

I

EINLEITUNG

1.1 Die Maus als Modellorganismus

Die Hausmaus (*Mus musculus*) hat ihren Ursprung im heutigen Indien, wo sich bis zum Beginn der Neolithischen Revolution vor etwa zehntausend Jahren bereits eine regionale Aufspaltung von vier Unterarten - *Mus musculus domesticus*, *M. m. musculus*, *M. m. castaneus* und *M. m. bactrianus* - etabliert hatte. Als der Mensch zunehmend sesshaft wurde und seine Nahrung durch Ackerbau und Viehzucht selbst produzierte, erwies sich die Maus als gut angepasst für ein Leben in Assoziation mit der menschlichen Zivilisation. In dem Maße, wie sich die neue Lebensweise des Menschen ausbreitete, breiteten sich auch die verschiedenen Subspezies der Maus über nahezu den gesamten Globus aus. Die beiden erfolgreichsten Unterarten waren dabei *M. m. domesticus* und *M. m. musculus*. *Domesticus* ist heute auf der Saudiarabischen Halbinsel, in Nordafrika, Mittel- und Westeuropa, Amerika, Zentral- und Südafrika sowie Australien vorherrschend (Ausbreitung gemäß der menschlichen Kulturgeschichte in dieser Reihenfolge), während *Mus musculus musculus* über das heutige China und Russland bis nach Mitteleuropa vordrang, um dort auf seine Artgenossen zu stoßen. Interessanterweise durchmischen sich die beiden Subspezies hier nur auf einem stabilen Grenzstreifen von wenigen Kilometern Breite, der unter anderem durch Deutschland führt (zusammengefasst aus Silver, 1995).

Bevor Mäuse Gegenstand wissenschaftlichen Interesses wurden, waren sie beliebt vor allem unter Züchtern, insbesondere wenn sie offensichtliche Anomalitäten aufwiesen, d.h. Träger spontaner, phänotypisch sichtbarer Mutationen waren. Als sich zu Beginn des 20. Jahrhunderts amerikanische Wissenschaftler für diese Tiere zu interessieren begannen, waren es Zuchtfarmen wie die von Abbie Lathrop in Massachusetts, die sie mit Tieren versorgten. Ein hochrangiges wissenschaftliches Anliegen war in dieser Anfangsphase die Erzeugung von Inzuchtstämmen durch mindestens 20 aufeinanderfolgende Bruder-Schwester-Verpaarungen zur Homogenisierung des genetischen Hintergrunds. Dazu konnte aufgrund von Restriktionslängenpolymorphismen nachgewiesen werden, dass mehrere alte und heute gängige Inzuchtstämme wie C57Bl/6 oder 129 auf einzelne oder sogar identische Tiere aus Lathrops Zucht zurückgehen, dass sie also nicht unabhängig voneinander etabliert wurden. Darüber hinaus waren die Mausfarmen eine Art Schmelztiegel für Wild- und Zuchttiere aus unterschiedlichen Teilen der Welt, womit zu erklären wäre, dass die meisten

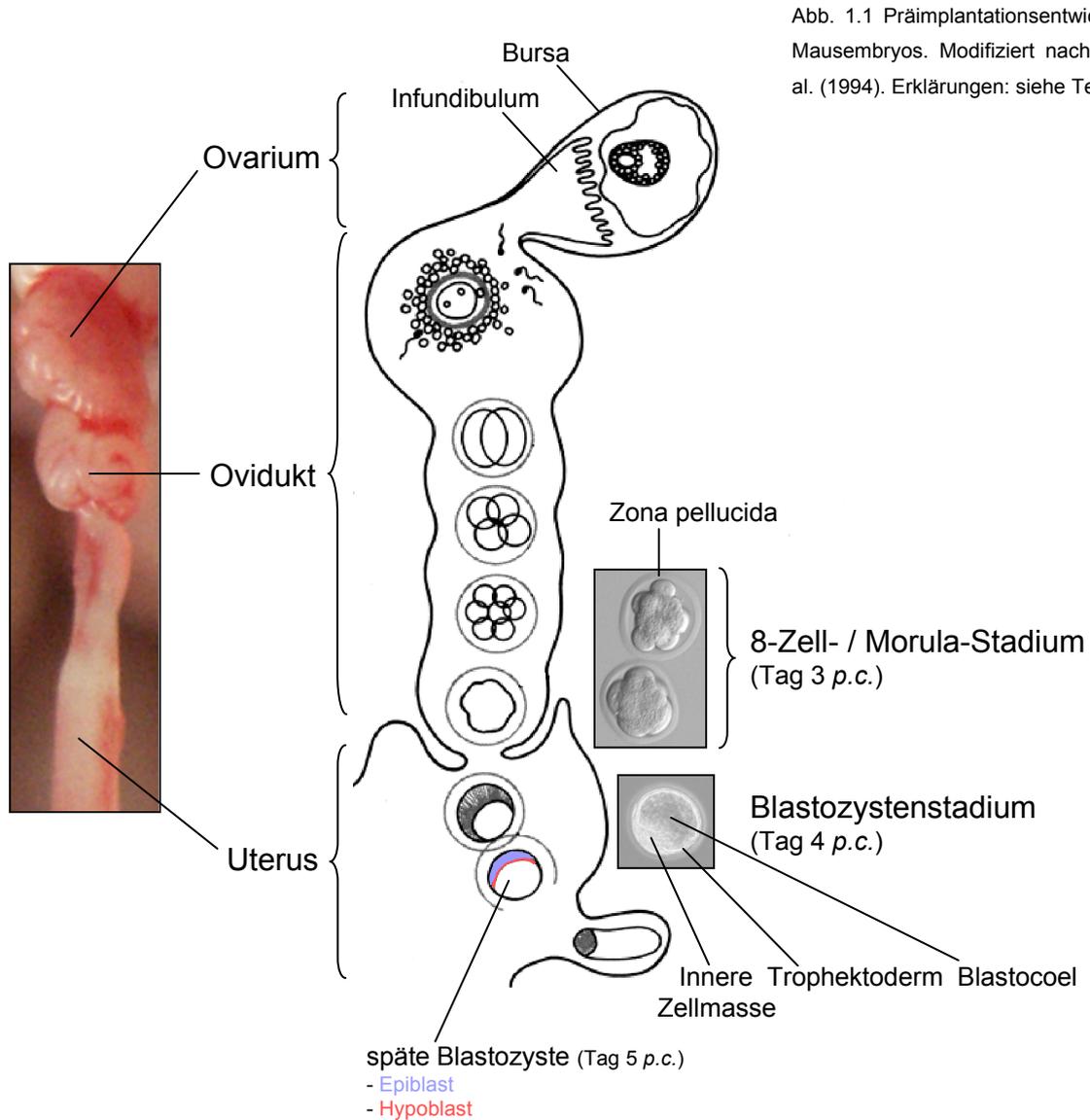
der heutigen Inzuchtstämme (Beck et al., 2000) genetisch zwar hauptsächlich der Subspezies *M. m. domesticus* zuzuordnen sind, aber auch Anteile von *M. m. musculus* im Genom tragen (in Nagy et al., 2003; Silver, 1995).

