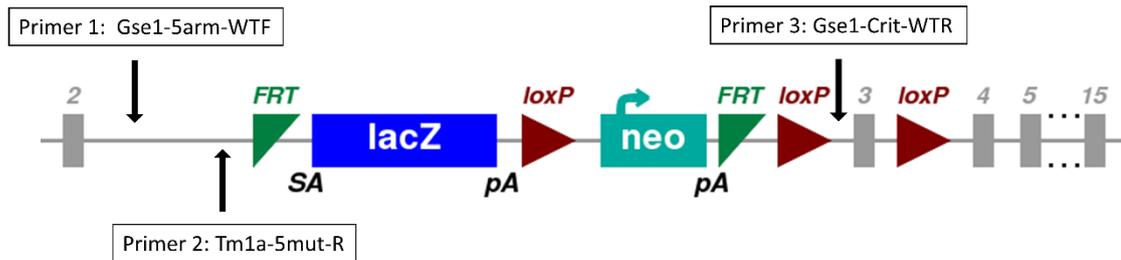


Abbildung 8: Schema der Trapping Cassette innerhalb des Gens *Gse1* sowie der Anlagerungsstellen der benutzten Primer (Modifiziert nach International Mouse Phenotyping Consortium (2018)). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des International Mouse Phenotyping Consortium.

2.2.2 Kolorimetrische Bestimmung der Hämoglobinkonzentration in embryonalen Blutproben

Nach der Isolierung der Embryonen wurden diese dekapitiert und mithilfe einer Pipette Blut aus den großen Gefäßen im Halsbereich entnommen und in zuvor mit Heparin benetzte Plastiktubes gegeben. Zur kolorimetrischen Bestimmung der Hämoglobinkonzentration im Blut der Embryonen wurde das Hemoglobin Colorimetric Detection Kit der Firma invitrogen genutzt. Gemäß des Product Information Sheet wurde der Versuch wie folgt durchgeführt:

Aufgrund der Verwendung von Vollblut wurde dieses zuerst mit dem im Kit enthaltenen Hemoglobin Sample Diluent mindestens im Verhältnis 1:2 verdünnt. Ausgehend von dem im Kit enthaltenen Hämoglobin-Standard mit einer Konzentration von 16 g/dl und dem Hemoglobin Sample Diluent wurde eine Standardverdünnungsreihe mit folgenden Hämoglobinkonzentrationen hergestellt: 8 g/dl, 4 g/dl, 2 g/dl, 1 g/dl, 0,5 g/dl, 0,25 g/dl sowie eine Negativkontrolle mit 0 g/dl.

Je 10 µl der Hämoglobin-Standards sowie je 10 µl Probe in zweimaliger Ausführung wurden in die passenden Vertiefungen der im Kit enthaltenen Mikrotiterplatte pipettiert. Zu jedem Standard und zu jeder Probe wurden zusätzlich 100 µL Hemoglobin Detection Reagent hinzugegeben. Zum Vermischen der Reagenzien wurde die Mikrotiterplatte vorsichtig gerüttelt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen und anhand der Standardverdünnungsreihe die Konzentrationen der Proben bestimmt. Diese wurden anschließend um den Faktor der Verdünnung vor Versuchsbeginn korrigiert. Für die Auswertung wurden jeweils die Mittelwerte der Probenduplikate verwendet (Thermo Fisher Scientific 2017).

2.2.3 Histologische Färbungen

2.2.3.1 Vorbereitung der Embryonen für die Einbettung in Paraffin

Nach der Isolierung der Embryonen und der Entnahme von Proben für die Genotypisierung wurde der restliche Körper in Einbettkassetten gelegt und für mindestens eine Woche in 4 % Formaldehydlösung aufbewahrt. Ab einem Entnahmezeitpunkt der Embryonen von E15.5 wurden auch Gewebeproben, in allen Fällen die beiden Hinterläufe, für Protein- und RNA-Isolierung entnommen. Vor dem Einbetten in Paraffin wurden Bäder in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol durchlaufen, um die Präparate zu entwässern.

Daraufhin wurden diese in Paraffin eingebettet. Schnitte wurden mit einer Dicke von 3 μ m angefertigt. Dabei wurde ab dem ersten Gewebeanschnitt jeder Schnitt aufgefangen. Pro Objektträger wurden in der Regel vier Schnitte aufgezo-

2.2.3.2 Entparaffinierung und Bewässerung der Schnitte

Als Vorbereitung auf die anschließenden Färbungen wurden die entsprechenden Schnitte nach dem folgenden Protokoll entparaffiniert und bewässert: Je zwei Mal für jeweils 10 Minuten in Xylol, zwei Mal für jeweils 5 Minuten in 100 % Ethanol, nacheinander je 5 Minuten in 96 % Ethanol, 80 % Ethanol, 70 % Ethanol, 50 % Ethanol, 30 % Ethanol. Abgeschlossen wurde die Bewässerung mit einem Bad in destilliertem Wasser für 5 Minuten.

2.2.3.3 Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung von Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Schnitten

Nach dem Entparaffinieren und der Bewässerung der Schnitte wurden diese für 6 Minuten zur Kernfärbung in Hämalaunlösung nach Mayer gefärbt. Zur Bläuung wurden die Schnitte anschließend für 10 Minuten unter fließendes Leitungswasser gestellt und danach kurz in destilliertes Wasser getaucht. Auf die Kernfärbung mit Hämalaun folgte die Gegenfärbung mit Eosin für 2 Minuten. Zuvor wurde bereits der pH-Wert der Eosin-Lösung gemessen und falls erforderlich mit 100 % Essigsäure auf den Zielwert von pH 5 eingestellt. Nach der Färbung mit Eosin wurde überschüssige Lösung in destilliertem Wasser entfernt.

Zur Vorbereitung auf das Eindecken wurden die Schnitte für 1 Minute in 96 % Ethanol, danach für 4 Minuten in 100 % Ethanol und zwei Mal für je 5 Minuten in Xylol getaucht. Eingedeckt wurden die Schnitte mit Entellan®.

2.2.3.4 Immunhistochemische Färbungen von Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Schnitten

Für immunhistochemische Färbungen wurden unter anderem die Materialien aus dem Vectastain Elite ABC Kit genutzt. Nach dem Entparaffinieren und der Bewässerung der Schnitte sowie 5 Minuten in 1X PBS wurden diese zur Antigendemaskierung in eine schon zuvor in einem Dampfgarer erhitzte Target Retrieval Solution (pH 6) gestellt. Nach 40 Minuten im Dampfgarer und weiteren 10 Minuten Abkühlzeit wurden die Schnitte drei Mal für je 5 Minuten zum Waschen in 1X PBS auf einen Plattformschüttler gestellt. Danach wurde ein Block mit 0,3 % Peroxidase durchgeführt. Dazu wurden die Objektträger rund um den Schnitt trocken getupft und daraufhin mit ausreichend Blockerflüssigkeit bedeckt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur in eine Feuchtkammer gelegt. Anschließend erfolgten erneute drei Waschvorgänge von jeweils 5 Minuten Dauer mit 1X PBS. Auf diesen ersten Block folgte ein weiterer Block mit dem im Kit enthaltenen Horse Normal Serum. Hierzu wurden 2 Tropfen Horse Normal Serum in 10 ml 1X PBS verdünnt und anschließend auf den Schnitt pipettiert. Die Schnitte wurden daraufhin für 20 Minuten bei Raumtemperatur in eine Feuchtkammer gelegt. Hiernach wurde der Horse-Block vorsichtig abgekippt. Der jeweilige Primärantikörper wurde gemäß der in der Materialliste für Antikörper angegebenen Verdünnung in dem Horse-Block verdünnt und auf die Schnitte pipettiert. Für die Negativkontrolle wurde nur die Blockerflüssigkeit auf den Schnitt gegeben, alle anderen Schritte wurden identisch zu den anderen Proben durchgeführt. Diese wurden schließlich zur Inkubation über Nacht in einer Feuchtkammer in den Kühlraum mit einer Temperatur von 4 °C gestellt.

Am nächsten Tag wurde durch dreimaliges Waschen mit 1X PBS für je 5 Minuten der überschüssige Primärantikörper entfernt. Anschließend wurden 2 Tropfen des im Kit enthaltenen Sekundärantikörpers in 5 ml Horse-Block verdünnt, auf die Schnitte pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur in eine Feuchtkammer gelegt. Danach wurden überschüssige Sekundärantikörper durch dreimaliges Waschen für jeweils 5 Minuten in 1X PBS entfernt.

Die im nächsten Schritt benötigte ABC-Lösung (enthalten im Kit) wurde zuvor durch Zusammengeben von je 2 Tropfen A-Lösung und B-Lösung in 5 ml 1X PBS hergestellt und für 30 Minuten bei 4 °C gekühlt. Die ABC-Lösung wurde dann auf die Schnitte pipettiert und zur Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur in eine Feuchtkammer gelegt. Anschließend wurde ein weiterer Waschvorgang vorgenommen. Danach wurde das AEC Substrat auf die Schnitte getropft, sodass die Schnitte mit diesem vollständig bedeckt waren. Unter dem Mikroskop wurde im Vergleich zur Positivkontrolle bewertet, ob die Intensität

der Färbung die gewünschte Stärke erreicht. Daraufhin wurde die Reaktion durch Abwaschen in 1X PBS gestoppt. Als Gegenfärbung wurden die Schnitte für 6 Minuten mit Häma-launlösung sauer nach Mayer gefärbt und anschließend unter fließendem Leitungswasser gebläut. Letztendlich wurden die Schnitte mit Immu-Mount eingedeckt und die Deckgläschen zur Fixierung mit klarem Nagellack umrandet.

2.2.3.5 TER-119-Färbung

Zur spezifischen immunhistochemischen Färbung von erythroiden Blutzellen wurde ein monoklonaler Antikörper gegen TER-119 verwendet. Dieser Antikörper reagiert mit frühen Proerythroblasten bis hin zu reifen Erythrozyten (Kina et al. 2000).

Da die meisten Antikörper für immunhistochemische Färbungen von unterschiedlichen Blutzellen für die Anwendung an Gefrierschnitten entwickelt wurden, wurde in dieser Arbeit ein Antikörper gegen TER-119 des Herstellers BD Pharmingen verwendet, der im Rahmen einer Studie von Kunder et al. (2007) als verlässlicher Antikörper für die Verwendung an Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Schnitten getestet wurde.

2.2.3.6 Vorbereitung von Gefrierschnitten

Die Embryonen, welche für Gefrierschnitte genutzt werden sollten, wurden direkt nach der Entnahme in OCT eingebettet und zum sofortigen Aushärten in flüssigen Stickstoff gegeben. Die längerfristige Lagerung erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. In absehbarer Zeit vor Beginn der Schnittanfertigung wurden die Blöcke bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Schnittdicke betrug für alle hier beschriebenen Versuche und Färbungen $5\text{ }\mu\text{m}$. Die fertigen Schnitte wurden bis zu ihrer Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

2.2.3.7 HE-Färbung von Gefrierschnitten

Für die HE-Färbung von Gefrierschnitten wurden die bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Schnitte zuerst für 10 Minuten in $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem Aceton fixiert und anschließend unter dem Abzug gründlich lufttrocknen gelassen. Daraufhin konnte direkt mit der Färbung begonnen werden. Hierfür wurden die Schnitte zuerst 6 Minuten mit Häma-laun sauer nach Mayer gefärbt und danach zum Bläuen für 5 Minuten unter fließendes Leitungswasser gestellt. Anschließend erfolgte die Färbung mit Eosin für eine Dauer von 2 Minuten. Überschüssiges Eosin wurde hiernach in destilliertem Wasser abgewaschen.

Im Anschluss an den Färbevorgang wurden die Schnitte jeweils zwei Mal kurz in 96 % Ethanol sowie zwei Mal 100 % Ethanol getaucht. Nach weiteren zwei Mal 5 Minuten in Xylol wurden die Schnitte mit Entellan eingedeckt.

2.2.3.8 LacZ-Färbung von Gefrierschnitten

Für die LacZ-Färbung wurde das Senescence Detection Kit von Abcam benutzt. Gefärbt wurden hiermit ausschließlich Gefrierschnitte, welche bis zu ihrer Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden. Diese wurden zuerst 5 Minuten in 1X PBS auf einem Plattformschüttler gewaschen. Anschließend wurde pro Schnitt $50\text{ }\mu\text{l}$ Fixative Solution auf die Schnitte gegeben und diese für 15 Minuten bei Raumtemperatur in eine Feuchtkammer gelegt. Danach wurden die Schnitte erneut für 5 Minuten in 1X PBS gewaschen. Zur Herstellung einer 20X X-Gal Lösung wurden 20 mg des im Kit enthaltenen X-Gal in 1 ml DMSO aufgelöst. Für die Färbelösung wurden diese 20X X-Gal Lösung 1:20 sowie das Staining Supplement 1:100 in der benötigten Menge 1X Staining Solution verdünnt. Die Schnitte wurden mit dieser Färbelösung bedeckt, zum Schutz vor dem Austrocknen mit einem Stück Parafilm bedeckt und für 24 Stunden bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

Nach 24 Stunden wurden die Schnitte kurz in destilliertem Wasser geschwenkt. Zur Gegenfärbung bzw. zur Anfärbung der Zellkerne wurden die Schnitte mit je $50\text{ }\mu\text{l}$ Nuclear Fast Red Solution bedeckt und für 4 Minuten in eine Feuchtkammer gelegt. Anschließend wurden die Schnitte in einer Küvette für 1 Minute unter fließendes Leitungswasser gestellt. Letztendlich wurden die Schnitte mit Immu-Mount eingedeckt und das Deckgläschen zur Fixierung mit klarem Nagellack umrandet.

2.2.4 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der erhobenen Daten sowie ihrer grafischen Darstellung wurde das Programm GraphPad Prism 7 benutzt. Zum Vergleich der Mittelwerte zweier normalverteilter Gruppen wurde der ungepaarte t-Test benutzt. Bei Vergleichen von mehr als zwei Gruppen wurden zuerst ein ANOVA und anschließend t-Tests zwischen den verschiedenen Gruppen durchgeführt. Zur Berechnung einer signifikanten Abweichung der vorgefundenen Genotypen von der erwarteten Mendel'schen Verteilung wurde der Chi-Quadrat-Test genutzt. Um eine Assoziation zwischen makroskopischen Auffälligkeiten und dem Genotyp zu bestätigen, wurde der Fisher-Test im 3x2 Format genutzt.

Als signifikant wurden in allen benutzten statistischen Tests p-Werte $< 0,05$ anerkannt. Für alle Versuche wurden für jede Gruppe mindestens drei Embryonen aus jeweils mindestens zwei verschiedenen Würfen benutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der *Gse1*-Genotypisierungen

Für diese Arbeit wurden, um Embryonen aller Genotypen zu erhalten, ausschließlich heterozygote Weibchen der Linie *E2a-Cre-Gse1^{tm1d}* mit heterozygoten Männchen derselben Linie verpaart. Gemäß der Mendel'schen Regeln sollten hierbei folglich je 25 % der Embryonen homozygot für die Wildtypallele und für die mutierten Allele sowie 50 % heterozygot sein.

In Abbildung 9 ist ein beispielhaftes Ergebnis einer *Gse1*-Genotypisierung mittels PCR und Gelelektrophorese dargestellt, in der die drei möglichen Genotypen abgebildet sind.

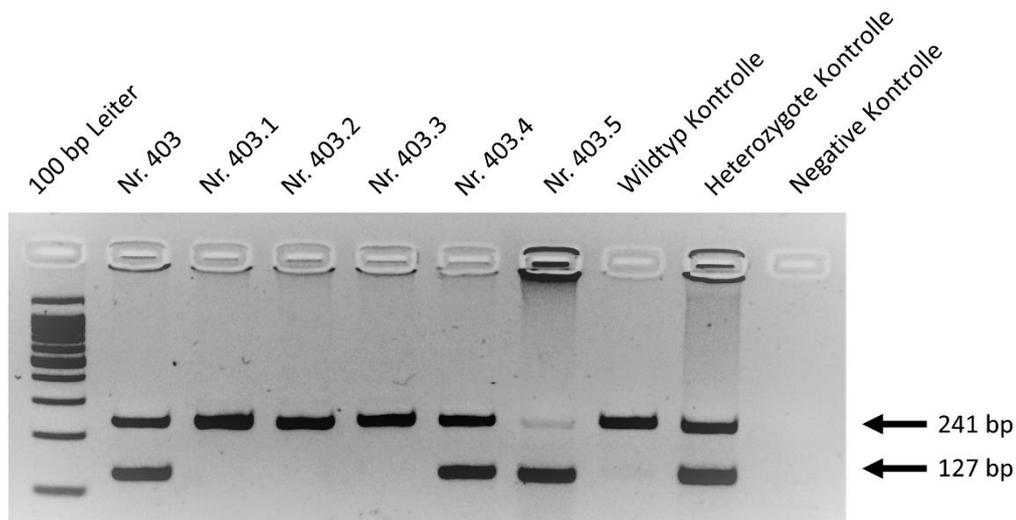


Abbildung 9: Beispiel eines Genotypisierungsergebnisses. Dargestellt ist hier das Ergebnis der Genotypisierung mittels PCR und Gelelektrophorese des Muttertiers *E2a-Cre-Gse1^{tm1d}* #403 und ihrer fünf Embryonen, die zum Zeitpunkt E18.5 entnommen worden sind. Der obere Balken, der einer Länge des Amplifikats von 241 bp entspricht, weist auf das Fehlen der Trapping Cassette bei noch vorhandenem Exon 3 hin, da sich hier ein Genprodukt zwischen den Primern *Gse1-5arm-WTR* und *Gse1-crit-WTF* bilden konnte. Der untere Balken stellt ein Amplifikat mit einer Länge von 127 bp dar, welches zwischen den Primern *Gse1-5arm-WTR* und *Tm1a-5mut-R* entstanden ist und somit für das Vorhandensein des mutierten Allels spricht. Daraus lässt sich folgern, dass die Embryonen Nr. 403.1, Nr. 403.2 und Nr. 403.2 über zwei Wildtypallele verfügten. Das Muttertier Nr. 403 sowie der Embryo Nr. 403.4 waren hiernach heterozygot, verfügten also über beide Allelvarianten. Allein der Embryo Nr. 403.5 war homozygot für die mutierten Allele.

3.1.1 Genotypisierungsergebnisse von Embryonen zum Zeitpunkt E18.5

In Tabelle 8 sind alle ausgewerteten Würfe dargestellt, bei denen die Embryonen zum Zeitpunkt E18.5 entnommen wurden. Zusätzlich zur Bestimmung der Genotypen der

Embryonen wurden auch die Genotypen der Muttertiere erneut bestimmt. Hierbei konnte bei allen ausgewerteten Würfen die Heterozygotie der Mutter bestätigt werden.

