

# III

## ERGEBNISSE

### 3.1 Charakterisierung der Mutagene TMP und ENU

Für die Erstellung einer Bibliothek mutagenbehandelter ES-Zellen ist es notwendig, einige relevante Parameter im Zusammenhang mit der chemischen Mutagenese kontrollieren zu können bzw. zu kennen. Dies sind insbesondere das Ausmaß des induzierten Zelltods in Abhängigkeit von der Mutagendosis, die zugehörigen Mutationsraten und das Spektrum der ausgelösten Mutationen.

#### 3.1.1 Überlebensraten

Durch die Behandlung von Zellen mit einem Mutagen werden unweigerlich auch Läsionen ausgelöst, die den Zelltod zur Folge haben. Ein effektives Mutagen zeichnet sich dabei dadurch aus, dass die Ursache des Zelltods in den DNA-strukturverändernden Eigenschaften und nicht in einer allgemeinen Toxizität des Stoffes liegt. Praktisch ist die Aufnahme von Dosis-Effekt-Kurven wichtig, um den Anteil überlebender Zellen nach chemischer Mutagenese abschätzen zu können. Im Falle von TMP können einerseits die Mutagenkonzentration und andererseits die applizierte UV-Dosis die Überlebensraten bestimmen, mit ENU hingegen können die Konzentration und die Expositionsdauer variiert werden. Für TMP gab es zu Beginn dieser Arbeit keine veröffentlichten Daten in dieser Hinsicht, für ENU waren bereits ES-Zell-Überlebensraten in Abhängigkeit von der Mutagendosis publiziert (Chen et al., 2000), jedoch sind diese u.a. abhängig von der verwendeten Zelllinie (Daten nicht gezeigt) und damit nicht einfach übertragbar.

Überlebensratenexperimente wurden durchgeführt durch Behandlung einer ES-Zellsuspension eines Titers von  $10^5$  bis  $10^6$  Zellen pro ml in verschiedenen Ansätzen unter Variation der o.g. Bedingungen. Nach chemischer Mutagenese gemäß Abschnitt 2.1.2 wurden davon für jede Probe standardmäßig 50.000 Zellen auf 9cm-Schalen mit *feeder layer* ausplattiert und kultiviert. Der Anteil überlebender Zellen wurde bestimmt durch Quantifizierung der wachsenden ES-Zellkolonien drei Tage nach Mutagenbehandlung. Überlebensraten wurden definiert als das Verhältnis zwischen der Koloniezahl auf einer gegebenen Platte und der für die unbehandelte Probe. Die Nullkontrolle ist unerlässlich, weil die Plattierungseffizienz typischerweise deutlich unter 100% liegt. Diese ist hier definiert durch die Anzahl an Kolonien auf der Kontrollplatte geteilt durch 50.000.

## Vorversuche

Bei der Ausplattierung vereinzelter Zellen ist es möglich, dass diese aggregieren, bevor sie auf dem *feeder layer* adhären. Dadurch würde man falsche Werte für die Überlebensraten erhalten, weil zwei oder mehr aggregierte, die Behandlung überlebende Zellen als eine Kolonie gezählt würden. Aus diesem Grund ist es wichtig sicherzustellen, dass die Zellen vor dem Ausplattieren gut vereinzelt sind und sich der Zelltitel in einem Bereich bewegt, in dem der Aggregationseffekt vernachlässigbar ist. Abb. 3.1 A zeigt dazu einen Kontrollversuch, in dem die Anzahl ausplattierter Zellen variiert und anschließend die Plattierungseffizienz bestimmt wurde: diese bleibt bis zu 50.000 ausplattierten Zellen konstant und fällt danach *scheinbar* ab, vermutlich aufgrund des genannten Effekts. Bei der Ausplattierung von 50.000 Zellen treten demnach keine Verfälschungen der Überlebensraten auf.

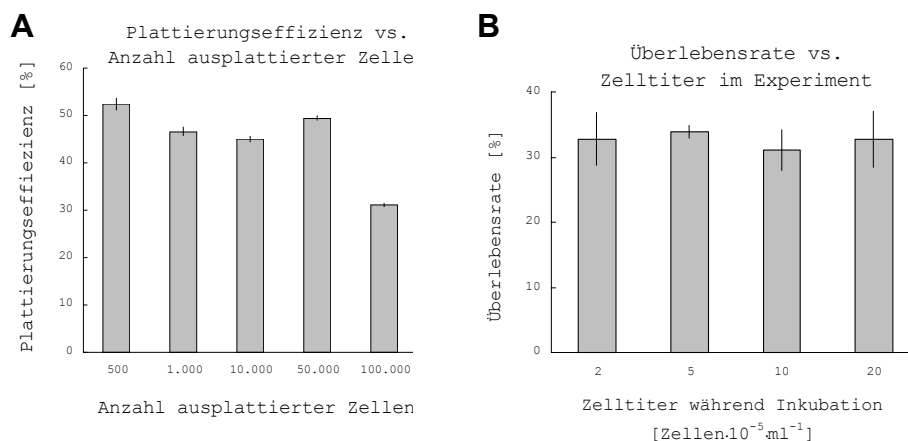


Abb. 3.1 Vorversuche zur chemischen Mutagenese von ES-Zellen. A: Apparente Plattierungseffizienz unbehandelter ES-Zellen in Abhängigkeit von der Anzahl ausplattierter Zellen zur Zählung koloniebildender Einheiten. B: Überlebensraten in Abhängigkeit vom Zelltitel während der Mutagenese. Die ES-Zellen wurden mit 0,1µM TMP vorinkubiert und mit 0,5 mW/cm<sup>2</sup> Nah-UV-Licht für 60 Sekunden bestrahlt. Die Fehlerbalken sind Standardfehler aus jeweils drei Parallelbestimmungen.

Abb. 3.1 B zeigt Überlebensraten für gleichartig mutagenisierte Proben mit der Ausnahme, dass der Zelltitel im Experiment verändert wurde. Ziel war es hier auszuschließen, dass die ES-Zellen durch variable Zellkonzentrationen von Experiment zu Experiment unterschiedlich stark mutagenisiert werden, z.B. weil durch zuviel genomische DNA in der Probe die Mutagenmoleküle den Mutagen-DNA-Sättigungsgrad limitieren. Die Konstanz der Überlebensrate bei mittleren Dosen an TMP und UV-Licht über alle gewählten Zelltitel zeigt aber, dass mit den üblicherweise verwendeten Konzentrationen von 10<sup>5</sup> bis 10<sup>6</sup> Zellen pro ml der Arbeitsbereich getroffen ist.

## Überlebensraten mit TMP/UV

Die drei Parameter TMP-Konzentration, UV-Intensität und UV-Expositionsdauer wurden einzeln in drei Versuchsserien variiert, jeweils unter Konstanthaltung der beiden anderen Größen in mittleren Bereichen. Die Diagramme der drei Serien sind in Abb. 3.2 B-D gezeigt. Die Überlebensraten wurden jeweils bezogen auf eine -TMP/-UV-Mangelkontrollprobe. Abb. 3.2 A zeigt, dass TMP oder Nah-UV-Licht allein keinen Einfluss auf die Überlebensraten ausüben:

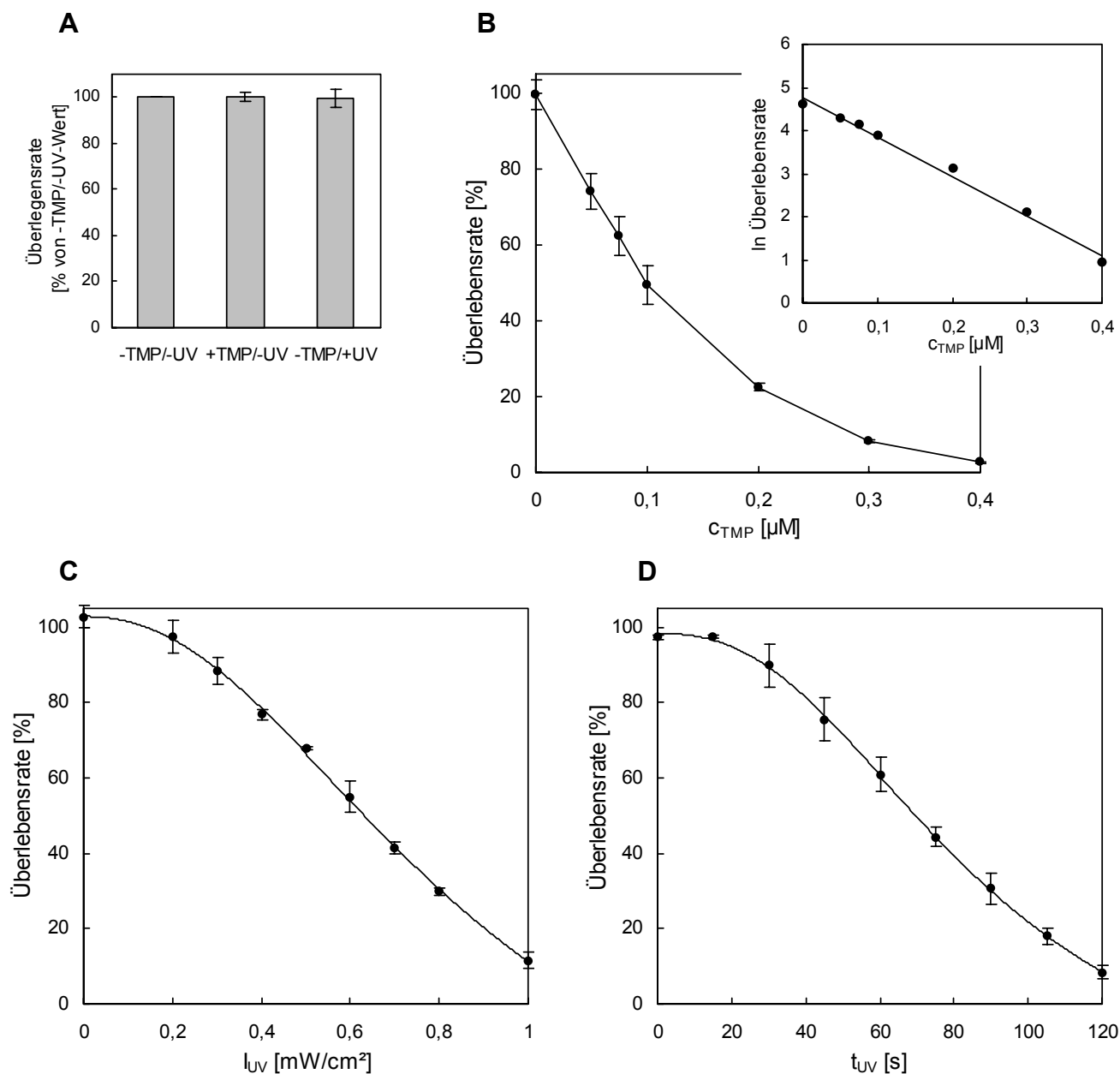


Abb. 3.2 ES-Zell-Überlebensraten mit TMP/UV-Behandlung. A: TMP allein ( $0,1\mu\text{M}$ ) oder UV-Exposition allein ( $0,5\text{ mW}/\text{cm}^2$  für 60s) lösen keinen Zelltod aus. B: Die Überlebensraten fallen bei konstanter UV-Bestrahlung ( $0,5\text{ mW}/\text{cm}^2$  für 60s) und steigender TMP-Konzentration exponentiell ab, wie die Linearisierung durch halblogarithmische Auftragung der Daten zeigt. Bei konstanter TMP-Konzentration ( $0,1\mu\text{M}$ ) unter Variation der UV-Dosis hingegen erhält man einen sigmoidalen Verlauf der Kurve. C: Veränderung der UV-Intensität (Expositionsdauer konstant bei 60s). D: Variation der Expositionsdauer (Intensität konstant bei  $0,5\text{mW}/\text{cm}^2$ ). Die Datenpunkte sind Mittelwerte aus jeweils drei unabhängigen Experimenten. Balken: Standardfehler.

Die durch die Mutagenbehandlung ausgelösten Überlebensraten waren gut reproduzierbar, wie es die Standardfehlerbalken in den Auftragungen wiedergeben. Die Tatsache, dass sich eine Verminderung der Überlebensraten sowohl mit zunehmenden TMP-Konzentrationen als auch mit ansteigenden UV-Dosen erzielen ließ, ermöglichte eine Mutagenisierung mit TMP/UV für Zwecke einer Klonbankerstellung wahlweise unter Hoch-TMP- oder Hoch-UV-Bedingungen. Die Ähnlichkeit der Kurvenverläufe in Abb. 3.2 C und D legt dabei nahe, dass es bei der UV-Bestrahlung auf die Gesamtzahl eintreffender Photonen ankommt (Photonenfluss) und nicht auf deren Dichte (Photonenfluss); daher könnte man sich mit der Absicht der Mutagenisierung unter Hoch-UV-Bedingungen für eine der beiden Varianten entscheiden.

### Überlebensraten mit ENU

Bei der Etablierung der Mutagenisierungsbedingungen mit ENU wurde auf die systematische Variation der Inkubationsdauer verzichtet, vielmehr wurde mit 90min ein Mittelwert aus Literaturdaten gebildet (nach Chen et al., 2000). Da die Reaktion von ENU mit DNA lichtunabhängig ist, beschränkt sich die Bestimmung des Arbeitsbereichs auf die Aufnahme von Überlebensraten in Abhängigkeit von der ENU-Konzentration:

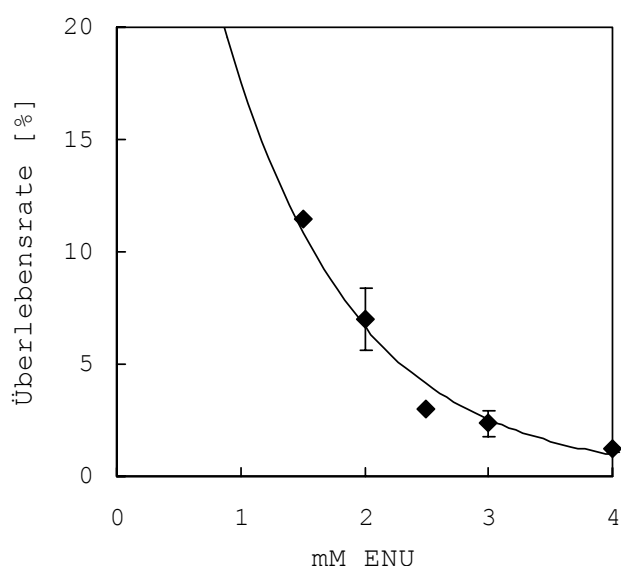


Abb. 3.3 Überlebensraten nach ENU-Behandlung. Die Datenpunkte sind Einzel- (für 1,5 und 2,5mM) bzw. Doppelbestimmungen (für 2, 3 und 4mM) aus insgesamt drei unabhängigen Experimenten, in denen gleichzeitig die zugehörigen Mutationsfrequenzen bestimmt wurden (siehe nächster Abschnitt).

Ähnlich wie bei der Veränderung der TMP-Konzentration, kann der Kurvenverlauf durch einen monoexponentiellen Abfall beschrieben werden (Regressionskurve in Abb. 3.3). Die Werte waren ähnlich reproduzierbar wie mit TMP; über einen Zeitraum von mehreren Monaten jedoch schienen die ES-Zellen sensitiver zu werden gegenüber der Behandlung mit ENU. Das deutete auf einen feuchtigkeitsinduzierten Zerfall des Mutagens hin trotz Lagerung der Trockensubstanz bei  $-20^{\circ}\text{C}$  auf Silicagel, der die Mutagenität nach den Ausführungen im Einleitungsteil scheinbar erhöhen könnte. Dieser Effekt wurde weitgehend ignoriert

angesichts der Möglichkeit, bei jeder Mutagenisierung von ES-Zellen die zugehörige Mutationsfrequenz messen zu können.

### 3.1.2 Mutationsfrequenzen

Mutationsfrequenzen können, wie im Einleitungsteil 1.4 erläutert, mit Hilfe des 6-TG-vermittelten Selektionstests gemessen werden (Hooper et al., 1987). Dazu ist nach chemischer Mutagenese und vor Beginn der Selektion zunächst eine etwa zehntägige Inkubationsphase nötig, in der funktionelles HPRT-Enzym in nunmehr mutierten Klonen degradiert und durch Zellteilung ausgedünnt werden kann, um falsch negative Ergebnisse zu verhindern. In dieser "Abklingphase" teilen sich natürlich alle Zellen im Test mehrfach. Um Redundanz im Endergebnis zu vermeiden, wurden nach Mutagenbehandlung zunächst sehr große Mengen an überlebenden ES-Zellen (bis  $10^6$ ) auf 15cm-Schalen ausplattiert. Bis zum Beginn der 6-TG-Selektion wurden die Zellen i.d.R. zweimal umplattiert, wobei deren Anzahl dabei jeweils um etwa eine Größenordnung vermindert wurde - es wurden sozusagen Stichproben gezogen, in denen die Klonredundanz im Vergleich zur Ausgangspopulation verringert sein sollte. Die Selektion mit  $10\mu\text{M}$  6-TG wurde einen Tag nach der zweiten Umplattierung initiiert - etwa zehn Tage nach Mutagenbehandlung. Weitere zehn Tage später wurden die resistenten Kolonien auf der Selektionsschale quantifiziert. Die Mutationsfrequenz ergab sich als deren Anzahl dividiert durch die Anzahl angewachsener Kolonien zu Beginn der Selektion. Die letzte Zahl wurde indirekt mit Hilfe einer weiteren Kulturschale bestimmt, auf der ein definiertes Aliquot der zu selektierenden Zellen ausplattiert und in Abwesenheit von 6-Thioguanin nach drei Tagen in Kolonieform ausgezählt wurde. Die Gesamtzahl 6-TG-selektierter Kolonien konnte dann durch Hochrechnung von dieser Kontrollplatte aus einfach ermittelt werden. Des Weiteren wurde in jedem Experiment eine Nullkontrolle mit nichtmutagenisierten ES-Zellen mitgeführt, um die erhaltenen Werte um die Rate an spontan auftretenden funktionellen Mutationen in *Hprt* korrigieren zu können.

