

Diss. ETH Nr. 9869

**Characterisation and deletion of the gene for the adhesion molecule on glia (AMOG, the  $\beta$ 2 subunit of the Na,K-ATPase) in the mouse**

ABHANDLUNG

Zur Erlangung des Titels

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

der EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

Jozsef Peter Magyar

Dipl. Biochemiker, Universität Zürich

geboren am 16.3.1961

in Budapest, Ungarn

Angenommen auf Antrag von:

Prof. Dr. M. Schachner, Referent

Prof. Dr. M. Aguet, Korreferent

1992

### **Zusammenfassung**

Die Voraussetzung für die Entwicklung eines vielzelligen Organismus ist das Vorhandensein von Zellerkennungsmolekülen, die die Interaktion einer Zelle mit seiner Umgebung erlauben. Es konnte gezeigt werden, dass AMOG (adhesion molecule on glia), ein Zellerkennungsmolekül, das von Gliazellen exprimiert wird, fähig ist, heterophile Adhäsion zwischen Neuronen und Gliazellen zu vermitteln. AMOG spielt eine wichtige Rolle bei der Migration der Körnerzellneuronen des Kleinhirns von der äusseren Körnerzellschicht entlang der Fortsätze der Bergmann'schen Gliazellen in die innere Körnerzellschicht während der frühen postnatalen Entwicklung des Kleinhirns. AMOG ist identisch mit der  $\beta 2$  Untereinheit der Na,K-ATPase und ist assoziiert mit der  $\alpha 2$  und vermutlich auch der  $\alpha 3$  Untereinheit der Na,K-ATPase. In dieser Studie wurde das Gen für AMOG isoliert und sequenziert. Ausserdem wurden Vektoren für die gezielte Genveränderung konstruiert, um AMOG defiziente ( $AMOG^{(0/0)}$ ) Mäuse zu produzieren und so die ontogenetische Rolle von AMOG *in vivo* analysieren zu können. Für die Identifikation submolekularer Domänen von AMOG, die für die Zellerkennung verantwortlich sind, wurden Vektoren für Fusionsproteine konstruiert. Die Expression der so konstruierten Fusionsproteine wurde in "chinese hamster ovary" (CHO) Zellen getestet.

Der genomische 18 kb lange Klon von AMOG wurde aus einer Genbank der Maus isoliert und charakterisiert. Der 7.2 kb lange Subklon G7SH, der das ganze AMOG Gen und dessen Promotor enthält, wurde sequenziert. Der Vergleich der genomischen Sequenz mit der cDNA zeigte, dass das AMOG Gen aus 7 Exonen besteht, im Gegensatz zu der  $\beta 1$  Untereinheit der Na,K-ATPase, die nur 6 Exone aufweist. Der Transkriptionsstart und mögliche Promotorelemente wurden identifiziert.

Für die Herstellung einer  $AMOG^{(0/0)}$  Maus wurde die Technik der gezielten Genveränderung benutzt. Dabei wird das endogene Gen in embryonischen Stammzellen (ES) durch homologe Rekombination mit einem DNA-Konstrukt ersetzt, das eine Null-Mutation in der kodierenden Region trägt. Die ES-Zellen sind fähig, chimäre Tiere zu bilden, wenn sie in Maus Blastozysten injiziert werden und können zur Keimbahntransmission der gewünschten Mutation führen. In diesem Projekt wurden verschiedene Strategien zur gezielten Genveränderung (Mikroinjektion, positive Selektion, positiv-negative Selektion) und verschiedene ES-Zelllinien (D3, AB1,  $\beta 1$ ) getestet. Das erfolgreichste

Konstrukt, das für die Einführung der Nullmutation in das AMOG Gen in ES-Zellen gebraucht wurde, war das für die positiv-negative Selektion. Dieses Konstrukt enthält zwei Regionen, die zu der genomischen Sequenz homolog sind: eine 1 kb lange Sequenz oberhalb der Mutation und eine zweite 4.6 kb lange Sequenz unterhalb der Mutation. Als gewählte Mutation wurden ein Stopcodon und die antibiotische Resistenzkassette (MC1-neo polyA) in das erste Exon des Gens hinter der 24ten Aminosäure eingefügt. Für die negative Selektion nicht-homologer Insertionen wurde eine HSV-tk Gen-Expressionskassette an dem 3'-Ende des Konstruktes eingefügt. Dieses HSV-tk Enzym wandelt Nukleotid-Analoga in giftige Substanzen um, wenn diese Analoga angeboten werden. Das HSV-tk geht aber bei homologer Rekombination verloren.

Nach Elektroporation dieses Konstruktes und Selektion der ES-Zellen wurde eine homologe Rekombinationsfrequenz von 1:40 in verschiedenen Zell-Linien beobachtet. Homolog rekombinante Zellklone wurden durch die negative Selektion 5-6 fach angereichert. Blastozysten wurden mit den gezielt genveränderten AB1 oder D3 Zellklonen injiziert und anschliessend in die Gebärmutter pseudoträchtiger Leihmütter transferriert. Die Blastozysten-injektion von D3 ES Zellen resultierte in der Geburt von 10 hochchimären (>90%) männlichen Tieren, im Gegensatz zu den AB1-Zellen, die nur Tiere mit niedrigem Chimärismus (<20%) ergaben. Die chimären männlichen Mäuse wurden mit weiblichen 129/Sv Mäusen verpaart. Die Übertragung der AMOG Mutation in die Keimbahn wurde durch Southern Blot Analyse gezeigt. Die heterozygoten AMOG mutanten Mäuse zeigten keinen offensichtlichen Phänotyp. Der Phänotyp der homozygoten AMOG mutanten Mäuse scheint bis zum Alter von 2 Wochen normal zu sein, wo dann eine rasch fortschreitende "Krankheit" zum Tod der Mäuse am Ende der dritten Woche führt.