Um den Menschen als komplexen Organismus verstehen zu lernen und um Wege zur Bekämpfung seiner Krankheiten zu finden, ist es aus offensichtlichen ethischen und praktischen Gründen notwendig, in der Forschung mit experimentell tiefgreifender zugänglichen Modellorganismen zu arbeiten. Es war zu erwarten, dass das nach dem des Menschen (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001) zweite zu sequenzierende Wirbeltiergenom dasjenige der besten Modellspezies sein würde. Dies war das Genom der Maus (Waterston et al., 2002) und nicht etwa das des Schimpansen als unserem evolutiv nächsten Verwandten. Denn die Maus eignet sich aus mehreren Gründen besser als Modellsystem: zunächst ist auch sie ein Säugetier, d.h. es gibt viele anatomische, physiologische etc. Parallelen zum Menschen. Die evolutive Distanz zwischen Mensch und Maus beträgt nach aktuellen Schätzungen etwa 90 Millionen Jahre (Hedges, 2002; Springer et al., 2003). Dies wird reflektiert durch die Ähnlichkeit der Genome: die meisten menschlichen Gene haben Orthologe in der Maus, deren mittlere Identität auf Aminosäureebene bei knapp 80% liegt (Waterston et al., 2002). Weiterhin sind Mäuse klein, in der Nahrungsaufnahme anspruchslos und resistent gegen viele Infektionen. Damit können die Tiere unter effizienter Raumausnutzung und zu relativ kostengünstigen Bedingungen gehalten werden. Des weiteren haben Mäuse eine kurze Generationszeit und hohe Wurfgrößen, d.h. sie produzieren innerhalb kleiner Zeitintervalle relativ viele Nachkommen. Diese Tatsache macht die Maus für Entwicklungsbiologen, Populationsgenetiker usw. interessant und erlaubte auch die Erzeugung der erwähnten Inzuchtstämme, die ihrerseits von hohem Wert z.B. in der Krebs- und immunologischen Forschung sind. Schließlich stehen für die Maus eine Reihe von Methoden zur genetischen Veränderung zur Verfügung, die zum Teil auf der Manipulation embryonaler Stammzellen beruhen.

1.2 Embryonale Stammzellen der Maus

Präimplantationsentwicklung

Embryonale Stammzellen sind *in vitro* unbegrenzt kultivierbare, pluripotente Zellen isoliert aus der Inneren Zellmasse der Säuger-Blastozyste (Smith, 2001). Zur Veranschaulichung ist in Abb. 1.1 die frühe Embryonalentwicklung der Maus mit für diese Arbeit relevanten Fachbegriffen dargestellt:



Die ersten Zellteilungen nach Befruchtung der Eizelle geschehen innerhalb der ersten Tage *post coitum* (*p.c.*) unter Migration des Embryos durch den Eileiter. Während die Blastomeren bis zum 8-Zell-Stadium totipotent und klar von einander abgegrenzt sind, kompaktieren sie am dritten Tag *p.c.* zunehmend (Morula-Stadium), und die erste Zelldifferenzierung wird induziert. Eine wichtige regulatorische Rolle spielt dabei der *in vivo* ausschließlich im Präimplantationsembryo (und später in Keimzellen) exprimierte Transkriptionsfaktor Oct4 (Schöler et al., 1990). Dessen Expression wird im Inneren des Morula-Embryos aktiviert (Pesce et al., 1998), und dies ist eine notwendige Bedingung für die Weiterentwicklung zur Blastozyste (oder Keimblase) bis zum vierten Tag *p.c.* (Nichols et al., 1998). In der Blastozyste liegen nun zwei Zelltypen vor: das Trophektoderm bildet eine einzellschichtige, flüssigkeitsgefüllte Hohlkugel, an deren Innenwand sich an einer Stelle eine Gruppe von Zellen befindet, die Innere Zellmasse (IZM). Interessanterweise scheint deren relative Lage zu korrelieren mit den Positionen des zweiten Polkörpers und dem Spermieintrittspunkt in

die Oocyte, was Implikationen für die Festlegung von Körperplanachsen bereits im Präimplantationsembryo hat (Tam et al., 2001). Bis zum fünften Tag *p.c.* differenziert die dem Blastocoel zugewandte äußere Zellschicht der Inneren Zellmasse zum sogenannten Hypoblasten (*primitive endoderm*). Die übrigen Zellen der Inneren Zellmasse werden in diesem späten Blastozystenstadium auch als Epiblast (*primitive ectoderm*) bezeichnet. Durch die Aktivität von Na^+/K^+ -Pumpen im Trophektoderm strömt Wasser passiv in das Blastocoel und lässt die Blastocyste anschwellen, was schließlich zum Austritt des Embryos aus der Zona pellucida und damit zur Einnistung in den Uterus führt (Wiley et al., 1990). Aus Trophektoderm und Hypoblast gehen in der weiteren Entwicklung ausschließlich extraembryonale Gewebe hervor: aus dem Trophektoderm bildet sich der Trophoblast-Anteil der Placenta (Kunath et al., 2002), und aus dem Hypoblasten entsteht der endodermale Teil des Dottersacks (Bielinska et al., 1999). Aus dem Epiblasten hingegen entwickeln sich neben extraembryonalem Mesoderm vor allem sämtliche embryonalen Gewebe (Hogan et al., 1994).

Embryonale Stammzellen

Anfang der 80er Jahre gelang es erstmals, pluripotente Zelllinien direkt aus Präimplantationsembryonen zu etablieren (Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981). Spätere Studien zeigten, dass der Ursprung dieser embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Epiblast später Blastozysten ist (Brook und Gardner, 1997). Aufbauend auf der Arbeit mit sogenannten EC-Zellen (*embryonic carcinoma*) erfolgte die erfolgreiche Isolation und Propagation der ES-Zellen in Kultur zusammen mit mitotisch inaktivierten embryonalen Fibroblasten, von denen eine proliferationsfördernde und differenzierungshemmende Wirkung ausging (Martin und Evans, 1975). Unter diesen Bedingungen teilen sich embryonale Stammzellen symmetrisch und unbegrenzt, d.h. sie besitzen die Fähigkeit zur Selbst-Erneuerung (*self-renewal*) - im Gegensatz zu anderen primären Zelllinien, die ihre Teilungsaktivität *ex vivo* nach einiger Zeit einstellen (Smith, 2002). Die bemerkenswerteste Eigenschaft von ES-Zellen besteht darin, dass sie quasi aus der Kulturschale wiedereingeführt werden können in Präimplantationsembryonen und nach deren Re-Transfer in Uteri pseudoschwangerer Weibchen beteiligt werden am Aufbau aller fötalen Gewebe inklusive der Keimbahn, d.h. sie sind pluripotent (Bradley et al., 1984). Für die Integration embryonaler Stammzellen in frühe Embryonen stehen verschiedene Techniken wie die ES-Zell-Injektion in isolierte Blastozysten oder die Aggregation mit frühen Morulae zur Verfügung (Nagy et al., 2003) - Präimplantationsembryonen sind tolerant gegenüber der Addition (oder Entfernung) von Zellen (Hogan et al., 1994). Diese Tatsachen eröffneten die Möglichkeit, *in vitro* genetische Manipulationen am ES-Zell-Genom vorzunehmen, die sich nach Keimbahntransmission in sämtlichen somatischen Zellen des Mausekörpers manifestieren.

Dies gelang erstmals Mitte der 80er Jahre mit Hilfe retroviraler Vektoren (Robertson et al., 1986). Die Vermischung der ES-Zellen mit den IZM-Zellen des Empfänger-Embryos führt zur Bildung chimärer Föten. Dass ES-Zellen in der Lage sind, auch allein den gesamten Fötus zu generieren, wurde gezeigt durch Einführung embryonaler Stammzellen in tetraploide Embryonen: diese können die extraembryonalen Gewebe bilden, sind aber gegenüber diploiden Zellen bei der Synthese des Fötus stark benachteiligt. In den erhaltenen Tieren ließ sich kein Beitrag der tetraploiden Empfänger-Embryonen nachweisen (Nagy et al., 1993). Gemäß ihres epiblastidären Ursprungs differenzieren ES-Zellen *in vivo* nicht zu Derivaten des Trophektoderms und so gut wie nicht zu denen des Hypoblasten, weshalb sie nicht als totipotent zu bezeichnen sind (Rossant, 2001). Kürzlich jedoch berichtete die Gruppe um Hans Schöler von der Bildung blastozysten-artiger Strukturen aus ES-Zellen *in vitro* - nach rund 40 Tagen der Kultivierung in Abwesenheit einer Nährschicht aus inaktivierten Fibroblasten (Hübner et al., 2003). In korrekter Verteilung konnten Trophektoderm- und IZM-spezifische Proteine immunocytochemisch nachgewiesen werden. Das logische Folgeexperiment - die Generierung lebendiger Mäuse durch Re-Transfer dieser *de novo* erzeugten Blastozysten in scheinchwangere Weibchen steht freilich noch aus, doch sind die Autoren der Ansicht, mit den genannten Ergebnissen bereits den Beweis für die (prinzipielle) Totipotenz von ES-Zellen geliefert zu haben.