#### **Mutationsfrequenzen mit TMP/UV**

Die mit TMP und UV-Bestrahlung erhaltenen Werte lagen deutlich unter den mit den Punktmutagenen Ethylmethansulfonat (EMS) und ENU erzielbaren Mutationsraten (Munroe et al., 2000; Chen et al., 2000). Mutationsfrequenzen, die signifikant über den spontanen Raten lagen, ließen sich nur unter Hoch-TMP- bzw. Hoch-UV-Bedingungen erreichen. Tab. 3.1 zeigt Werte aus vier unabhängigen Versuchen:

Überlebensrate [%]	Anzahl selektierter Kolonien	Anzahl 6-TG-resistenter Kolonien		MF x 10 <sup>5</sup>
		+ TMP/UV	- TMP/UV	
25	160,000	9	2	4.4
9.5	120,000	5	0	4.2
3	268,000	8	1	2.6
12.5	287,000	10	2	2.8
				3.5 ± 0.5

Tab. 3.1 Mutationsfrequenzen mit TMP/UV, basierend auf der Selektion mit 6-TG. Die ersten drei Reihen stellen Ergebnisse nach Mutagenisierung mit hohen TMP-Konzentrationen dar (0,2 bis 0,3µM, UV: 0,5 mW/cm<sup>2</sup> für 60s). Die Werte der letzten Zeile stammen aus einer Behandlung unter Hoch-UV-Bedingungen (0,9 mW/cm<sup>2</sup> für 60s, 0,075µM TMP). Die Mutationsfrequenzen (letzte Spalte) sind korrigiert durch Raten spontan auftretender 6-TG-Resistenzen. Unten rechts: Mittelwert ± Standardfehler.

Offensichtlich also lassen sich mit TMP/UV in ES-Zellen funktionell wirksame Mutationen auslösen. Die über die vier Experimente gemittelte Mutationsfrequenz von  $3,5 \cdot 10^{-5}$  entspricht allerdings der Auslösung lediglich einer funktionellen Mutation unter knapp 30.000 überlebenden Zellen. Durch weitere Steigerung der TMP/UV-Dosis ließen sich keine signifikant höheren Mutationsfrequenzen erzielen. Vielmehr wurde es dann zunehmend schwierig, die überlebenden Zellen zu kultivieren, denn deren Wachstumsgeschwindigkeit verlangsamte sich und die ES-Zellkolonien nahmen zunehmend anomale Gestalten an.

### Mutationsfrequenzen mit ENU

Die maximalen mit ENU erhaltenen Mutationsfrequenzen lagen über mehr als eine Größenordnung über den mit TMP/UV erzielbaren Werten und zeigten im Gegensatz auch eine klare Abhängigkeit von der Mutagenkonzentration:

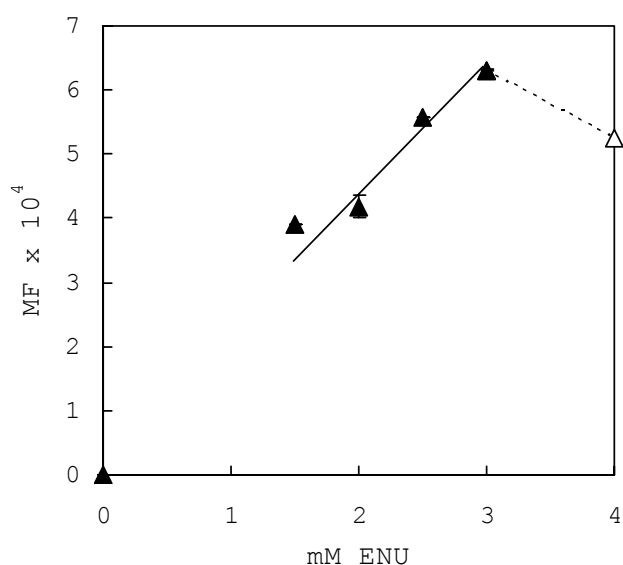


Abb. 3.4 Mutationsfrequenzen in Abhängigkeit von der ENU-Konzentration. Die Daten stammen aus denselben Proben, für die in Abb. 3.3 die Todesraten aufgetragen sind.

Die Mutationsraten stiegen bis 3mM ENU linear mit der Mutagenkonzentration an, bei weiterer Erhöhung der Dosis schienen sie wieder abzufallen. Dies ist mit hoher

Wahrscheinlichkeit ein Artefakt, bedingt durch die angesprochenen schlechten Wachstumseigenschaften überlebender ES-Zellen nach extremer Mutagenisierung: es ist anzunehmen, dass ein Teil der 6-TG-resistenten Klone bei 4mM ENU nach den zehn Tagen der Kultivierung nicht die erforderliche Mindestgröße erreichte, um makroskopisch als Kolonie identifiziert zu werden. Die maximale Mutationsrate bei 3mM ENU entspricht etwa einer funktionellen *Hprt*-Mutation in 1600 mutagenisierten Klonen und liegt damit in der gleichen Größenordnung wie der in Chen et al. (2000) publizierte Wert von ca. 1 zu 1000 bei einer Überlebensrate von unter einem Prozent.

Durch die klaren Beziehungen zwischen Überlebensraten, Mutationsfrequenz und ENU-Konzentration war es nun möglich, durch Wahl einer entsprechenden Mutagendosis eine gewünschte Mutationsrate einzustellen. Die Kenntnis der zu erwartenden Überlebensrate ist vor allem beim Ausplattieren frisch mutagenisierter Zellen mit dem Ziel definierter Koloniedichten von Wert.

### 3.1.3 Mutationspektren

Der 6-TG-Selektionstest ermöglichte die Isolation von ES-Zellklonen mit Verlust der HPRT-Aktivität. Es ist naheliegend anzunehmen, dass in den meisten Fällen Mutationen im *Hprt*-Gen selbst, und zwar vorzugsweise in der proteinkodierenden Sequenz, den Funktionsdefekt auslösen. Um Aufschluss über die Natur der induzierten Mutationen zu erhalten, wurden sowohl für TMP als auch für ENU eine Reihe 6-TG-resistenter ES-Zellkolonien gepickt und expandiert für die Charakterisierung der zugrundeliegenden Defekte.

#### **Mutationsspektrum mit TMP**

TMP galt nach den Ausführungen im Einleitungsteil 1.4 als potentielles Deletionsmutagen für ES-Zellen der Maus. Für die Detektion von Deletionen auf genomischer Ebene wurde daher aus den nach TMP/UV-Mutagenese 6-TG-resistenten Klonen DNA isoliert und verwendet als Templat für 21 unterschiedliche PCR-Reaktionen, deren Zielsequenzen sich in systematischer Weise über den *Hprt*-Locus erstreckten (siehe Primerliste im Anhang). Größtenteils wurden die Oligonukleotide dafür auf der Grundlage der bekannten Mausgenomsequenz (<http://www.ensembl.org/>; Hubbard et al., 2002) erstellt. Da diese jedoch zu der Zeit, in der die Experimente stattfanden, noch lückenhaft war, wurden auch einige publizierte Marker der DXMit-Serie übernommen (Dietrich et al., 1996), deren relative Lage zu *Hprt* anfangs nicht allzu präzise definiert war. Aus dem gleichen Grund war es nicht möglich, PCR-Fragmente für die ersten Introns von *Hprt* zu bestimmen.

Für die 21 PCR-Reaktionen wurden 27 6-TG-resistente Klone herangezogen. Der reproduzierbare Misserfolg einer gegebenen Amplifikation wurde dabei als Deletion in diesem Bereich gewertet. Es stelle sich nach diesen Versuchen und im Weiteren heraus,

dass einige Klone redundant waren, was die Gesamtzahl unabhängiger Mutationen auf 17 reduzierte. Für dieses nichtredundante Set sind die Ergebnisse in Abb. 3.5 zusammengefasst.

**A**

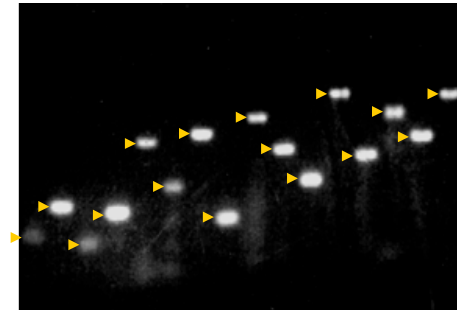
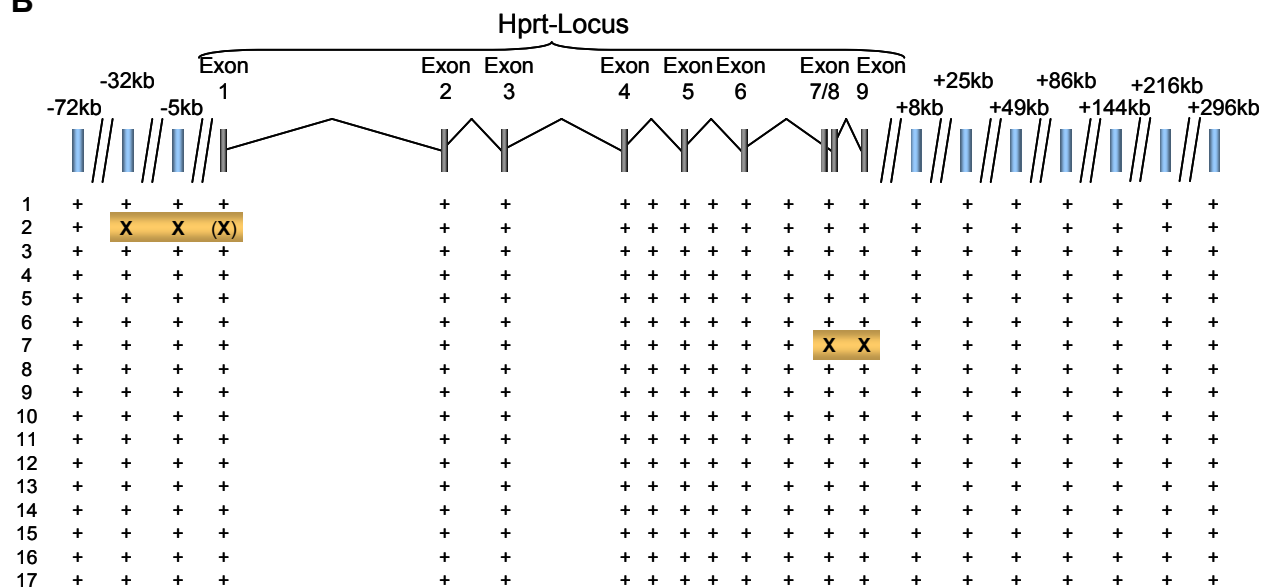


Abb. 3.5 PCR-vermittelte Deletionsdetektion in 6-TG-resistenten ES-Zellklonen nach Mutagenese mit TMP/UV. A: Gezeigt sind 16 von anfangs mehr als 25 verwendeten Fragmenten über den *Hprt*-Locus (teilweise nicht in Primerliste im Anhang aufgenommen), hier amplifiziert auf Wildtyp-Templat und aufgetrennt durch Gelelektrophorese (1,5% Agarose). Mit Hilfe der Kenntnis über die Sollgrößen der Amplifikate (Pfeile, Größenstandard nicht gezeigt) konnten auch schwache Signale als positiv gewertet, d.h. Zweifelsfälle entschieden werden. B: Zusammenfassung der Ergebnisse für ein Set von 17 unabhängigen Klonen. Positive Amplifikationen sind mit "+" gekennzeichnet, negative mit orange unterlegten "X" - in zwei Fällen konnten genomische Deletionen nachgewiesen werden.

**B**



In zwei von 17 Fällen wurden danach genomische Deletionen ausgelöst. Falsch negative Ergebnisse können hier nicht ausgeschlossen werden, weil die Abdeckung des Locus lückenhaft - und die Auflösung der Deletionsdetektion durch den Abstand der amplifizierten Sequenzen zueinander limitiert ist. Der *Hprt*-Locus hat eine Größe von knapp 35kb. Weitere Erkenntnisse in dieser Hinsicht können aber auf Transkriptebene gewonnen werden. Abb. 3.6 zeigt RT-PCRs für dieselben 17 ES-Zellklone mit einem 593bp-Amplikon, das innerhalb der proteinkodierenden Sequenz von *Hprt* liegt.



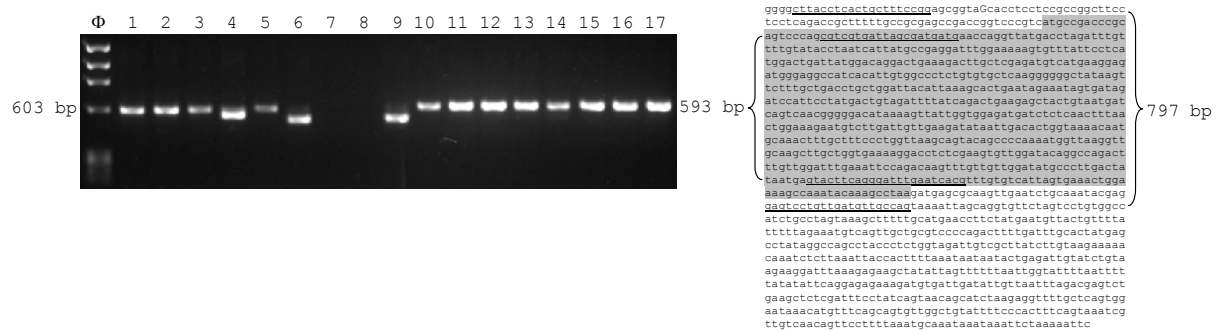


Abb. 3.6 Amplifizierung von *Hprt* mit RT-PCR in 17 6-TG<sup>R</sup>-Klonen nach TMP/UV-Behandlung. Rechts: *Hprt* cDNA-Sequenz mit zwei häufig verwendeten Primerpaaren (593bp: *Hprt* CDS, 797bp: *Hprt* UTR). Der *forward*-Primer des für die RT-PCR-Reaktionen links verwendeten 593bp-Amplikons verläuft über die Exon1/Exon2-Grenze, der *reverse*-Primer über den Exon9/Exon8-Übergang. Grau unterlegt ist die proteinkodierende Sequenz. Links: Agarose-Gelelektrophorese der entsprechenden RT-PCRs. Die 603bp-Bande des  $\Phi$ -Größenstandards ist gekennzeichnet.

Die Mehrheit der Klone ergab positive Amplifikationen entsprechend der *Hprt*-Wildtyp-Länge. Klone 7 und 8 waren nicht zu amplifizieren und Klone 4, 6 und 9 zeigten verkürzte Fragmentlängen. Nach Abb. 3.5 wäre zu erwarten gewesen, dass die RT-PCR mit Klon 2 negativ ausfällt, obwohl die Ergebnisse für Exon 1 auf genomischer Ebene nicht konsistent waren (Abb. 3.5: X in Klammern). Weitere Tests durch alternative Kombination der in Abb. 3.6 gezeigten Primer miteinander zeigten aber, dass Klon 2 einen Deletionsdefekt in der 5'-untranslatierten Region haben muss, denn der *forward*-Primer des Paares *Hprt* UTR funktionierte hier nicht (Daten nicht gezeigt). Dass die RT-PCR mit den Oligonukleotiden *Hprt* CDS für Klon 7 negativ ausfällt, war zu erwarten, denn der *reverse*-Primer liegt in den auf genomischer Ebene deletierten Exons (vg. Abb. 3.5). Es wurde nicht weiterverfolgt, ob in diesem Fall in Wirklichkeit ein trunkiertes *Hprt*-Transkript vorliegt.

Um die anderen Mutationen auf Transkriptebene aufzuklären, wurden die in Abb. 3.6 erhaltenen Fragmente gereinigt und in beide Richtungen sequenziert (Abb. 3.7). Mit den Sequenzierungsdaten ergänzt durch die PCRs auf Transkript- bzw. genomischer Ebene konnte letztlich für alle 17 Klone ein Defekt identifiziert werden. Das Mutationsspektrum ist in der Tabelle von Abb. 3.7 zusammengestellt.