Tabelle 8: Übersicht der *Gse1*-Genotypisierungen von Würfen, die zum Zeitpunkt E18.5 entnommen wurden

Muttertier	Wildtyp Embryonen	Heterozygote Embryonen	Homozygote Embryonen	Insgesamte Anzahl der Embryonen
Nr. 379	2	4	3	9
Nr. 387	0	6	1	7
Nr. 411	2	5	1	8
Nr. 403	3	1	1	5
Insgesamt	7 (24 %)	16 (55 %)	6 (21 %)	29

Innerhalb der vier entnommenen Würfe zum Zeitpunkt E18.5 waren von den insgesamt 29 Embryonen sieben homozygot für die Wildtypallele, 16 heterozygot und sechs homozygot für die mutierten Allele, in diesem Fall also für das Allel *Gse1^{tm1d}*. Ausgewertet wurden hierfür alle entnommenen Embryonen, unabhängig vom Auftreten makroskopischer Auffälligkeiten oder vermutlichem Tod des Embryos. Unter allen Embryonen zeigte sich eine Verteilung der Genotypen, die vereinbar mit der Mendel'schen Regel zur Kreuzung von heterozygoten Individuen war ($p = 0,55$ im Chi-Quadrat-Test).

In Abbildung 10 sind die entnommenen Embryonen zum Zeitpunkt E18.5 unterteilt nach dem Auftreten makroskopischer Auffälligkeiten dargestellt. Als makroskopische Auffälligkeiten wurden folgende Aspekte eingestuft: beginnende Zersetzung, extreme Blässe und starke, von außen sichtbare Blutkoagulation. Die gleichen Aspekte wurden auch für die Differenzierung von Embryonen, die zum Zeitpunkt E15.5 entnommen wurden, angewendet.

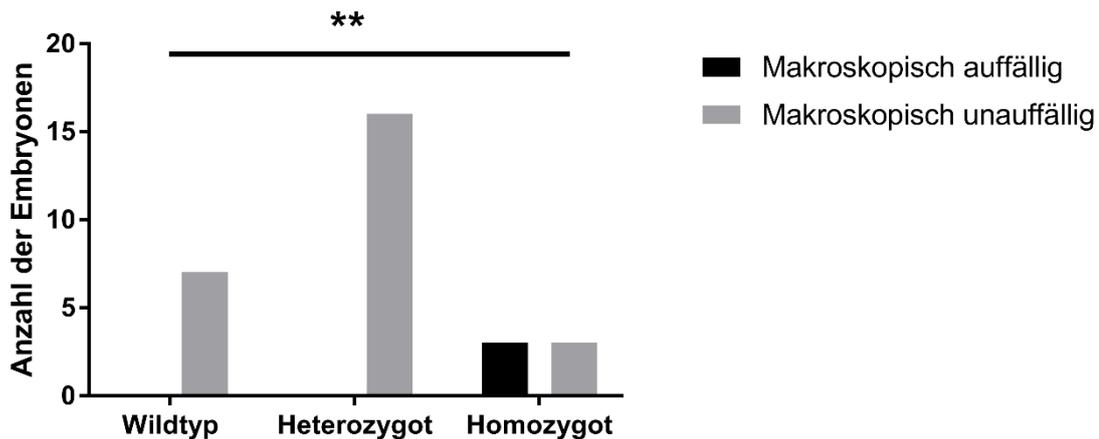


Abbildung 10: Darstellung der Verteilung des Auftretens makroskopischer Auffälligkeiten zwischen den Genotypen bei Entnahme zum Zeitpunkt E18.5. (**) weist hierbei auf einen signifikanten Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen mit einem $p < 0,01$ hin.

Bei Betrachtung der Verteilung des Auftretens makroskopischer Auffälligkeiten bei Entnahme in Bezug auf den später ermittelten Genotyp fiel auf, dass alle bereits makroskopisch auffälligen Embryonen homozygot für das mutierte Allel *Gse1^{mutd}* waren. Im Fisher-Test zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen dem Auftreten makroskopischer Auffälligkeiten und einem homozygot mutierten Genotyp der betroffenen Embryonen ($p = 0,0055$).

3.1.2 Genotypisierungsergebnisse von Embryonen zum Zeitpunkt E15.5

In Tabelle 9 sind alle ausgewerteten Würfe dargestellt, bei denen die Embryonen zum Zeitpunkt E15.5 entnommen wurden. Zusätzlich zur Bestimmung der Genotypen der Embryonen wurden auch die Genotypen der Muttertiere erneut bestimmt. Dabei konnte bei allen ausgewerteten Würfen die Heterozygotie der Mutter bestätigt werden.

Innerhalb der neun entnommenen Würfe zu diesem früheren Zeitpunkt E15.5 waren von den insgesamt 54 Embryonen zwölf homozygot für die Wildtypallele, 30 heterozygot und zwölf homozygot für die mutierten Allele, in diesem Fall also für das Allel *Gse1^{mutd}*. Ausgewertet wurden auch zu diesem Zeitpunkt alle entnommenen Embryonen, unabhängig vom Auftreten makroskopischer Auffälligkeiten oder vermutlichem Tod des Embryos. Unter allen Embryonen zeigte sich einer Verteilung der Genotypen, die vereinbar mit der Mendel'schen Regel zur Kreuzung von heterozygoten Individuen war ($p = 0,49$).

Tabelle 9: Übersicht der *Gse1*-Genotypisierungen von Würfeln, die zum Zeitpunkt E15.5 entnommen wurden

Muttertier	Wildtyp Embryonen	Heterozygote Embryonen	Homozygote Embryonen	Insgesamte Anzahl der Embryonen
Nr. 365	2	0	0	2
Nr. 388	0	3	1	4
Nr. 391	3	2	0	5
Nr. 393	0	2	2	4
Nr. 404	0	4	3	7
Nr. 414	3	6	1	10
Nr. 413	0	4	2	6
Nr. 440	2	3	2	7
Nr. 421	2	6	1	9
Insgesamt	12 (22 %)	30 (56 %)	12 (22 %)	54

Auch zum Zeitpunkt E15.5 stachen einige Embryonen durch makroskopische Auffälligkeiten hervor. Die Verteilung dieser äußerlichen Auffälligkeiten wird in Abbildung 11 in Bezug auf den anschließend ermittelten Genotyp graphisch dargestellt.

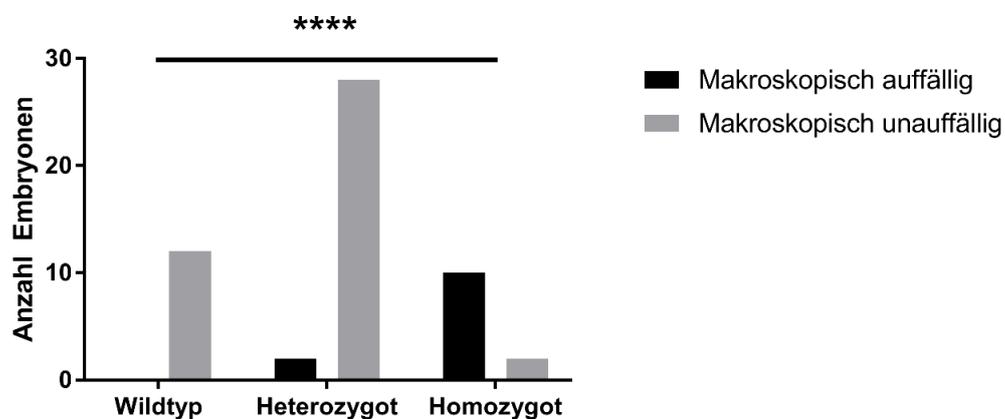


Abbildung 11: Darstellung der Verteilung des Auftretens makroskopischer Auffälligkeiten zwischen den Genotypen bei Entnahme zum Zeitpunkt E15.5. (****) weist auf einen signifikanten Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen mit einem $p < 0,0001$ hin.

Bei Betrachtung der Verteilung des Auftretens makroskopischer Auffälligkeiten bei Entnahme in Bezug auf den später ermittelten Genotyp konnte festgestellt werden, dass fast alle bereits makroskopisch auffälligen Embryonen homozygot für das mutierte Allel *Gse1^{tm1d}* waren. Im Fisher-Test zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen dem Auftreten makroskopischer Auffälligkeiten und einem homozygot mutierten Genotyp der betroffenen Embryonen ($p < 0,00001$).

Zur Unterscheidung der Embryonen für folgende Versuche und gleichzeitiger Zuteilbarkeit zu ihren Würfen wurden diese mit der Nummer ihres Muttertiers (z.B. Nr. 379) und einer fortlaufenden Nummerierung innerhalb des Wurfes benannt (z.B. .1, .2 etc.), sodass sich Bezeichnungen wie beispielsweise Nr. 379.1 ergaben.

3.2 Ergebnisse der Hämoglobinmessungen

Die Entnahme des Blutes sowie die kolorimetrische Bestimmung der Hämoglobinkonzentration wurde wie in 2.2.2 beschrieben durchgeführt. Hierfür wurden nur Embryonen, die zum Zeitpunkt E18.5 entnommen wurden, genutzt, da nur diese über ein ausreichendes Blutvolumen verfügen, um zum einen frühzeitige Koagelbildung zu verhindern und zum anderen die Möglichkeit zu haben, Duplikate für genauere Ergebnisse erstellen zu können. Tauglich für den Versuch waren die Blutproben von insgesamt vier Wildtyp-Embryonen, von fünf heterozygoten und von drei homozygot mutierten Embryonen. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abbildung 12 graphisch dargestellt.

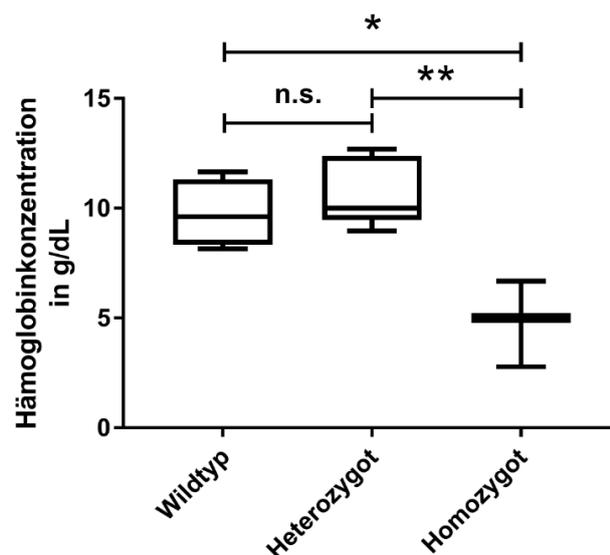


Abbildung 12: Kolorimetrisch bestimmte Hämoglobinkonzentrationen von Embryonen unterschiedlicher Genotypen zum Zeitpunkt E18.5, dargestellt mit ihren Mittelwerten,

Minima und Maxima. (*) weist auf einen signifikanten Unterschied der verglichenen Gruppen mit einem $p < 0,05$, (**) auf ein $p < 0,01$ hin. (n.s.) zeigt einen nicht signifikanten Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen an.

Durch die kolorimetrische Bestimmung der Hämoglobinkonzentration im Blut der Embryonen verschiedener Genotypen konnte gezeigt werden, dass die homozygot mutierten Embryonen sowohl im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen ($p = 0,0131$) als auch im Vergleich zu heterozygoten Embryonen ($p = 0,0032$) eine signifikant niedrigere Hämoglobinkonzentration aufwiesen. Zwischen Wildtyp- und heterozygoten Embryonen ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,3815$).

3.3 Vergleich der Verteilung und Morphologie der Blutzellen

Zur Eingrenzung der Art oder auch der Ursache der gemessenen verminderten Hämoglobinkonzentrationen bei homozygot mutierten Embryonen – sowie vor allem auch als alternative Untersuchung zum Zeitpunkt E15.5 - wurden von jeweils drei Wildtyp- und drei homozygot mutierten Embryonen zu den Zeitpunkten E15.5 und E18.5 transversale histologische Schnitte, wie in 2.2.3 beschrieben, angefertigt und zur Übersicht mit HE gefärbt.

3.3.1 Vergleich der Blutzellmorphologie zum Zeitpunkt E15.5

Zum Zeitpunkt E15.5 wurden anfangs zur ersten Übersicht HE-Färbungen von Wildtyp- und homozygot mutierten Embryonen angefertigt und verglichen. Schwerwiegende Organveränderungen oder gar das Fehlen solcher konnte nicht festgestellt werden. Bei näherer Betrachtung allerdings fielen ausgeprägte Unterschiede bezüglich der Morphologie der Blutzellen auf. Diese scheinen in den histologischen Schnitten von homozygoten Embryonen häufiger einen Zellkern zu enthalten als in Schnitten von Wildtyp-Embryonen.

In Abbildung 13 ist hierzu vertretend für jeden ausgewerteten Embryo – insgesamt drei Wildtyp- und drei homozygot mutierte Embryonen – ein histologischer Schnitt in der Transversalebene durch die thorakale Aorta in HE-Färbung dargestellt.

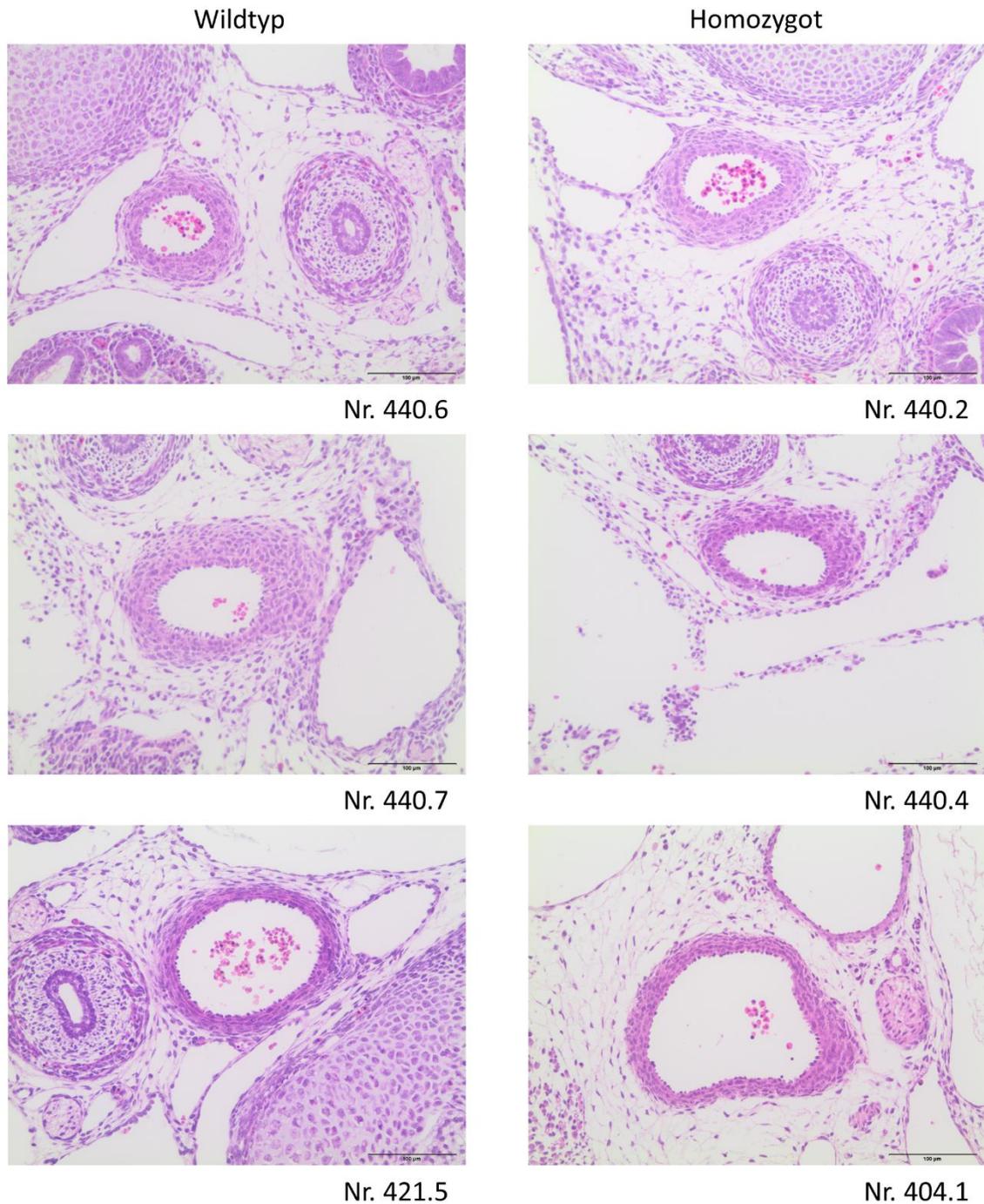


Abbildung 13: HE-Färbung der thorakalen Aorta in der Transversalebene mit enthaltenen Blutzellen von Embryonen zum Zeitpunkt E15.5. Dargestellt ist jeweils ein Bild der insgesamt fünf ausgewerteten Schnitte pro Embryo. In der linken Spalte befinden sich hierbei Aufnahmen der drei verwendeten Wildtyp-Embryonen, in der rechten Spalte Aufnahmen der drei verwendeten homozygoten Embryonen. Die Aufnahmen wurden mit einem 20x Objektiv gemacht. Der Balken rechts unten in den einzelnen Bildern entspricht einer Breite von 100 μm .

In Abbildung 13 ist gut sichtbar, dass sich zum Zeitpunkt E15.5 mehr zellkernhaltige Blutzellen im Blut homozygot mutierter Embryonen verglichen mit gleichaltrigen Wildtyp-Embryonen finden ließen.

3.3.2 Verteilung der Blutzellen zum Zeitpunkt E15.5

Zur quantitativen Überprüfung der Annahme, dass sich zum Zeitpunkt E15.5 im Blut homozygot mutierter Embryonen mehr zellkernhaltige Blutzellen befinden als im Blut von Wildtyp-Embryonen, wurde neben einem subjektiven Vergleich der insgesamt Anzahl aller Blutzellen auch der Anteil zellkernhaltiger Blutzellen in jeweils fünf transversalen Schnitten der thorakalen Aorta bestimmt (siehe Abbildung 14). Zur Vermeidung von Doppelzählungen wurde dabei ein Abstand von etwa 120 μm zwischen den einzelnen auszuwertenden Schnitten gewählt.