Differenzierung und Differenzierungshemmung

Ohne weitere Maßnahmen wie der Kultur auf der erwähnten Fibroblasten-Nährschicht (*feeder layer*) differenzieren ES-Zellen *in vitro* spontan in Gemisch unterschiedlicher Zelltypen. Unmittelbare *in-vivo*-Abkömmlinge wie Mesoderm und Ektoderm lassen sich bereits wenige Tage nach *feeder*-freier Kultivierung nachweisen. Für die Überführung in adulte Zelltypen werden die ES-Zellen i.d.R. zunächst als Aggregate in Suspension zu multidifferenzierten Strukturen, sogenannten Embryoidkörpern (*embryoid bodies*), kultiviert (Martin et al., 1977). Die nach dem Ausplattieren mehr oder weniger zielgerichtete Umwandlung ist für einige Zelltypen mit Hilfe von Differenzierungsagenzien möglich (Überblick in Smith, 2001). Die erhaltenen Zellpopulationen sind jedoch immer heterogen. Eine Anreicherung des gewünschten Zelltyps ist z.B. durch Flusszytometrie nach selektiver Fluoreszenzaktivierung möglich (Ying et al., 2003). Durch rein spontane Differenzierung, aber unter Einsatz geeigneter Markierungstechniken, wurden vor kurzem haploide Spermatozoen (aus männlichen) bzw. Oocyten aus (weiblichen) ES-Zellen gewonnen (Geijsen et al., 2004; Hübner et al., 2003). Die isolierten Spermatozoen waren sogar in der Lage, natürliche Eizellen zu befruchten. Ein Teil der so erzeugten Embryonen entwickelte sich *in vitro* weiter bis zum Blastozystenstadium.

Spontane Differenzierung ist unerwünscht, wenn Keimbahntransmission das Ziel ist. Der Erhalt der Pluripotenz und des undifferenzierten Zustands von ES-Zellen gelang anfangs nur durch Kultivierung auf den Nährschichten aus embryonalen Fibroblasten. Die Erkenntnis aber, dass bestimmte konditionierte Medien die Wirkung der Fibroblasten ersetzen können (Smith und Hooper, 1987), legte die Existenz (mindestens) eines diffundiblen Faktors nahe, dem die genannten Effekte zuzuschreiben wären. Dieser Faktor wurde identifiziert als ein einzelnes, aus anderen physiologischen Zusammenhängen bereits bekanntes Zytokin, *leukemia inhibitory factor* - LIF (Smith et al., 1988; Williams et al., 1988). Die entsprechende cDNA wurde kloniert (Gearing et al., 1987), und das rekombinant hergestellte Peptid konnte inaktivierte Fibroblasten oder konditionierte Medien in bezug auf ihre Wirkung substituieren (Williams et al., 1988). Die Frage, warum *feeder layer* selbst kaum in der Lage sind, Kulturmedien zu konditionieren, obwohl sie ebenfalls LIF exprimieren, wurde beantwortet durch den Nachweis einer alternativ gespleißten LIF-Variante in den Fibroblasten (Rathjen et al., 1990): diese wird ebenso wie die lösliche Form sezerniert, bindet aber über die durch Exon 1 kodierte alternative N-terminale Region des prozessierten Peptids an ein Protein der extrazellulären Matrix (Mereau et al., 1993). In der Routine werden ES-Zellen seither entweder in Gegenwart inaktivierter Fibroblasten, rekombinanten LIFs oder einer Kombination aus beidem kultiviert.

Molekulare Grundlagen der Selbst-Erneuerung

Ein beträchtlicher Teil dessen, was wir über die Biologie embryonaler Stammzellen wissen, insbesondere über ihre durch LIF vermittelte Selbst-Erneuerung, ist den Arbeiten von Austin Smith und Kollegen zu verdanken. So ist der LIF-Signaltransduktionsweg weitgehend aufgeklärt (Burdon et al., 2002): kurz und vereinfacht ausgedrückt, induziert LIF die Heterodimerisierung der beiden transmembranen LIF-Rezeptor-Komponenten LIFR und gp130. Dadurch wird zyttoplasmaseitig die rezeptor-assoziierte Proteinkinase JAK aktiviert, die ihrerseits mehrere Tyrosin-Reste des LIF-Rezeptors phosphoryliert. Dadurch kommt es unter anderem zur Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor Stat3 und damit zu dessen Aktivierung. Es wurde gezeigt, dass die direkte Aktivierung von Stat3 in ES-Zellen hinreichend ist für die Wahrung des undifferenzierten Zustands in Abwesenheit von LIF (Matsuda et al., 1999) und umgekehrt, dass Stat3-defiziente ES-Zellen spontan differenzieren, auch bei Anwesenheit von LIF (Niwa et al., 1998). Trotz der hohen Bedeutung für die Arbeit mit ES-Zellen *in vitro* spielt die Aktivierung von Stat3 durch LIF *in vivo* aber nur eine Nebenrolle: in Blastozysten der Maus wird LIF zwar exprimiert vom Trophektoderm und der LIF-Rezeptor von den Zellen der Inneren Zellmasse (Nichols et al., 1996), doch weder LIF- noch LIF-Rezeptor-Mutanten zeigen Defekte in der IZM-Entwicklung (in Rossant, 2001). Vielmehr scheint die Signifikanz des LIF-Signalweges in der Aufrechterhaltung der Integrität

des Epiblasten in sogenannten Diapause-Blastozysten zu liegen (Nichols et al., 2001): Solange Mausweibchen ihren Nachwuchs säugen, können sie zwar erneut befruchtet werden, doch die Einnistung von Blastozysten in den Uterus ist in dieser Zeit nicht möglich. Im Gegensatz zu Primaten dauert die Diapause bei Mäusen aber nur wenige Wochen; es ist daher biologisch vorteilhaft, wenn die Blastozysten so lange im Uterus überleben, um anschließend gleich einnisten zu können. Nichols und Kollegen zeigten, dass LIF-rezeptordefizienten Blastozysten nach mehreren Tagen künstlich induzierter Diapause die Fähigkeit abhanden kommt, einen Fötus zu generieren, weil der Epiblast seine Pluripotenz verliert und degeneriert. Signifikanterweise stellen späte bzw. verzögerte Blastozysten die bevorzugte Quelle für die Isolation von ES-Zellen dar (Brook und Gardner, 1997), möglicherweise weil die Epiblast-Zellen durch die Implantationsverzögerung, d.h. die Arretierung der normalen Weiterentwicklung, präkonfiguriert werden für die LIF-abhängige Selbst-Erneuerung, auch in der Kulturschale (Smith, 2002). Angesichts dieser Zusammenhänge könnte es sein, dass der LIF-Signalweg im Präimplantationsembryo der Maus eine Besonderheit im Vergleich zu anderen Säuger-Spezies darstellt; tatsächlich sprechen die bislang etablierten ES-Zelllinien humanen Ursprungs (erstmalige Isolation durch Thomson et al., 1998) in der Aufrechterhaltung ihrer Pluripotenz nicht auf LIF an (Brivanlou et al., 2003).