	Klonnr.	Art der Mutation	Position in CDS	Effekt auf Transkriptebene
	1	Transversion AT/TA	205	AAG (K) → TAG (stop)
	2	genomische Deletion	-	Läsion in 5' UTR
	3	(unbekannt)	-	Läsion in 5' UTR
	4	Splice-Mutation	-	Exon 7 deletiert
	5	Transversion TA/GC	398	GTT (V) → GGT (G)
	6	Splice-Mutation	-	Exon 6 deletiert
	7	genomische Deletion	-	kein RT-PCR-Produkt
	8	(unbekannt)	-	kein RT-PCR-Produkt
	9	Splice-Mutation	-	Exon 6 deletiert
	10	Transversion TA/AT	82	TAT (Y) → AAT (N)
	11	Transition TA/CG	146	CTT (L) → CCT (P)
	12	Transversion TA/AT	23	GTC (V) → GAC (D)
	13	Transversion AT/TA	239	GAT (D) → GTT (V)
	14	Verschiebung des Leserahmens	218	Einzelbasendeletion (AT)
	15	Transversion TA/AT	585	TAT (Y) → TAA (stop)
	16	Transversion TA/AT	318	TGT (C) → TGA (stop)
	17	Verschiebung des Leserahmens	257/258	Einzelbaseninsertion (TA)

Punktmutationen in CDS:	8/17 = 47%, diese betreffen zu 100% AT-Basenpaare, 88% sind Transversionen
Splice-Mutationen:	3/17 = 18%
genomische Deletionen:	2/17 = 12%
Verschiebung des Leserahmens:	2/17 = 12%
andere / unbekannt:	2/17 = 12%

Abb. 3.7 Mutationsspektrum von TMP/UV in ES-Zellen. Links: Sequenzierung von RT-PCR-Produkten 6-TG-resistenter Klone. Gezeigt ist ein Ausschnitt der Hprt-Sequenz von Klon 1 mit Basensubstitution (eingekreist: TA → AT), die sowohl in *forward*- (oberes Spektrum) als auch in *reverse*-Richtung (unten) detektiert wurde. Tabelle: Zusammenstellung der Hprt-Läsionen für ein nichtredundantes Set an TMP/UV-behandelten ES-Zellklonen. Die Nummerierung der Klone entspricht der in Abb. 3.5 und 3.6.

Etwa die Hälfte der Läsionen waren demnach Punktmutationen innerhalb der kodierenden Sequenz von Hprt. In allen Fällen waren dabei AT-Basenpaare betroffen. 7 von 8 dieser Basensubstitutionen wiederum waren Transversionen. Die partiellen Deletionen auf Transkriptebene für Klone 4, 6 und 9 (Abb. 3.6) entpuppten sich als Deletionen einzelner Exons. Da die betroffenen Abschnitte auf genomischer Ebene nachweisbar sind (Abb. 3.5), ist anzunehmen, dass es sich dabei um Spleißmutationen handelt - möglicherweise Punktmutationen auf genomischer Ebene, die zum Überspringen einzelner Exons (*exon skipping*) beim Spleißen der Prä-mRNA führen. Entgegen der Erwartungen stellen eindeutig identifizierte genomische Deletionen lediglich 12% aller Mutationen dar, wobei für Klon Nr. 3 und 8 kleinere genomische Deletionen als Ursache für die Beobachtungen auf cDNA-Ebene nicht ausgeschlossen werden können.

Als genereller Punkt bei der Interpretation von Mutationsspektren, die auf funktioneller Negativselektion wie hier mit 6-Thioguanin beruhen, gilt, dass Mutationen mit potenziell besonders gravierenden Folgen für die Funktion des Proteins (Deletionen, *nonsense*-Mutationen) gegenüber den übrigen Basensubstitutionen überrepräsentiert sein können. Die konstitutive Deletion einzelner Exons in der mRNA dürfte in den meisten Fällen zum Funktionsverlust führen, während hingegen mit Sicherheit ein Teil der induzierten Basensubstitutionen tolerabel - d.h. funktionell nicht selektierbar - ist.

## Mutationsspektrum mit ENU

Für das als Punktmutagen etablierte ENU wurde auf die Charakterisierung 6-TG-resistenter Klone auf genomischer Ebene verzichtet. Ein Set von 35 Klonen, für die Hprt ausnahmslos mit RT-PCR amplifiziert werden konnte, wurde wie oben sequenziert. Zusätzlich konnten die meisten der gefundenen Mutationen durch denaturierende HPLC (siehe Ergebnisteil 3.2) bestätigt werden. Identische Mutationen, die aus demselben Selektionsexperiment stammen, wurden als redundant gewertet, was die Anzahl der Klone auf 31 reduzierte. Die Sequenzänderungen sind in Abb. 3.8 aufgelistet.

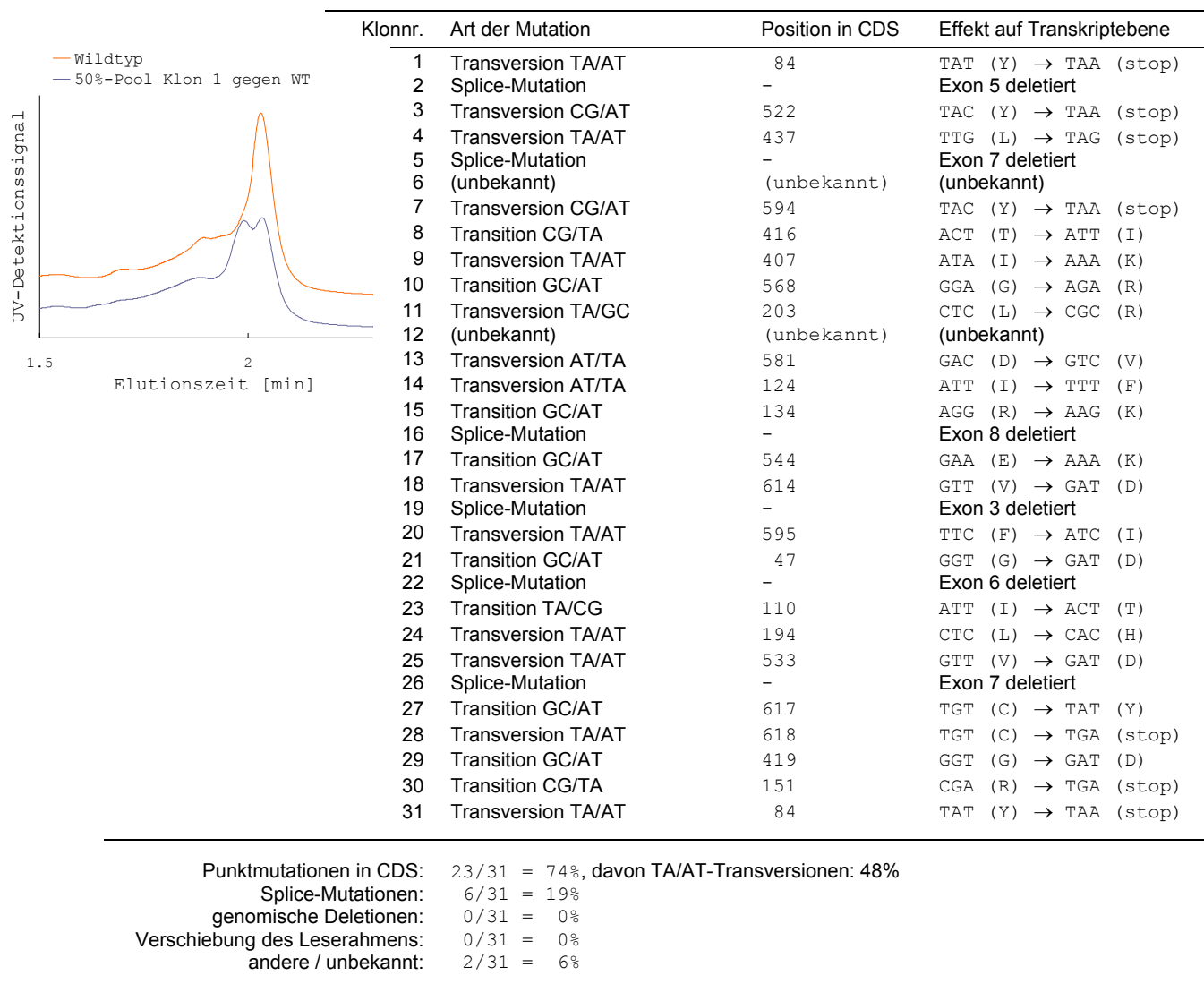


Abb. 3.8 Mutationsspektrum von ENU in ES-Zellen. Tabelle: 29 Mutationen eines nichtredundanten Sets von 31 6-TG-resistenten Klonen liegen in der proteinkodierenden Sequenz von Hprt. Die Klone stammen aus mehreren Selektionsexperimenten, so dass z.B. die Identität von Klon 5 und 26 ausgeschlossen werden kann. Diagramm oben links: Ausschnitt eines dHPLC-Spektrums für Klon 1 zur Kontrolle der Sequenzierungsergebnisse. Das Doppelmultiplex mit dem 50%-Pool der Mutante weist auf die Anwesenheit einer Mutation in diesem PCR-Fragment hin (Primerpaar: *Hprt* dHPLC 1, siehe Primerliste im Anhang).

Erwartungsgemäß stellen Basensubstitutionen den größten Teil der gefundenen Defekte dar. Darunter befinden sich aufgrund der funktionsgetriebenen 6-TG-Selektion auffällig viele *nonsense*-Mutationen, die zum vorzeitigen Translationsstopp führen. Der nach dem Austausch von Basen zweithäufigste Läsionstyp sind mit knapp 20% Spleißmutationen, die zur Deletion einzelner Exons auf Transkriptebene führen.

### 3.1.4 Zusammenfassung

Sowohl mit TMP/UV als auch mit ENU konnten reproduzierbare Überlebensratenkurven aufgenommen werden. Bestimmungen entsprechender Mutationsfrequenzen ergaben jedoch, dass die mit TMP/UV erzielbaren Werte nur etwa eine Größenordnung über der Rate spontan auftretender Mutationen liegen. Für Zwecke der Klonbanketablierung wäre dies nicht ausreichend, wie noch erläutert werden wird. Mit ENU hingegen können nahezu beliebige Mutationsraten erzielt werden - in definierter Abhängigkeit von der eingesetzten Dosis. Das mit ENU erhaltene Mutationsspektrum lässt sich homogen einteilen in Basensubstitutionen und Spleißmutationen. Die mit TMP/UV erhaltenen Mutationen hingegen sind relativ heterogen und reichen von Punktmutationen über Deletionen auf genomischer und mRNA-Ebene bis hin zu Verschiebungen des Leserahmens.

## 3.2 Strategien zur PCR-basierten Mutationsdetektion

Vor allem wegen des Problems der geringen Mutationsfrequenzen wurde an diesem Punkt die Arbeit mit TMP eingestellt. Die Möglichkeit, gewünschte Mutationsraten über die Mutagenkonzentration einzustellen sowie die Homogenität des Mutationsspektrums argumentierten für die Verwendung von ENU zur Generierung eines Archivs chemisch mutagenisierter ES-Zellklone. Die ENU-induzierten Mutationen waren fast ausnahmslos in der proteinkodierenden Sequenz von Hprt lokalisiert (Abb. 3.8). Diese Tatsache legte einen Ansatz zur Mutationsdetektion auf cDNA-Ebene nahe, wo mit einer einzelnen PCR-Reaktion der gesamte kodierende Bereich eines gegebenen Gens erfasst werden könnte. Auf Transkriptebene lässt sich das Mutationsspektrum einteilen in Basensubstitutionen und Spleißmutationen. Die mit Ergebnissen anderer Gruppen (Chen et al., 2000; in Justice et al., 1999) im Einklang stehende Beobachtung relativ hoher Spleißmutationsfrequenzen eröffnete die Möglichkeit, sich neben der Identifikation von Punktmutationen alternativ auf die Detektion von Exondeletionen zu konzentrieren.

Gesucht war daher ein PCR-basiertes Mutationsdetektionsverfahren, das in der Lage ist, entweder Punktmutationen oder interne Deletionen oder beides zu detektieren. Um eine ausreichende Wahrscheinlichkeit zu gewährleisten, für individuelle Gene Mutanten aus einer zu erstellenden Klonbibliothek zu isolieren, muss diese groß sein, d.h. sie wird eine Vielzahl

von Proben enthalten. Um Arbeitsaufwand und Kosten für die Durchmusterung zu reduzieren, ist daher ein *screening*-Verfahren wünschenswert, das die Vereinigung mehrerer Proben (*pooling*) gestattet. Die Sensitivität ist daher neben der schieren Detektierbarkeit unbekannter Mutationen das wichtigste Kriterium für eine in Frage kommende Durchmusterungsmethode. Weiterhin gilt für ein *screening* auf cDNA-Ebene: je größer die maximal analysierbare Fragmentlänge, in desto weniger Subfragmente muss die zu untersuchende Sequenz unterteilt werden. Schließlich entscheiden auch Charakteristika wie Einfachheit und Robustheit des Verfahrens sowie die laufenden Kosten pro Probe über die Wahl einer geeigneten Methode.

Es wurden verschiedene Ansätze mit Bezug auf die genannten Kriterien evaluiert. Im Vordergrund stand dabei die Sensitivität der Mutationsdetektion. Dazu wurden fünf gleichmäßig über den offenen Hprt-Leserahmen verteilte Modellmutationen aus der Liste in Abb. 3.8 ausgewählt - die drei Punktmutationen T84A, T203G und T407A sowie die Spleißmutanten  $\Delta$ Exon3 (Deletion der Basen 135-318 im ORF) und  $\Delta$ Exon6 (bp 403-485). Für jedes Verfahren wurden dann - i.d.R. auf cDNA-Ebene - Verdünnungsreihen der einzelnen Klone gegen Wildtyp erstellt, um die geplante *pooling*-Strategie für eine Klonarchivsdurchmusterung zu simulieren. Nach PCR-Amplifizierung von Hprt aus den Mutante-Wildtyp-cDNA-Gemischen erfolgte die Identifizierung der einzelnen Mutationen in allen Fällen ohne Optimierung der Detektion für die jeweiligen Klone. Vielmehr kam es als Test für realistische *screening*-Bedingungen darauf an, die Parameter in den einzelnen Verfahren so zu wählen, als seien die Mutationen unbekannt. Die untersuchten Methoden sind dHPLC, MALDI *re-sequencing* und Heteroduplex-Spaltung mit CEL1 zur Detektion von Punktmutationen *und* kleinen Deletionen sowie Kapillarelektrophorese, *poison*-Primer-PCR und *exon-skipping*-PCR zur Identifizierung von Exondeletionen. Die Ergebnisse werden für jeden Ansatz der Reihe nach vorgestellt und schließlich vergleichend zusammengefasst.

Die unterschiedlichen Eigenschaften der Methoden hatten zur Folge, dass nicht ein einheitliches Amplikon für alle fünf Mutationen verwendet werden konnte. Die verwendeten Fragmente sind in Tab. 3.2 angegeben.

Fragmentname	Größe [bp]	benutzt für	enthält Mutationen	bp-Position im PCR-Fragment
<i>Hprt dHPLC 1</i>	336	dHPLC	T84A, T203G, $\Delta$ ex3	64, 184, 115-298
<i>Hprt dHPLC 2</i>	297	dHPLC	T407A, $\Delta$ ex6	73, 69-151
<i>Hprt skip ex 3</i>	309	<i>exon-skipping</i> PCR	( $\Delta$ ex3)	(übersprungen)
<i>Hprt CDS</i>	593	alle anderen	T84A, T203G, T407A, $\Delta$ ex3, $\Delta$ ex6	64, 184, 387, 115-298, 383-465
<i>Hprt UTR + Hprt poison ex 3 fwd</i>	797	erste <i>poison</i> -Primer-PCR	$\Delta$ ex3	223-406

Tab. 3.2 RT-PCR Fragmente für die Evaluierung verschiedener Mutationsdetektionsmethoden. Die Primersequenzen können der Liste im Anhang entnommen werden. Für alle Methoden wurden die PCR-Reaktionen zweistufig durchgeführt. Die erste Reaktion erfolgte mit den in der 5'- bzw. 3'-untranslatierten Region liegenden Primern *Hprt UTR* (vgl. Abb. 3.6). Im Falle der *poison*-Primer-PCR wurde der interferierende Primer (Erklärung weiter unten) dieser Reaktion zusätzlich beigefügt. Die zweite PCR-Reaktion (*nested* PCR) erfolgte i.d.R. mit dem Primerpaar *Hprt CDS* (vgl. Abb. 3.6). Ausnahmen bildeten die dHPLC, für die das Fragment mit *Hprt dHPLC 1* und 2 zerteilt wurde, sowie die *exon-skipping*-PCR, in der die Spezifität der Mutationsdetektion in dieser zweiten Stufe liegt (Erklärung weiter unten).

### 3.2.1 Denaturierende HPLC

Denaturierende HPLC ist die klassische Methode für PCR-basierte Mutationsdetektion (Underhill et al., 1997). dHPLC ist eine Ionenpaar-Reversphasen-Chromatografie, bei der die Trennsäule beheizbar ist. Heterozygote Mutationen in PCR-Fragmenten führen nach Hitzedenaturierung und Renaturierung zur Bildung von Homoduplex- und Heteroduplex-Doppelsträngen. Unter partiell denaturierenden Bedingungen können die beiden Spezies auf der dHPLC-Säule voneinander getrennt werden. Für Proben ohne Mutation erhält man hingegen keine Heteroduplexbildung und damit nur ein einzelnes Signal.