Bezüglich der Absolutzahl der Blutzellen in den betrachteten Schnitten ließ sich sagen, dass diese bei homozygot mutierten Embryonen subjektiv nicht reduziert war. Interindividuell allerdings kam es hier, bedingt durch die vorherige Blutentnahme, zu großen Schwankungen, sodass eine quantitative Auswertung nicht aussagekräftig war und daher nicht durchgeführt wurde.

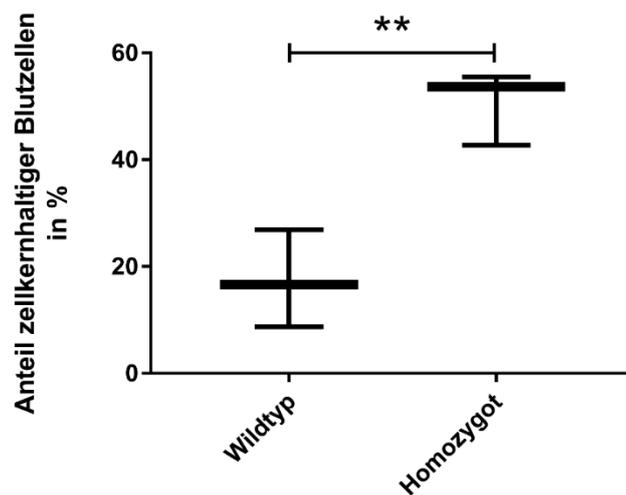


Abbildung 14: Anteil zellkernhaltiger Blutzellen bei homozygoten und Wildtyp-Embryonen zum Zeitpunkt E15.5. (**) weist auf einen signifikanten Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen mit einem $p < 0,01$ hin.

Aus Abbildung 14 ist ersichtlich, dass sich zum Zeitpunkt E15.5 ein signifikanter Unterschied zwischen dem Anteil zellkernhaltiger Blutzellen im Blut von Wildtyp- und homozygot mutierten Embryonen zeigt ($p = 0,0073$). Zu erwähnen sei aber, dass sich auch im Blut von

Wildtyp-Embryonen ein nicht zu vernachlässigender Anteil zellkernhaltiger Blutzellen finden lässt.

3.3.3 Vergleich der Blutzellmorphologie zum Zeitpunkt E18.5

Auch zum Zeitpunkt E18.5 wurden HE-Färbungen von Wildtyp- und homozygoten Embryonen verglichen. Hinsichtlich fehlenden oder morphologisch andersartigen Organanlagen konnten auch zu diesem späteren Zeitpunkt keine Unterschiede zwischen den beiden betrachteten Genotypen gefunden werden. Ausgehend von den Erkenntnissen zur unterschiedlichen Morphologie der Blutzellen zwischen den Genotypen zum Zeitpunkt E15.5 konnten ähnliche Unterschiede auch zum Zeitpunkt E18.5 festgestellt werden: Während die Blutzellen in den histologischen Schnitten von Wildtyp-Embryonen bis auf wenige Ausnahmen keinen Zellkern enthielten und mit großer Sicherheit als definitive Erythrozyten eingeordnet werden konnten, präsentierten sich in den histologischen Schnitten der homozygoten Embryonen viele Blutzellen mit Zellkernen. Diese Zellkerne füllten in den meisten Zellen das Zytoplasma fast vollständig aus.

In Abbildung 15 ist jeweils vertretend für jeden ausgewerteten Embryo – insgesamt drei homozygote und drei Wildtyp-Embryonen - ein transversaler Schnitt durch die thorakale Aorta in der HE-Färbung dargestellt.

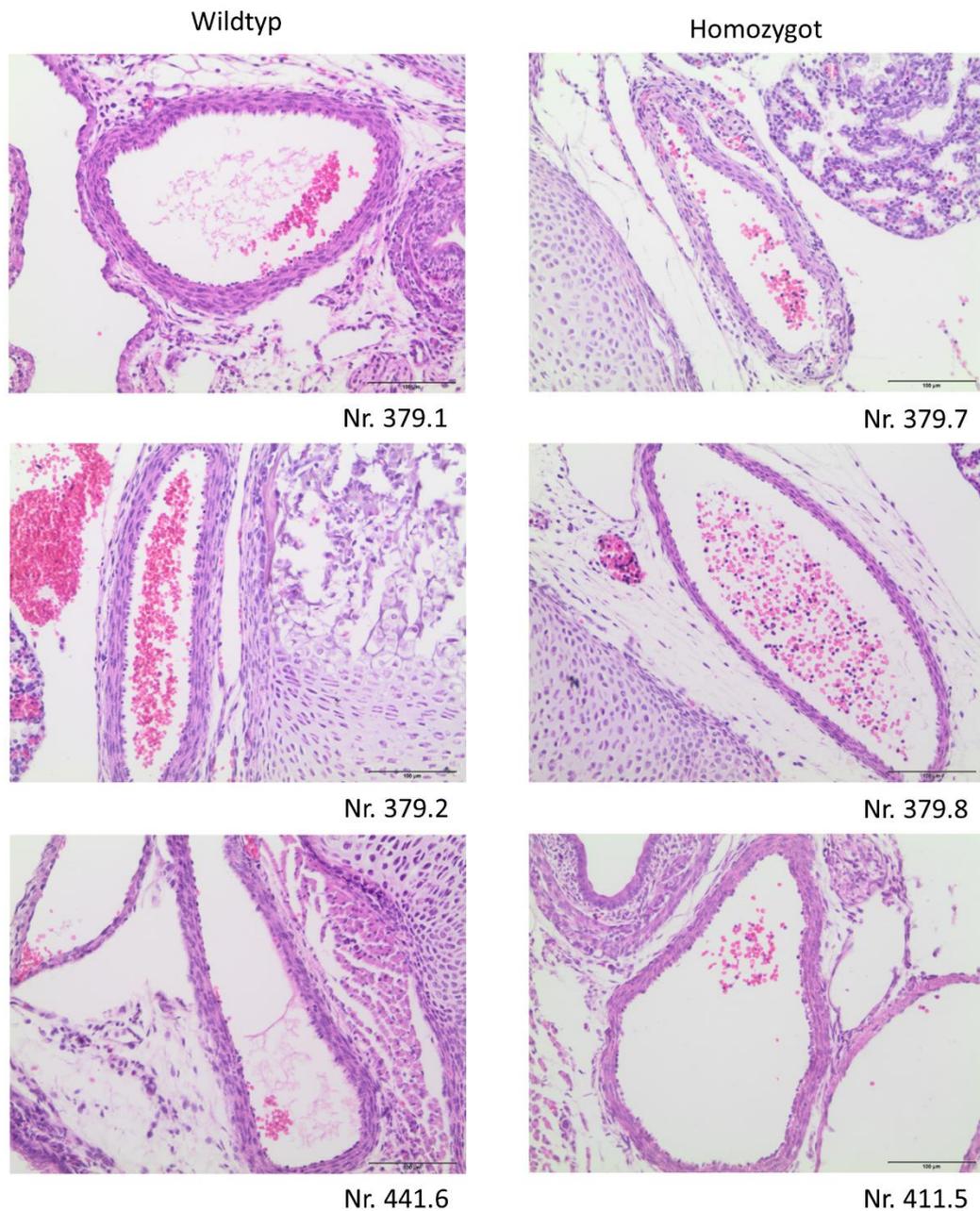
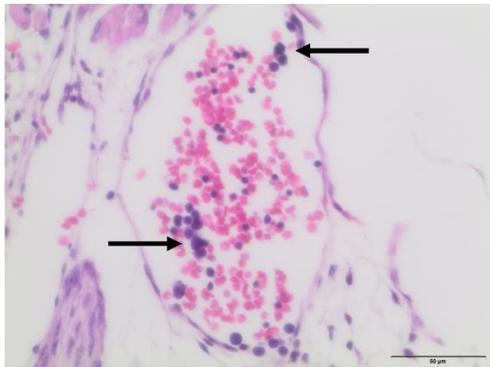


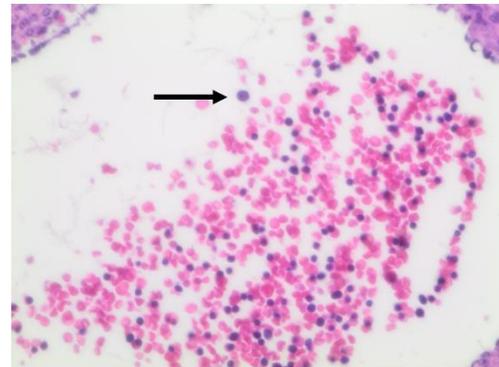
Abbildung 15: HE-Färbung der thorakalen Aorta in der Transversalebene mit enthaltenen Blutzellen von Embryonen zum Zeitpunkt E18.5. Dargestellt ist jeweils ein Bild der insgesamt fünf ausgewerteten Schnitte pro Embryo. In der linken Spalte befinden sich hierbei Aufnahmen der drei verwendeten Wildtyp-Embryonen, in der rechten Spalte Aufnahmen der drei verwendeten homozygoten Embryonen. Die Aufnahmen wurden mit einem 20x Objektiv gemacht. Der Balken rechts unten in den einzelnen Bildern entspricht einer Breite von 100 μm .

Wie in Abbildung 15 sichtbar entsprach die Größe der vermehrt auftretenden zellkernhaltigen Blutzellen im Blut der homozygot mutierten Embryonen zum Zeitpunkt E18.5 in den meisten Fällen der Größe der restlichen zellkernlosen Blutzellen. Zusätzlich zu den in der Aorta enthaltenen Blutzellen wurden auch die Blutzellen in den restlichen Gefäßen bezüglich

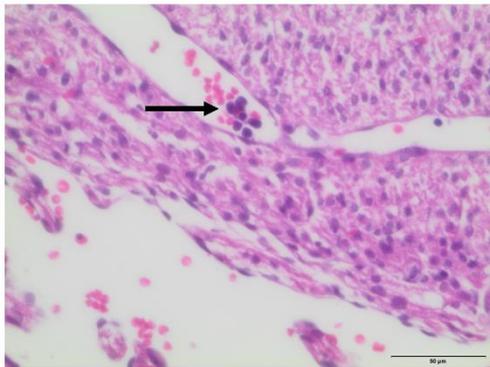
ihrer Morphologie betrachtet. In Abbildung 16 sind einige kernhaltige Blutzellen dargestellt, die sowohl durch ihre Gesamtgröße als auch durch die Größe ihres Zellkerns aus den Zellen in ihrer Umgebung herausstachen und eher an Vorläuferzellen erinnerten.



Nr. 379.7



Nr. 379.8



Nr. 411.5

Abbildung 16: Blutzellen homozygoter Embryonen zum Zeitpunkt E18.5. Die Bilder wurden mithilfe eines 40x Objektivs aufgenommen. Die schwarzen Pfeile zeigen auf kernhaltige Blutzellen, deren Kern um einiges größer zu sein scheint als die Zellkerne anderer kernhaltiger Blutzellen.

3.3.4 Verteilung der Blutzellen zum Zeitpunkt E18.5

Zur quantitativen Überprüfung der erneuten subjektiven Annahme, dass sich im Blut homozygot mutierter Embryonen auch zum Zeitpunkt E18.5 mehr zellkernhaltige Blutzellen befinden als im Blut von Wildtyp-Embryonen, wurde wiederum neben einer subjektiven Beurteilung der insgesamten Anzahl aller Blutzellen der Anteil zellkernhaltiger Blutzellen an allen Blutzellen in jeweils fünf transversalen Schnitten der thorakalen Aorta quantifiziert (siehe Abbildung 17). Zur Vermeidung von Doppelzählungen wurde dabei ein Abstand von etwa 120 μm zwischen den einzelnen auszuwertenden Schnitten gewählt.

Bezüglich der Absolutzahl der Blutzellen in den betrachteten Schnitten ließ sich auch zu diesem Zeitpunkt sagen, dass diese erneut bei homozygot mutierten Embryonen subjektiv nicht reduziert war. Interindividuell allerdings kam es ein weiteres Mal zu großen Schwankungen. Eine quantitative Auswertung wurde auch hier aus dem zuvor bereits beschriebenen Grund nicht durchgeführt.

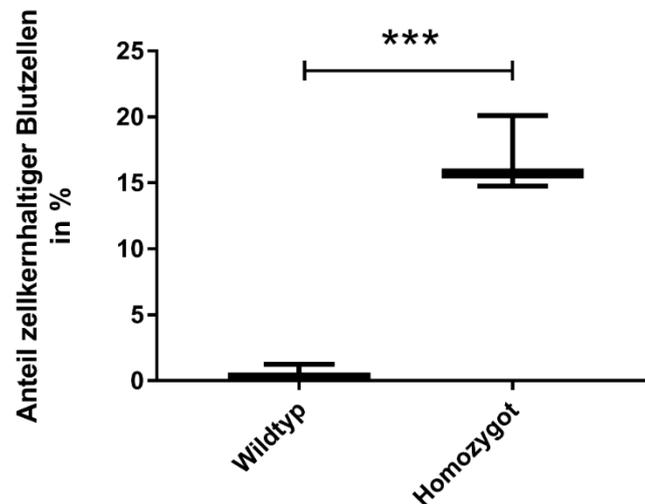


Abbildung 17: Anteil zellkernhaltiger Blutzellen bei homozygoten und Wildtypembryonen zum Zeitpunkt E18.5. (***) weist auf einen signifikanten Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen mit einem $p < 0,001$ hin.

Aus Abbildung 17 geht hervor, dass sich auch zu dem späteren Zeitpunkt E18.5 im Blut homozygot mutierter Embryonen signifikant mehr zellkernhaltige Blutzellen fanden ($p = 0,0006$). Gegenüber den Ergebnissen zum Zeitpunkt E15.5 fällt auf, dass der Anteil zellkernhaltiger Blutzellen an allen Blutzellen bei beiden Genotypen geringer ausfällt, bei den Wildtyp-Embryonen sogar fast Richtung Null geht.

Bei dem Vergleich des Anteils zellkernhaltiger Blutzellen und der kolorimetrisch bestimmten Hämoglobinkonzentration im Blut homozygot mutierter Embryonen zum Zeitpunkt E18.5 fiel ein Gefälle der Hämoglobinkonzentrationen bei höheren Anteilen von zellkernhaltigen Blutzellen auf. In Abbildung 18 ist dieser Zusammenhang graphisch dargestellt.

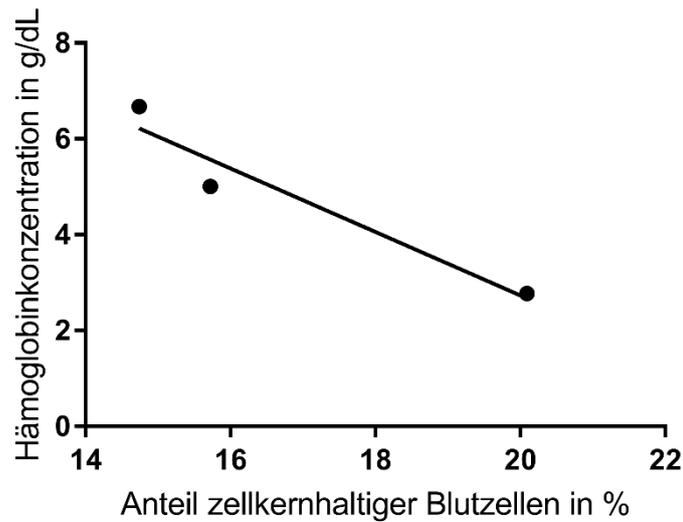


Abbildung 18: Kolorimetrisch gemessene Hämoglobinkonzentration in g/dl in Abhängigkeit von dem Anteil zellkernhaltiger Blutzellen. Für diese lineare Regression wurden die Daten der drei homozygoten Embryonen zum Zeitpunkt E18.5 verwendet. Der Korrelationskoeffizient R^2 liegt bei 0,93. $P = 0,17$

Auch wenn keine statistische Signifikanz vorliegt, so legt Abbildung 18 nahe, dass sich der Anteil zellkernhaltiger Blutzellen und die kolorimetrisch gemessenen Hämoglobinkonzentration im Blut homozygot mutierter Embryonen zum Zeitpunkt E18.5 in einen linearen Zusammenhang bringen lassen.

3.3.5 Vergleich der Morphologie von Blutzellen zu den Zeitpunkten E15.5 und E18.5

Während es Parallelen hinsichtlich der unterschiedlichen Anteile zellkernhaltiger Blutzellen zwischen den betrachteten Genotypen zu den beiden Zeitpunkten E15.5 und E18.5 gab, fielen Unterschiede bezüglich der Morphologie der zellkernhaltigen Blutzellen zu diesen beiden Zeitpunkten auf. Zur Veranschaulichung dessen sind in Abbildung 19 noch einmal Aufnahmen der transversal geschnittenen thorakalen Aorta von Wildtyp- und homozygot mutierten Embryonen zu beiden Zeitpunkten in HE-Färbung nebeneinander dargestellt.