Diese Tatsache, die angesprochene Toleranz der normalen (d.h. unverzögerten) Blastozysten-Entwicklung gegenüber der Ausschaltung des LIF-Gens bzw. -Rezeptors sowie die Beobachtung, dass gänzlich LIF-freie ES-Zell-Kulturen nicht vollständig ausdifferenzieren (Dani et al., 1998), legte die Annahme eines weiteren, möglicherweise fundamentalen Mechanismus für die Erhaltung der Pluripotenz von ES-Zellen (und der Inneren Zellmasse im Embryo) nahe. Unabhängig von einander konnten kürzlich Mitsui et al. (2003) und Chambers et al. (2003) einem bis dahin unbekanntem ES-zell- bzw. IZM-spezifischen Transkriptionsfaktor die zentrale Rolle in diesem Zusammenhang zuordnen. Das Gen wurde *nanog* genannt, nach dem Land der ewigen Jugend aus der keltischen Mythologie (Tir nan Og). Die unterschiedlichen Ansätze der beiden Arbeiten hatten die Forderung gemeinsam, dass ES-Zell-Kolonien bei Überexpression des gesuchten Gens und in Abwesenheit von LIF eine undifferenzierte Morphologie aufweisen müssten. Beide Gruppen wiesen nach, dass dieser ausschließlich für *Nanog* gefundene Effekt unabhängig von der LIF/Stat3-Signaltransduktionskette auftritt. Zudem ist *Nanog* bei Überexpression in ES-Zellen notwendig und hinreichend für die Generierung von Chimären, wenn gleichzeitig der LIF/Stat3-Weg inaktiviert wird (Chambers et al., 2003). Hingegen verhindert die Ausschaltung des *nanog*-Gens die Entstehung einer pluripotenten Inneren Zellmasse in Blastozysten (Mitsui et al., 2003). In dieser Hinsicht ist *Nanog* damit tatsächlich von grundlegenderer Bedeutung als die Aktivierung von Stat3 durch LIF. Interessanterweise

können aber Nanog und der LIF/Stat3-Signalweg kooperieren bei der Aufgabe, ES-Zell-Differenzierung zu unterbinden: die exogene Applikation von LIF führte bei gleichzeitiger Nanog-Überexpression nach morphologischen Gesichtspunkten zur Bildung von "hyperundifferenzierten" Kolonien.

Wie bestimmen und erhalten die Transkriptionsfaktoren Stat3, Nanog und Oct4 zusammen die Identität des Epiblasten bzw. undifferenzierter ES-Zellen? Ein attraktives Modell wurde dazu von Mitsui und Kollegen (2003) vorgeschlagen: Im Morula-Stadium bestimmt das Muster der Oct4-Expression das Schicksal der Zellen: die äußeren Zellen mit wenig Oct4 differenzieren in Trophektoderm, während dies im Inneren der Morula verhindert ist. Ebenso erhält man in ES-Zellen Differenzierung in Trophektoderm bei mehr als 50%iger Reduzierung des Oct4-Expressionspegels (Niwa et al., 2000). Doch auch Nanog ist im Zentrum der Morula exprimiert (Chambers et al., 2003) und trägt dort aktiv zur Etablierung und Erhaltung der Inneren Zellmasse bei; analoge Ergebnisse wurden für ES-Zellen erzielt (siehe oben). Auch der nächste Differenzierungsschritt *in vivo*, die Entstehung des Hypoblasten, wird bestimmt durch den Oct4-Expressionslevel: Niwa et al. (2000) zeigten, dass ES-Zellen in primitives Endoderm differenzieren, wenn sie Oct4 überexprimieren; entsprechend ist die Oct4-Expression im Hypoblasten später Blastozysten erhöht (Palmieri et al., 1994). *Knock-out*-Studien (Mitsui et al., 2003; Niwa et al., 1998) legen nahe, dass gleichzeitig Nanog und später auch Stat3 durch ihre Aktivität im Epiblasten dessen Differenzierung blockieren und seine Selbst-Erneuerung fördern - so, wie es auch bei ES-Zellen der Fall ist. Über die Zielgene der drei Transkriptionsfaktoren, ihre Interaktionen untereinander sowie weitere "Spieler" in diesem regulatorischen System ist derzeit noch wenig bekannt.

1.3 Ansätze zur Gendisruption in der Maus

Phänotyp-getriebene Ansätze

Die Inaktivierung von Genen der Maus ist von hohem Wert für die Aufklärung ihrer Funktionen, auch vor dem Hintergrund, Tiermodelle für menschliche Krankheiten zu etablieren (Bedell et al., 1997a; Bedell et al., 1997b). Anstatt auf seltene spontane Mutationsereignisse zu warten, versuchte man in den Anfängen der Mausgenetik, Mutationen auf physikalischem Wege zu erzeugen, d.h. z.B. durch Röntgenbestrahlung der Tiere (Muller, 1927). Trotz Nachteilen wie der relativ geringen Mutagenisierungseffizienz und der Komplexität der induzierten Läsionen (Multilocusdeletionen, Umlagerungen) ist die hochenergetische Bestrahlung als Methode zur Geninaktivierung noch immer aktuell, allerdings eher beschränkt auf die Exposition embryonaler Stammzellen als auf die

lebendiger Mäuse (Kushi et al., 1998; Schimenti et al., 2000; Thomas et al., 1998). Effektiver als physikalische Methoden ist die Behandlung von Mäusen mit mutagenen Chemikalien. Der Stoff mit dem höchsten bekannten Mutagenisierungspotenzial ist *N*-Ethyl-*N*-nitrosoharnstoff, ENU (Russell et al., 1982; Russell et al., 1979). Bei intraperitonealer Injektion von ENU werden somatische Zellen wie auch Spermatogonien der männlichen Mäuse zufällig mutagenisiert, so dass die Nachkommen der behandelten Tiere in all ihren Körperzellen identische - zunächst heterozygote - Mutationen tragen. Dabei ist im Prinzip jedes Gen mutierbar, denn chemische Mutationsagenzien unterliegen keiner DNA-Sequenzspezifität. Bei sichtbarem Phänotyp muss durch Kreuzungsexperimente mit Hilfe genetischer Marker und anschließender Positionsklonierung ermittelt werden, in welchem Locus sich die verursachende Mutation befindet. Dieses Vorgehen ist aufwändig, doch die Mutagenese mit ENU in großem Stil - die Generierung einer hohen Anzahl mutagenisierter Mäuse - ist die einzige Möglichkeit, in kurzer Zeit viele Phänotypen zu erzeugen (Brown und Peters, 1996). Angesichts der Vielzahl an Genen unbekannter Funktion, die durch die Genomsequenzierungsprojekte von Mensch und Maus ans Licht kamen (Okazaki et al., 2002), erleben klassische ENU-Mutageneseprogramme seit einigen Jahren eine Renaissance (Brown und Balling, 2001; Justice et al., 1999; Nadeau et al., 2001). Wegen der Vorgehensweise, zunächst nach dem Zufallsprinzip Phänotypen zu erzeugen und daran anschließend die zugrundeliegenden Läsionen zu erkunden, bezeichnet man die klassische ENU-Mutagenese auch als Phänotyp-getriebenen Ansatz.

Gen-getriebene Ansätze

Im Gegensatz dazu sind die übrigen Methoden zur Ausschaltung von Genen in der Maus Gen-getrieben, d.h. der zufällig oder gezielt eingeführte Gendefekt ist bekannt, bevor die Maus generiert wird. Für eine solche Strategie wird Material benötigt, mit dem man *in vitro* genetische Veränderungen charakterisieren und aus dem man Mäuse "machen" kann. Dafür kommen im Wesentlichen embryonale Stammzellen in Frage, aber im Prinzip auch Archive kryokonservierter Mausspermien in Verbindung mit dazugehörigen DNA-Proben der Spendertiere (Brown und Hardisty, 2003): aus im Sinne der genetischen Läsion positiven ES-Zellklonen können Mäuse wie im vorigen Abschnitt beschrieben generiert werden; für die Spermproben bietet sich die *in-vitro*-Fertilisation von Oocyten an. Die auf ES-Zellen basierenden *knock-out*-Methoden sind typischerweise molekularbiologische, d.h. vektorvermittelte Ansätze. Man kann unterscheiden zwischen zufälliger oder zielgerichteter Insertion des Vektors ins Genom der ES-Zellen.