Vorversuche zeigten in Übereinstimmung mit den Angaben des Geräteherstellers, dass die PCR-Produktlängen zur Vermeidung falsch negativer Ergebnisse 300bp nicht wesentlich übersteigen sollten. Das Standardfragment für die *Hprt*-Amplifikation wurde daher in zwei Teilstücke aufgeteilt (Tab. 3.2). Die sonstige Probenvorbereitung wurde bereits im Methodenteil 2.3 beschrieben. Gegen Wildtyp verdünnte Proben der fünf Klone wurden aufgrund mehrerer Schmelzdomänen in den PCR-Fragmenten jeweils bei drei verschiedenen Temperaturen analysiert, um die Chance zu erhöhen, die als unbekannt behandelten Mutationen zu identifizieren. Die Elutionsparameter waren mit Bedacht optimiert für die Geschwindigkeit der Analyse, weniger für die Auflösung der Signale - ein Kompromiss, den man für Analysen im großen Maßstab gezwungen wäre zu schließen, denn dHPLC erlaubt nicht die multiparallele Analyse von Proben.

Insgesamt wurden zwei der drei Punktmutationen und beide Deletionen detektiert. Der Klon T203G konnte nicht identifiziert werden. Abb. 3.9 zeigt je ein repräsentatives Beispiel für die Detektion von Basensubstitutionen und Spleißmutationen.

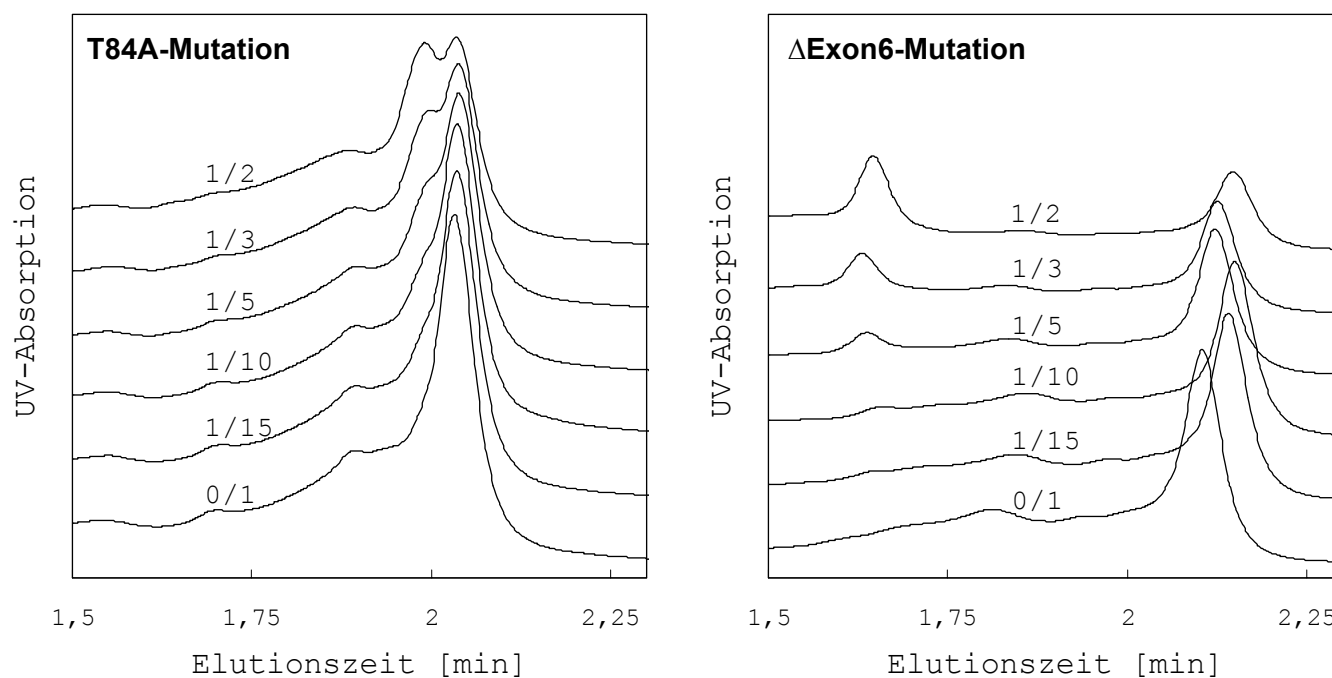


Abb. 3.9 Repräsentative Ergebnisse der Mutationsdetektion mit dHPLC. Die Werte über den einzelnen Kurven geben den Mutantenanteil im cDNA-Gemisch vor der Amplifizierung an. Links: Detektion der T84A-Basensubstitution in verschiedenen Verdünnungen gegen Wildtyp. Ein Doppelmaximum ist nur im 50%-Pool präsent. Das Heteroduplexsignal ist als Schulter bis zu einer Verdünnung von etwa 1/5 erkennbar. Rechts: Detektion der Deletion von Exon 6. Der Mutantenpeak ist in einer Verdünnung von 1/5 noch gut zu identifizieren.

Die für die Auflösung der Punktmutationen optimalen Temperaturen waren 56°C (für T84A) bzw. 57°C (für T407A). Zur Fragmentelution wurde die Acetonitrilkonzentration im Elutionspuffer innerhalb von zwei Minuten von 14,5 auf 17,5% (v/v) bzw. von 14 auf 16,5% erhöht. Die Mutation T203G konnte nicht detektiert werden. Die Parameter für die Deletionsdetektion waren weniger kritisch.

Wie den Diagrammen entnommen werden kann, lag die maximale Verdünnung von mutierter Hprt-cDNA gegen Wildtyp für beide Mutationstypen bei etwa 1/5. Das würde für ein autosomales Gen die Poolbarkeit von zwei Klonen (vier Allelen) bedeuten.

Die Auflösung ist im Falle der  $\Delta$ Exon6-Läsion gegenüber der Punktmutation verbessert, denn die Identifizierung beruht hier lediglich auf der Trennung von Mutanten- und Wildtypform gemäß ihres Größenunterschieds. Dass dieser Vorteil hinsichtlich der Auflösung sich kaum niederschlägt in einer Verbesserung der Poolbarkeit, deutet darauf hin, dass nicht so sehr die Trennauflösung, sondern eher die mengenmäßige Beladung der Säule mit mutiertem PCR-Produkt die Sensitivität der Methode limitiert.

### 3.2.2 MALDI-vermittelte Resequenzierung

Diese Methode beruht auf der Analyse kontrolliert fragmentierter, *in vitro* von einem PCR-Produkt transkribierter RNA mit MALDI-*time-of-flight*-Massenspektrometrie. Im vorliegenden Fall wurden daher für die RT-PCR-Amplifizierung der kodierenden Hprt-Sequenz Oligonukleotide mit 5'-Überhängen viraler Promotorsequenzen eingesetzt (T7-Promotor für den *forward*-Strang, Sp6 für die Gegenrichtung). Die *in-vitro*-Transkription erfolgt für *forward*-

und *reverse*-Strang in separaten Reaktionen, die anschließend nukleotidspezifisch gespalten werden. Die Fragmentierung erfolgt beispielsweise durch Behandlung mit der pyrimidinspezifisch schneidenden RNase-A. Wurden für die *in-vitro*-Transkription - wieder in getrennten Reaktionen - die 2'-Desoxynukleotide dCTP bzw. dUTP eingesetzt, die von der Ribonuklease nicht geschnitten werden können, so erfolgt die Spaltung wahlweise nach jedem U bzw. jedem C. Auf diese Weise werden vier komplementäre Populationen an RNA-Fragmenten generiert, die massenspektrometrisch zu analysieren sind (Stanssens et al., 2004). Sequenzänderungen können nun detektiert werden durch Vergleich der Fragmentmassen im Spektrum mit *in silico* gewonnenen Daten eines theoretischen Verdauers der bekannten Sequenz: eine Mutation macht sich bemerkbar durch Auftreten eines nicht vorhergesagten Fragmentes im experimentell erzeugten Massenspektrum. Aufgrund der präzisen Messbarkeit der entsprechenden Masse lassen sich, wieder in Verbindung mit den theoretischen Daten der Wildtypsequenz, u.U. sogar Aussagen treffen über die Natur und Lokalisation der Mutation in dem ursprünglichen PCR-Fragment.

Aus praktischen Gründen erfolgte die Verdünnung der *Hprt*-Modellmutationen hier nach der ersten Amplifikation (Primerpaar *Hprt UTR*, Abb. 3.6) und vor der *nested* PCR unter Inkorporation der viralen Promotoren. Die Sequenzänderungen konnten in allen Fällen detektiert werden. Darüberhinaus ließ sich die exakte Position und Art der Mutation mit einer Ausnahme in allen Fällen anhand diagnostischer Signale bestimmen. Die Ausnahme bildete die Mutation T407A, deren Lokalisation aber zumindest stark eingegrenzt werden konnte (auf vier potenzielle, nah beieinander liegende Positionen des Basenaustauschs). Die Mutationen waren auch in Verdünnung detektierbar. Abb. 3.10 zeigt repräsentative Beispiele für die Detektion von Punkt- und Deletionsmutationen.



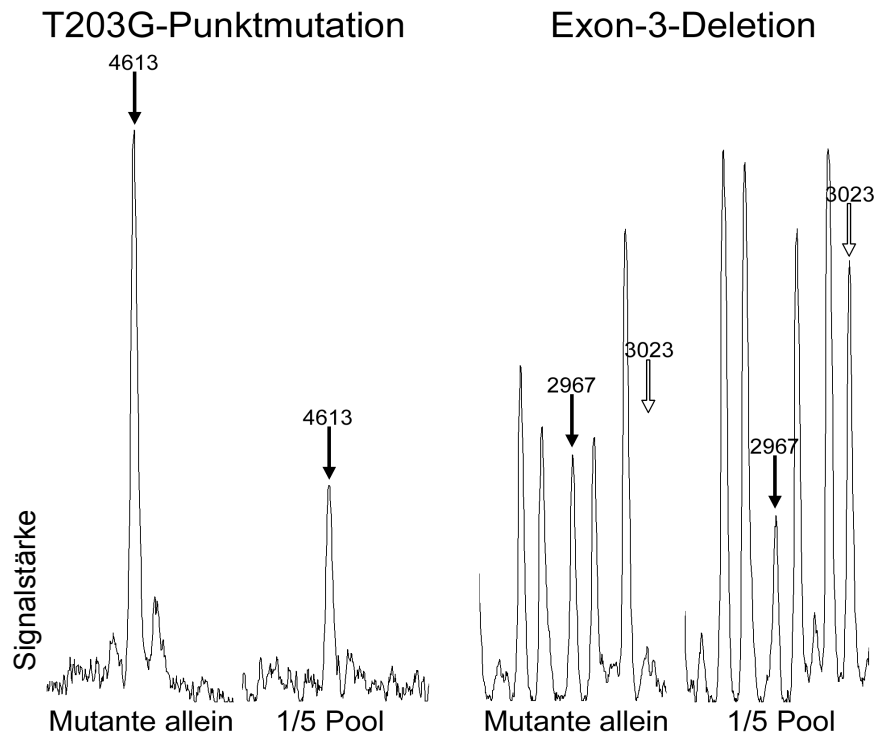


Abb. 3.10 Mutationsdetektion mit MALDI *re-sequencing* nach Stanssens et al. (2004). Für eine der Punktmutationen (links) und eine Exondeletion (rechts) sind relevante Ausschnitte der Massenspektren gezeigt, die nach U-spezifischem Verdau der *forward*-Transkripte gewonnen wurden. Zum Vergleich nebeneinander angeordnet sind jeweils die Signale der reinen Mutantenproben und der 20%-Verdünnungen gegen Wildtyp. Die Identifizierung von Sequenzänderungen erfolgt anhand mutantenspezifischer Signale im Massenspektrum. Diese sind durch ausgefüllte Pfeile markiert. Die Zahlen geben Fragmentmassen in Dalton an. Das 3023-Da-Signal rechts ist spezifisch für die Wildtypsequenz: es fehlt infolge der Exondeletion in dem Spektrum ohne WT-Zusatz.

Die Sensitivität reichte hier für Punktmutationen wie für Deletionen durchschnittlich bis zu einem *pooling*-Verhältnis von etwa 1/5, ähnlich wie mit dHPLC. Bei stärkerer Verdünnung waren die mutantenspezifischen Peaks nicht mehr zweifelsfrei vom Hintergrundrauschen zu unterscheiden. Die Erkennung von Basensubstitutionen ist hier gegenüber der Deletionsdetektion ausnahmsweise leicht im Vorteil, weil mit Punktmutationen durch die Komplementarität der vier basenspezifischen Transkript-Spaltungsreaktionen insgesamt mehr diagnostische Signale generiert werden.

### 3.2.3 CEL1

CEL1 ist eine S1-Endonuklease aus Sellerie, die Basenfehlpaarungen (*mismatches*) in Heteroduplices ohne Sequenzpräferenz erkennt und an dieser Stelle schneidet (Oleykowski et al., 1998). Dadurch entstehen zwei Spaltprodukte, deren Größen sich zur Länge des Substrats addieren. Die Verwendung des gereinigten Enzyms für einen Mutationsdetektionstest ist denkbar einfach: die Heteroduplexbildung mit einem Gemisch

aus Mutanten- und Wildtyp-Fragmenten erfolgt gleich anschließend an die PCR-Reaktion im selben Thermocycler. Dann werden Aliquots der PCR-Proben mit CEL1 inkubiert und die Verdauungsprodukte analysiert gemäß ihrer Größen. Dies kann chromatografisch oder elektrophoretisch geschehen, im einfachsten Fall durch Agarose-Gelelektrophorese und Sichtbarmachung mit Ethidiumbromidfärbung.

Mit diesem Test konnten nicht nur alle drei Basensubstitutionen unter den *Hprt*-Modellmutationen detektiert werden, vielmehr wurden auch Paarungen aus Deletions- und Wildtypsträngen geschnitten. Abb. 3.11 zeigt typische Beispiele.

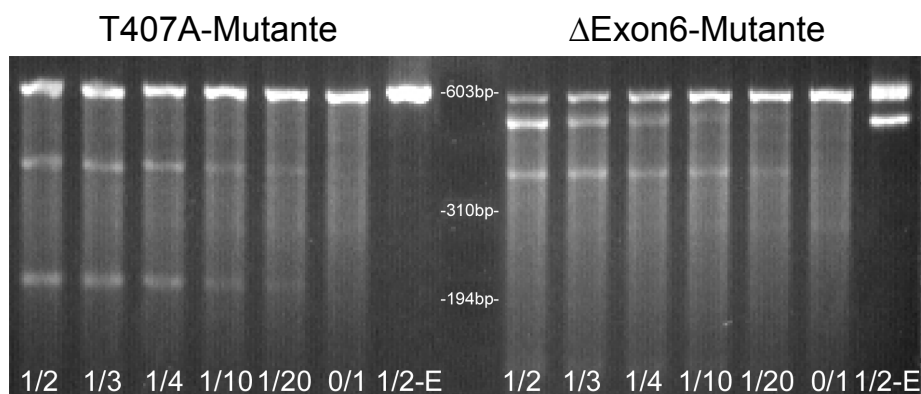


Abb. 3.11 Mutationsdetektion mit CEL1. Auf dem Gel (2% Agarose) sind Verdünnungsreihen der T407A- und  $\Delta$ Exon6-Mutationen gegen Wildtyp nach CEL1-Verdau der rehybridisierten RT-PCR-Proben aufgetragen. Die Bahnbeschriftungen geben den Mutantenanteil im cDNA-Gemisch vor der Amplifizierung wieder. 1/2-E: Enzymmangelkontrolle. In der Mitte sind die Positionen von drei Banden des  $\Phi$ -Markers angezeigt.

Die Enzymkonzentration für optimale Sensitivitäten schien abhängig zu sein von der Fragmentlänge in der Weise, dass der Verdau größerer Substrate mehr Nukleaseaktivität erforderte. Die CEL1-Konzentration wurde daher gegebenen Fragmentlängen angepasst und schien optimal, wenn die Menge des Ausgangsfragments (siehe Kontrolle ohne Enzym) durch unspezifische Schneideereignisse (siehe Hintergrundschmier in den übrigen Proben) um ein Drittel bis zur Hälfte reduziert wurde.

Nach Tab. 3.2 sollten T407A-WT-Heteroduplexe des 593bp großen, durch das Primerpaar *Hprt* CDS definierten Ausgangsfragments in zwei Produkte der Größen 386,5bp und 593bp - 386,5bp = 206,5bp gespalten werden, was durch Vergleich der beiden Produktbanden in Abb. 3.11 mit den Positionen der  $\Phi$ -Standardbanden nachvollzogen werden kann. Im Falle der Exondeletion sind zwei Effekte sichtbar: einerseits werden Homoduplex-Fragmente von Mutante und Wildtyp gemäß ihres Größenunterschieds von 83bp aufgelöst (vgl. Enzymmangelkontrolle in Abb. 3.11 rechts). Andererseits werden auch hier spaltbare Heteroduplexe gebildet. Die zusätzliche Bande markiert demnach die Position (Basenpaar 383) des Exon6-Deletionsbeginns im PCR-Fragment.