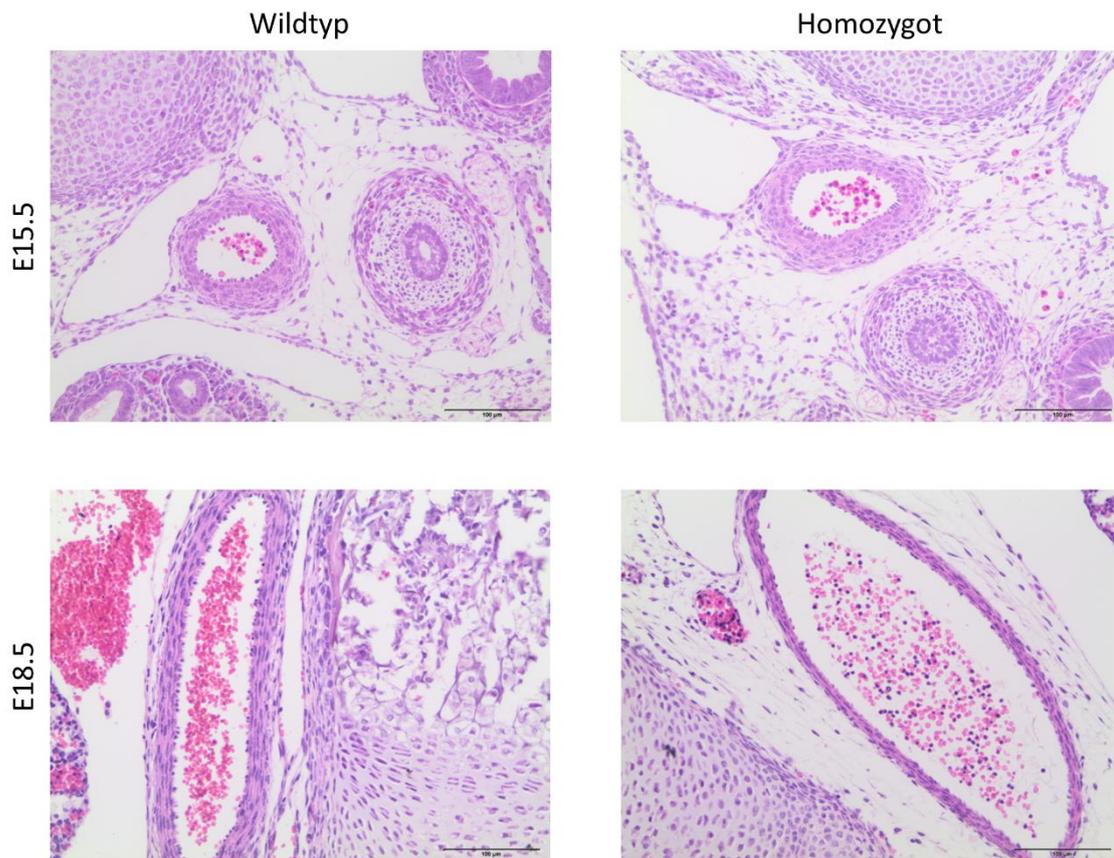


Abbildung 19: Vergleich der Morphologie von Blutzellen zu den Zeitpunkten E15.5 und E18.5 in der HE-Färbung. Dargestellt sind pro Zeitpunkt je eine Aufnahme eines Wildtyp- und eines homozygoten Embryos, die mithilfe eines 20x Objektivs gemacht wurden. Die Balken in den jeweils rechten unteren Ecken der Aufnahmen stellt eine Breite von 100 µm dar.

Aus Abbildung 19 ist erkennbar, dass zum einen zellkernhaltige Blutzellen bei Embryonen zum Zeitpunkt E18.5 nahezu ausschließlich bei homozygot mutierten Embryonen zu finden waren, während solche bei Embryonen zum Zeitpunkt E15.5 grundsätzlich im Blut beider betrachteter Genotypen vorhanden waren. Zusätzlich lässt sich sagen, dass es zwischen den beiden Zeitpunkten Unterschiede bezüglich der Größe der Zellkerne im Verhältnis zur Gesamtgröße der jeweiligen Blutzellen gab. Die Zellkerne der Blutzellen im Blut von Embryonen zum Zeitpunkt E15.5 nahmen in einem Großteil der abgebildeten Blutzellen einen eher kleineren Anteil der Gesamtgröße in Anspruch. Zum Zeitpunkt E18.5 allerdings füllten die Zellkerne der vermehrt vorkommenden zellkernhaltigen Blutzellen diese in der Mehrzahl annähernd vollständig aus.

3.3.6 TER-119-Färbung von Blutzellen in Gefäßen

Zur Differenzierung der Herkunft der vermehrt vorkommenden zellkernhaltigen Blutzellen vor allem im Blut homozygot mutierter Embryonen wurden immunhistochemische Färbungen gegen das Oberflächenantigen TER-119 auf Blutzellen erythroider Herkunft durchgeführt. Hierfür wurden Schnitte zweier Embryonen zum Zeitpunkt E18.5 gefärbt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 mitsamt der angefertigten Negativkontrollen dargestellt.

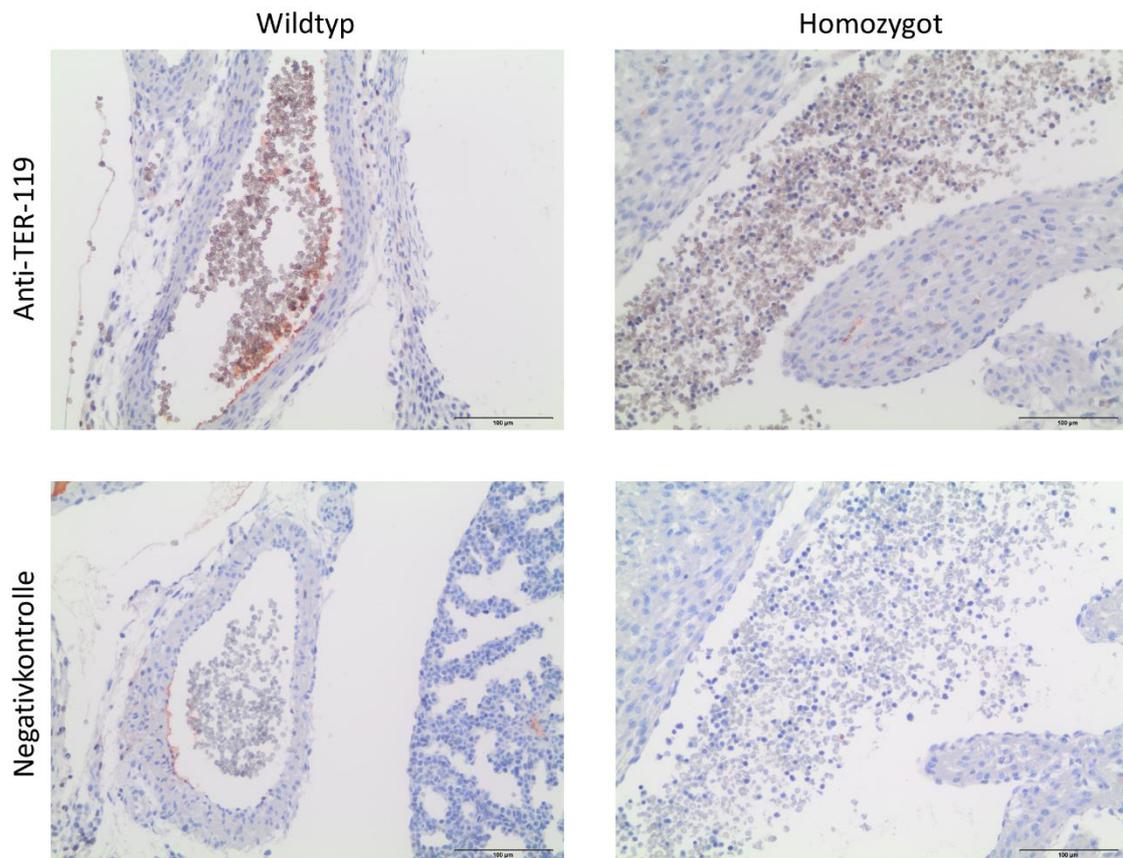


Abbildung 20: Immunhistochemische Färbung mit Anti-TER-119. In der oberen Reihe wurde der Antikörper in der Verdünnung 1:25 verwendet. In der unteren Reihe ist die Negativkontrolle dargestellt. Die Bilder wurde mit einem 20x Objektiv aufgenommen. Der Balken rechts unten in den Bildern entspricht einer Breite von 100 µm.

In Abbildung 20 ist gut erkennbar, dass die verwendete Färbung zuverlässige Ergebnisse mit sehr guten Negativkontrollen ergab. In den Schnitten, auf denen der Antikörper verwendet wurde, waren auf der Oberfläche der Erythrozyten durchweg positive Anfärbungen sichtbar, während das umliegende Gewebe bis auf sehr wenige unspezifische Areale negativ für den verwendeten Antikörper zu sein schien. In den Negativkontrollen kam es zu keiner Anfärbung der Blutzellen.

Zur besseren Sichtbarkeit sind in Abbildung 21 nochmalig immunhistochemische Färbungen gegen TER-119 in Schnitten von je einem Wildtyp- und homozygot mutierten Embryo zum Zeitpunkt E18.5 in einer höheren Vergrößerung dargestellt.

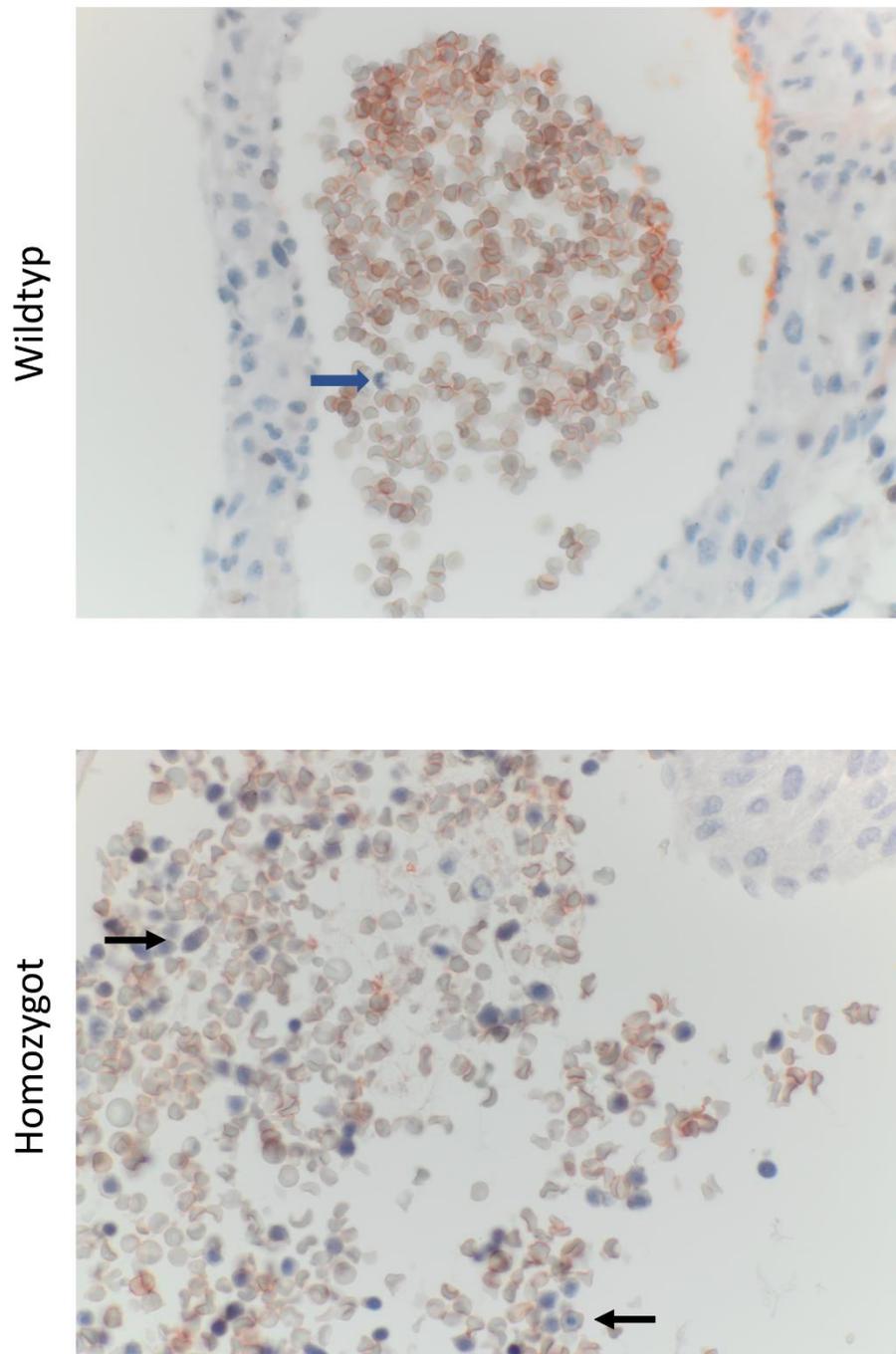


Abbildung 21: Immunhistochemische Färbung mit Anti-TER-119. Diese Aufnahmen wurden mithilfe eines 60x Objektivs gemacht. Der Antikörper wurde 1:10 verdünnt. Im oberen Bild zeigt der blaue Pfeil auf eine aufgrund ihrer Kernmorphologie am ehesten als neutrophilen Granulozyten einzuordnende Zelle. Die schwarzen Pfeile im unteren Bild zeigen auf zwei kernhaltige Blutzellen, deren Zellmembran positiv in der TER-119-Färbung zu sein scheint.

In der oberen Aufnahme der Abbildung 21 ist neben der Mehrzahl der definitiven Erythrozyten mit positiver Anfärbung ihrer Zelloberflächen eine Blutzelle erkennbar, die aufgrund der Morphologie ihres Zellkerns wahrscheinlich am ehesten als neutrophiler Granulozyt einzuordnen ist (siehe blauer Pfeil). Dieser verfügte über keine positive Anfärbung in der verwendeten immunhistochemischen Färbung. Die zellkernhaltigen Blutzellen eines homozygot mutierten Embryos in der unteren Aufnahme der Abbildung 21 zeigen dagegen zu einem großen Anteil leichte positive Anfärbungen auf ihren Zelloberflächen.

3.4 Immunhistochemische TER-119-Färbungen der Leber

Da zu diesem Zeitpunkt die Hämatopoese vollständig in der Leber ablaufen sollte, wurden zur Untersuchung einer möglichen hepatischen Ursache der gemessenen verminderten Hämoglobinkonzentrationen bei homozygot mutierten Embryonen zum Zeitpunkt E18.5 auch die Lebern von Wildtyp- und homozygot mutierten Embryonen histologisch aufgearbeitet und immunhistochemisch gegen das Oberflächenantigen erythroider Zelle TER-119 gefärbt.

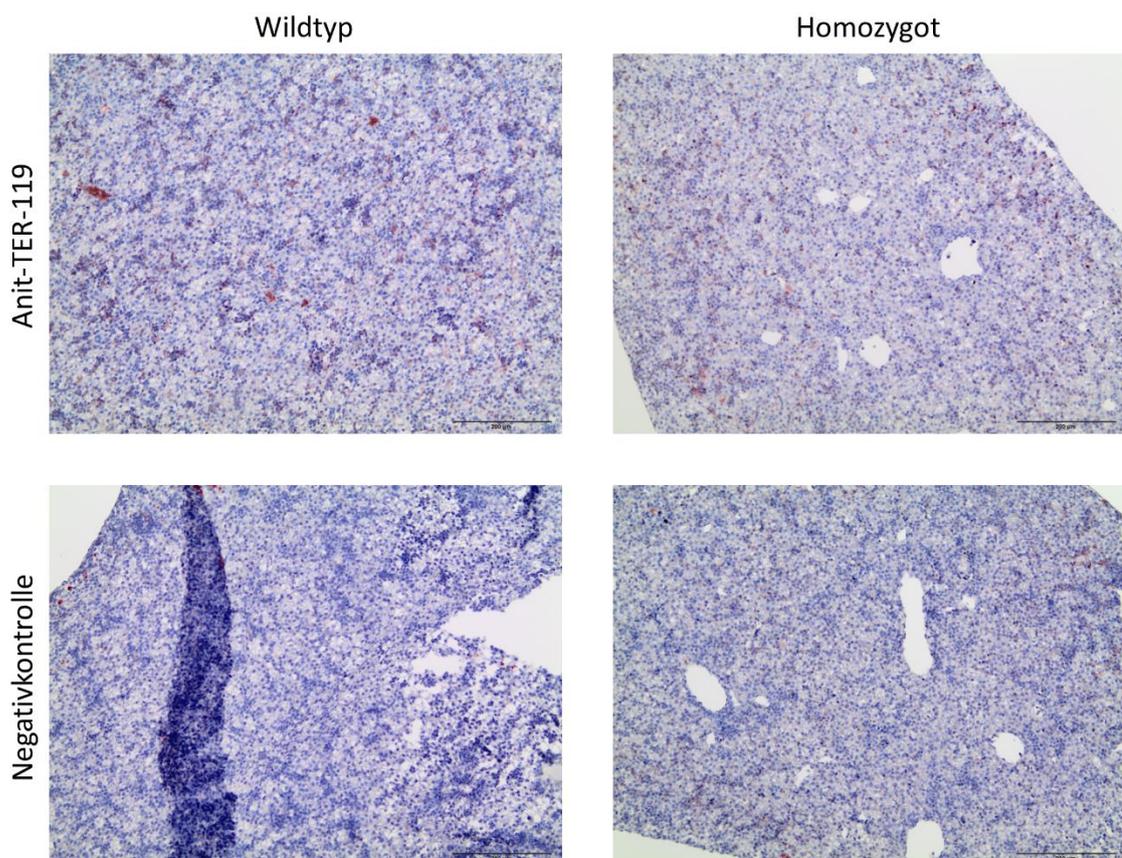


Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung gegen TER-119 in Schnitten der Leber von Wildtyp- und homozygot mutierten Embryonen zum Zeitpunkt E18.5. Dargestellt sind zusätzlich in der unteren Reihe die angefertigten Negativkontrollen. Der Antikörper Anti-TER-119 wurde hier in der Verdünnung 1:25 verwendet. Die Aufnahmen wurden mithilfe

eines 10x Objektivs gemacht. Der Balken in den jeweils unteren rechten Ecken der Aufnahmen entspricht einer Breite von 200 μm .

Aus der Abbildung 22 geht hervor, dass es keine eindeutigen Unterschiede in der immunhistochemischen Anfärbarkeit der Lebern bei Verwendung des für erythroide Zellen spezifischen Antikörper Anti-TER-119 zwischen den beiden Genotypen gab.