Da der größte Teil des Mausgenoms nichtkodierend ist (Waterston et al., 2002), wird mit zufällig integrierenden Vektoren nur eine Minderheit Gene treffen, um deren Funktion auslöschen. Deshalb benötigt man ein Reportersystem, dass die Integration des Vektors in

aktive Gene anzeigt. Dies ist der Ansatz für die sogenannten Genfallen (Gossler et al., 1989). Der Vektor dafür (genauer: für 5'-Genfallen) enthält als zentrale Komponente eine Spleiß-Akzeptorsequenz, unmittelbar gefolgt von einem promotorfreien Reportergen wie dem für β -Galaktosidase. Bei Integration des Vektors in ein Intron eines in ES-Zellen aktiven Gens wird unter Ausnutzung der endogenen Spleißmechanismen ein Fusionstranskript aus stromaufwärts liegenden Exons und Reportergen gebildet. Die Funktion des Zielgens wird so meist ausgeschaltet, und der Reporteranteil des Fusionsproteins erlaubt die Selektion von ES-Zellkolonien mit produktiven Vektor-Integrationen (Stanford et al., 2001). Die Vektorsequenz im Fusionstranskript dient dabei als Matrize für eine 5'-RACE-PCR (*rapid amplification of cDNA ends*) zur Identifizierung des getroffenen Gens. Da die Insertion der Vektoren ungerichtet erfolgt, macht der Ansatz nur Sinn, wenn man ihn in großem Stil betreibt - dies wird in mehreren großangelegten Projekten auch getan (Hansen et al., 2003; Stanford et al., 2001; Zambrowicz et al., 1998). Die Motivation dazu rührt her aus der angesprochenen Vielzahl unbekannter Gene, denen es gilt, in standardisierter Weise Funktionen zuzuschreiben (Evans et al., 1997: "Funktionelle Genomik"). Die hauptsächlichen Limitierungen des Genfallen-Ansatzes liegen in der Abhängigkeit von der endogenen Genexpression und der Tatsache, dass es eine Neigung für jeden Vektor gibt, in bestimmte Loci im Genom bevorzugt zu integrieren ("*hot spots*"). Dadurch geht die Auftragung der Anzahl neu getroffener Gene gegen die Anzahl charakterisierter Klone in eine vorzeitige Sättigung über, was die Arbeit ab einem für jeden Vektor spezifischen Punkt zunehmend ineffizient macht (in Hansen et al., 2003).

Die eleganteste weil potenziell subtilste Methode zur Gendisruption besteht in der zielgerichteten Vektorinsertion in einen spezifischen Locus (*gene targeting*). Dies geschieht unter Ausnutzung der ES-zellimmanenten Eigenschaft, Vektorsequenzen durch homologe Rekombination zu integrieren. Die Techniken dafür - Positivselektion durch Neomycin-Resistenz und G418, Negativselektion durch das Thymidinkinasegen aus dem Herpes-Simplex-Virus und Ganciclovir - wurden Ende der 80er Jahre entwickelt (Mansour et al., 1988; Thomas und Capecchi, 1987) und benutzt für die erste erfolgreiche Genveränderung durch *gene targeting* mit anschließender Keimbahntransmission des entsprechenden ES-Zellklons (Thompson et al., 1989). Je nach Vektoraufbau ist eine Insertion von DNA-Segmenten oder ein Austausch von Abschnitten zwischen Ziellocus und Vektor bis hin zur zielgerichteten Einführung einzelner Punktmutationen möglich. Für die einfache Auslöschung einer Genfunktion kann man z.B. das erste Exon (mit Start-Codon) ersetzen durch das Neomycin-Resistenzgen. Diese Möglichkeiten haben das *gene targeting* zur wichtigsten Methode der Genmanipulation für die Maus gemacht. Die hohe Präzision erkaufte man sich allerdings durch einen nicht unerheblichen Arbeitsaufwand für die Konstruktion des spezifischen *targeting*-Vektors. Zudem ist homologe Rekombination in eukaryotischen Zellen

ineffizient, was die Notwendigkeit, eine Vielzahl von resistenten ES-Subklonen zu picken und zu charakterisieren, zur Folge hat.

Die etablierten Strategien zur Gendisruption in der Maus sind in Abb. 1.2 willkürlich kategorisiert, um den Ansatz, um den es in der vorliegenden Arbeit geht, klarer zu machen.

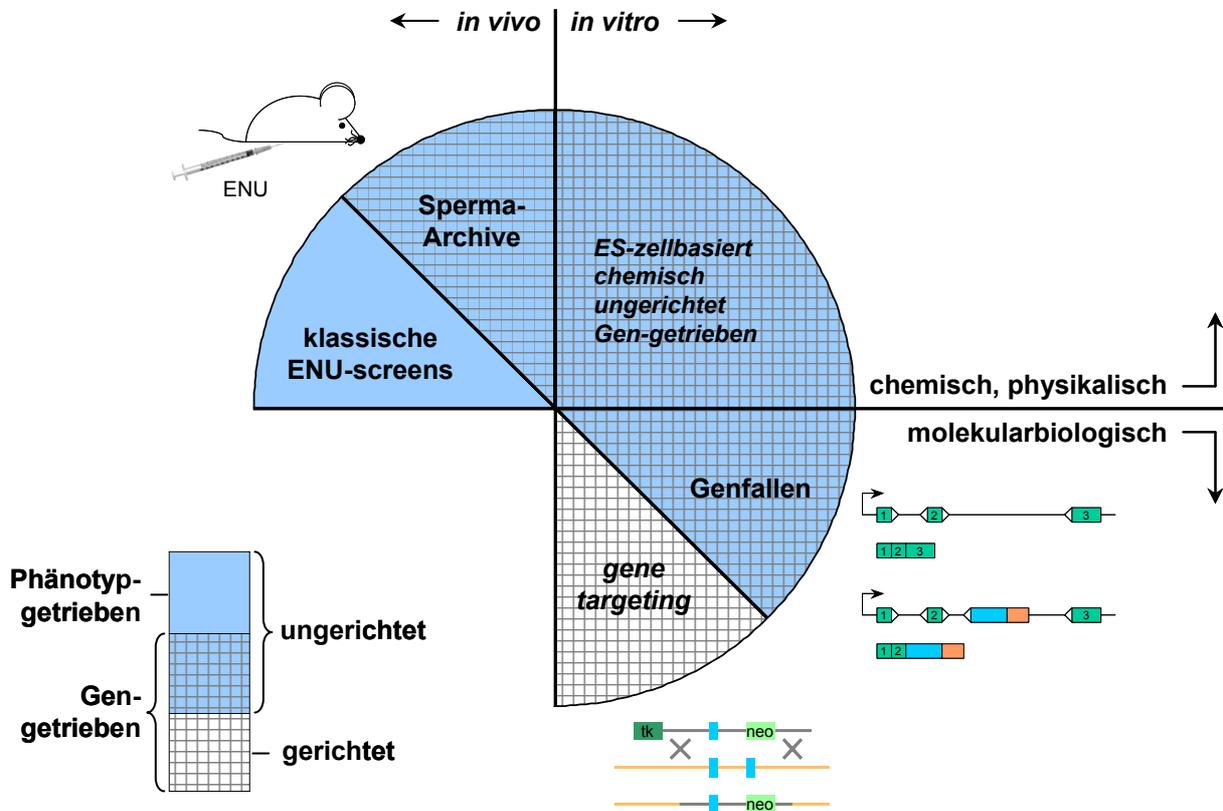


Abb. 1.2 Schema zum Vergleich verschiedener Ansätze zur Gendisruption in der Maus. Die vorliegende Arbeit ist im "nordöstlichen" Quadranten angesiedelt und teilt verschiedene Aspekte mit etablierten Methoden.

Jede der Strategien ist entweder phänotyp- oder Gen-getrieben, gerichtet oder ungerichtet, basiert auf der Behandlung von ES-Zellen oder zielt auf die Keimbahn der Maus, und die verwendeten Mittel zur Genauswahl sind entweder chemischer (bzw. physikalischer) oder molekularbiologischer Natur. Die Größe der einzelnen Felder reflektiert in keiner Weise die Bedeutung der einzelnen Methoden. So ist für die schon kurz erwähnte Gen-getriebene Generierung von Mutanten nach klassischer Maus-ENU-Mutagenese erst eine Arbeit publiziert (Coghill et al., 2002) - die auf der Durchmusterung eines Archivs mutagenisierter DNA in Verbindung mit entsprechenden Proben kryokonservierter Spermien beruht. Der Quadrant für molekularbiologische Ansätze zur Gendisruption *in vivo* ist mangels ausgereifter Methoden freigelassen. Jedoch gibt es interessante Entwicklungen, transponible Elemente, die auch in der Keimbahn der Maus aktiv sind, für eine Art *in-vivo gene trapping* einzusetzen (Carlson et al., 2003; Largaespada, 2003).