Die Sensitivität der Detektion ist für beide Mutationstypen im Vergleich zu dHPLC und MALDI *re-sequencing* deutlich verbessert: die CEL1-Verdauungsprodukte sind auf dem Gel bis zu einem *pooling*-Verhältnis von 1/10 sicher zu identifizieren - für Exon-Deletionen ist

dies bereits mehr als über den Größenunterschied zum WT-Fragment allein möglich ist (Abb. 3.11). Signifikanterweise scheint die Intensität der Produktbanden nicht linear abzunehmen mit dem Mutantenanteil in der Ausgangsprobe.

### 3.2.4 Kapillarelektrophorese

Konzentriert man sich bei der Mutationsdetektion auf Exondeletionen, so wäre die naheliegendste Möglichkeit die Trennung von der Wildtypform aufgrund des Größenunterschieds. Die beste Auflösung für diesen Zweck verspricht die PCR-Fragmentanalyse durch Kapillarelektrophorese. Immanente Vorteile liegen mit dieser Methode in der Automatisierbarkeit und der Fluoreszenzdetektion zur Erhöhung der Sensitivität. Abb. 3.12 zeigt die Analyse der Exon6-Deletion in unterschiedlich stark gepoolten Proben.

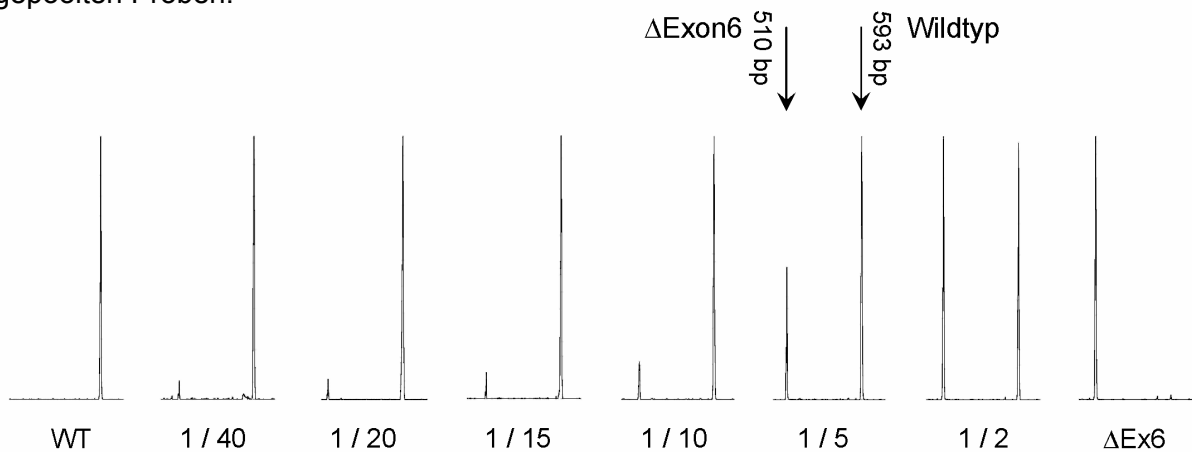


Abb. 3.12 Deletionsdetektion mit Kapillarelektrophorese. Gezeigt sind die relevanten Ausschnitte von Spektren unterschiedlich stark gepoolter Proben. Für die Amplifizierung des Fragmentes *Hprt CDS* (Abb. 3.6, Tab. 3.2) wurden fluoresceinmarkierte Primer zur Fluoreszenzdetektion eingesetzt. Die Fragmentgrößen wurden mit Hilfe eines ausgeblendeten Größenstandards bestätigt.

Die Trennschärfe der Signale reflektiert das hohe Auflösungsvermögen dieser Methode. Zudem ist das Signal-Rausch-Verhältnis aufgrund der Fluoreszenzdetektion bemerkenswert hoch. Dadurch ist die Sensitivität im Vergleich z.B. zur konventionellen Agarose-Gelelektrophorese erhöht. Das deletierte Fragment ist zwar noch in einer Verdünnung von 1/40 detektierbar, jedoch traten Signale der entsprechenden Intensität auch unspezifisch auf. Das maximale *pooling*-Verhältnis ist damit realistischerweise bei etwa 1/15 festzusetzen.

### 3.2.5 *Poison*-Primer-PCR

Eine Variante der konventionellen *nested* PCR zur Detektion von Deletionen in definierten Abschnitten eines Amplikons wurde von Edgley et al. (2002) beschrieben. Dazu wird der ersten PCR-Reaktion ein sog. *poison*-Primer zugefügt, der im Bereich der erwarteten Deletion an die Wildtypsequenz bindet (Abb. 3.13). Dadurch wird für Wildtyp-Templat im

ersten Schritt bevorzugt ein kurzes Produkt aus *poison*- und dem zugehörigen äußeren Primer generiert, während für die Deletionsmutante *beide* äußeren Oligonukleotide benutzt werden. In der zweiten PCR-Reaktion sollte dann mit der in Abb. 3.13 dargestellten Positionierung der *nested* Primer eine weitere Amplifizierung nur für die mutierte Form möglich sein. Die Attraktivität dieses Ansatzes besteht zum einen in der Unterdrückung des Wildtypsignals, zum anderen wird dadurch die Synthese des deletierten Produkts befreit von konkurrierenden Einflüssen durch die ansonsten synchron ablaufende Amplifizierung des

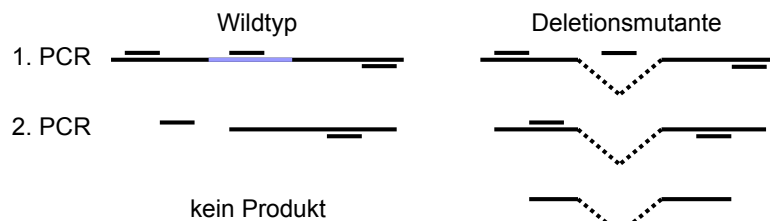


Abb. 3.13 Illustration zur Funktionsweise der *poison*-Primer-PCR.

WT-Fragments. Aus Abb. 3.14 geht am Beispiel der  $\Delta$ Exon3-Mutation der Effekt des interferierenden Primers in der ersten PCR-Reaktion hervor.

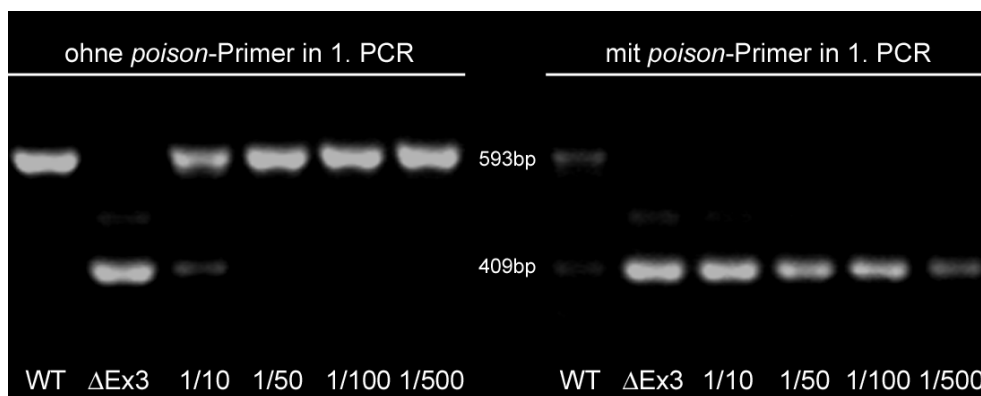


Abb. 3.14 Detektion von Spleiß-Mutationen mit der *poison*-Primer-PCR.  $\Delta$ Exon3- und WT-Templat wurden auf cDNA-Ebene in den am unteren Rand angegebenen Verhältnissen vermischt und zweistufig amplifiziert (1. PCR mit Primerpaar *Hprt* UTR, 2. PCR mit *Hprt* CDS, siehe Abb. 3.6 und Tab. 3.2). Der ersten PCR-Reaktion der rechts auf das Gel (1,5% Agarose) aufgetragenen Serie wurde ein innerhalb von Exon 3 in *forward*-Richtung bindender *poison*-Primer hinzugefügt. Der Größenunterschied der beiden Banden bei 593 und 409bp gleicht der Länge des im mutierten Klon deletierten Exons. Für das schwache Signal in den  $\Delta$ Exon3-Kontrollen oberhalb der 409bp-Hauptbande gibt es keine naheliegende Erklärung.

Der Vergleich der beiden WT-Kontrollen zeigt, dass der eingesetzte *poison*-Primer seinen Zweck erfüllt: das durch die *nested* Primer definierte 593bp-Wildtypfragment ist in der rechts aufgetragenen Serie fast vollständig unterdrückt. Interessanterweise ist hier in der WT-Probe eine schwache Bande bei 409bp zu erkennen, was auf seltene, spontane *skipping*-Ereignisse beim Spleißen der *Hprt*-Prä-mRNA hindeutet. Die Nachweisgrenze für die Mutation liegt ohne *poison*-Primer bei einer Verdünnung von etwa 1/10, mit *poison*-Primer war die Deletion noch in einem Pool von 1/500 detektierbar, was einer 50-fachen Sensitivitätssteigerung gleichkommt. Nicht gezeigte Ergebnisse mit anderen Exon-

Deletionsklonen wie dem für Exon 6 bestätigten die Poolbarkeit von 1/100 und darüber hinaus.

### 3.2.6 Exon-skipping-PCR

Auf Transkriptebene sind die Grenzen möglicher Deletionsmutationen durch die für die meisten Gene bekannte Exon-Struktur exakt vorgegeben: die in den Hprt-Mutationsspektren für TMP und ENU (Abb. 3.7 und 3.8) enthaltenen Spleiß-Mutationen waren ausnahmslos präzise Deletionen einzelner Exons. Die Anreicherung mutierter Fragmente bereits in der PCR wäre damit nicht nur über die Unterdrückung des Wildtyp-Produkts wie unter 3.2.5 denkbar, sondern auch durch selektive Amplifikation der deletierten Form mit Hilfe exonüberbrückender Primer (Abb. 3.15).

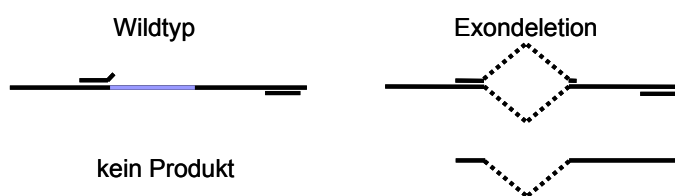


Abb. 3.15 Schema zur selektiven Amplifizierung von Spleiß-Mutationen mit exonüberbrückenden Primern. Zur Erhöhung der Sensitivität kann eine PCR-Reaktion vorgeschaltet werden, die zunächst den gesamten Leserahmen der interessierenden cDNA amplifiziert.

stark gepoolten cDNA-Proben nachweisen, so dürfte es auch hier nötig sein, die PCR zweistufig durchzuführen: in einem ersten Schritt würde der gesamte kodierende Bereich des interessierenden Gens amplifiziert. Im zweiten Schritt würden sich

Reaktionen unter Verwendung exonüberspringender Primer anschließen. Abb. 3.16 zeigt das Testergebnis für den Hprt-Klon mit Deletion des dritten Exons.

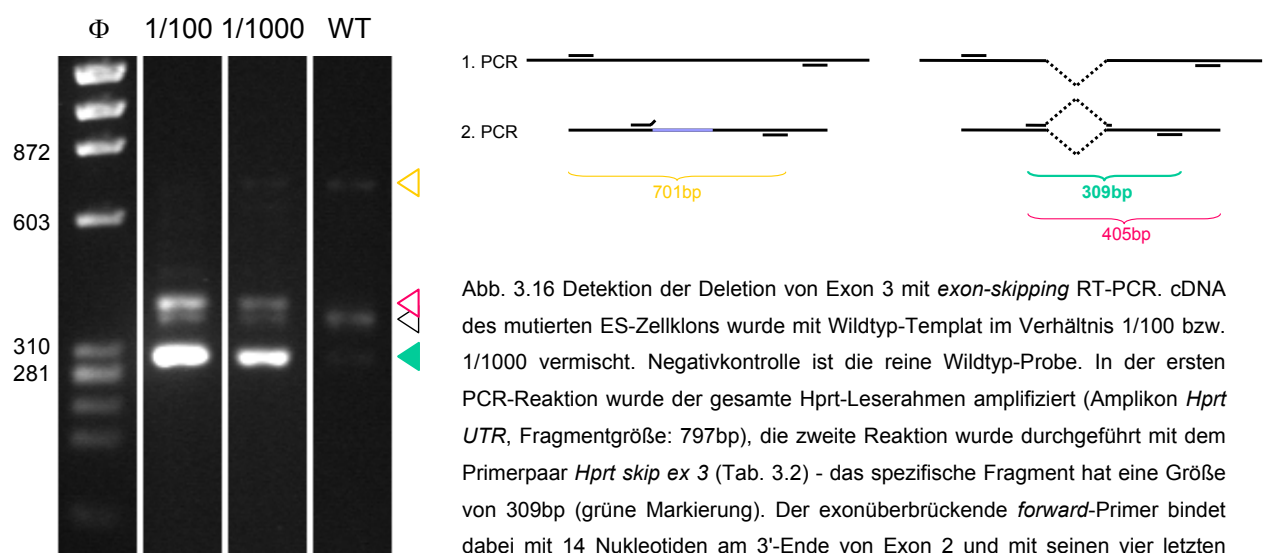


Abb. 3.16 Detektion der Deletion von Exon 3 mit *exon-skipping* RT-PCR. cDNA des mutierten ES-Zellklons wurde mit Wildtyp-Templat im Verhältnis 1/100 bzw. 1/1000 vermischt. Negativkontrolle ist die reine Wildtyp-Probe. In der ersten PCR-Reaktion wurde der gesamte Hprt-Leserahmen amplifiziert (Amplikon *Hprt UTR*, Fragmentgröße: 797bp), die zweite Reaktion wurde durchgeführt mit dem Primerpaar *Hprt skip ex 3* (Tab. 3.2) - das spezifische Fragment hat eine Größe von 309bp (grüne Markierung). Der exonüberbrückende *forward*-Primer bindet dabei mit 14 Nukleotiden am 3'-Ende von Exon 2 und mit seinen vier letzten Basen am Beginn von Exon 4. Zwei von drei Nebenprodukten lassen sich anhand ihrer Größen erklären (vgl. farbmarkierte Fragmente auf dem Gel und im Schema oben rechts). Dazu sind links die Längen (in bp) einiger Größenstandard-Fragmente angegeben. Gel: 2% Agarose.

Selbst in einer Ausdünnung von 1/1000 gegen Wildtyp wurde das für die Exondeletion spezifische 309bp-Fragment noch gebildet, während die WT-Kontrolle praktisch negativ blieb

(vgl. letzte beiden Gelspuren). Ähnliche Sensitivitäten wurden auch für den ES-Zellklon mit Deletion von Hprt-Exon Nr. 6 erhalten, so dass dieser PCR-assay die Kombination einer Vielzahl von cDNA-Proben der zu erstellenden Klonbibliothek erlauben würde. Neben der erhöhten Empfindlichkeit besitzt die Verwendung exonüberbrückender Primer zur Spleiß-Mutationsdetektion gegenüber der *poison*-Primer-PCR zwei weitere Vorteile. Erstens: die Spezifität der Mutationsdetektion liegt mit der *poison*-Primer-PCR in der ersten Amplifizierung. Ist da die Bildung des langen Wildtyp-Produkts nicht vollständig unterdrückt, erhält man nach der 2. PCR eine starke Hintergrundbande und evtl. auch weitere, unspezifische Signale, welche die Ergebnisinterpretation erschweren. Die alternative Verwendung exonüberbrückender Primer in der *zweiten* PCR liefert erfahrungsgemäß spezifischere und insgesamt sauberere Resultate. Zweitens: die Notwendigkeit, zur Erzielung maximaler Sensitivitäten der *exon-skipping*-PCR eine Amplifizierung des Zielgens vorzuschalten, ist vorteilhaft im Hinblick auf den Verbrauch an cDNA. Die im Falle eines großen Klonarchivs im Multititerplattenformat zu isolierende RNA würde nur für eine relativ begrenzte Anzahl von RT-PCR-Amplifizierungen ausreichen. Zwar könnten auch mit der *poison*-Primer-PCR eine Reihe von Proben gepoolt werden, was neben der Arbeitersparnis auch den cDNA-Verbrauch senken würde - einerseits. Andererseits wäre für jedes Exon im Zielgen - außer dem nicht screenbaren ersten und letzten - eine individuelle zweistufige *poison*-Primer-PCR nötig (wenngleich wiederum denkbar wäre, die *poison*-Primer über Exon-Exon-Grenzen zu legen und damit die Anzahl der Reaktionen zu halbieren). Mit der *exon-skipping*-PCR hingegen könnte zunächst der gesamte Leserahmen des interessierenden Gens in einer einzigen PCR-Reaktion aus stark gepoolten cDNA-Proben amplifiziert werden. Die separaten exonspezifischen Reaktionen fänden dann statt unter Verwendung eines PCR-Fragments als Templat.

### 3.2.7 Zusammenfassung

Die in diesem Teil behandelten Methoden zur Mutationsdetektion sind im Hinblick auf Anwendungen im größeren Maßstab in Tab. 3.3 vergleichend zusammengefasst.