3.5 Ergebnisse der LacZ-Färbung

Zur Etablierung der LacZ-Färbung zur Darstellung von Bereichen im Embryo, in denen die Trapping Cassette exprimiert wird, wurden Gefrierschnitte von Embryonen zum Zeitpunkt E11.5 angefertigt. Insgesamt wurden Schnitte von sechs Embryonen wie in 2.2.3.8 beschrieben gefärbt. Unter diesen sechs Embryonen befanden sich je drei Wildtyp- und drei homozygot mutierte Embryonen, welche aus zwei verschiedenen Würfen entstammten. In Abbildung 23 ist das Ergebnis dieser Färbung im Rahmen einer Übersicht über alle gefärbten Embryonen dargestellt

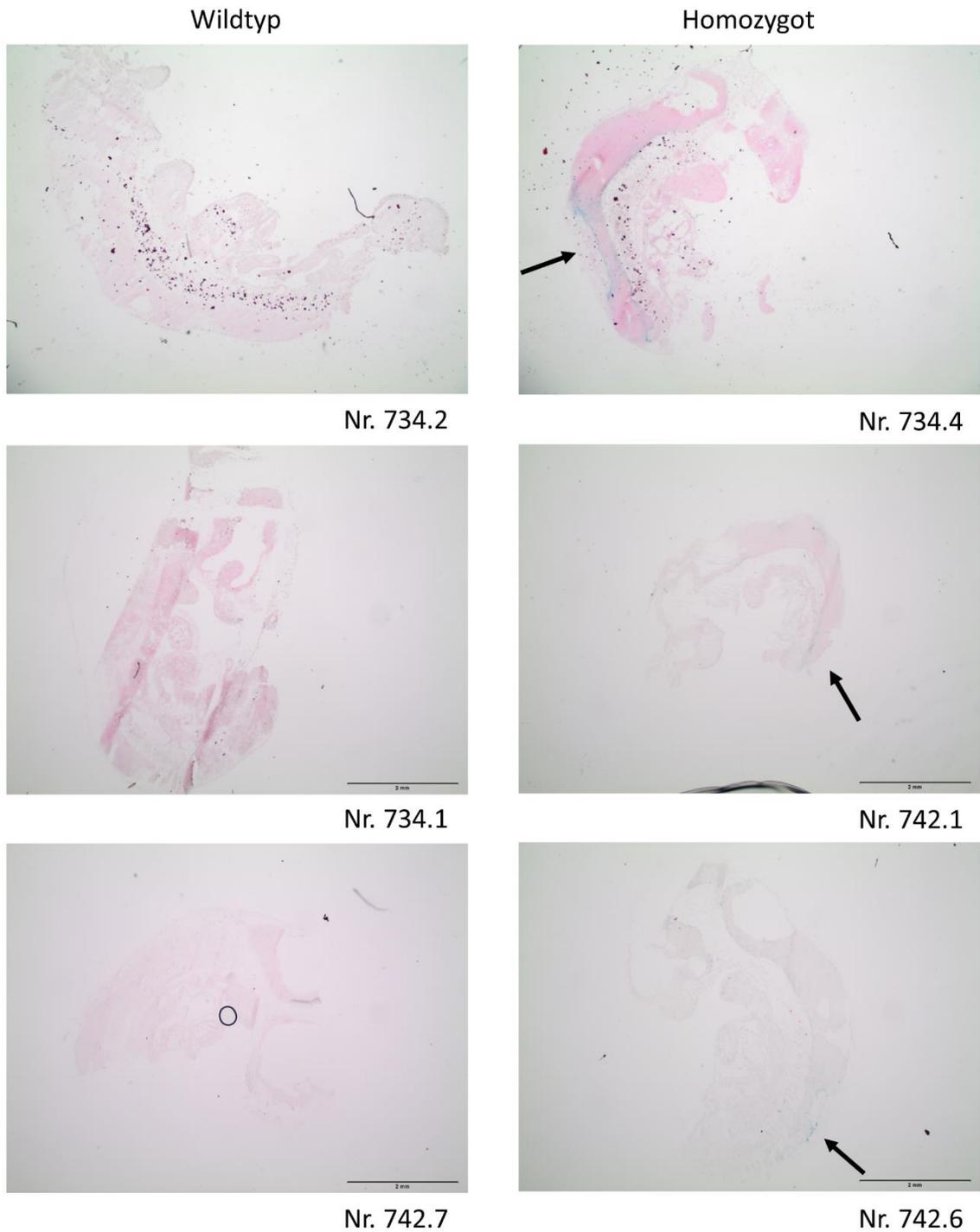


Abbildung 23: LacZ-Färbung von jeweils drei Embryonen der Linie *Gse1^{tm1a}* mit Wildtyp- und homozygot mutiertem Genotyp zum Zeitpunkt E11.5. In der linken Spalte sind die Wildtyp-Embryonen, in der rechten Spalte die homozygot mutierten Embryonen dargestellt. Zur besseren Sichtbarkeit sind positive Areale mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Die Aufnahmen wurden mit einem 1,25x Objektiv erstellt.

Zu Abbildung 23 lässt sich sagen, dass die Färbung – positive Areale färbten sich hellblau bis türkis an – spezifisch nur Areale in homozygot mutierten Embryonen anfärbte, während

eine solche Färbung in den Wildtyp-Embryonen nicht aufzufinden war. Zusätzlich fiel auf, dass die Färbung bei den homozygot mutierten Embryonen immer an ähnlichen anatomischen Regionen auftrat. Zur einfacheren Orientierung wurden zusätzlich HE-Färbungen von Schnitten aus der unmittelbaren Umgebung der LacZ-gefärbten Schnitte angefertigt. Eine solche ist in Abbildung 24 neben der korrespondierenden LacZ-Färbung abgebildet.

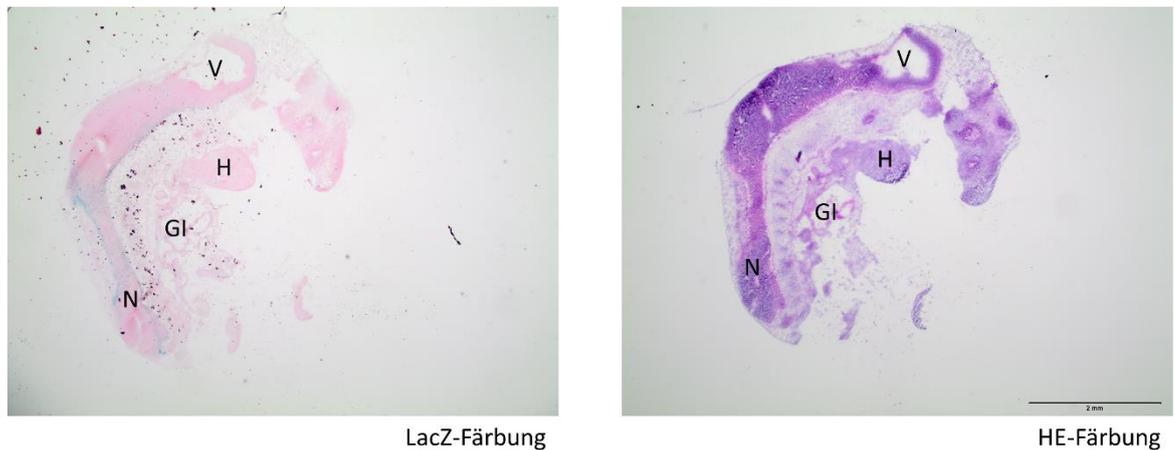


Abbildung 24: Vergleich eines Schnittes in LacZ-Färbung mit einem HE-gefärbten Schnitt eines homozygot mutierten Embryos der Linie *Gse1^{tm1a}* zum Zeitpunkt E11.5. Die Aufnahmen wurden mithilfe eines 1,25x Objektiv gemacht. Einige anatomische Regionen und Organe wurden zur Übersicht wie folgend markiert: N = Neuroepithel des Neuralrohrs, V = vierter Ventrikel des Gehirns, H = Herz, GI = Gastrointestinaltrakt

In Abbildung 25 sind darüberhinaus vergrößerte Darstellungen zum einen des Herzens und zum anderen des Areals der stärksten LacZ-Färbung gezeigt, die Abbildung 24 zufolge im Bereich des Neuralrohrs lag. Zusätzlich ist in Abbildung 26 nochmalig das gesamte Areal markiert, das von LacZ positiver Färbung umgeben wurde.

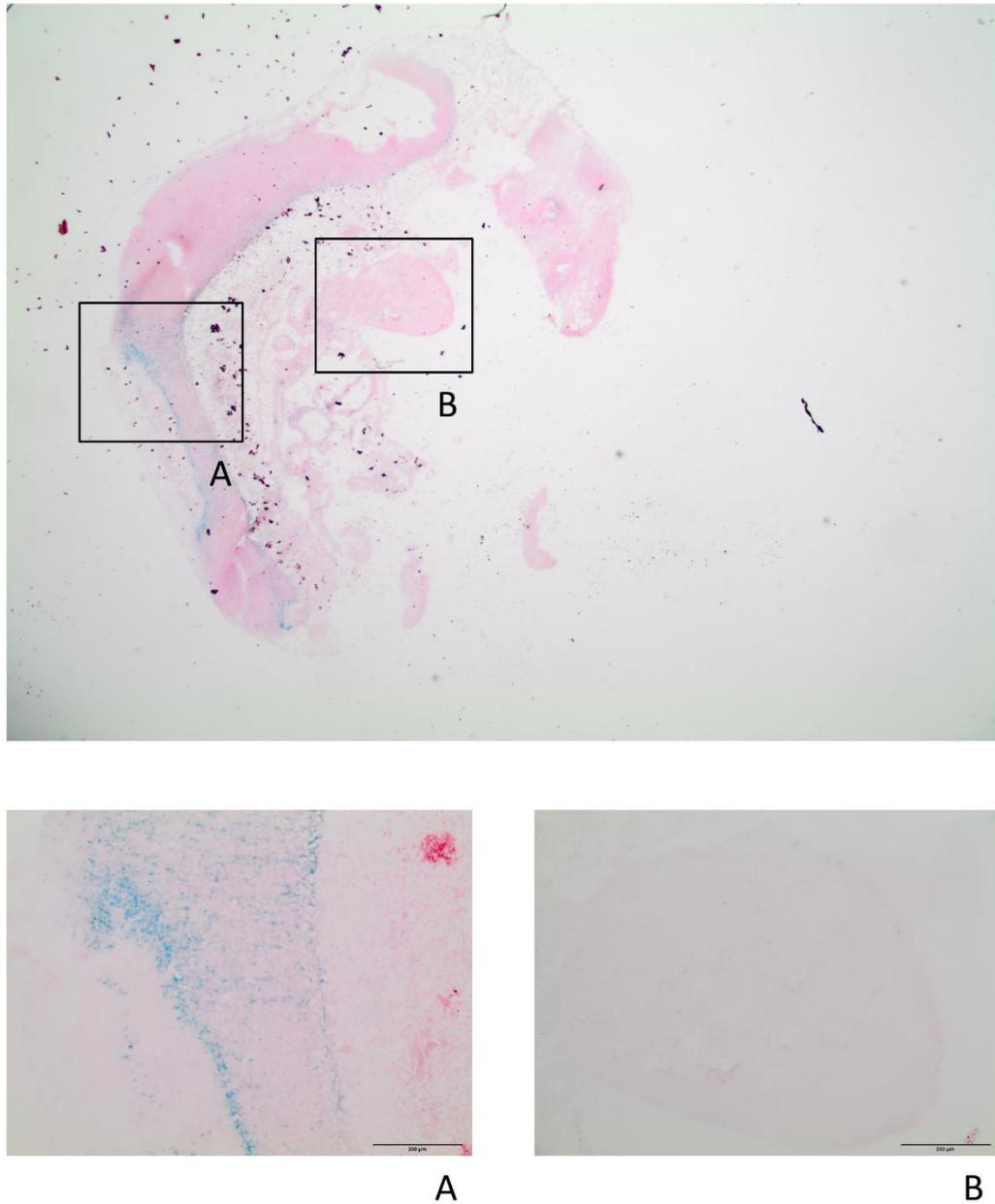


Abbildung 25: LacZ-Färbung eines homozygoten Embryos der Linie *Gse1^{tm1a}* zum Zeitpunkt E11.5 mit vergrößerter Darstellung zweier ausgewählter Bereiche, wobei Ausschnitt A aus dem Bereich des Neuralrohrs stammt und Ausschnitt B das Herz zeigt. Das obere Bild wurde mithilfe eines 1,25x Objektiv und die Bilder A und B mithilfe eines 10x Objektiv aufgenommen. Die Balken in den jeweils rechten unteren Ecken der Bilder A und B stellen eine Breite von 200 µm dar.

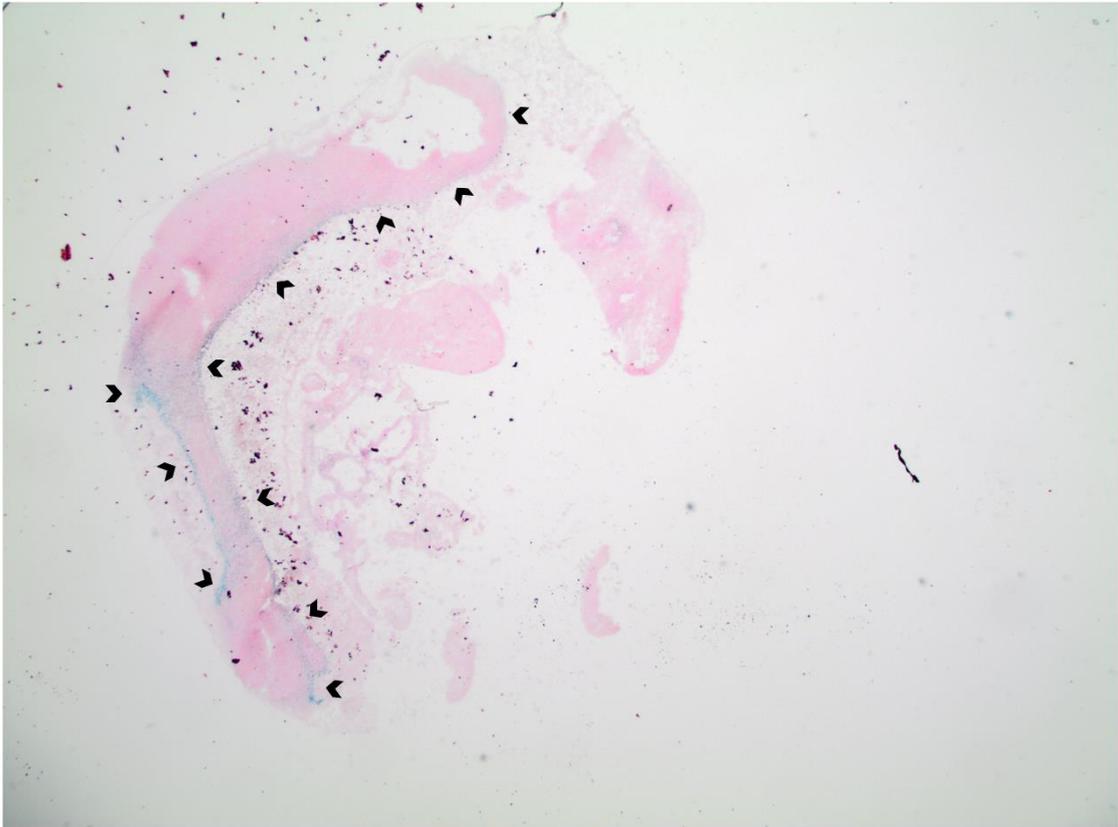


Abbildung 26: LacZ-Färbung eines homozygot mutierten Embryos der Linie *GSE1^{tm1a}* zum Zeitpunkt E11.5. Türkisfarbene, demnach LacZ-positive Bereiche, sind mit schwarzen Pfeilspitzen markiert. Die Aufnahme wurde mithilfe eines 1,25x Objektivs angefertigt.

Aus Abbildung 25 und Abbildung 26 geht hervor, dass sich LacZ-positive Areale im dorsalen Anteil der Embryonen zum Zeitpunkt E11.5, die am ehesten im Bereich des Neuralrohr und des umgebenden Neuroepithels liegen, finden ließen. Im Herzen dagegen konnten derartig angefärbte Bereiche nicht gezeigt werden.

4 Diskussion

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Studie stellt eine Fortführung der Erforschung der Funktion des murinen Gens *Gse1* durch Nutzung der Knockout-first-Strategie dar, die von Dr. med. Fouzi Alnour begonnen worden ist. Eine heterozygote de novo Mutation dessen humanen Orthologs *GSE1* bzw. *KLAA0182* war zuvor im Genom eines Jungen mit Hypoplastischen Linksherzsyndrom festgestellt worden. Da dessen Funktion bisher größtenteils unbekannt war, sollte diese sowohl im Allgemeinen als auch im Speziellen für die Entstehung von angeborenen Herzfehlern untersucht werden. Eine der wahrscheinlich wichtigsten Erkenntnisse der Studie von Dr. Alnour war die Letalität jener Embryonen, die homozygot für das Knockout-first-Allel *Gse1^{tm1a}* waren (Alnour 2016). Eines der primären Ziele der vorliegenden Arbeit war demnach die nähere Untersuchung dieses letalen Phänotyps mit der besonderen Fragestellung, ob sich Unterschiede bezüglich des Blutbildes und der Hämoglobinkonzentration finden lassen. In einer vorangegangenen Studie konnte festgestellt werden, dass zumindest zum Zeitpunkt E13.5 kardiale Unterschiede zwischen homozygoten *Gse1^{tm1a}* Embryonen und Wildtypen erkennbar sind (Baier (in Vorbereitung²)). Eine Frage, die im Vorfeld geklärt werden musste, war, ob die beobachtete embryonale Sterblichkeit in der Linie *Gse1^{tm1a}* tatsächlich durch die Unterbrechung der Genfunktion auf Expressionsebene hervorgerufen wurde oder ob diese durch Off-Target-Effekte der eingefügten Trapping Kassetten und somit durch Störung anderer Gene bedingt war. Dieses Problem bei der Nutzung der Knockout-first-Strategie wird von mehreren Autoren beschrieben. Off-Target-Effekte können sich dabei in unterschiedlicher Weise präsentieren:

Maguire und seine Kollegen (2014), die die genetischen Grundlagen der 2-Oxadipinazidämie erforschten, konnten zeigen, dass der beobachtete, aber relativ unerwartete Phänotyp ihrer homozygoten *Slc25a21^{tm1a(KOMP)Wtsi}* Mäuse nicht durch die unterbrochene Genfunktion des mutierten Gens zustande kam, sondern durch Off-Target-Effekte der insertierten Trapping Kassetten. Homozygote Mäuse mit den daraufhin generierten Allelen *Slc25a21^{tm1b(KOMP)Wtsi}* und *Slc25a21^{tm1d(KOMP)Wtsi}* konnten hingegen nicht von Wildtypmäusen unterschieden werden. Im Umfeld der Trapping Kassetten konnte allerdings ein Gen identifiziert werden, dessen Genexpression reduziert war und das den beobachteten Phänotyp zu Großteilen erklären konnte. Eine weitere mögliche Konsequenz von Off-Target-Effekten durch Trapping Kassetten stellt eine vermeintliche Letalität dar. Pan und seine Kollegen (2016) zeigten, dass die postnatale Sterblichkeit von *Ampd1^{tm1a/tm1a}* Mäusen ebenfalls durch Off-Target-Effekte bedingt war. Homozygote Mäuse zeigten zwar nach Geburt den erwarteten Phänotyp, ihr

² Mit freundlicher Genehmigung von Eva Baier

Versterben innerhalb der ersten zwei postnatalen Tage widersprach allerdings bisherigen Forschungsergebnissen. Mäuse mit dem Genotyp *Ampd1^{tm1c/tm1c}* und *Ampd1^{tm1d/tm1d}*, aus deren Allel also die Trapping Kasette und im Weiteren das kritische Exon entfernt worden war, überlebten wiederum bis in das Erwachsenenalter. Auch in dieser Studie konnten Einflüsse auf benachbarte Gene festgestellt werden, die den zusätzlichen Phänotyp bzw. die unerwartete Letalität begründen konnten. Demnach kann es aufgrund von Off-Target-Effekten durch unzureichendes kritisches Hinterfragen der Ergebnisse zu der Annahme eines falschen oder auch letalen Phänotyps kommen. Beide Autoren empfehlen daher die Generierung eines konditionalen Allels (tm1c) und eines globalen Knockouts auf DNA-Ebene (tm1d), um diese Fehler auszuschließen.