Ein ebenfalls neuer, bisher ungenannter Ansatz zur Geninaktivierung verläuft über RNAi, RNA-Interferenz (Hannon, 2002): ein Gen, das eine dem Zielgen entsprechende shRNA

(*short hairpin RNA*) kodiert, wird nach Elektroporation vektorvermittelt und ungerichtet in das ES-Zell-Genom integriert. Werden die so transfizierten ES-Zellen durch tetraploide Embryoaggregation (oder Blastocysteninjektion) in eine Maus transformiert, kann man dort einen genetischen Null-Phänotyp erwarten - sofern die Herabregulierung durch RNA-Interferenz vollständig ist (Kunath et al., 2003). Dies ist allerdings ein kritischer Punkt bei der Methode. In dem Schema von Abb. 1.2 stünde der Ansatz dem *gene targeting* am nächsten, weil die Vektor-Insertion zwar ungerichtet erfolgt - die Inaktivierung aber ist zielgenspezifisch.

Alle Methoden zur Ausschaltung von Genen in der Maus haben ihre spezifischen Nachteile, so dass wohl für die Realisierung des Ziels, für sämtliche Gene eine *knock-out*-Mutante zu generieren, verschiedene und auch neue Ansätze bemüht werden müssen. In diesem Zusammenhang steht die vorliegende Arbeit, die im "nordöstlichen" Quadranten von Abb. 1.2 positioniert werden kann: die chemische Mutagenese embryonaler Stammzellen ist per se ungerichtet. Ein genspezifisches Durchmusterungsverfahren für die induzierten Mutationen (siehe nächste Abschnitte) und die Möglichkeit zur *in-vitro*-Charakterisierung gefundener Läsionen machen den gewählten Ansatz zu einem Gen-getriebenen.

1.4 Chemische Mutagenese embryonaler Stammzellen

Zu Beginn dieser Arbeit lagen zwei Studien über die chemische Mutagenese von ES-Zellen vor (Chen et al., 2000; Munroe et al., 2000) - bis dahin wurde sie mit dem Hintergrund der Phänotyp-getriebenen Mutantenproduktion ausschließlich *in vivo*, d.h. auf lebendige Mäuse, angewandt (siehe oben). In beiden Arbeiten wurde gezeigt, dass die ES-Zellen trotz Mutagenisierung im Prinzip - nicht in allen, aber in vielen Fällen - noch verwendet werden können zur Generierung von Mausmutanten. Dies eröffnete die Möglichkeit für einen Gen-getriebenen Ansatz zur Genausschaltung mit chemisch mutagenisierten ES-Zellen. Dass die produzierten Mäuse tatsächlich funktionelle Läsionen im Genom trugen, wurde gezeigt anhand eines negativen Selektionstests, der es erlaubt, ES-Zellklone mit funktionellen Mutationen im Gen für die Hypoxanthin-guanin-phosphoribosyltransferase (*Hprt*) zu isolieren. Der Test beruht auf der Applikation des Purinanalogs 6-Thioguanin (6-TG), was bei Funktionalität des Enzyms zur Phosphoribosylierung des Guanin-Derivats und schließlich zu dessen Einbau in genomische DNA führt. Dies jedoch löst Störungen bei der Zellteilung aus, was letztlich zum Tod der Zelle führt. Karyotypisch männliche ES-Zellen jedoch, die eine funktionelle Mutation in dem X-chromosomalen *Hprt*-Gen tragen, überleben die 6-TG-Selektion. Der Test ist in Abb. 1.3 illustriert.

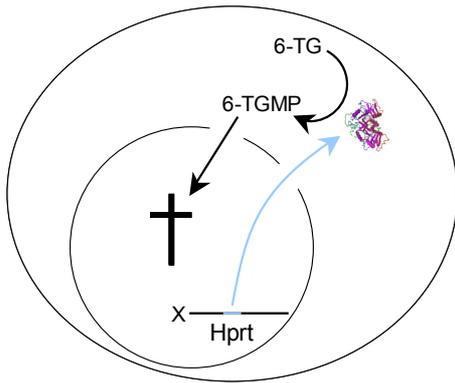


Abb. 1.3 6-TG-vermittelter Test zur negativen Selektion von Klonen mit funktionellen Läsionen in *Hprt*. Dargestellt sei eine Zelle mit funktionell intaktem *Hprt*-Gen. Die Applikation von 6-Thioguanin wirkt dann letal, andernfalls überlebt der Klon.

Im Gegensatz zum Menschen, wo ein Defekt in diesem Gen das Lesch-Nyhan-Syndrom verursacht, sind *Hprt*-defiziente Mäuse phänotypisch normal (Hooper et al., 1987). Die von Chen bzw. Munroe et al. generierten Mäuse sind abgeleitet von 6-TG-resistenten ES-Zellen, die also chemisch induzierte genetische Defekte trugen. Der 6-TG-Selektionstest diente beiden Gruppen auch zur Charakterisierung der ausgelösten Mutationen. Erwartungsgemäß waren die meisten ENU-induzierten Defekte im *Hprt*-Gen 6-TG-resistenter ES-Zellklone Punktmutationen (Chen et al., 2000). Interessanterweise wurden jedoch auf RNA-Ebene auch eine Reihe von

Spleißmutationen detektiert (rund 20% aller Fälle) - höchstwahrscheinlich Punktmutationen auf genomischer Ebene, die sich als Deletionen einzelner Exons im gespleißten Transkript manifestieren. Dieses Mutationsspektrum stimmt überein mit den Arten von Veränderungen, die durch *in-vivo*-Mutagenese mit ENU ausgelöst werden (Justice et al., 1999).

ENU

Die Induktion von Mutationen durch chemische Agenzien setzt deren Reaktion mit DNA voraus. ENU (Abb. 1.4 A) ist in wässriger Lösung instabil, die Halbwertszeit beträgt bei pH 7,0 und 37°C nur etwas mehr als eine halbe Stunde (in Shibuya und Morimoto, 1993).

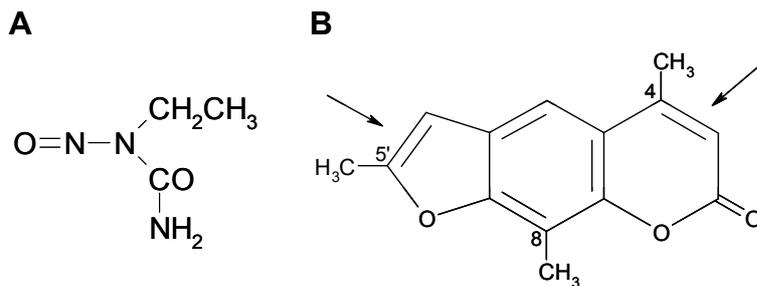


Abb. 1.4 Die Mutagene *N*-Ethyl-*N*-nitrosourea (ENU, links) und 4,5,8-Trimethylpsoralen (TMP, rechts). Die beiden Pfeile markieren die Doppelbindungen, deren π -Elektronen nach Photoaktivierung kovalente Bindungen mit Pyrimidinbasen gegenüberliegender DNA-Stränge eingehen (nach Cimino et al., 1985).

Der Zerfall u.a. in ein Ethyldiazoniumion ist aber produktiv für die Reaktion mit DNA. Diese wird dann, wahrscheinlich nach einem SN_1 -Mechanismus, an verschiedenen Stellen ethyliert, und zwar neben den Phosphatgruppen vorwiegend an den O⁶- bzw. O⁴-Positionen der Basen Guanin und Thymin (Justice et al., 1999; Shibuya und Morimoto, 1993). Diese Ethylierungen interferieren stark mit der wasserstoffbrückenvermittelten Basenpaarung innerhalb der DNA-Doppelhelix und sind daher wohl ein Hauptgrund für die hohe Mutagenität von ENU. Durch die chemische Reaktion mit DNA kommt es aber nicht unmittelbar zur Einfügung von Mutationen. Vielmehr kommt es darauf an, wie die Zelle auf die

Modifizierungen reagiert. Dies tut sie durch Aktivierung von Reparaturmechanismen. So können z.B. die O⁶-Ethylierungen an Guaninen durch Aktivität der O⁶-Alkylguanin-alkyltransferase entfernt werden, weshalb durch ENU seltener Mutationen an GC-Basenpaaren induziert werden als an AT-Paarungen (Noveroske et al., 2000). Greifen solche Korrekturmechanismen nicht, kommt es während der Zellteilung zu Lesefehlern und damit zum Einbau falscher Nukleotide.