	≈ max. Ausdünnung der Mutation <sup>1</sup>	≈ max. Fragmentlänge < oder > 500bp	Signal- informations- gehalt	Einfach- / Robustheit	Erschwing- lichkeit <sup>3</sup>
dHPLC	1/5	<	+	++	+
MALDI <i>re-sequencing</i>	1/5	≤	+++	++	+
CELI	1/10 <sup>2</sup>	>	++	+++	++ <sup>4</sup>
Kapillarelektrophorese	1/15	>	+	++	++
<i>poison</i> -Primer-PCR	1/100	>	++	++	++
<i>exon-skipping</i> PCR	1/1000	>	++	++	++

<sup>1</sup> ohne Optimierung  
<sup>2</sup> mit Agarose-Gelelektrophorese  
<sup>3</sup> ohne Instrumentierungskosten  
<sup>4</sup> mit selbstisolierendem Enzym

Tab. 3.3 Vergleich verschiedener PCR-basierter Methoden zur Detektion unbekannter Mutationen. Die ersten drei Methoden sind sowohl für die Identifizierung von Basensubstitutionen als auch kleiner Deletionen geeignet, die letzten drei ausschließlich für Deletionsdetektion - die *exon-skipping*-PCR insbesondere nur für Spleiß-Mutationen auf cDNA-Ebene.

Die Schätzungen der maximalen Poolbarkeiten beruhen auf den Daten aus 3.2.1 bis 3.2.6. Die Detektion von Exondeletionen auf cDNA-Ebene ist besonders sensitiv, wenn man bereits die PCR-Reaktionen darauf ausrichtet (siehe 3.2.5 und 3.2.6). Hinsichtlich der Länge zu analysierender Fragmente ist vor allem dHPLC limitiert. Über die schiere Mutationsdetektion hinaus lässt sich insbesondere mit MALDI *re-sequencing* direkt wertvolle Information über Lage und Art identifizierter Läsionen gewinnen. Die Punktmutationsdetektion mit CEL1 ist im Vergleich zu den beiden ersten Verfahren in Tab. 3.3 besonders sensitiv und robust, d.h. zuverlässig und wenig fehleranfällig in bezug auf falsch positive oder falsch negative Ergebnisse, weil für ein einzelnes Mutationsereignis zwei komplementäre Signale generiert werden.

### 3.3 Klonbanketablierung und gezielte Isolation von Spleiß-Mutanten

Nach den Ergebnissen der Teile 3.1 und 3.2 erschienen zwei Wege möglich. Die durch ENU hervorgerufenen Mutationen auf genomischer Ebene sind fast ausschließlich Basensubstitutionen. Mit dem CEL1-vermittelten Test hätte man eine praktikable Methode zur Detektion von Punktmutationen in der Hand. Der Arbeits- und Kostenaufwand bei der Durchmusterung einer Klonbank ließe sich reduzieren durch Vereinigung mehrerer Proben. Die zweite Möglichkeit bestünde in der Fokussierung auf Spleiß-Mutationen, die einen kleinen, aber signifikanten Anteil im Mutationsspektrum darstellen. Dazu müsste man auf

cDNA-Ebene arbeiten, was den Nachteil der Abhängigkeit von der endogenen Genexpression und den Vorteil der Kompaktierung der kodierenden Sequenz mit sich brächte. Der geringen Auftrittshäufigkeit von Exondeletionen müsste man mit einer Erhöhung der Klonbankgröße begegnen. Jedoch könnten später für das *screening* der Bibliothek dank der hochsensitiven Mutationsdetektion (Abschnitt 3.2.6) eine Vielzahl von Proben gepoolt werden, was den zuverigen Mehraufwand überkompensieren sollte. Da Spleiß-Mutationen zudem die Funktion des betroffenen Gens im Gegensatz zu Punktmutationen in den meisten Fällen beeinträchtigen dürfte, wurde für die Weiterarbeit der zweite Weg eingeschlagen. (Der 6-TG-assay selektierte auf den Funktionsverlust der Hprt-Genaktivität und brachte so nur einen Teil der in diesem Gen ausgelösten Sequenzveränderungen zu Tage.)

### 3.3.1 Abschätzung der nötigen Klonbibliotheksgröße

Eine Bibliothek chemisch mutagenisierter ES-Zellen muss so groß sein, dass eine ausreichende Wahrscheinlichkeit besteht, mutierte Klone für ein beliebiges Gen zu isolieren (Saturierung). Diese Wahrscheinlichkeit wird neben der Bibliotheksgröße in erster Linie von der Mutationsfrequenz bestimmt, die nach Abb. 3.4 von der eingesetzten ENU-Dosis abhängt. Die Erstellung und Durchmusterung einer Klonbank nach Mutationen entspricht im stochastischen Sinne dem "Ziehen ohne Beachtung der Reihenfolge und ohne Zurücklegen" (Urnenmodell). Man kann sich eine Urne mit weißen (mutationsnegativen) und schwarzen (mutationspositiven) Kugeln (ES-Zellklone) vorstellen. Die Erstellung und die Durchmusterung einer Klonbibliothek entspräche dann dem Ziehen eines Teils der Kugeln: ein Teil der Klone einer Zellsuspension wird in irgendeiner Weise auf Multititerplatten verteilt und individuell überprüft auf die Präsenz von Mutationen in einem betreffenden Gen. Die Wahrscheinlichkeit wäre analog dem Lottoproblem zu berechnen (z.B. zwei Treffer bei "6 aus 49"). Für Bibliotheksgrößen von einigen Tausend Klone würde dies jedoch einen enormen Rechenaufwand bedeuten, so dass man das Problem näherungsweise auf ein "Ziehen ohne Reihenfolge, aber mit Zurücklegen" reduzieren kann. Dies ist berechtigt, weil die Wahrscheinlichkeit, eine Kugel (einen Klon) zweimal zu ziehen, vernachlässigbar klein ist, wenn die Gesamtzahl der Kugeln (Gesamtzahl der Klone in der Zellsuspension) groß ist gegenüber der Anzahl gezogener Kugeln (ausplattierter Klone) - dies ist in einem Mutagenisierungsexperiment der Fall. Also kann die Wahrscheinlichkeit  $P$  nach der Binomialverteilung berechnet werden ("Pascalsches Dreieck"):

$$P = \frac{n!}{(n-k)! \cdot k!} \cdot p^k \cdot (1-p)^{n-k}$$

Dabei stünde  $n$  für die Anzahl der Klone in der Bibliothek (Anzahl der Ebenen im Pascalschen Dreieck), die Ausfallwahrscheinlichkeit  $p$  entspräche der Mutationsfrequenz und  $k$  wäre die Anzahl positiver Klone für ein beliebiges Gen von Interesse. Für die Berechnung



der Wahrscheinlichkeit, *keinen* positiven Klon zu identifizieren ( $k=0$ ), vereinfacht sich der Ausdruck zu  $P_0 = (1 - \text{Mutationsfrequenz})^{\text{Bibliotheksgro\ss e}}$ . Trägt man diese Wahrscheinlichkeit, *keinen* positiven Klon zu finden, gegen die Bibliotheksgro\ss e auf, so erhält man eine gegen Null konvergierende Kurve, die erwartungsgemäß umso schneller abfällt, je größer die Mutationsfrequenz ist. Die Wahrscheinlichkeit, *mindestens einen* Klon mit Mutation zu erhalten, ist dann einfach  $P_{\geq 1} = 1 - P_0$ . Die Wahrscheinlichkeit, *mindestens zwei* positive Klone zu identifizieren, ist gegeben durch  $P_{\geq 2} = P_{\geq 1} - P_1$  usw..

Für eine realistische Berechnung muss der mit dem 6-TG-assay erhaltene und über die ENU-Konzentration einstellbare Wert für die Mutationsfrequenz noch um mehrere Faktoren korrigiert werden. Beispielsweise würde sich die Mutationsrate verdoppeln, wenn Hprt ein autosomales Gen wäre (und der Selektionstest dann noch funktionierte). Konzentriert man sich mit der Detektion von Spleiß-Mutationen nur auf eine Teilmenge der induzierten Läsionen, so ist deren Anteil am Mutationsspektrum mit der alle Mutationstypen betreffenden Mutationsrate zu multiplizieren. Weiterhin wäre die Wahrscheinlichkeit, Exondeletionen für ein gegebenes Gen zu generieren, erhöht (bzw. vermindert), wenn es mehr (bzw. weniger) Exons enthält als Hprt. Die Anzahl von neun Exons in Hprt liegt nah am Säuger-Durchschnitt von 8,4 (Modrek und Lee, 2003). Abb. 3.17 zeigt die Berechnung für ein typisches, autosomales Gen, mit der Absicht, Spleiß-Mutationen zu detektieren.

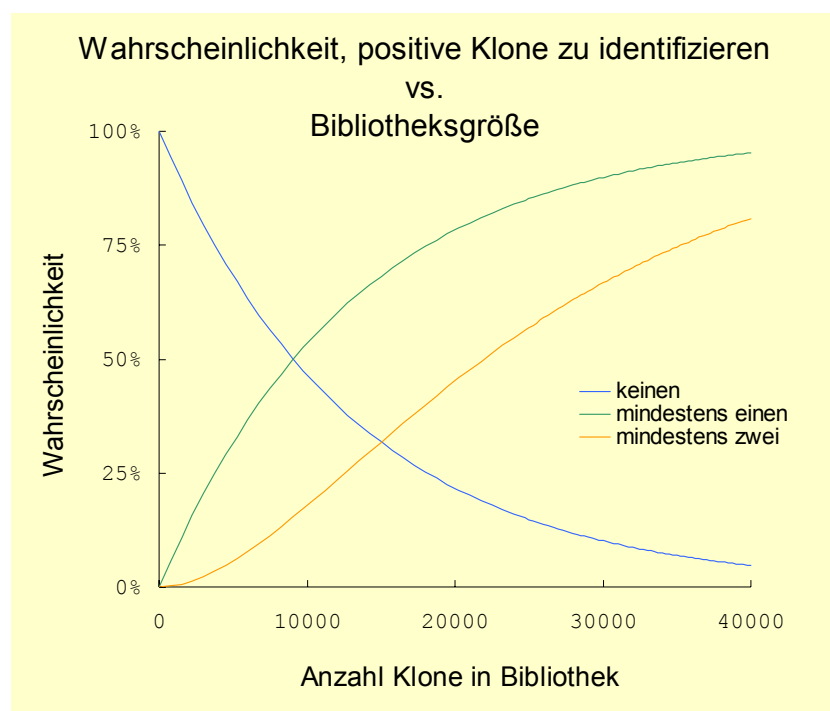


Abb. 3.17 Theoretische Wahrscheinlichkeiten beim *screening* nach Exondeletionen. Parameter / Korrekturfaktoren: Mutationsfrequenz = 1/2500; Anteil von Spleiß-Mutationen am Mutationsspektrum: 15% (nach Abb. 3.8 und Literaturdaten); Anzahl an Exons im interessierenden Gen: 9 (wie für Hprt,  $\approx$  Säuger-Durchschnitt); Anteil der im Laufe der Probenaufarbeitung verloren gegangenen und damit nicht mehr screenbaren Proben: 5% (Erfahrungswert nach Abschnitt 3.3.3 - s.u.); Anteil der durch spontane Spleißvarianten nicht screenbaren Exons: 33% (Erfahrungs-/ theoretischer Wert, siehe Diskussionsteil 4.3).

Die in der Berechnung angenommene Mutationsfrequenz von 1 zu 2500 stellt einen mittleren Wert dar. Die Mutationsrate sollte nicht auf Maximalwerte eingestellt werden, weil dies Probleme aufwerfen könnte, wenn es darum geht, aus isolierten ES-Zellklonen Mäuse zu erzeugen - wie Daten in Munroe et al. (2000) nahelegen. Außerdem müssen Läsionen,

die parallel zur interessierenden Mutation in einem positiven Klon gesetzt wurden, durch mendelsche Kreuzung der daraus generierten Mäuse eliminiert werden, was umso aufwändiger ist, je höher die applizierte Mutagenosis war. Andererseits vergrößern hohe Mutationsraten die Chance, mutationspositive Klone aus einer Bibliothek zu isolieren - wie die dargelegten Zusammenhänge zeigen. Der Wert von 1 zu 2500 bedeutet insofern einen Kompromiss, mit dem bei einer Klonbankgröße von etwa 40.000 akzeptable Wahrscheinlichkeiten für die Isolation von Spleiß-Mutanten zu erzielen wären (siehe Abb. 3.17). Unter der Annahme von 30.000 Genen im Mausgenom (Waterston et al., 2002) würden dabei in jedem Klon der Bibliothek durchschnittlich  $(30.000 : 2500 =)$  12 funktionelle Mutationen induziert - ein Wert, mit dem man angesichts von 40 Chromosomen gut leben kann.

### 3.3.2 Erstellung einer Klonbibliothek aus ENU-behandelten ES-Zellen

Eine im 96-*well*-Multititerplattenformat zu erstellende Klonbibliothek aus 40.000 Klonen hätte bei einer Dichte von einem Klon pro Probe einen Umfang von mehr als 400 Platten. Dies würde einen kaum zu bewältigenden arbeitstechnischen und finanziellen Aufwand bedeuten, nicht nur im Hinblick auf die Schritte in der Zellkultur - hier insbesondere auf das Picken von ES-Zellkolonien - sondern auch in bezug auf die spätere RNA-Isolation und reverse Transkription der Proben. Alternativ kann man neben der angestrebten Probenvereinigung auf cDNA-Ebene auch die Kombination von Klonen bereits während der Kultivierung in Multititerplatten erwägen. Dazu könnte eine Suspension mutagenisierter ES-Zellen einfach in geeigneter Verdünnung über die Positionen von 96-*well*-Platten verteilt werden, so dass sich eine gewünschte durchschnittliche Anzahl von Klonen pro Probe einstellt. Dies hätte im Gegensatz zu einer gepickten Bibliothek eine in Grenzen schwankende statistische Verteilung von Klonen über die einzelnen Proben zur Folge. Die durchschnittliche Anzahl von Klonen pro *well* muss dabei allerdings relativ gering angesetzt werden, um zu gewährleisten, dass später positive Klone sicher und ohne zu großen Aufwand aus dem Gemisch isoliert - d.h. von der Mehrheit negativer Klone in der selben Probe wieder getrennt werden können. Vor diesem Hintergrund erschien ein Mittelwert von vier Klonen pro Probe sinnvoll, was die Anzahl zu verarbeitender Platten auf etwa 100 reduzieren würde.

Auf der Basis dieser Überlegungen wurden ES-Zellen für 90min mit 1,5mM ENU behandelt, um sie mit einer Rate von etwa 1/2500 zu mutagenisieren. Die Zellen wurden in Aliquots eingefroren, um ihre Expansion in Multititerplatten sukzessive vornehmen zu können, ohne für jede Charge eine neue Mutagenisierung durchzuführen zu müssen. Da ein fester, *a priori* jedoch nicht präzise vorhersagbarer Anteil der Zellen den Einfrier-Auftau-Zyklus nicht überlebt, wurde zur Messung der effektiven Plattierungseffizienz nach dem Auftauen eine Art

Eichkurve erstellt. Dazu wurden verschiedene Volumina eingefrorener Aliquots aufgetaut und in 96-well-Platten mit *feeder layer* ausplattiert. Durch Auszählen der Kolonien einige Tage später ergab sich eine proportionale Abhängigkeit der Kolonieanzahl pro well gegen das ausplattierte Zellvolumen der aufgetauten Proben (Abb. 3.18 A)

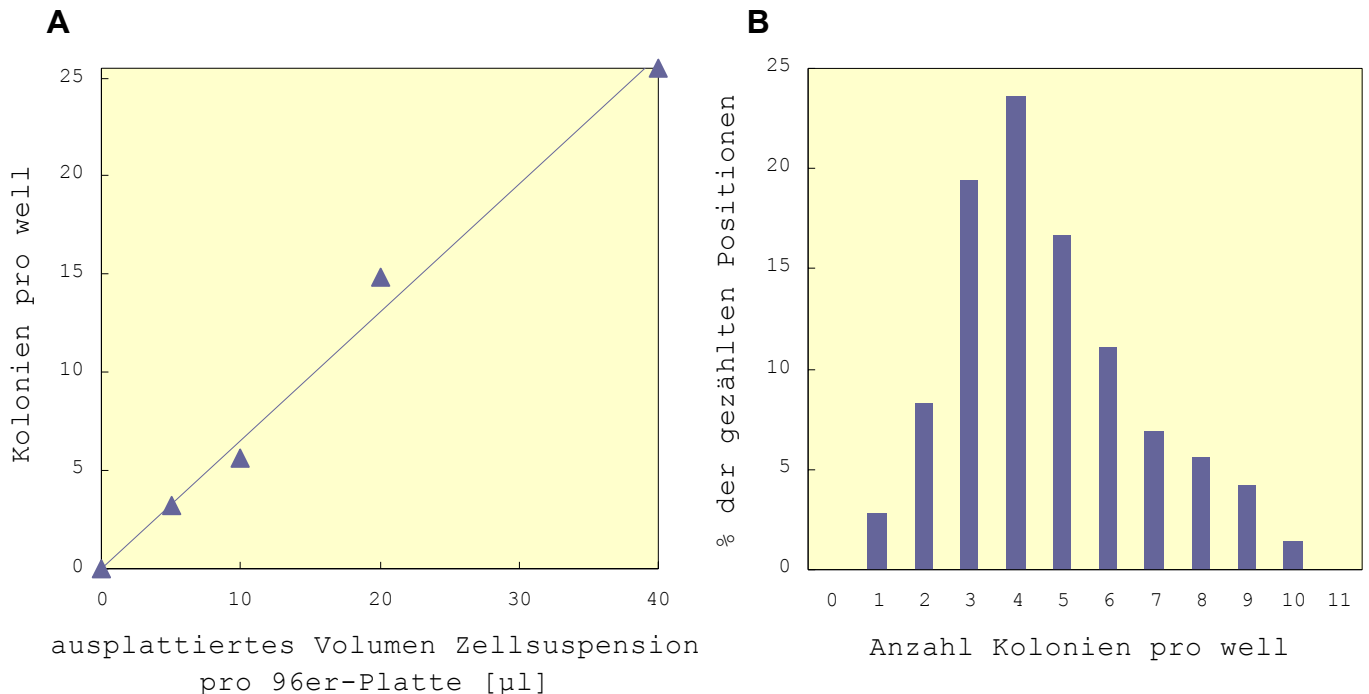


Abb. 3.18 Erstellung einer Klonbibliothek aus ENU-behandelten ES-Zellen. A: Eichkurve zur Berechnung des effektiven Zelltiters eingefrorener, mutagenisierter Zellen. Aus der Gleichung der Regressionsgeraden lässt sich leicht das zur Einstellung einer gewünschten Koloniedichte auszuplattierende Volumen berechnen. B: Verteilung von auf diese Weise ausplattierten Klonen über die Positionen von 96-well-Multititerplatten. Die Werte sind repräsentativ für ein Set von 24 Platten. Der Mittelwert liegt hier bei 4,7 Kolonien pro Napf.