In Bezug auf das von Alnour (2016) studierte Allel *Gse1^{tm1a}* ergeben sich hieraus mehrere mögliche Szenarien: Sowohl die Sterblichkeit, der kardiale Phänotyp als auch die Kombination aus beiden könnten lediglich durch Off-Target-Effekte der Trapping Kasette zustande kommen. Die Sterblichkeit für sich alleine könnte entweder eine Folge des tatsächlichen Phänotyps eines Herzfehlers, unabhängig davon oder auch als Off-Target-Effekt auftreten. Um die aufgeführten Möglichkeiten auszuschließen und differenzieren zu können, welche Auswirkungen ein Knockout von *Gse1* tatsächlich hat, war es nötig - ausgehend von dem Allel *Gse1^{tm1a}* mittels Verpaarung mit FLP-Rekombinase positiven und im Weiteren mit Cre-Rekombinase positiven Mäusen - das globale Knockout Allel *Gse1^{tm1d}* zu generieren (siehe Abbildung 27), welches für die Erforschung des Phänotyps in dieser Arbeit ausschließlich verwendet wurde.

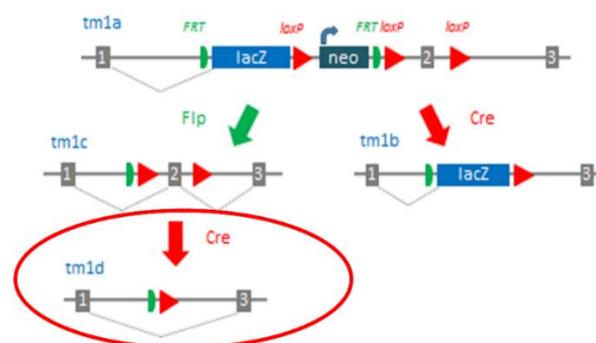


Abbildung 27: Schema der möglichen Allele ausgehend von dem Allel tm1a. Markiert ist das in dieser Arbeit verwendete Allel tm1d (Adaptiert nach International Mouse Phenotyping Consortium (2020)). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des International Mouse Phenotyping Consortium.

Im Fall von *Gse1* wurde die Trapping Kasette so platziert, dass bei Vorhandensein einer Cre-Rekombinase das Exon 3 entfernt wird und ein womöglich noch entstehendes Protein funktionslos wird.

Hinsichtlich eines möglichen kardialen Phänotyps konnte ein solcher bei homozygoten *Gse1^{tm1d}* Embryonen in schwächerer Form ebenfalls festgestellt werden. Allerdings zeigten einige homozygote *Gse1^{tm1d}* Embryonen auch einen normalen kardialen Phänotyp, obwohl sich unter den Nachkommen von Verpaarungen heterozygoter Tiere auch keine homozygoten Mäuse finden ließen (unveröffentlichte Daten der AG Zeisberg). Als Todesursache musste somit eine andere als der kardiale Phänotyp angenommen werden und es war das Ziel vorliegender Arbeit, die tatsächliche Todesursache in den homozygoten *Gse1^{tm1d}* Embryonen zu identifizieren.

Auch die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Genotypisierungsergebnisse zu verschiedenen embryonalen Entwicklungszeitpunkten legen eine embryonale Sterblichkeit nahe. Betrachtet wurden hierfür Embryonen zu zwei Zeitpunkten: E15.5 und E18.5. Der Zeitpunkt E15.5 befindet sich in der Fetalperiode nach Abschluss der Organogenese mit Ausnahme der Lungenentwicklung. In diesem Stadium sollte die Leber die Hämatopoese bereits so gut wie vollständig übernommen haben. Der Zeitpunkt E18.5 befindet sich kurz vor der Geburt (Theiler 1989).

Für den Zeitpunkt E18.5 standen insgesamt 29 Embryonen aus vier Würfen und für den Zeitpunkt E15.5 54 Embryonen aus neun Würfen zur Verfügung. Die Verteilung der Genotypen unter allen entnommenen Embryonen zu beiden betrachteten Zeitpunkten entsprach annähernd dem Mendel'schen Gesetz für die Verpaarung heterozygoter Elternteile. Unter den später als homozygot bestätigten Embryonen befanden sich allerdings zu beiden Zeitpunkten makroskopisch auffällige bzw. offensichtlich bereits tote Embryonen. Die Assoziation zwischen einem externen Phänotyp und dem homozygoten Genotyp war in beiden Gruppen statistisch signifikant. Der Anteil der makroskopisch auffälligen an allen homozygoten Embryonen unterschied sich allerdings zwischen den beiden Entnahmezeitpunkten. Während zu E15.5 etwas mehr als 80 % externe Auffälligkeiten zeigten, traf dieses zu E18.5 nur auf die Hälfte der homozygoten Embryonen zu. Dies erscheint auf den ersten Blick widersprüchlich, ist aber wahrscheinlich durch die unterschiedliche Größe der Gruppen erklärbar. Diese Ergebnisse legen insgesamt nahe, dass die Letalität um den Zeitpunkt E15.5 herum beginnt. Eine wichtige Aussage, die aufgrund dieser Ergebnisse getroffen werden kann, ist demnach, dass sich die beobachtete Letalität der homozygoten *Gse1^{tm1a}* Embryonen auch bei homozygoten *Gse1^{tm1d}* Embryonen nachweisen lässt, in deren Allel die Trapping

Kassette nicht mehr vorhanden ist und zusätzlich das kritische Exon 3 entfernt wurde. Hieraus lässt sich schließen, dass der globale Knockout von *Gse1* auf DNA-Ebene für homozygot mutierte Embryonen letal ist. Dies stellt auch ein Indiz dafür dar, dass die Letalität in der Linie *Gse1^{tm1a}* ebenfalls durch die unterbrochene Genfunktion zustande kommen und nicht nur ein Resultat von möglichen Off-Target-Effekten der Trapping Kassette sein könnte.

An dieser Stelle sollte allerdings noch erwähnt werden, dass eine wesentliche Limitation der bisherigen Studien an den verschiedenen *Gse1* Knockout Mäusen weiterhin der fehlende Nachweis des Knockouts auf Proteinebene ist. Alle bisher im Rahmen von Western Blots, immunhistochemischen und Immunfluoreszenzfärbungen verwendeten Antikörper gegen *Gse1*, die sowohl für die Studie von Alnour (2016) als auch im Vorfeld der vorliegenden Arbeit getestet worden waren, ergaben keine verlässlichen Ergebnisse.

Ein konkretes Ziel dieser Arbeit war es, die Hypothese zu überprüfen, ob eine Störung der Blutbildung und eine daraus folgende Anämie als Ursache der Letalität in Frage kommen könnte.

Die Beantwortung dieser Frage brachte Schwierigkeiten in der Versuchsplanung mit sich, die vor allem aus dem generell sehr kleinen Blutvolumen, der schnellen Koagelbildung sowie dem Wunsch nach Probenduplikaten resultierten. Daher wurden nur Blutproben von Embryonen zum Entnahmezeitpunkt E18.5 verwendet. Insgesamt konnten zwölf auswertbare Blutproben gewonnen werden, davon vier von Wildtyp-Embryonen, fünf von heterozygoten und drei von homozygoten Embryonen. In der kolorimetrischen Bestimmung der Hämoglobinkonzentrationen zeigten sich signifikante Unterschiede sowohl zwischen den Blutproben von homozygoten und Wildtyp-Embryonen als auch zwischen homozygoten und heterozygoten Embryonen. Die Mittelwerte der heterozygoten und der Wildtyp-Embryonen waren im Vergleich zu homozygoten Embryonen hierbei beinahe doppelt so hoch, lagen allerdings selbst noch leicht unter den Normwerten von etwa 10,2-16,6 g/dL bei adulten Hausmäusen (Wolfensohn und Lloyd 2003). Die Hypothese, dass homozygot mutierte Embryonen von einer Anämie betroffen sind, kann folglich als belegt angesehen werden.

Zwischen den Hämoglobinkonzentrationen von heterozygoten und Wildtyp-Embryonen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Dies war im Einklang mit den Ergebnissen, dass der heterozygote Genotyp in den vorangegangenen Studien keine erhöhte Sterblichkeit zeigte hatte und untermauert, dass die Anämie die Ursache der beobachteten Sterblichkeit bei homozygoten Embryonen ist.

Aufgrund der oben genannten Limitationen war es nicht möglich, die Blutproben mittels herkömmlicher labormedizinischer Gerätschaften zu analysieren, um eine Differenzierung der Art der Anämie aufgrund von Erythrozytenindizes zu ermöglichen. Alternativ wurde die Morphologie der Blutzellen von homozygoten und Wildtyp-Embryonen zu den Zeitpunkten E15.5 und E18.5 in histologischen Schnitten verglichen. Hierzu wurden transversale Schnitte mit HE gefärbt. Zur besseren Analyse wären nach Pappenheim gefärbte Blutaussstriche wünschenswert gewesen. Allerdings war die Menge des zur Verfügung stehenden Blutes so beschränkt, dass es lediglich für die kolorimetrische Bestimmung der Hämoglobinkonzentrationen ausreichte. Ein Vorteil dieser alternativen Betrachtung der Morphologie in HE-gefärbten histologischen Schnitten stellte hingegen die Möglichkeit des direkten intraindividuellen Vergleiches von Hämoglobinkonzentration und Blutzellmorphologie dar.

In den Schnitten homozygoter Embryonen stachen zu beiden Entnahmezeitpunkte zahlreiche kernhaltige Blutzellen ins Auge. Zum Zeitpunkt E18.5 entsprachen diese kernhaltigen Zellen bezüglich ihrer Größe der von normalen Erythrozyten, wobei der Zellkern das Zytoplasma beinahe vollständig ausfüllte und bei den meisten Zellen relativ kompakt erschien. Aufgrund dieser Charakteristika erinnerten sie am ehesten an kleine Lymphozyten. Vereinzelt fanden sich allerdings auch vergleichsweise größere kernhaltige Blutzellen mit aufgelockert wirkenden Zellkernen, die Vorläuferzellen oder gar blastären Zellen ähnelten. Im Blut von Wildtyp-Embryonen waren kernhaltige Blutzellen höchstens vereinzelt auszumachen. Auch zum Zeitpunkt E15.5 fiel eine starke Vermehrung zellkernhaltiger Blutzellen im Blut homozygot mutierter Embryonen im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen auf. Allerdings fand sich hier bei den Wildtyp-Embryonen auch eine nicht zu vernachlässigende Zahl kernhaltiger Blutzellen. Zusätzlich unterschieden sich die kernhaltigen Zellen im Blut von Embryonen, die zum Zeitpunkt E15.5 entnommen worden waren, in der Weise von den drei Tage älteren Embryonen, dass der Zellkern das Zytoplasma nicht nahezu vollständig auszufüllen schien.

Zur genaueren Analyse dieser Auffälligkeiten wurde der Anteil der kernhaltigen Blutzellen an der Gesamtzahl der Blutzellen zu beiden Zeitpunkten quantifiziert. Als festes Volumen zur Zählung der intravasalen Blutzellen wurde die transversal angeschnittene thorakale Aorta gewählt. Hierbei sollte bedacht werden, dass von diesen Embryonen nach ihrer Entnahme bereits Blut entnommen wurde. Da das Vorgehen bei allen Embryonen aber gleich war und nicht davon ausgegangen wurde, dass sich das Verhältnis der Blutzellen zueinander durch die Blutentnahme verändern könnte, sollte dies keine Auswirkung auf die Beurteilbarkeit der Ergebnisse haben. Zu beiden Zeitpunkten bestätigte sich die Vermutung eines statistisch

signifikanten Unterschiedes hinsichtlich des Anteils zellkernhaltiger Blutzellen an der Gesamtzahl von Blutzellen zwischen homozygoten und Wildtyp-Embryonen.

Wie bereits beschrieben befanden sich im Blut der E15.5 Wildtyp-Embryonen im Gegenteil zu E18.5 Wildtyp-Embryonen ebenfalls vermehrte kernhaltige Blutzellen. Diese stellen allerdings einen Rest kernhaltiger Erythrozyten dar, der zu diesem Zeitpunkt noch physiologisch ist (Brotherton et al. 1979; Kaufman 2010).

Bei einem Vergleich der zuvor gemessenen Hämoglobinkonzentrationen im Blut von E18.5 Embryonen mit dem jeweiligen Anteil kernhaltiger Blutzellen in den histologischen Schnitten fiel ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen diesen beiden Messwerten auf. Unter den homozygoten Embryonen war ein höherer Anteil kernhaltiger Blutzellen mit einer niedrigeren Hämoglobinkonzentration vergesellschaftet.

Ausgehend von diesen bisher beschriebenen Beobachtungen liegen zwei mögliche Ursachen für die Vermehrung kernhaltiger Blutzellen im Blut der homozygot mutierten Embryonen nahe: Zum einen könnte es sich um Erythrozyten handeln, die ihren Zellkern bisher nicht auswerfen konnten, zum anderen um eine Störung der definitiven Erythropoese mit einer kompensatorischen Steigerung oder Verlängerung der primitiven Erythropoese. Denkbar wäre auch eine Vermehrung von Lymphozyten oder deren Vorstufen im peripheren Blut, womöglich im Sinne eines myeloproliferativen Geschehens.

Um zwischen diesen beiden möglicherweise betroffenen Zellreihen differenzieren zu können, wurde auf den immunhistochemischen Nachweis des Oberflächenmoleküls TER-119 zurückgegriffen. Dieses Molekül wird auf der Zelloberfläche roter Blutzellen ab der Entwicklungsstufe eines frühen Proerythroblasten bis hin zum reifen Erythrozyten exprimiert und dient daher als guter Marker für diesen Zweck (Kina et al. 2000). Diese Färbung erbrachte generell sehr zuverlässige Ergebnisse mit stark positiv angefärbten reifen kernlosen Erythrozyten. Aufgrund der Tatsache, dass der Zellkern der kernhaltigen Blutzellen, wie bereits beschrieben, bei vielen Zellen das gesamte Zytoplasma ausfüllte, fiel es teilweise schwer, eine mögliche positive Anfärbung der Zellmembran abzugrenzen. In histologischen Schnitten von homozygoten E18.5 Embryonen ließen sich bei starker Vergrößerung letztendlich aber schwache positive Anfärbungen von zellkernhaltigen Blutzellen ausmachen, welche somit der erythroiden Zellreihe zugeordnet werden konnten. Eine verminderte Expression von TER-119 und die damit verbundene schwächere Anfärbung von kernhaltigen erythroiden Zellen im Vergleich zu reifen Erythrozyten wurde bereits von Fraser und seinen Kollegen (2007) beschrieben.

Bezüglich der daraus folgenden Hypothese, dass im Blut homozygoter Embryonen vermehrt erythroide Vorläuferzellen vorhanden sind, könnte angenommen werden, dass die gemessenen verminderten Hämoglobinkonzentrationen fälschlicherweise durch das unterschiedliche Vorkommen von Globinmolekülen innerhalb der erythroiden Entwicklungsstufen zustande kommen könnte (Kingsley et al. 2006; McGrath et al. 2011). Der Hersteller des Kits für die kolorimetrische Bestimmung der Hämoglobinkonzentration (invitrogen, Bestellnummer: EIAHGBC) gibt in dem entsprechenden Produktinformationsblatt allerdings an, dass dieses alle Formen von Hämoglobin messen könne (Thermo Fisher Scientific 2017).

Ausgehend von den bisher beschriebenen Ergebnissen lässt sich folglich zusammenfassend sagen, dass sich im Blut homozygot mutierter Embryonen zum Zeitpunkt E18.5 eine signifikant verringerte Hämoglobinkonzentration im Sinne einer Anämie messen ließ. Darüber hinaus fanden sich im Blut homozygot mutierter Embryonen zu beiden untersuchten Zeitpunkten E15.5 und E18.5 eine statistisch signifikante Vermehrung kernhaltiger Blutzellen, die am ehesten der erythroiden Zellreihe entstammten. Aufgrund des vermuteten Todeszeitpunktes der homozygot mutierten Embryonen beginnend um Tag 15.5 kann am ehesten von einer Störung der definitiven Hämatopoese ausgegangen werden. Um sich dessen sicher zu sein, könnten beispielsweise die Expressionsmuster der β -Globine im Blut der Embryonen untersucht werden. Diese sind charakteristisch für die Herkunft der Erythroblasten bzw. Erythrozyten und erlauben somit eine Zuordnung zur primitiven oder zur definitiven Hämatopoese (McGrath et al. 2011).