Weiterhin kann der *Hprt*-Selektionstest benutzt werden, um die Gesamtanzahl funktionell relevanter Mutationen in einem gegebenen Klon abzuschätzen. Das Verhältnis von resistenten zur Gesamtzahl an 6-TG-selektierten Zellen ist die sogenannte Mutationsfrequenz (oder -rate). Sie ist gleichbedeutend mit der Wahrscheinlichkeit, dass ein gegebener ES-Zellklon eine funktionelle Mutation in *Hprt* trägt. Unter der Prämisse, dass *Hprt* ein repräsentatives Gen sei, kann man diese Wahrscheinlichkeit mit Einschränkungen übertragen auf beliebige Gene. Zu den Einschränkungen zählt, dass andere Gene signifikant mehr bzw. weniger kodierende Sequenz haben können als *Hprt* und ggf. anfälliger bzw. resistenter sind gegen Mutationen, denn der 6-TG-assay selektiert ja auf funktionelle Läsionen und nicht auf reine Sequenzänderungen. Die Entsprechung für die chemische Mutagenese *in vivo* ist der sog. spezifische Lokustest, der auf der Auftrittshäufigkeit charakteristischer Phänotypen beruht. Im Arbeitsbereich steigt die Mutationsfrequenz dort linear mit der ENU-Dosis (Noveroske et al., 2000). Chen et al. (2000) haben gezeigt, dass die mit ENU maximal erreichbaren Mutationsfrequenzen in ES-Zellen so hoch sind wie die *in vivo*, nämlich etwa 1:1000 (Justice et al., 1999).

Durchmusterungsstrategien

Das ist für mögliche Gen-getriebene Ansätze zur Genausschaltung eine wichtige Voraussetzung, denn um für ein bestimmtes Gen einen ES-Zellklon mit Mutation zu identifizieren, sollte die Anzahl zu durchsuchender Proben - die direkt von der Mutationsrate abhängt - überschaubar bleiben, sonst wird die Prozedur nicht effektiv sein. Wie durchsucht man eine Kollektion an mutagenisierten ES-Zellklonen nach Mutationen in definierten Genen? Die zunächst dafür in Frage kommenden Methoden basieren auf der Mutationsdetektion in genspezifischen PCR-Produkten und wurden bereits in anderen Organismen für analoge Zwecke erprobt, beispielsweise in *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege - Bentley et al., 2000), *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand - McCallum et al., 2000; Till et al., 2003) oder *Danio rerio* (Zebrafisch - Wienholds et al., 2003). Dazu wurden in den genannten Beispielen zunächst PCR-Produkte ohne - und solche mit potenzieller Mutation miteinander vermischt, hitzedenaturiert und durch Abkühlen renaturiert. In Proben mit Mutation werden neben Homoduplex-Doppelsträngen auch Heteroduplices gebildet. Eine Strategie zur Mutationsdetektion beruht nun auf der Tatsache,

dass sich die Retentionszeiten der beiden DNA-Spezies auf einer Reversphasen-HPLC-Säule (*high-performance liquid chromatography*) unter partiell denaturierenden Bedingungen (dHPLC) unterscheiden, d.h. im Falle einer Mutation ergibt sich kein Einzel- sondern ein Doppelsignal (Xiao und Oefner, 2001). Die physikalische Trennung von Homo- und Heteroduplex-DNA ist alternativ auch durch Kapillarelektrophorese in einem Temperaturgradienten möglich (Li et al., 2002). Ein anderes Verfahren, Fehlpaarungen in Heteroduplex-DNA zu detektieren, ist deren Inkubation mit der Endonuklease CEL1 aus *Selleria*. Dabei entstehen zwei Verdauungsprodukte, deren Größen sich zur ursprünglichen Länge des PCR-Fragments addieren. Die Spaltprodukte müssen dann lediglich ihrer Größe nach ausreichend aufgetrennt und sichtbar gemacht werden (Colbert et al., 2001). In den oben zitierten Arbeiten wurden mit dHPLC bzw. CEL1 Kollektionen chemisch mutagenisierter genomischer DNA-Proben durchmustert. Beide Verfahren waren erfolgreich und wären im Prinzip auch anwendbar auf Proben aus ES-Zellen der Maus. Im Unterschied dazu wurden die mutagenisierten DNA-Proben in den genannten Beispielen jedoch aus lebendigen Individuen der jeweiligen Spezies gewonnen. Das gilt auch für die bereits mehrfach erwähnte Arbeit um die Mausspermakollektion (Coghill et al., 2002): mutageninduzierte letale Defekte - auch in Genen, die nicht den eigentlichen Ziellocus betreffen - sind damit von vornherein ausgeschlossen. Für das Arbeiten mit ES-Zellen bleibt diese Gefahr jedoch bestehen. Daten in Munroe et al. (2000) sowie Vivian et al. (2002) zeigen, dass nur ein Teil chemisch mutagenisierter ES-Zellklone in der Lage ist, die Keimbahn chimärer Mäuse zu kolonisieren, und dieser Anteil korreliert negativ mit der Mutationsfrequenz. Deshalb ist es ratsam, hinsichtlich der Mutationsrate einen Kompromiss einzugehen: für die Etablierung einer Kollektion mutagenisierter ES-Zellklone ist einerseits eine hohe Mutationsrate wünschenswert, weil dadurch die Chance, Mutationen in interessierenden Genen überhaupt zu identifizieren, erhöht ist. Andererseits sollten pro ES-Zelle nicht allzu viele Defekte ausgelöst werden, eben weil dadurch Gefahr bestünde, zu vielen Klonen ihre Pluripotenz zu rauben. Ein weiteres Argument gegen maximale Mutationsfrequenzen ist die Schwierigkeit, später in der Maus die interessierende Mutation durch Rückkreuzungen von den übrigen zufällig induzierten Defekten im Genom zu isolieren. Eine Bibliothek aus mutagenisierten ES-Zellklonen sollte, damit erfolgreich Mutationen in beliebigen Genen identifiziert werden können, saturiert sein, d.h. statistisch für jedes Gen eine bis mehrere Mutanten enthalten. Wählt man aber eine mittlere Mutationsfrequenz, so hat dies zur Folge, dass eine solche Bibliothek sehr groß sein müsste. Um die Anzahl der Proben - und damit den Arbeitsaufwand - zu reduzieren, könnte man die mutagenisierten Zellen derart über die einzelnen Positionen im Multititerplattenformat verteilen, dass jede Probe mehrere Klone enthielte. Dies hingegen hieße, dass Mutationen in gegen Wildtyp verdünnten ("gepoolten") Proben detektiert werden

müssten, was entsprechende Anforderungen an ein mögliches *screening*-Verfahren stellen würde.

