



Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik

Chemische Mutagenese
embryonaler Stammzellen der Maus

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie - Chemie - Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Boris Greber
aus Bonn

Juni 2004

Siehst du den Vogel? ... Du magst den Namen des Vogels in allen Sprachen der Welt kennen, aber wenn du die alle gelernt hast, dann wirst du absolut nichts über den Vogel wissen. Du wirst nur etwas über Menschen an verschiedenen Orten der Welt gelernt haben, und darüber, wie diese Menschen den Vogel bezeichnen.

So, wollen wir den Vogel einmal anschauen und sehen, was er tut - das ist es, was zählt.

Richard Feynman

1. Gutachter: Dr. habil. Heinz Himmelbauer
2. Gutachter: Prof. Dr. Volker Erdmann

Disputation am 18.2.2005

KURZINHALT

INHALTSVERZEICHNIS	I-V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
ZUSAMMENFASSUNG	2
ABSTRACT	3
I EINLEITUNG	4-21
II METHODEN und METHODENETABLIERUNG	22-39
III ERGEBNISSE	40-83
IV DISKUSSION	84-99
ANHANG	100-114

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I-V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
ZUSAMMENFASSUNG	2
ABSTRACT	3

I EINLEITUNG

1.1 Die Maus als Modellorganismus	4-5
1.2 Embryonale Stammzellen der Maus	5-11
Präimplantationsentwicklung	5
Embryonale Stammzellen	7
Differenzierung und Differenzierungshemmung	8
Molekulare Grundlagen der Selbst-Erneuerung	9
1.3 Ansätze zur Gendisruption in der Maus	11-15
Phänotyp-getriebene Ansätze	11
Gen-getriebene Ansätze	12
1.4 Chemische Mutagenese embryonaler Stammzellen	15-20
ENU	16
Durchmusterungsstrategien	17
TMP/UV	19
1.5 Zielsetzung	20-21

II METHODEN und METHODENETABLIERUNG

2.1 Zellkulturbiologische Methoden	22-29
2.1.1 Kultivierung embryonaler Fibroblasten der Maus	22
Isolation embryonaler Fibroblasten	22
Einfrieren von MEFs	23
Auftauen und Expansion	23
Generierung von <i>feeder layern</i>	24
2.1.2 Kultivierung embryonaler Stammzellen	24

ES-Medium	24
Kultivierung von ES-Zellen	25
Zählen von ES-Zellen und -Zellkolonien	26
Picken von ES-Zell-Kolonien	27
Chemische Mutagenese	27
Karyotypisierung	28
2.1.3 Zellkultur im Multititerplattenformat	29
2.2 Molekularbiologische Standardmethoden	29-33
2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese	29
2.2.2 DNA-Isolation aus ES-Zellen und Mausschwanzbiopsien	29
2.2.3 RNA-Isolation aus ES-Zellen	30
2.2.4 Reverse Transkription	31
2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion	32
2.2.6 Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten	33
2.3 Methoden zur Mutationsdetektion	33-34
2.3.1 Denaturierende HPLC	33
2.3.2 MALDI-vermittelte Resequenzierung	33
2.3.3 Heteroduplex-Spaltung mit CEL1	33
2.3.4 Fragmentanalyse durch Kapillarelektrophorese	34
2.4 Mausembryologische Methoden	34-39
2.4.1 Vasektomie	34
2.4.2 Isolation von Präimplantationsembryonen	35
2.4.3 Blastozysteninjektion	36
2.4.4 Embryoaggregation und Morulainjektion	38
2.4.5 Embryotransfer und Chimärenverpaarung	38

III ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung der Mutagene TMP und ENU	40-51
3.1.1 Überlebensraten	40
Vorversuche	41
Überlebensraten mit TMP/UV	42
Überlebensraten mit ENU	43
3.1.2 Mutationsfrequenzen	44
Mutationsfrequenzen mit TMP/UV	44
Mutationsfrequenzen mit ENU	45