Für die Identifikation der Domänen von AMOG, die für die verschiedenen Funktionen des Moleküls verantwortlich sind (z.B. Zellerkennung, Zellwanderung, Neuritenwachstum), wurden Mittel für die spätere Analyse der cDNA Fragmente hergestellt. Ausgehend von dem pSP64-polyA Vektor wurde ein vielfach verwendbarer Expressionsvektor hergestellt, der die Signalsequenz und die 5' nicht-kodierende Region der N-CAM cDNA gefolgt von Stopcodons und einem PolyA-Schwanz enthält. Mit diesen Vektoren (pJS1 und pJS2) ist die Expression sekretierter Fusionsproteine möglich, entweder durch Injektion der SP6 RNA Polymerase transkribierten mRNA in *Xenopus laevis* Oozyten oder durch

Transformation der Fusionsproteinkonstrukte in eukaryontische Zellen (z.B. CHO-Zellen) mit Hilfe eines eukaryontischen Exressionsvektors (pEE14).

### **Summary**

The prerequisite for the development of a multicellular organism is the existence of recognition molecules allowing an interaction of the cell with its environment. The adhesion molecule on glia (AMOG), a cell recognition molecule expressed by glial cells, was shown to be able to mediate a heterophilic adhesion between neurons and glial cells. AMOG plays a crucial role in the migration of the cerebellar granule neurons from the external granular layer, along the processes of the Bergmann glial cells, into the internal granular layer during development of the early postnatal mouse cerebellum. AMOG is identical to the Na,K-ATPase  $\beta$ 2 subunit and is associated with the  $\alpha$ 2 (and probably with the  $\alpha$ 3) subunit of the Na,K-ATPase. In this study the AMOG gene was isolated, sequenced and gene targeting vectors were constructed in order to produce an AMOG deficient (AMOG<sup>(0/0)</sup>) mice for the *in vivo* analysis of the ontogenetic role of AMOG. For the identification of submolecular domains of AMOG responsible for its cell recognition properties, a fusion protein construction vector was created. The expression of the fusion proteins constructed with this vector were tested in Chinese hamster ovary (CHO) cells.

The AMOG genomic clone, 18 kb long, was isolated from a mouse genomic library and characterised. The 7.2 kb long subclone G7SH containing the entire AMOG gene and the promoter region was sequenced. Comparison of genomic with the cDNA sequences revealed that the AMOG gene consists of 7 exons in contrast to the Na,K-ATPase  $\beta$ 1 subunit, which consists of only 6 exons. The transcription start site and putative promoter motifs were identified.

For the generation of an AMOG<sup>(0/0)</sup> mouse, the gene targeting technique was used. Hereby the endogenous gene in embryonic stem (ES) cells is replaced by homologous recombination with a DNA construct bearing a null mutation in the coding region. The ES cells are capable for the formation of chimeric animals, if they are injected into mouse blastocysts and can lead therefore to germline transmission of the desired mutation. In this project, different gene targeting strategies (microinjection, positive selection, positive-negative selection) and different embryonic stem cell lines (D3, AB1,  $\beta$ 1) were tested. The most successful gene targeting construct used for introduction of a null mutation into the AMOG gene in mouse embryonic stem cells was the positive-negative selection construct. This construct contains two regions, homologous to the genomic

sequences: one, 1 kb long, placed upstream to the mutation and a second; 4.6 kb long, placed downstream. As a selectable mutation, a stop codon and the antibiotic resistance gene cassette (MC1-neo polyA) were inserted into the first exon of the gene, after the 24th amino acid of the AMOG protein. For negative selection of nonhomologous integrations, the HSV thymidine kinase gene expression cassette was introduced at the 3' end of the long arm of the gene targeting construct. This HSV-tk enzyme phosphorylates nucleotide analogs to a toxic substance if the analogs are provided, but the HSV-tk gets lost upon homologous recombination.

After electroporation of this construct and selection of the ES cells, a homologous recombination frequency of 1:40 could be observed in different cell lines. A 5-6 fold enrichment of the AMOG gene targeted cells was obtained by the negative selection. Blastocysts were injected with the gene targeted AB1 or D3 ES cells and transferred afterwards into the uterus of pseudopregnant foster mother mice. Blastocyst injection of D3 embryonic stem cells resulted in the birth of 10 highly chimeric (>90%) male founders, in contrast to the AB1 cells, which gave only animals with low chimerism (<20%). The chimeric male mice were paired with 129/Sv female mice. Germline transmission of the AMOG mutation was shown by Southern blot analysis. Heterozygous AMOG mutant mice did not show any obvious behavioural phenotype. The behavioural phenotype of the homozygous AMOG mutant mice seems to be normal until the age of 2 weeks, where a rapidly progressing "sickness" leads to death of the mice at the end of the third week.

For the identification of the domains of AMOG responsible for different functions (e.g. cell recognition, cell migration, neurite outgrowth), tools were created for later analysis of cDNA fragments. Outgoing from the pSP64-polyA vector, a multipurpose expression vector was created containing the signal sequence and 5' noncoding region of the N-CAM cDNA followed by stop codons and the polyA stretch. Using the constructed vectors (pJS1 and pJS2), expression of secreted soluble fusion proteins becomes possible, both by injection of the SP6 RNA polymerase transcribed cRNA into *Xenopus laevis* oocytes or by transformation of the fusion protein construct into eukaryotic cells (e.g. CHO cells) with the help of an eukaryotic expression vector (pEE14).