Mit Hilfe dieser Kurve konnte das auszuplattierende Volumen ermittelt werden, das nötig war, um den gewünschten Mittelwert von vier Kolonien pro Napf einzustellen. Insgesamt wurden vier Sets à 24 Platten generiert. Abb. 3.18 B zeigt die statistische Verteilung von Kolonien über die Multititerpositionen für eines dieser vier Sets. Der Mittelwert war in diesem Fall etwas größer als angestrebt, doch für die gesamten 96 Platten ergab sich ein Durchschnitt von  $4,1 \pm 2,1$  (Kolonien pro Napf  $\pm$  Standardabweichung der Verteilung). Für die gesamte Bibliothek ergab sich demnach eine Gesamtanzahl von  $4,1 \cdot 96 \cdot 96 \approx 38.000$  ES-Zellklonen.

Die Platten wurden jeweils eine Woche lang kultiviert, bis jede Kolonie schätzungsweise aus mehreren Hundert Zellen bestand. Dann wurden die Proben dreigeteilt: ein Drittel wurde in den Originalplatten belassen und sofort eingefroren (Masterplatten). Diese Platten waren gedacht als primäre Quelle für die Reinkultivierung einzelner mutationspositiver Proben nach erfolgreicher Durchmusterung der Bibliothek. Ein weiteres Drittel wurde replattiert und wenige Tage später eingefroren (erste Replika). Diese Platten waren gedacht als

Sicherheitskopie der Masterproben oder als Ausgangsmaterial zur DNA-Isolation für alternativ mögliche *screening*-Ansätze auf genomischer Ebene. Das letzte Drittel an Zellen wurde ebenfalls replattiert, doch diesmal bis zur Konfluenz kultiviert (zweite Replika). Diese zweite Kopie der Bibliothek diente der RNA-Isolation.

### 3.3.3 RNA-Isolation, reverse Transkription und Probenvereinigung

Aus den gut 9200 Proben der zweiten Replika wurde Gesamt-RNA wie unter 2.2.3 beschrieben durch Guanidinisothiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert. Die Integrität der RNA wurde stichprobenartig mit Agarose-Gelelektrophorese überprüft (Abb. 3.19 A). Im Anschluss daran wurde die mRNA revers transkribiert (Abschnitt 2.2.4), um Einzelstrang-cDNA für die Amplifikation von Zielgenen zu generieren. Der Erfolg der reversen Transkription wurde erneut in Stichproben kontrolliert (Abb. 3.19 B).

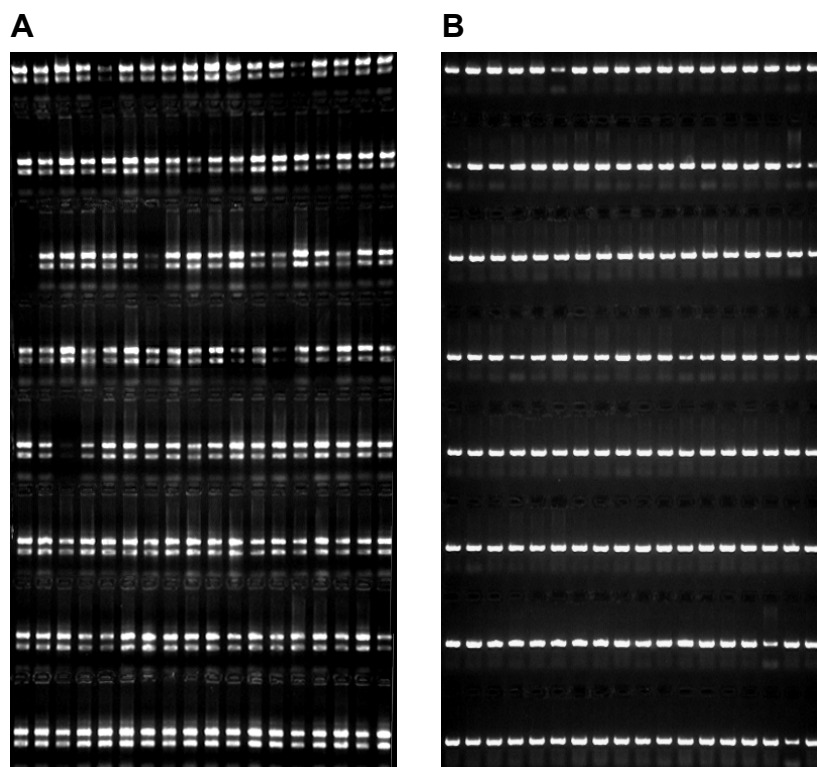
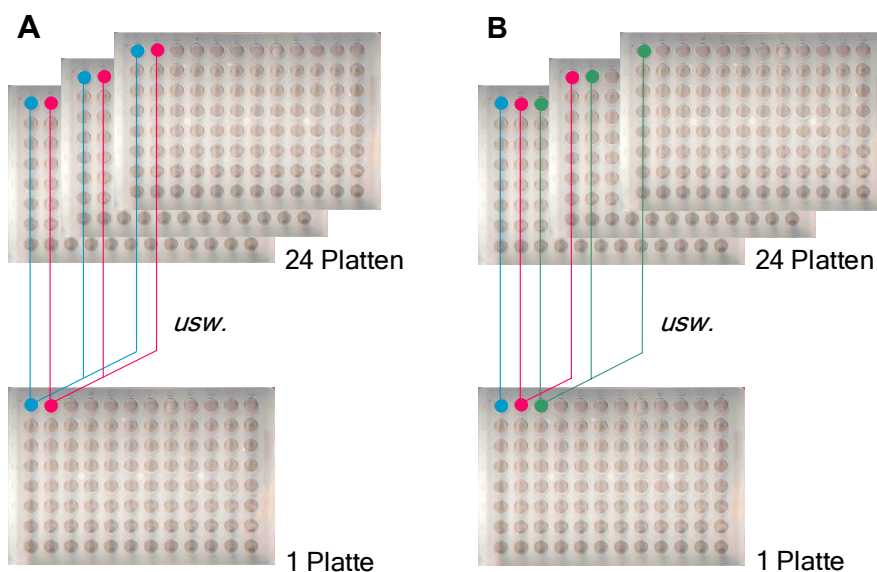


Abb. 3.19 Isolation von RNA und RT-PCR mit Proben der ES-Zellklonbibliothek. A: Stichproben (sechs zufällige Positionen pro Platte) aus 24 der 96 Platten. Es wurde 1/5 der isolierten Menge zur Kontrolle auf das Gel (1,2% Agarose) aufgetragen. B: RT-PCR zur Erfolgskontrolle der reversen Transkription mit dem Primerpaar *Hprt CDS* (593bp, siehe vorherige Abschnitte). Auch hier wurden aus 24 Platten der Bibliothek jeweils 6 Proben zufällig ausgewählt.

Die Qualität der isolierten RNA war angesichts der mit der Isolationsmethode verbundenen Umstände zufriedenstellend. Die Ausschussrate betrug ca. 5%, hervorgerufen teils durch Probenverlust während der Isolation, teils durch Mangel an Ausgangsmaterial zu Beginn der Prozedur. Die RNA-Ausbeute war von Probe zu Probe in Grenzen variabel, i.d.R. vermutlich durch Variabilität der Ausgangsmenge an ES-Zellen. Die durchgehend positiven Reaktionen in Abb. 3.19 B jedoch deuten darauf hin, dass auch RNA-arme Proben genügend cDNA für anschließende RT-PCR-Amplifikationen liefern konnten. Die für diese Reaktionen als Templat eingesetzte Menge an cDNA entsprach einem Fünfzigstel der jeweils isolierten Menge an RNA.

Diese Materiallimitierung unterstreicht die Notwendigkeit einer *screening*-Methode, welche die Vereinigung von cDNA-Proben erlaubt. Nach Abb. 3.16 können mit der zweistufigen *exon-skipping*-PCR Exondeletionen noch in 1000-facher Verdünnung detektiert werden. Zu berücksichtigen ist aber vor der Vereinigung von Proben der Klonbibliothek, dass auch schwach exprimierte Gene Ziele eines Mutationsscreenings sein könnten. Außerdem gibt es Mechanismen, welche die Degradation von Transkripten mit vorzeitigem Stopp-Kodon - verursacht z.B. durch Deletion eines Exons unter Verschiebung des Leserahmens - auslösen. Dies ist der *nonsense-mediated mRNA decay*, NMD (Frischmeyer und Dietz, 1999; Thermann et al., 1998), der somit die Detektion von Exondeletionen erschweren kann, obgleich der Level konstitutiver *nonsense*-mRNAs praktisch nie auf Null reduziert wird. Als dritte Vorüberlegung ist anzufügen, dass in Proben, die überdurchschnittlich viele Klone enthalten (Abb. 3.18 B), einzelne Klone mengenmäßig unterrepräsentiert sein könnten, die aber nach Möglichkeit in die Durchmusterung einzubeziehen sind. Aus diesen Gründen wäre es leichtfertig, jeweils Proben von insgesamt 500 Klonen (1000 haploiden Genomen) zu vereinen. Vielmehr wurden mit dem schließlich gewählten *pooling*-Schema je 24 cDNA Proben miteinander vermischt, was einem Durchschnitt von  $4,1 \cdot 24 \approx 100$  Klonen (200 haploiden Genomen) pro Pool gleichkommt. Die Gesamtzahl an 96-*well*-Platten verringerte sich damit von 96 auf nunmehr vier, die zusammen bequem in einen Tetra-Thermocycler passten. Das technisch einfachste Schema zur Kombination von je 24 im 96-*well*-Format aufbewahrten Proben besteht in der Vereinigung von Aliquots aus zugleich 24 96er-Platten in einer neuen Platte unter Wahrung der Koordinaten jeder einzelnen Ausgangsprobe (Abb. 3.20 A). Damit wären bei Detektion eines positiven Signals in einer der vier gepoolten Platten die Koordinaten, welche die mutationspositive Probe in ihrer "Heimatplatte" innehat, bereits festgelegt. Für das positive Signal kämen dann aber 24 Plattennummern in Frage. Um zur Ermittlung der positiven Ursprungsplatte nicht alle 24 möglichen, in separaten 96er-Platten gelagerten cDNA-Proben auftauen zu müssen, wurde die Bibliothek zusätzlich in einem alternativen Schema komprimiert, dessen Prinzip in Abb. 3.20 B dargestellt ist. Diese von Platte zu Platte um je eine Position versetzt gepoolten Proben würden nur dann zum Einsatz kommen, wenn in einer der vier Schema-A-Platten bereits ein Mutationskandidat gefunden wäre. In diesem Fall könnte durch *screening* der 24 in Frage kommenden Positionen der betreffenden Schema-B-Platte die gesuchte Plattennummer in einem Schritt ermittelt werden.

Abb. 3.20 Schema zur Vereinigung von cDNA-Proben der Klonbibliothek. Aliquots der Proben wurden auf zwei unterschiedliche Arten gepoolt. Ein positives Signal in einer nach Schema A gepoolten Probe legt die Koordinaten in der Ausgangsplatte fest, nicht jedoch die Plattennummer. Diese kann durch *screening* der 24 in Frage kommenden nach Schema B kombinierten Proben ermittelt werden. Beispiel: Probe A1 in einer



Schema-A-Poolplatte sei positiv, dann kommt die Position A1 von einer der 24 Ursprungssplatten als Quelle für das Signal in Frage. In Schema B wurden die A1-Proben der 24 Platten allesamt auf unterschiedliche Positionen der Poolplatte verteilt, nämlich auf die Positionen A1 bis B12. Würde nun etwa Probe A12 der Schema-B-Poolplatte ein positives Signal liefern, so wäre klar, dass Position A1 von Platte Nr. 12 die mutierte Probe darstellt.

Dieses Prinzip der Ermittlung von Plattenkoordinaten und Plattennummer in zwei Stufen ließe theoretisch die Vereinigung von Aliquots aller 96 Platten in jeweils einer Platte zu, wobei dann zur Bestimmung der Plattennummer in der Schema-B-Poolplatte alle 96 Proben zu "screenen" wären. Damit würde man jedoch im vorliegenden Fall an die Sensitivitätsgrenze der Mutationsdetektion stoßen.

### 3.3.4 Kontrolle der Funktionsfähigkeit des *screening*-Ansatzes

Bei der Etablierung der Klonbibliothek (Abschnitt 3.3.2) wurde einer der rund 9200 Proben ein ES-Zellklon mit bekannter Spleiß-Mutation beigemischt. Dies war der bereits in Teil 3.2 verwendete Klon mit Deletion des dritten Hprt-Exons. Dieser Klon wurde folglich, so wie alle übrigen auch, den Prozessen RNA-Isolation, reverse Transkription und Probenvereinigung unterworfen und konnte damit als Positivkontrolle dienen, um die Probenintegrität am Ende der Prozedur und die Funktionsfähigkeit des gewählten *screening*-Ansatzes zu überprüfen. Dazu wurden die nach dem Schema in Abb. 3.20 A gepoolten cDNA-Proben zweistufig amplifiziert, wobei in der zweiten PCR-Reaktion der *skipping*-Primer für Exon 3 zum Einsatz kam (vgl. Abschnitt 3.2.6). Die PCR-Proben wurden schließlich auf einem großen Agarosegel mit Kapazität für alle vier 96-*well*-Platten der komprimierten Bibliothek analysiert (Abb. 3.21). Zusätzlich wurde in gleicher Weise die bekannte, den Deletionsklon enthaltende Probe aus dem gemäß Schema B in Abb. 3.20 gepoolten cDNA-Gemisch amplifiziert und separat auf dem Gel - in der letzten Reihe links neben dem Größenstandard - mitgeführt.



Abb. 3.21 Positivkontrollscreen zur Detektion des der Bibliothek beigemischten *Hprt-ΔExon3*-Klons. Auf dem Gel (1,7% Agarose) sind 4 mal 96 PCR-Proben aufgetragen. Als Templat für die Reaktionen dienten die vier Platten mit gepoolten cDNA-Proben der gesamten ES-Zellbibliothek, die durch knapp 40,000 Klone repräsentiert ist. Im Unterschied zu Abschnitt 3.2.6 wurde hier ein alternativer *reverse*-Primer (der des Amplikons *Hprt UTR*) für die zweite PCR-Reaktion gewählt, der in Verbindung mit dem exonüberbrückenden Primer eine spezifische Fragmentgröße von 405bp ergibt. Die unten in der rechten Hälfte markierte Bande stellt das positive Signal in der korrekten Probe dar. Links unten neben dem  $\Phi$ -Marker aufgetragen ist das entsprechende PCR-Produkt aus der gemäß Abb. 3.20 B alternativ gepoolten Probe.

Auf dem Gelphoto sind die beiden bekannten, den Kontrollklon repräsentierenden Proben durch Pfeilspitzen markiert. Nur diese Proben lieferten intensive Banden, d.h. eindeutig positive Signale. Die übrigen Proben sind allesamt als negativ zu werten, was bedeutet, dass die Bibliothek keinen weiteren Klon mit Deletion des dritten *Hprt*-Exons enthielt. Die Tatsache jedoch, dass der Kontrollklon eindeutig identifiziert werden konnte, demonstrierte die Funktionsfähigkeit des gewählten *screening*-Ansatzes.