3.1.3 Mutationspektren	46
Mutationsspektrum mit TMP	46
Mutationsspektrum mit ENU	50
3.1.4 Zusammenfassung	51
3.2 Strategien zur PCR-basierten Mutationsdetektion	51-62
3.2.1 Denaturierende HPLC	53
3.2.2 MALDI-vermittelte Resequenzierung	54
3.2.3 CEL1	56
3.2.4 Kapillarelektrophorese	58
3.2.5 <i>Poison</i> -Primer-PCR	58
3.2.6 <i>Exon-skipping</i> -PCR	60
3.2.7 Zusammenfassung	61
3.3 Klonbanketablierung und gezielte Isolation von Spleiß-Mutanten	62-83
3.3.1 Abschätzung der nötigen Klonbibliotheksgröße	63
3.3.2 Erstellung einer Klonbibliothek aus ENU-behandelten ES-Zellen	65
3.3.3 RNA-Isolation, reverse Transkription und Probenvereinigung	67
3.3.4 Kontrolle der Funktionsfähigkeit des <i>screening</i> -Ansatzes	69
3.3.5 <i>Proof of concept: screening</i> nach Exondeletionen in Kit	71
Verfeinerung der <i>screening</i> -Methode	71
Kit-Screen	74
Mausarbeit	79

IV DISKUSSION

4.1 Mutagencharakterisierung	84-87
TMP/UV	84
ENU	87
4.2 Durchmusterungsstrategien	88-90
4.3 Ein gen-getriebener Ansatz zur Generierung von Spleiß-Mutanten aus ENU-behandelten ES-Zellen der Maus	90-99
Klonbanketablierung	90
Kit-Screen	93
Allgemeine Beurteilung des <i>screening</i> -Ansatzes	96

ANHANG

DANKSAGUNG	100
BIBLIOGRAFIE	101-109
VERBRAUCHSMATERIAL und GERÄTE	110
PRIMERLISTE	112
LEBENS LAUF	113
VERÖFFENTLICHUNGEN	114

häufiger verwendete **ABKÜRZUNGEN**

A	Adenin
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	<i>complementary</i> DNA, komplementäre DNA
CEL1	CEL1-Endonuklease aus Sellerie
CDS	<i>coding sequence</i> , kodierende Sequenz
dHPLC	denaturierende HPLC (<i>high-performance liquid chromatography</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMS	Ethylmethansulfonat
ENU	<i>N</i> -Ethyl- <i>N</i> -nitrosoharnstoff
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
EZM	extrazelluläre Matrix
Φ	ΦX174/ <i>Bsu</i> RI DNA-Größenstandard
G	Guanin
IZM	Innere Zellmasse
kb	Kilobasen
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
MALDI	matrixassistierte Laser-Desorptions-/Ionisation
MEFs	<i>mouse embryonic fibroblasts</i> , embryonale Fibroblasten der Maus
MF	Mutationsfrequenz
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
NMD	<i>nonsense-mediated mRNA decay</i>
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
<i>p.c.</i>	<i>post coitum</i>
<i>Pfu</i>	DNA-Polymerase von <i>Pyrococcus furiosus</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
RT	Reverse Transkription bzw. Reverse Transkriptase
T	Thymin
<i>Taq</i>	DNA-Polymerase von <i>Thermus aquaticus</i>
6-TG	6-Thioguanin
TMP	4,5',8-Trimethylpsoralen
WT	Wildtyp

ZUSAMMENFASSUNG

Um die Funktionen der menschlichen Gene aufzuklären, sind Studien an Modellorganismen essentiell. Das wichtigste Modelltier für den Menschen ist die Maus. Mausmutanten sind bei der Aufklärung von Genfunktionen von hoher Bedeutung, doch haben sämtliche etablierte Ansätze zur Gendisruption ihre spezifischen Nachteile. Angesichts der Vielzahl an Genen unbekannter Funktion, die durch großangelegte Sequenzierungsprojekte offenbart wurden, gibt es allgemein einen Bedarf an effizienten und zielgerichteten Ansätzen zur Produktion von Mausmutanten.