In der Literatur ist die embryonale bzw. fetale Anämie ein vielfach beschriebener Phänotyp: Häufige Schlüsselfaktoren stellen hierbei Elemente des Zytoskeletts, die Zell-Zell-Interaktion mit Makrophagen in den hepatischen Blutinseln sowie der Prozess der E nukleation dar. Mäuseembryonen mit einem homozygoten Knockout von Tropomodulin3, einem Protein, das an Tropomyosin binden kann und somit einen Teil des Zytoskeletts darstellt, werden etwa ab Entwicklungstag 13.5 anämisch und versterben zwischen Tag 14.5 und 18.5. Hierfür wird vor allem ein Defekt der definitiven Hämatopoese durch gestörte Bildung von hepatischen Blutinseln und eine beeinträchtigte E nukleation verantwortlich gemacht (Sui et al. 2014). Ähnlich wie bei den in dieser Arbeit betrachteten Embryonen konnte dieser Phänotyp nur bei homozygot mutierten Tieren beobachtet werden. Darüber hinaus fanden sich bei diesen ebenfalls zahlreiche kernhaltige Erythrozyten. Während in der Arbeit von Sui und Kollegen (2014) ein Bestandteil des Zytoskeletts der Erythrozyten selbst zu einer Anämie führte, konnte eine andere Arbeitsgruppe zeigen, dass auch eine Beeinflussung des Zytoskeletts in anderen Blutzellen diese auslösen kann. Embryonen mit

einer Palladin-Defizienz versterben zwischen Tag 12.5 und 15.5, wobei die noch vitalen homozygot mutierten Embryonen in diesem Zeitraum durch ihre Blässe auffielen. Auch hier wurde eine Störung der definitiven Hämatopoese vermutet, die in eine letale Anämie resultiert. Interessanterweise waren aus homozygot mutierten Embryonen entnommene hämatopoetische Stammzellen in der Lage, in bestrahlten Empfänger-mäusen die Hämatopoese zu rekonstituieren. Histologisch konnte bei Palladin-defizienten Embryonen schließlich eine Beeinträchtigung der Blutinselbildung in der Leber nachgewiesen werden. In *in vitro* Experimenten konnte anschließend gezeigt werden, dass hierfür vor allem die Mutation von Palladin in den Makrophagen der Leber für die fehlende Ausbildung der Blutinseln verantwortlich sein musste, da nur Wildtyp-Makrophagen sowohl mit Wildtyp-Erythroblasten als auch mit mutierten Erythroblasten Blutinseln bilden konnten (Liu et al. 2007). Einen späteren Todeszeitpunkt weisen Embryonen mit einer homozygoten DNase II Defizienz auf. Diese sind abgesehen von einer ab Tag 14.5 beginnenden Anämie auch noch an Tag 17.5 äußerlich unauffällig, können unter den Nachkommen von heterozygoten Verpaarungen aber nicht aufgefunden werden. Ebenso wie in den oben beschriebenen Studien konnten im Blut dieser Embryonen zahlreiche kernhaltige Erythroblasten nachgewiesen werden, während im Blut von Wildtyp-Embryonen die einzigen kernhaltigen Zellen lymphozytären Ursprungs waren. Ähnlich wie in der Arbeit von Liu und Kollegen (2007) konnte auch hier gezeigt werden, dass der entscheidende Faktor die Defizienz der Makrophagen der fetalen Leber war (Kawane et al. 2001). Die Interaktion von Erythroblasten und Makrophagen in den hepatischen Blutinseln scheint demzufolge eine zentrale Rolle für die E nukleation und somit für die Reifung der roten Blutzellen einzunehmen.

Abgesehen von Störungen auf Zellebene oder im Zell-Zell-Kontakt kann auch eine Beeinträchtigung der blutbildenden Organe zu einer verminderten Hämatopoese führen. Durch einen Knockout von *GATA4* in Lebersinusoid-Endothelzellen kommt es aufgrund einer Störung der Mikrovaskularisierung zur Leberhypoplasie und -fibrose, die wiederum eine verminderte Besiedlung durch hämatopoetische Zellen und folglich eine schwere Anämie nach sich zieht (Géraud et al. 2017). Eine ausgeprägte Leberhypoplasie konnte jedoch weder makroskopisch während der Entnahme der Embryonen noch histologisch in Übersichtsschnitten unserer *Gse1^{tm1d}* Embryonen beobachtet werden. Für genauere Aussagen diesbezüglich sollte aber in Zukunft noch ein quantitativer Vergleich des Lebervolumens zwischen homozygot mutierten und Wildtyp-Embryonen vorgenommen werden. Zusätzlich wurden auch histologische Schnitte, die Leberparenchym enthielten, immunhistochemisch gegen

TER-119 gefärbt, um Differenzen bezüglich der Besiedelung mit erythroiden Zellen leichter erkennbar zu machen. Dabei konnten ebenfalls keine Unterschiede beobachtet werden.

Neben diesen zahlreichen, die eigentliche Hämatopoese betreffenden Faktoren, kann eine Anämie auch durch die Genmanipulation selbst entstehen. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Aktivität von Cre-Rekombinasen toxisch auf die Hämatopoese wirken, eine allgemein gesteigerte Apoptose auslösen und somit zu einem letalen Phänotyp führen können. Es scheint sogar ein weit verbreitetes Phänomen zu sein, dass in zahlreichen Studien keine ausreichenden Kontrollen genutzt werden, um die beschriebene Cre-Toxizität als Ursache des beobachteten Phänotyps auszuschließen (Naiche and Papaioannou 2007). Diese Möglichkeit kann im Falle dieser Arbeit allerdings ausgeschlossen werden, da das Allel *Gse1^{tm1d}* - wie in 2.1.1 beschrieben - zwar durch eine Verpaarung mit Cre-positiven Mäusen generiert wurde, es hiernach aber wieder zu einer Verpaarung mit Wildtyp-Mäusen kam, so dass die genutzten Mäuse selbst nicht über eine aktive Cre-Rekombinase verfügen, die den beobachteten anämischen Phänotyp artifiziell bewirken könnte.

Nach dem Vergleich der Todeszeitpunkte und der Blutzellmorphologien der in dieser Arbeit untersuchten Embryonen liegt am ehesten eine Störung der definitiven Hämatopoese nahe. Die hier beschriebenen Untersuchungen der Hämoglobinkonzentrationen sowie die Betrachtung der Blutzellmorphologie sollten zukünftig auch analog mit Embryonen der Linie *Gse1^{tm1a}* durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob sich bei diesen der gleiche Phänotyp nachweisen lässt. Dies würde dann die Möglichkeit, dass der in dieser Mauslinie beobachtete embryonal letale Phänotyp durch Off-Target-Effekte der Trapping Kasette zustande gekommen ist, weniger wahrscheinlich machen.

Ein immer wieder auftretendes Motiv der beschriebenen Studien stellt die Beeinträchtigung von hepatischen Blutinseln und der Interaktion mit Makrophagen in diesen dar, welche wiederum eine Störung der Enukleation und damit der benötigten finalen Differenzierung der Erythrozyten nach sich zieht. Oftmals ging die Beeinträchtigung dabei nicht von Proteinen innerhalb der erythroiden Zellen selbst aus. Hieraus geht hervor, dass vor allem diesem Zusammenhang in zukünftigen weiteren Untersuchungen Aufmerksamkeit geschenkt werden sollte. Interessant wäre außerdem die Durchführung einer Hypoxie-Färbung zur Darstellung jener Bereiche, die durch die Anämie in kritischer Weise in ihrer Entwicklung beeinträchtigt werden. Dadurch könnte weiter differenziert werden, ob der kardiale Phänotyp, der bei homozygot mutierten Embryonen der Linie *Gse1^{tm1a}* beobachtet wurde, sekundär durch die Anämie bedingt ist.

Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass bei Embryonen zum Zeitpunkt E15.5 vermehrt kardiale Fehlbildungen beobachtet wurden, wenn die Muttertiere innerhalb einer besonders vulnerablen Phase zwischen E10.5 und E13.5 verringerten Sauerstoffkonzentrationen in der Umgebungsluft ausgesetzt wurden (Kenchegowda et al. 2014). Diese morphologischen Auffälligkeiten bestanden unter anderem aus einem verdünnten Myokard und ähneln somit dem kardialen Phänotyp einiger homozygoter *Gse1^{tm1d}* Embryonen. Ream und seine Kollegen (2008) zeigten ebenfalls, dass Embryonen, deren Mutter um den Zeitpunkt E13.5 hypoxischen Bedingungen ausgesetzt war, unter anderem ein dünneres Myokard aufwies, wobei sie zusätzlich beobachteten, dass sich dieser Phänotyp mit zunehmender Hypoxie-Zeit verstärkte. Im Allgemeinen lässt sich sagen, dass es durch hypoxämische Zustände des Embryos neben vor allem Fehlbildungen der Extremitäten auch zu Herzfehlbildungen kommen kann (Webster and Abela 2007).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Etablierung der LacZ-Färbung für die hier verwendete Mauslinie. Durch das Vorhandensein des β -Galaktosidase (LacZ) Gens innerhalb der Trapping Kasette kann die Aktivität des mutierten Gens - also in diesem Falle des *Gse1*-Promotors - nachverfolgt werden (Alnour 2016; Testa et al. 2004). Hierdurch sollte die Möglichkeit geschaffen werden, die Expression von *Gse1* während der embryonalen Entwicklung sowohl zeitlich als auch örtlich nachvollziehen zu können.

Hierfür wurden Embryonen der Linie *Gse1^{tm1a}* verwendet, die zum Zeitpunkt E11.5 entnommen worden waren. Alternativ hätten auch Embryonen der Linie *Gse1^{tm1b}* genutzt werden können, da auch in dieser Allelvariante das LacZ-Element noch vorhanden ist (siehe Abbildung 27). Der Tag 11.5 befindet sich dabei relativ mittig im Zeitraum der Organogenese, die sich etwa von Tag 9 bis Tag 14 erstreckt (Kaufman 2010; Theiler 1989). Die angefertigten Gefrierschnitte wurden zum Teil gegen β -Galaktosidase gefärbt, zum Teil aus Übersichtszwecken mittels HE. Die verwendete LacZ-Färbung erwies sich als verlässliche Methode und erbrachte konsistente Ergebnisse: Während sich bei Wildtyp-Embryonen keine positiven Anfärbungen nachweisen ließen, färbten sich bei mutierten Embryonen jeweils korrespondierende anatomische Lokalisationen an. Vermeintlich unspezifische Anfärbungen fanden sich nicht. Durch Vergleiche mit histologischen Schnitten aus Atlanten zur Embryonalentwicklung der Maus konnten die angefärbten Areale am ehesten als das das Neuralrohr umgebende Neuroepithel identifiziert werden (Kaufman 2010).

Ursprünglich bestand die Vermutung, *KIAA0182* bzw. *Gse1* könnten eine Rolle in der Herzentwicklung spielen (Alnour 2016). Zum Zeitpunkt E11.5 konnte jedoch - zumindest mittels LacZ-Färbung an einzelnen Sagittalschnitten - keine *Gse1*-Expression im Herzen

selbst nachgewiesen werden. Allerdings stellt die Färbung zu nur einem Entnahmezeitpunkt eine Momentaufnahme dar und schließt natürlich nicht aus, dass *Gse1* in früheren oder späteren Phasen der Herzentwicklung eine wichtige Rolle direkt vor Ort einnehmen könnte. Außerdem besteht auch die Möglichkeit, dass *Gse1* durch sekundäre Effekte Einfluss auf die Herzentwicklung nehmen könnte. Zur Beantwortung dieser Fragen ist es dringend notwendig, Embryonen zu verschiedenen weiteren Zeitpunkten zu entnehmen, zu färben und hinsichtlich dessen auszuwerten.

Die Frage, die sich nach diesem doch eher unerwarteten Ergebnis der LacZ-Färbung stellte, war, ob sich dieses mit dem beobachteten anämischen Phänotyp der homozygot mutierten Mäuse in einen Zusammenhang bringen ließe. Tatsächlich liegt zum Entnahmezeitpunkt E11.5 die AGM-Region, die einen der Ursprungsorte definitiver hämatopoetischer Stammzellen darstellt, in unmittelbarer Umgebung der Neuralleistenzellen. Schon Pietila und Vainio (2005) stellten die Hypothese auf, dass die hämatopoetischen Stammzellen der AGM-Region Signale von migrierenden Neuralleistenzellen erhalten könnten. Über Neuralleistenzellen weiß man inzwischen außerdem, dass sie den Ursprung einiger mesenchymaler Stammzellen darstellen, die positiv für das Intermediärfilament Nestin sind. Diese beteiligen sich nachweislich nicht an der Ausbildung von fetalem Knorpel- und Knochengewebe, sondern behalten ihren Stammzellcharakter und unterstützen als solche die Ausbildung einer Blutstammzellnische im Knochenmark von Röhrenknochen sowie das Anlocken zirkulierender hämatopoetischer Stammzellen aus dem Blut in das sich entwickelnde Knochenmark (Isern et al. 2014). In einer Übersichtsarbeit von Coste und Kollegen (2015) wurde auch noch einmal hervorgehoben, dass sich Ähnlichkeiten zwischen Regulierungsvorgängen im hämatopoetischen und neuronalen System beschreiben lassen, und die Frage aufkommen lassen, ob von Neuralleistenzellen abstammende mesenchymale Stammzellen das Verbindungsglied zwischen diesen beiden Systemen darstellen könnten.

Die von den Neuralleistenzellen ausgehenden Zelllinien könnten im Allgemeinen kaum vielgestaltiger sein: Unter anderem entstehen aus ihnen Pigmentzellen, Zellen des peripheren Nervensystems, Zellen des Nebennierenmarks sowie mesenchymale Zelltypen (Selleck et al. 1993). Eine direkte Verbindung von Neuralleistenzellen und der Hämatopoese vor Besiedelung des Knochenmarks ist – abgesehen von der oben beschriebenen Hypothese von Pietila und Vainio – allerdings bisher in der Literatur nicht beschrieben.

Aus der kombinierten Betrachtung der Ergebnissen der Hämoglobinkonzentrationsbestimmungen, des Vergleichs der Blutzellmorphologien und der in der Literatur beschriebenen Erkenntnissen über die Bedeutung der Mikroumgebung in der fetalen Leber für den

physiologischen Ablauf der Blutzellreifung folgt, dass in zukünftigen Experimenten vor allem ein Schwerpunkt auf die Untersuchung von hepatischen Blutinseln, den dort involvierten Zelltypen sowie äußeren Einflussfaktoren auf diese gelegt werden sollte. Um eine mögliche Verbindung zwischen Neuralleistenzellen und der Leberhämatopoese aufzudecken, sollten in jedem Fall LacZ-Färbungen von Embryonen zu späteren Entnahmezeitpunkten als E11.5 erfolgen, da dieser Zeitpunkt noch ganz am Anfang der Besiedelung der Leber durch hämatopoetische Stammzellen liegt und Hinweise auf eine solche Verbindung deshalb bisher noch nicht erkennbar sein konnten.

5 Zusammenfassung

Die Grundlage dieser Arbeit stellen die Studien der Arbeitsgruppe Zeisberg an Mäusen, die über das Knockout-first-Allel $Gse1^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}$ verfügen, dar. Es wurde beobachtet, dass aus der Homozygotie für $Gse1^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}$ embryonale Letalität resultiert und dass eine verminderte kardiale Kompaktion vorliegt. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass auch alle Embryonen, die homozygot für das Allel $Gse1^{tm1d}$ sind, embryonal versterben. In diesen Embryonen lag allerdings der kardiale Phänotyp schwächer ausgeprägt und vor allem inkonsistent vor, so dass es einzelne $Gse1^{tm1d/tm1d}$ -Embryonen gab, die keinen kardialen Phänotyp aufwiesen, bei allerdings im Verlauf kompletter Letalität. Diese Daten legen nahe, dass die Letalität nicht oder jedenfalls nicht vollständig durch den kardialen Phänotyp bedingt ist.

Ziel der vorliegenden Studie war es folglich, den genauen Phänotyp zu beschreiben, der diese Sterblichkeit nach sich zieht. Eine erste Hypothese hierfür war eine Störung der Hämatopoese mit einer sich daraus ergebenden Anämie. Außerdem sollte die LacZ-Färbung als Möglichkeit der zeitlichen und örtlichen Expressionsverfolgung etabliert werden.

Die Embryonen der Linie $Gse1^{tm1d}$, die zu den Zeitpunkten E15.5 und E18.5 entnommen wurden, wurden mittels PCR genotypisiert. Der Hämoglobingehalt des erhaltenen Blutes wurde kolorimetrisch bestimmt, die Morphologie der Blutzellen wurde in HE-gefärbten histologischen Schnitten verglichen. Zusätzlich wurden immunhistologische Färbungen gegen das Oberflächenmolekül TER-119 angefertigt. Die LacZ-Färbung wurde an E11.5 Embryonen der Linie $Gse1^{tm1a}$ etabliert.

Die Genotypisierungsergebnisse deuteten zu beiden Entnahmezeitpunkten auf eine Letalität homozygot mutierter Embryonen hin, wobei makroskopische Auffälligkeiten während der Entnahme signifikant mit einem in der PCR nachgewiesenen homozygoten Genotyp assoziiert waren. Mittels kolorimetrischer Bestimmung konnte eine signifikante Reduktion der Hämoglobinkonzentration im Blut homozygot mutierter Embryonen zum Zeitpunkt E18.5 gezeigt werden. Bei dem Vergleich der Blutzellmorphologien fiel zu beiden Entnahmezeitpunkten ein vermehrtes Vorkommen zellkernhaltiger Blutzellen im Blut jener mutierten Embryonen auf. Diese Unterschiede wurden quantifiziert und waren zu beiden Zeitpunkten statistisch signifikant. Bei immunhistochemischer Färbung konnten zellkernhaltige Blutzellen beobachtet werden, die positiv für das erythrozytenspezifische Oberflächenantigen TER-119 waren. Die LacZ-Färbung erbrachte spezifische und konsistente Ergebnisse. LacZ-positive Areale waren bei allen homozygoten Embryonen ausschließlich im Bereich des Neuroepithels zu detektieren, deren Bedeutung zum jetzigen Zeitpunkt allerdings unklar ist.

Die Hypothese, dass der homozygot mutierte Genotyp zu einem anämischen Phänotyp führt, konnte zumindest für Embryonen der Linie *Gse1^{tm1d}* zum Zeitpunkt E18.5 bestätigt werden. Aufgrund der Ergebnisse der Quantifizierung des Anteils zellkernhaltiger Blutzellen, der immunhistochemischen Anfärbbarkeit dieser gegen TER-119 sowie des Zeitpunktes der Letalität kann am ehesten von einer Störung der definitiven Erythropoese als von einem beispielsweise leukämischen Geschehen als Grund der Anämie ausgegangen werden. Eine häufige in der aktuellen Literatur beschriebene Ursache ist eine Störung der E nukleation durch Mutationen, die Einfluss auf die Ausbildung von Blutinseln und die Interaktion verschiedener Zelltypen in der fetalen Leber haben (Kawane et al. 2001; Liu et al. 2007; Sui et al. 2014). Hierauf sollte in zukünftigen Experimenten ein besonderer Schwerpunkt gelegt werden.

Das zweite Ziel dieser Arbeit, die Etablierung der LacZ-Färbung für Embryonen mit einem Knockout von *Gse1*, konnte ebenfalls erreicht werden. Diese deutete zum Zeitpunkt E11.5 auf eine Expression von *Gse1* im Bereich des Neuroepithels hin. Von den dort ihren Ursprung nehmenden Neuralleistenzellen weiß man inzwischen, dass sie eine Rolle in der Gestaltung der hämatopoetischen Stammzellnische im Knochenmark spielen. Ein genauer Zusammenhang zwischen Neuralleistenzellen und embryonaler bzw. fetaler Hämatopoese konnte bisher allerdings noch nicht gezeigt werden. Hierfür ist es dringend notwendig, LacZ-Färbungen auch an Embryonen früherer und späterer Entnahmezeitpunkte anzufertigen und auf diese Fragestellung hin zu untersuchen.