TMP/UV

Sensitiver als die Detektion von Punktmutationen vor einem Wildtyp-Hintergrund könnte die Suche nach Deletionen sein. Zudem würden Deletionen Genfunktionen mit höherer Wahrscheinlichkeit auslöschen. Neben der Röntgenbestrahlung ist Chlorambucil als Deletionsmutagen bekannt. Allerdings überspannen die mit Chlorambucil ausgelösten Deletionen meist mehrere bis viele Loci, was zu unerwünschten komplexen Phänotypen führen kann (Russell et al., 1989). Gesucht ist vielmehr ein Mutagen, das in ES-Zellen der Maus Deletionen in der Größenordnung von etwa einer Kilobase induziert. Ein Kandidat dafür ist 4,5',8-Trimethylpsoralen (TMP, Abb. 1.4 B), ein Mutagen, das in dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* in ca. der Hälfte aller Fälle solch kleine genomische Deletionen auslöst (Gengyo-Ando und Mitani, 2000; Lee et al., 1994; Yandell et al., 1994). TMP ist als Mutagen für die Maus nicht etabliert, wird jedoch in *C. elegans* erfolgreich für Gengetriebene Ansätze zur Gendisruption verwendet. Da die Größe der Deletionen in einem PCR-kompatiblen Bereich liegt, können positive Proben detektiert werden durch Ampifizierung mit flankierenden Primern. PCR-Fragmente, die eine genomische Deletion überbrücken, sind dabei gegenüber den längeren Wildtyp-Sequenzen ab einer bestimmten Deletionsgröße deutlich im Vorteil, so dass Mutanten auch in starker Verdünnung gegen Wildtyp noch klare Signale liefern (Jansen et al., 1997; Liu et al., 1999). Eine solche Strategie wäre auch für eine Bibliothek entsprechend mutagenisierter ES-Zellen denkbar. TMP ist ein tricyklischer Heteroaromat, der zwischen die Basen doppelsträngiger DNA interkalieren kann. Das Molekül ist in bezug auf die Reaktion mit DNA bifunktionell und lichtabhängig: bei sukzessiver Absorption zweier Photonen des Wellenbereichs zwischen 320 und 400nm (Nah-UV - DNA ist hier transparent) bilden sich kovalente Diaddukte an Pyrimidinbasen gegenüberliegender DNA-Stränge (Cimino et al., 1985). Die Kinetik dieser Quervernetzung (*cross-linking*) wird im Wesentlichen bestimmt durch die Gleichgewichtslage der DNA-Interkalierung (die Dissoziationskonstante von TMP und DNA ist klein) und die Effizienz der ersten Photozykloaddition (Isaacs et al., 1977). Die Diadduktbildung ist dann eine reine Folgereaktion, die für die Doppelstrangvernetzung nur limitierend wird, wenn die aktivierenden Lichtpulse extrem kurz gehalten werden (Johnston et al., 1977). In der Zellkultur kann man die Quervernetzung durch Vorinkubation mit TMP und anschließender Bestrahlung mit einer Langwellen-UV-Quelle realisieren. Die Hydrophobizität von TMP ist hier eher ein Vorteil, denn Zellmembranen stellen dadurch keine Diffusionsbarriere dar (Cimino et al., 1985). Die Induktion von genomischen Deletionen *in vivo* ist ein sekundärer Effekt infolge fehlerhafter Reparatur der DNA-Modifizierungen in der Zelle: diese reagiert auf

die Doppelstrangverknüpfungen durch Aktivierung der *nucleotide-excision-repair*-Maschinerie (Op het Veld et al., 1997; Sancar und Sancar, 1988). Wohl dadurch, dass durch TMP *beide* DNA-Stränge kovalent modifiziert sind, kommt es - zumindest in *C. elegans* - zur Entstehung von Deletionen an diesen Stellen (Yandell et al., 1994). Angesichts der Erfolge mit der TMP/UV-Mutagenese in *C. elegans* wäre es wünschenswert, auch für die Maus ein Mutagen zur Verfügung zu haben, das mit hoher Spezifität kleine Deletionen im Genom auslöst.

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung eines effizienten Gengetriebenen Ansatzes zur Generierung von Mausmutanten aus chemisch mutagenisierten ES-Zellen. In Abb. 1.5 ist dafür ein Flusschema dargestellt: zunächst ist es erforderlich, die chemische Mutagenese von ES-Zellen an sich soweit kontrollieren zu können, dass eine Bibliothek nach definierten Parametern (Auswahl und Charakteristika eines geeigneten Mutagens, Mutationsfrequenz, erforderliche Größe der Klonkollektion) erstellt werden kann. Die folgende Klonbanketablierung besteht in der Verteilung mutagenisierter ES-Zellklone in die einzelnen Positionen von Multititerplatten mit anschließender Expansion und Lagerung in gefrorenem Zustand. Die Überführung der ES-Zellen in Multititerplatten kann durch Picken einzelner Kolonien aus einer Kulturschale geschehen oder durch Ausplattieren einer ES-Zellsuspension in geeigneter Verdünnung. Bei der letzteren Variante würde man in Kauf nehmen, dass sich jeweils mehrere Klone eine Multititerplattenposition teilen. Dies würde einen gewissen

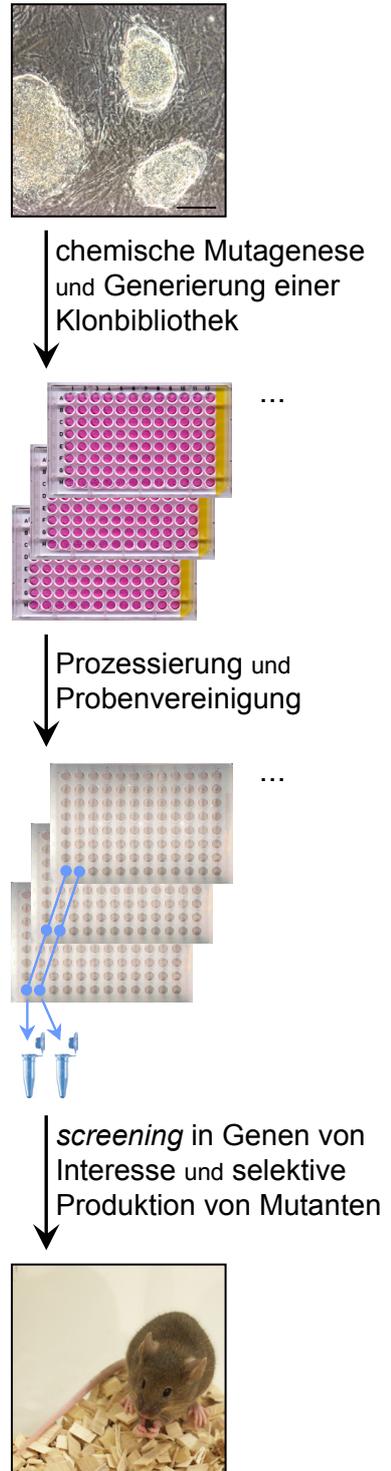


Abb. 1.5 Flusschema zur vorliegenden Arbeit. ES-Zellen (Bild oben) werden chemisch mutagenisiert und zur Expansion in Multititerplatten überführt (zweites Bild von oben). Eine Replika dieser einzufrierenden Klonbibliothek wird verwendet für die Isolation genomischer DNA oder RNA. Diese Proben können dann PCR-basiert durchmustert werden nach Mutationen in Genen von Interesse (ein Gen pro Screen). Nach Möglichkeit erlaubt das gewählte *screening*-Verfahren die Vereinigung mehrerer Proben, um Arbeitsaufwand und Kosten zu reduzieren (zweites Bild von unten). Klone positiver Positionen können dann selektiv aus den eingefrorenen ES-Zellproben isoliert und zur Produktion von Mausmutanten herangezogen werden (letztes Bild).

Anspruch an die Sensitivität der geplanten *screening*-Methode stellen, welche zuvor zu erarbeiten ist. Im Prinzip ist eine Durchmusterung nach Mutationen auf genomischer, Transkript- oder auch auf Proteinebene denkbar. Ein gutes Durchmusterungsverfahren ist sensitiv, einfach und robust. Aus einer Replika der einzufrierenden ES-Zell-Bibliothek ist dann genetisches Material (DNA oder RNA) zu isolieren und ggf. weiter aufzuarbeiten (z.B. durch reverse Transkription isolierter mRNA). Genomische DNA als Ausgangsmaterial hat den Vorteil, dass sie recht stabil ist, während revers transkribierte RNA die Möglichkeit bietet, mit einer einzigen PCR-Reaktion den gesamten kodierenden Bereich eines gegebenen Gens zu erfassen. Neben der angedeuteten Vereinigung von Proben auf Klonebene zur Reduzierung des Arbeits- und Kostenaufwands wäre an dieser Stelle auch die Kombination von DNA- bzw. cDNA-Proben möglich - wieder unter der Voraussetzung, dass das geplante *screening*-Verfahren dazu sensitiv genug ist. Schließlich ist die Machbarkeit des Ansatzes unter Beweis zu stellen durch die erfolgreiche Detektion von Mutationen in einer genspezifischen Durchmusterung der Klonkollektion, die anschließende Isolation der mutationspositiven Klone aus der eingefrorenen Zellbibliothek und die Generierung von Mausmutanten daraus.