Die klassische Methode, Gene in Mäusen auszuschalten, verläuft über die Mutagenisierung der Keimbahn mit Hilfe mutationsauslösender Agenzien. Die Generierung von Mausmutanten erfolgt dort nach dem Zufallsprinzip. Demgegenüber bietet die Gendisruption in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) den Vorteil, positive Klone *in vitro* zu selektieren für die *zielgerichtete* Produktion von Mutanten. Durch die sequenzspezifische, chemische Mutagenisierung einer Population embryonaler Stammzellen können statistisch sämtliche Gene im Mausgenom getroffen werden. Die in separate Proben zu verteilenden Klone könnten dann nach Mutationen in interessierenden Genen durchmustert werden, um anschließend die selektive Produktion von Mausmutanten zu ermöglichen.

Gegenstand dieser Arbeit ist die Etablierung eines solchen Ansatzes. Dazu wurden zwei Agenzien, 4,5',8-Trimethylpsoralen (TMP) und *N*-Ethyl-*N*-nitrosoharnstoff (ENU), in ihren Eigenschaften als chemische Mutagene für ES-Zellen charakterisiert. Es stellte sich heraus, dass sich das potenzielle Deletionsmutagen TMP wegen seiner geringen Mutagenität und der Heterogenität induzierter Mutationen nicht als Mutagenisierungsagenz für die Generierung eines ES-Zell-Klonarchivs eignet. Das Punktmutagen ENU hingegen erfüllte die Voraussetzungen hoher Mutagenität und Homogenität des Mutationsspektrums. Es wurden anschließend verschiedene Strategien zur Identifizierung unbekannter Mutationen evaluiert, wobei die Detektion von Exondeletionen auf Transkriptebene die weitaus höchsten Ausdünnungen von Mutationen erlaubte. Da Spleiß-Mutationen einen signifikanten Anteil am ENU-Mutationsspektrum ausmachten, wurde eine rund 40.000 Klone umfassende Bibliothek erstellt mit der Absicht, hochgradig gepoolte cDNA-Proben PCR-basiert nach Spleiß-Mutationen zu durchmustern. Am Beispielgen *Kit* sollte die Machbarkeit dieses Ansatzes demonstriert werden. Es konnten zwei Klone mit Exondeletion im *Kit*-Transkript isoliert werden. Mit einem der beiden Klone, Δ Exon18, gelang die Transmission der Mutation durch die Keimbahn. Die heterozygote Mausmutante zeigte einen für dominante Null-Mutationen charakteristischen Phänotyp.

ABSTRACT

Model organisms play an essential role for studying the functions of human genes. The most important model for the human is the laboratory mouse. Mouse mutants present valuable tools for deciphering mammalian gene functions. The established methods for disrupting gene functions, however, all have their specific shortcomings. Facing large numbers of genes with unknown functions there is a general need for efficient methodology to produce mouse mutants in a directed fashion.

Classically, knock-out mice are produced at random using chemical mutagenesis to treat whole animals. In contrast, inactivating genes in embryonic stem (ES) cells bears the advantage to select for positive clones *in vitro* enabling a gene-driven production of mutants. By chemically mutagenizing a set of ES cells virtually any gene in the mouse genome may be affected. Generating a library of statistically mutated clones would therefore allow to screen for mutations in a particular gene of interest. Mouse mutants could then selectively be generated from clones with mutations identified in that gene.

The present work aims at establishing such an approach. To this end, the properties of two mutagens, 4,5,8'-trimethylpsoralen (TMP) and *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU), were characterized in ES cells. TMP appeared to be inefficient as a mutagen and showed a heterogeneous spectrum of induced mutations. In contrast, ENU proved to be highly effective. Interestingly, a significant proportion of its mutational spectrum was presented by exon deletions at the mRNA level. Moreover, comparing different PCR-based mutation detection strategies revealed that the detection of deletions was most sensitive. Therefore, a library of approximately 40,000 clones was generated aiming at the identification of splice mutations. As a proof of concept, highly pooled cDNA samples were screened for mutations that lead to exon deletions in the *Kit* transcript. Two splice mutant clones could be isolated. One of these, Δ exon18, was successfully employed to transmit its mutation through the mouse germline. The heterozygous mutant displayed a specific phenotype resembling that of a dominant null mutation.