Abschließend lässt sich sagen, dass der in dieser Studie bestätigte anämische Phänotyp homozygot mutierter *Gse1^{tm1d}*-Embryonen vermutlich die Ursache für den beobachteten – folglich sekundären – kardialen Phänotyp und am ehesten die Todesursache dieser Embryonen darstellt. Bezüglich der nachgewiesenen *KLAA0182*-Mutation bei einem Kind mit HLHS wäre es denkbar, dass auch diesem die hier beschriebene Pathogenese zugrunde liegen könnte.

6 Literaturverzeichnis

Alberman ED, Creasy MR (1977): Frequency of chromosomal abnormalities in miscarriages and perinatal deaths. *J Med Genet* 14, 313–315

Alliot F, Godin I, Pessac B (1999): Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res Dev Brain Res* 117, 145–152

Alnour F: ‘Knockout-first’ mouse model as a biological tool to study the role of KIAA0182 gene in hypoplastic left heart syndrome. Med. Diss. Göttingen 2016

Alvarez-Silva M, Belo-Diabangouaya P, Salaün J, Dieterlen-Lièvre F (2003): Mouse placenta is a major hematopoietic organ. *Development* 130, 5437–5444

Baier E: Characterization of the cardiogenesis in Tm-1a-embryos of the Gse-1-"knockout-first"-mouse line. Med. Diss. Göttingen (in Vorbereitung, mit freundlicher Genehmigung von Eva Baier)

Baron MH, Isern J, Fraser ST (2012): The embryonic origins of erythropoiesis in mammals. *Blood* 119, 4828–4837

Bergsmedh A, Donohoe ME, Hughes R-A, Hadjantonakis A-K (2011): Understanding the molecular circuitry of cell lineage specification in the early mouse embryo. *Genes (Basel)* 2, 420–448

Boisset J-C, van Cappellen W, Andrieu-Soler C, Galjart N, Dzierzak E, Robin C (2010): *In vivo* imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. *Nature* 464, 116–120

Bradley A, Anastassiadis K, Ayadi A, Battey JF, Bell C, Birling M-C, Bottomley J, Brown SD, Bürger A, Bult CJ et al. (2012): The mammalian gene function resource: the international knockout mouse consortium. *Mamm Genome* 23, 580–586

Brotherton TW, Chui DH, Gauldie J, Patterson M (1979): Hemoglobin ontogeny during normal mouse fetal development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 2853–2857

Bruijn MFTR de, Speck NA, Peeters MCE, Dzierzak E (2000): Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo. *EMBO J* 19, 2465–2474

Burkhard P, Stetefeld J, Strelkov SV (2001): Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol* 11, 82–88

Chai P, Tian J, Zhao D, Zhang H, Cui J, Ding K, Liu B (2016): GSE1 negative regulation by miR-489-5p promotes breast cancer cell proliferation and invasion. *Biochem Biophys Res Commun* 471, 123–128

Christensen JL, Wright DE, Wagers AJ, Weissman IL (2004): Circulation and chemotaxis of fetal hematopoietic stem cells. *PLOS Biol* 2, 368–377

- Connor JA, Thiagarajan R (2007): Hypoplastic left heart syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2
- Copp AJ (1995): Death before birth: clues from gene knockouts and mutations. *Trends Genet* 11, 87–93
- Costa G, Kouskoff V, Lacaud G (2012): Origin of blood cells and HSC production in the embryo. *Trends Immunol* 33, 215–223
- Coste C, Neirinckx V, Gothot A, Wislet S, Rogister B (2015): Are neural crest stem cells the missing link between hematopoietic and neurogenic niches? *Front Cell Neurosci* 9, 218
- Cross JC (2001): Genes regulating embryonic and fetal survival. *Theriogenology* 55, 193–207
- Croy BA, Yamada AT, DeMayo FJ, Adamson SL (Hrsg.) (2014): *The guide to investigation of mouse pregnancy*; Elsevier Academic Press, Amsterdam 2014
- Cumano A, Ferraz JC, Klaine M, Di Santo JP, Godin I (2001): Intraembryonic, but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution. *Immunity* 15, 477–485
- Davis AC, Wims M, Spotts GD, Hann SR, Bradley A (1993): A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes Dev* 7, 671–682
- DGPK (2013): Leitlinie Pädiatrische Kardiologie: Hypoplastisches Linksherzsyndrom (HLHS). http://www.kinderkardiologie.org/fileadmin/user_upload/Leitlinien/29%20LI%20Hypoplastisches%20Linksherzsyndrom.pdf, abgerufen am: 02.03.2020
- Dieterlen-Lievre pF (1975): On the origin of haemopoietic stem cells in the avian embryo: an experimental approach. *Development* 33, 607–619
- Ding K, Tan S, Huang X, Wang X, Li X, Fan R, Zhu Y, Lobie PE, Wang W, Wu Z (2018): GSE1 predicts poor survival outcome in gastric cancer patients by SLC7A5 enhancement of tumor growth and metastasis. *J Biol Chem* 293, 3949–3964
- Ema H, Nakauchi H (2000): Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo. *Blood* 95, 2284–2288
- Ema M, Yokomizo T, Wakamatsu A, Terunuma T, Yamamoto M, Takahashi S (2006): Primitive erythropoiesis from mesodermal precursors expressing VE-cadherin, PECAM-1, Tie2, endoglin, and CD34 in the mouse embryo. *Blood* 108, 4018–4024
- Ensembl (2020a): Gene: GSE1 (ENSG00000131149) - Summary - Homo sapiens - Ensembl genome browser 100. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000131149;r=16:85169525-85676204, abgerufen am: 22.7.2020

- Ensembl (2020b): Gene: Gse1 (ENSMUSG00000031822) - Summary - Mus musculus - Ensembl genome browser 100. http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Summary?g=ENSMUSG00000031822;r=8:120228456-120581390, abgerufen am: 22.7.2020
- Epstein CJ (1986): Developmental genetics. *Experientia* 42, 1117–1128
- Fraser ST, Isern J, Baron MH (2007): Maturation and enucleation of primitive erythroblasts during mouse embryogenesis is accompanied by changes in cell-surface antigen expression. *Blood* 109, 343–352
- Friebs I, Illigens B, Melnychenko I, Zhong-Hu T, Zeisberg E, Del Nido PJ (2013): An animal model of endocardial fibroelastosis. *J Surg Res* 182, 94–100
- Ganuzha M, Chabot A, Tang X, Bi W, Natarajan S, Carter R, Gawad C, Kang G, Cheng Y, McKinney-Freeman S (2018): Murine hematopoietic stem cell activity is derived from pre-circulation embryos but not yolk sacs. *Nat Commun* 9, 5405
- Gekas C, Dieterlen-Lièvre F, Orkin SH, Mikkola HKA (2005): The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Dev Cell* 8, 365–375
- Genome Reference Consortium (2017): Gse1 genetic suppressor element 1, coiled-coil protein [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/382034#gene-expression>, abgerufen am: 22.7.2020
- Genome Reference Consortium (2019): GSE1 Gse1 coiled-coil protein [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23199>, abgerufen am: 22.7.2020
- Géraud C, Koch P-S, Zierow J, Klapproth K, Busch K, Olsavszky V, Leibing T, Demory A, Ulbrich F, Dieltz M et al. (2017): GATA4-dependent organ-specific endothelial differentiation controls liver development and embryonic hematopoiesis. *J Clin Invest* 127, 1099–1114
- Godin I, Garcia-Porrero JA, Dieterlen-Lièvre F, Cumano A (1999): Stem cell emergence and hemopoietic activity are incompatible in mouse intraembryonic sites. *J Exp Med* 190, 43–52
- Harrison DE, Astle CM (1997): Short- and long-term multilineage repopulating hematopoietic stem cells in late fetal and newborn mice: Models for human umbilical cord blood. *Blood* 90, 174–181
- IMPC Search | International Mouse Phenotyping Consortium. <http://www.mousephenotype.org/data/search/allele2?kw=%22Gse1%22#order2>, abgerufen am: 01.11.2018
- Infrafrontier (2019): EMMA strain search - Infrafrontier. <https://www.infrafrontier.eu/search?keyword=Gse1>, abgerufen am: 28.01.2019

- International Mouse Phenotyping Consortium (2018): Gse1 | International Mouse Phenotyping Consortium. [http://www.mousephenotype.org/data/order?acc=MGI:1098275&allele=tm1a\(EUCOMM\)Wtsi&bare=true&type=mouse](http://www.mousephenotype.org/data/order?acc=MGI:1098275&allele=tm1a(EUCOMM)Wtsi&bare=true&type=mouse), abgerufen am: 26.11.2018
- International Mouse Phenotyping Consortium (2019): About the IMPC - IMPC | International Mouse Phenotyping Consortium. <https://www.mousephenotype.org/about-imp/>, abgerufen am: 22.08.2019
- International Mouse Phenotyping Consortium (2020): Targeting Strategies - IMPC | International Mouse Phenotyping Consortium. <https://www.mousephenotype.org/about-imp/targeting-strategies/>, abgerufen am: 26.7.2020
- Isern J, Fraser ST, He Z, Baron MH (2008): The fetal liver is a niche for maturation of primitive erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6662–6667
- Isern J, García-García A, Martín AM, Arranz L, Martín-Pérez D, Torroja C, Sánchez-Cabo F, Méndez-Ferrer S (2014): The neural crest is a source of mesenchymal stem cells with specialized hematopoietic stem cell niche function. *Elife* 3
- Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, Slevin MK, Burd CE, Liu J, Marzluff WF, Sharpless NE (2013): Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA* 19, 141–157
- Kaufman MH: The atlas of mouse development, Elsevier Acad. Press, Amsterdam 2010
- Kawane K, Fukuyama H, Kondoh G, Takeda J, Ohsawa Y, Uchiyama Y, Nagata S (2001): Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. *Science* 292, 1546–1549
- Kenchegowda D, Liu H, Thompson K, Luo L, Martin SS, Fisher SA (2014): Vulnerability of the developing heart to oxygen deprivation as a cause of congenital heart defects. *J Am Heart Assoc* 3, e000841
- Khan JA, Mendelson A, Kunisaki Y, Birbrair A, Kou Y, Arnal-Estapé A, Pinho S, Ciero P, Nakahara F, Ma'ayan A et al. (2016): Fetal liver hematopoietic stem cell niches associate with portal vessels. *Science* 351, 176–180
- Kina T, Ikuta K, Takayama E, Wada K, Majumdar AS, Weissman IL, Katsura Y (2000): The monoclonal antibody TER-119 recognizes a molecule associated with glycophorin A and specifically marks the late stages of murine erythroid lineage. *Bri J Haematol* 109, 280–287
- Kingsley PD, Malik J, Emerson RL, Bushnell TP, McGrath KE, Bloedorn LA, Bulger M, Palis J (2006): “Maturation” globin switching in primary primitive erythroid cells. *Blood* 107, 1665–1672
- Kingsley PD, Malik J, Fantauzzo KA, Palis J (2004): Yolk sac-derived primitive erythroblasts enucleate during mammalian embryogenesis. *Blood* 104, 19–25

- Kumaravelu P, Hook L, Morrison AM, Ure J, Zhao S, Zuyev S, Ansell J, Medvinsky A (2002): Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver. *Development* 129, 4891–4899
- Kunder S, Calzada-Wack J, Holzwimmer G, Muller J, Kloss C, Howat W, Schmidt J, Hofler H, Warren M, Quintanilla-Martinez L (2007): A comprehensive antibody panel for immunohistochemical analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded hematopoietic neoplasms of mice: analysis of mouse specific and human antibodies cross-reactive with murine tissue. *Toxicol Pathol* 35, 366–375
- Lacaud G, Kouskoff V (2017): Hemangioblast, hemogenic endothelium, and primitive versus definitive hematopoiesis. *Exp Hematol* 49, 19–24
- Larue L, Ohsugi M, Hirchenhain J, Kemler R (1994): E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Sci U S A* 91, 8263–8267
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R (1992): Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69, 915–926
- Lindinger A, Schwedler G, Hense H-W (2010): Prevalence of congenital heart defects in newborns in Germany: Results of the first registration year of the PAN Study (July 2006 to June 2007). *Klin Padiatr* 222, 321–326
- Liu X-S, Li X-H, Wang Y, Shu R-Z, Wang L, Lu S-Y, Kong H, Jin Y-E, Zhang L-J, Fei J et al. (2007): Disruption of palladin leads to defects in definitive erythropoiesis by interfering with erythroblastic island formation in mouse fetal liver. *Blood* 110, 870–876
- Maguire S, Estabel J, Ingham N, Pearson S, Ryder E, Carragher DM, Walker N, Team, Sanger MGP Slc25a21 Project, Bussell J, Chan W-I et al. (2014): Targeting of Slc25a21 is associated with orofacial defects and otitis media due to disrupted expression of a neighbouring gene. *PLoS One* 9, e91807
- McGrath KE, Frame JM, Fegan KH, Bowen JR, Conway SJ, Catherman SC, Kingsley PD, Koniski AD, Palis J (2015): Distinct sources of hematopoietic progenitors emerge before HSCs and provide functional blood cells in the mammalian embryo. *Cell Rep* 11, 1892–1904
- McGrath KE, Frame JM, Fromm GJ, Koniski AD, Kingsley PD, Little J, Bulger M, Palis J (2011): A transient definitive erythroid lineage with unique regulation of the β -globin locus in the mammalian embryo. *Blood* 117, 4600–4608
- Medvinsky A, Dzierzak E (1996): Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 86, 897–906
- Medvinsky AL, Samoylina NL, Müller AM, Dzierzak EA (1993): An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* 364, 64–67

- Mikkola HKA, Orkin SH (2006): The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* 133, 3733–3744
- Müller AM, Medvinsky A, Strouboulis J, Grosveld F, Dzierzakt E (1994): Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* 1, 291–301
- Naiche LA, Papaioannou VE (2007): Cre activity causes widespread apoptosis and lethal anemia during embryonic development. *Genesis* 45, 768–775
- Orkin SH, Zon LI (2008): Hematopoiesis: An evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132, 631–644
- Ottersbach K, Dzierzak E (2005): The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region. *Dev Cell* 8, 377–387
- Palis J (2014): Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. *Front Physiol* 5, 3
- Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C, Keller G (1999): Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* 126, 5073–5084
- Palis J, Yoder MC (2001): Yolk-sac hematopoiesis: The first blood cells of mouse and man. *Exp Hematol* 29, 927–936
- Pan Y, Zhang L, Liu Q, Li Y, Guo H, Peng Y, Peng H, Tang B, Hu Z, Zhao J et al. (2016): Insertion of a knockout-first cassette in *Ampd1* gene leads to neonatal death by disruption of neighboring genes expression. *Sci Rep* 6, 35970
- Pietila I, Vainio S (2005): The embryonic aorta-gonad-mesonephros region as a generator of haematopoietic stem cells. *APMIS* 113, 804–812
- Ream M, Ray AM, Chandra R, Chikaraishi DM (2008): Early fetal hypoxia leads to growth restriction and myocardial thinning. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295, R583-95
- Rhodes KE, Gekas C, Wang Y, Lux CT, Francis CS, Chan DN, Conway S, Orkin SH, Yoder MC, Mikkola HKA (2008): The emergence of hematopoietic stem cells is initiated in the placental vasculature in the absence of circulation. *Cell Stem Cell* 2, 252–263
- Ryder E, Gleeson D, Sethi D, Vyas S, Miklejewska E, Dalvi P, Habib B, Cook R, Hardy M, Jhaveri K et al. (2013): Molecular characterization of mutant mouse strains generated from the EUCOMM/KOMP-CSD ES cell resource. *Mamm Genome* 24, 286–294
- Sasaki K, Sonoda Y (2000): Histometrical and three-dimensional analyses of liver hematopoiesis in the mouse embryo. *Arch Histol Cytol* 63, 137–146
- Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Costantini F, Pachnis V (1994): Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* 367, 380–383

- Selleck MAJ, Scherson TY, Bronner-Fraser M (1993): Origins of neural crest cell diversity. *Dev Biol* 159, 1–11
- Skarnes WC, Rosen B, West AP, Koutsourakis M, Bushell W, Iyer V, Mujica AO, Thomas M, Harrow J, Cox T et al. (2011): A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature* 474, 337–342
- Spyropoulos DD, Capecchi MR (1994): Targeted disruption of the even-skipped gene, *evx1*, causes early postimplantation lethality of the mouse conceptus. *Genes Dev* 8, 1949–1961
- Steiner R, Vogel H (1973): On the kinetics of erythroid cell differentiation in fetal mice. I. Microspectrophotometric determination of the hemoglobin content in erythroid cells during gestation. *J Cell Physiol* 81, 323–337
- Sui Z, Nowak RB, Bacconi A, Kim NE, Liu H, Li J, Wickrema A, An X-l, Fowler VM (2014): Tropomodulin3-null mice are embryonic lethal with anemia due to impaired erythroid terminal differentiation in the fetal liver. *Blood* 123, 758–767
- Takahashi K, Yamamura F, Naito M (1989): Differentiation, maturation, and proliferation of macrophages in the mouse yolk sac: A light-microscopic, enzyme-cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study. *J Leukoc Biol* 45, 87–96
- Testa G, Schaft J, van der Hoeven F, Glaser S, Anastassiadis K, Zhang Y, Hermann T, Stremmel W, Stewart AF (2004): A reliable lacZ expression reporter cassette for multipurpose, knockout-first alleles. *Genesis* 38, 151–158
- Theiler K: The house mouse: Atlas of embryonic development, 2. Auflage; Springer, New York 1989
- Thermo Fisher Scientific (2017): Hemoglobin colorimetric detection kit.
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EIAHGBC#/EIAHGBC>,
abgerufen am: 29.10.2019
- Tsai F-Y, Keller G, Kuo FC, Weiss M, Chen J, Rosenblatt M, Alt FW, Orkin SH (1994): An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 371, 221–226
- Tweddell JS, Hoffman GM, Ghanayem NS, Frommelt MA, Mussatto KA, Berger S: Hypoplastic left heart syndrome; In: Allen MD (Hrsg.): Moss and Adams heart disease. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia 2013, 1005–1038
- Webster WS, Abela D (2007): The effect of hypoxia in development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 81, 215–228
- Wolfensohn, S., Lloyd, M. (Hrsg.) (2003): Handbook of laboratory animal management and welfare, 3. Auflage; Blackwell Pub, Oxford, UK, Ames, Iowa 2003

Zovein AC, Hofmann JJ, Lynch M, French WJ, Turlo KA, Yang Y, Becker MS, Zanetta L, Dejana E, Gasson JC et al. (2008): Fate tracing reveals the endothelial origin of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 625–636