Für die meisten übrigen Proben ist eine schwache Bande in der Höhe des spezifischen PCR-Produkts zu erkennen. Da der (in *forward*-Richtung angeordnete) *skipping*-Primer lediglich mit seinen letzten vier Basen am Beginn von Exon 4 bindet, kommen PCR-Artefakte als Erklärung kaum in Frage. Vielmehr muss man annehmen, dass ein minimaler Anteil fehlerhaft gespleißter *Hprt*-Transkripte in den Wildtyp-Proben vorliegt, die hier aufgrund der hohen Detektionssensitivität sichtbar gemacht werden. Ist die Erklärung richtig, dann könnten solche Ereignisse in anderen Fällen u.U. ein Hindernis für die Identifizierung echter Mutationen darstellen. Dies gilt insbesondere für reguläre alternative Spleiß-Varianten, die in der Wildtypzelle in hoher Kopiezahl vorliegen. In solchen Fällen müsste ein betreffendes Exon für ein Mutationsscreening ausgeschlossen werden.

### 3.3.5 *Proof of concept: screening* nach Exondeletionen in Kit

Für die Entwicklung der *screening*-Methode wurden mutierte ES-Zellklone verwendet, die mit Hilfe eines Selektionstests isoliert wurden. Hprt ist aber das einzige endogene Gen in der Maus, für das die Isolation von mutierten Klonen so einfach möglich ist. Es war nun zu zeigen, dass mit der *screening*-Methode, deren Funktionsfähigkeit im letzten Abschnitt prinzipiell demonstriert wurde, mutierte Klone für andere Gene sequenzbasiert isoliert werden können. Für den *proof of principle* sollte ein bekanntermaßen in ES-Zellen exprimiertes Zielgen ausgewählt werden, dessen funktionelle Mutierung in der Maus einen möglichst spezifischen, äußerlich sichtbaren, dominanten Phänotyp auslöst. Diese Anforderungen erfüllt das Protoonkogen *Kit*, das einen transmembranen Tyrosin-Proteinkinase-Rezeptor kodiert. *Kit* ist allelisch mit dem schon lange bekannten W-Locus (*dominant white spotting*, Geissler et al., 1988). Funktionell mutierte *Kit*-Allele haben pleiotrope Effekte auf die Mausentwicklung, u.a. werden Proliferation und Migration von Melanoblasten aus der Neuralleiste beeinträchtigt. Dadurch entstehen - vorzugsweise bauchseitig und an den Extremitäten - pigmentfreie, d.h. weiße, Zonen bei heterozygoten Tieren. Das Ausmaß dieses Phänotyps ist abhängig vom Schweregrad der zugrundeliegenden Mutation, und zwar im umgekehrten Sinne: funktionelle Null-Mutationen verursachen mildere Pigmentierungsphänotypen als die meisten der bekannten, funktionell relevanten Aminosäuresubstitutionen (Besmer et al., 1993; Nocka et al., 1990). Das auf Chromosom 5 lokalisierte Gen (Referenzsequenz der mRNA: NM\_021099) hat 21 Exons und eignet sich auch dadurch gut für einen Screen nach Exondeletionsmutanten.

Für den ersten der beiden PCR-Amplifikationsschritte wurde der 2928bp große Leserahmen der 5132bp langen cDNA-Sequenz in zwei Subfragmente unterteilt (siehe Primerliste im Anhang). Für die sich anschließenden Reaktionen unter Verwendung exonüberspringender Primer würden dann wahlweise das erste oder zweite Subfragment als Templat eingesetzt, je nachdem, in welchem Amplikon sich das betreffende Exon befindet.

#### **Verfeinerung der *screening*-Methode**

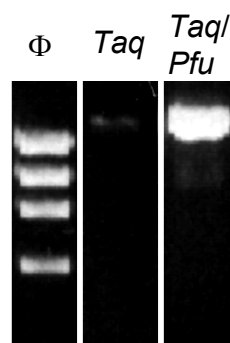
Die Reaktionen des zweiten PCR-Schrittes sollten vor Beginn des eigentlichen Screens getestet werden, denn es ist z.B. vorher auszuschließen, dass sich bei Verwendung von Wildtyp-cDNA als Startmaterial Banden der spezifischen (exondeletierten) Größe ergeben. Dies kann, wie zuvor angedeutet, geschehen, wenn ein *skipping*-Primer allein mit seinem 3'-Bereich am Beginn des Folgeexons bindet. Um dies zu vermeiden, sollte dieser Teil kurz sein gegenüber dem 5'-Bereich des Oligonukleotids, mit dem es an das Ende des vorangehenden Exons bindet (vgl. Abb. 3.16). (Die Verwendung der Begriffe stromaufwärts und stromabwärts wird hier vermieden, weil einige der *Kit-skipping*-Primer in *reverse*-Richtung angeordnet waren.) Die andere Möglichkeit, in Testreaktionen nach dem zweiten



PCR-Schritt Fragmente der spezifischen Größe zu erhalten, ist gegeben durch alternative, d.h. physiologische, oder spontane Spleiß-Varianten, die sich durch Deletion eines gegebenen Exons auszeichnen. Es galt mithin, solche Fälle vorher auszusortieren.

Im Laufe der Tests stellte sich aber zunächst heraus, dass die hier mit guter Absicht neu eingeführte Verwendung von *Taq/Pfu*-Gemischen in der zweiten PCR-Reaktion zu vermeiden ist. Abb. 3.22 zeigt den Grund dafür: Die 3'-Exonuklease-Aktivität der *Pfu*-DNA-

Abb. 3.22 Effekt von *Pfu*-Polymerase in der *exon-skipping*-PCR. Gezeigt ist ein Beispiel für Kit Exon 9 (Primerpaar *Kit skip ex 9*, siehe Primerliste im Anhang). Theoretische Bandengröße ohne Exondeletion: 1496bp, mit Exondeletion: 1310bp; Länge des größten  $\Phi$ -Marker-Fragments: 1353bp. Templat: Erstrunden-PCR auf Wildtyp-cDNA. *Taq/Pfu*-Mischungsverhältnis: 9 : 1. Mit *Pfu*-Polymerase allein wurden die gleichen Ergebnisse erzielt wie mit dem *Taq/Pfu*-Gemisch. Gel: 1,3% Agarose. Weitere Erklärungen: siehe Text.



Polymerase bedingt anscheinend die partielle Degradation der *skipping*-Primer, wodurch diese dann auf Wildtyp-Templat plötzlich Spezifität erlangen. Die

resultierenden Fragmente sind zwar um die Länge des zu überspringenden Exons größer als es die spezifischen PCR-Produkte wären, doch würden sie die Interpretation der Gele in einem Screen erschweren, insbesondere wenn die Exons klein sind. Aus diesem Grund wurden die *skipping*-PCRs fortan ohne Zusatz von *Pfu*-Polymerase durchgeführt. Der in Abb. 3.22 vorliegende Fall einer Nebenproduktbildung, allerdings ohne partielle 3'-Degradation des *skipping*-Primers, ist in Abb. 3.24 B (Fall 2) schematisch dargestellt.

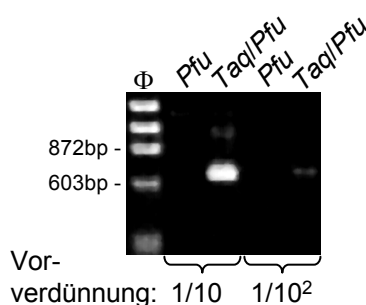
Der drastische Effekt des Zusatzes von *Pfu*-Polymerase in der *exon-skipping*-PCR warf die Frage auf, ob das *Taq/Pfu*-Mischungsverhältnis auch in der ersten PCR-Reaktion kritisch sein könnte. Der *Pfu*-Anteil wurde daher in der Amplifizierung der kodierenden Kit-Sequenz variiert, bevor die exonüberbrückende Reaktion nach den zuvor verbesserten Bedingungen durchgeführt wurde. Abb. 2.23 zeigt am Beispiel von Exon 3, dass für den ersten PCR-

Abb. 3.23 Effekt von *Taq*-Polymerase in der ersten Amplifizierung auf das Ergebnis nach der *exon-skipping*-PCR.

Gezeigt ist ein Beispiel mit dem Primerpaar *Kit skip ex 3 neu* (vgl. Abb. 3.24 A), das im Falle einer Deletion von

Exon 3 ein Fragment der Größe 962bp - 282bp = 680bp generieren sollte. Als

Templat wurde hier jedoch Wildtyp-cDNA eingesetzt. Vorverdünnung: bevor 1/25 Volumen der ersten PCR-Reaktion als Templat in die zweite überführt wurde, wurde das erste Produkt auf 1/10 bzw. 1/100 vorverdünnt. Gel: 1,5% Agarose.



Schritt das exakte Gegenteil gilt: ein hoher Anteil von *Taq*-Polymerase wirkt hier kontraproduktiv auf das Ergebnis nach der zweiten PCR-Reaktion. Das spezifische Produkt mit Exondeletion hat hier eine Länge von 680bp. Bei

Verwendung eines *Taq/Pfu*-Gemisches mit nur geringem *Pfu*-Anteil (hier gezeigt für 2% der Aktivität) könnte man annehmen, es läge hier ein Fall von alternativem Spleißen vor. Diese Bande verschwindet jedoch, wenn der *Pfu*-Anteil in der ersten PCR angehoben wird - im

Optimalfall bis 100% - wie in der Abbildung gezeigt. Das Phänomen war reproduzierbar und wurde auch für andere Exons beobachtet. Es scheint also, als würden durch einen hohen *Taq*-Polymerase-Anteil in der *ersten* PCR-Reaktion Artefakte produziert, die im *zweiten* Amplifizierungsschritt zur Synthese von Fragmenten der im Falle einer Exondeletion erwarteten Größe führen. Es ist schwer nachzuvollziehen, um welche Art von Artefakten es sich hier handeln könnte, doch wurde das Ergebnis von Abb. 3.23 berücksichtigt, indem von diesem Punkt an die Reaktionen der Erstrunden-PCRs mit möglichst hohem *Pfu*-Anteil durchgeführt wurden.

Die Testreaktionen mit den *Kit-skipping*-Primern für Exon 2 und 3 machten die Notwendigkeit der PCR-Optimierung vor Beginn des eigentlichen Screens deutlich. Abb. 3.24 A zeigt Reaktionen nach dem zweiten Amplifizierungsschritt, die mit je zwei unterschiedlichen *skipping*-Primern durchgeführt wurden - die Primer sind mit a (für alt) und n (für neu) abgekürzt und ihre Struktur ist am rechten Rand der Abbildung wiedergegeben. Der Gebrauch der alten Oligonukleotide führte bei moderaten *annealing*-Temperaturen in beiden Fällen zur Bildung der spezifischen Fragmente von 954 (Exon 2) bzw. 673bp (Exon 3), wobei diese im Fall von Exon 3 bei erhöhten *annealing*-Temperaturen verschwanden. Für Exon 2 jedoch blieb dieser Effekt aus. Dies legte nahe, dass der Exon 3 überbrückende Primer bei niedrigen Anlagerungstemperaturen mit seinem relativ langen 3'-Bereich am Beginn von Exon 4 des Wildtyp-Templats bindet und so das Artefakt in der *zweiten* PCR-Reaktion produziert (Fall 3 in Abb. 3.24 B). Im Falle der Exon2-PCR sprach die Konstanz und Stärke des 954bp-Signals auch bei erhöhter Vorverdünnung des Produkts aus der ersten Reaktion eher gegen einen solchen Effekt, obwohl der an Exon 3 bindende 3'-Bereich des alten Exon2-*skipping*-Primers ebenfalls etwas zu lang geraten war.

Um diese Vermutungen zu untermauern, wurden alternative *skipping*-Primer verwendet - mit verkürzten 3'-Überlappungen mit den jeweiligen Folgeexons (siehe Strukturen der grünen Oligonukleotide in der Abbildung). In beiden Fällen sollte damit ausgeschlossen sein, dass die Primer allein mit ihrem 3'-Bereich an Wildtyp-cDNA binden können. Der Effekt der Primerstrukturveränderung geht aus Abb. 3.24 A hervor: für Exon 2 ergab sich im Wesentlichen kein Unterschied - mit Ausnahme einer verstärkten Nebenproduktbande von 1231bp bei 52°C (= spezifische Amplikonlänge unter Einbeziehung des im Wildtyp präsenten zweiten Exons) aufgrund der festeren Bindung des *skipping*-Primers am Ende von Exon 1 und der durch die Verkürzung seines 3'-Endes bedingten Reduzierung der Spezifität (Fall 2 in Abb. 3.24 B). Mit dem neuen *skipping*-Primer für Exon 3 hingegen verschwanden die Artefakte auch bei niedrigen *annealing*-Temperaturen. Diese Beobachtungen erhärteten die Vermutung, dass mit riskantem Primerdesign die Generierung falsch positiver Resultate droht (Exon 3: Fall 3 in Abb. 3.24 B), bzw. dass alternative/spontane Spleiß-Varianten mit der Detektion echter Deletionsmutationen interferieren (Exon 2: Fall 1 in Abb. 3.24 B).

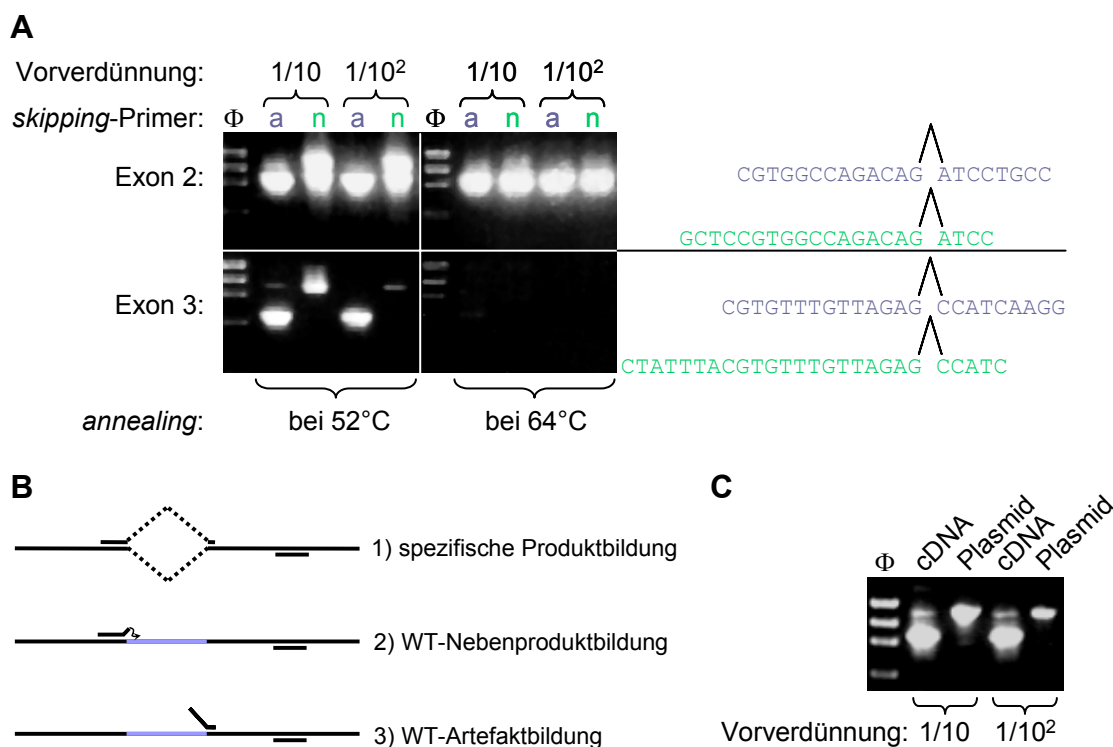


Abb. 3.24 PCR-Tests für die *exon-skipping*-Reaktionen von Kit Exon 2 und 3. A: Variation von Primerstruktur und *annealing*-Temperatur. Längen der vier sichtbaren  $\Phi$ -Markerbanden: 1353, 1078, 872 und 603bp. Weitere Erklärungen: siehe Text. B: Modell zur der Erklärung der hier gemachten Beobachtungen. Alternatives oder spontanes Spleißen in größerem Umfang liefert spezifische Produkte - Fall 1 - und interferiert daher grundsätzlich mit der Mutationsdetektion durch *exon-skipping*-PCR. Die Fälle 2 und 3 lassen sich durch Optimierung der PCR-Bedingungen in der Griff bekommen. C: Für Exon 2 muss spontanes Spleißen vorliegen, denn ein Kit-Plasmidklon lieferte unter sonst gleichen PCR-Bedingungen nicht das spezifische Produkt von 958bp. Von den Vorverdünnungen der ersten PCR-Reaktionen wurde in A und C jeweils 1/25 Volumen als Templat für die *skipping*-PCRs eingesetzt. Gele in A und C: 1,5% Agarose.

Um endgültig auszuschließen, dass das Ergebnis für Exon 2 nicht durch die PCR-Bedingungen verursacht wurde, wurde die Kit-cDNA kloniert und das resultierende Plasmid im Vergleich mit Wildtyp-cDNA für die zweistufige Exon2-*skipping*-PCR eingesetzt (Abb. 3.24 C). Vor der zweiten PCR-Reaktion wurden die Produktkonzentrationen aus der ersten Kit-Amplifizierungsstufe normalisiert. Das Gelbild zeigt, dass bei Verwendung des Plasmids als Templat die spezifische 958bp-Bande nicht auftritt. Als einzig mögliche Erklärung für den Unterschied zur Verwendung von cDNA-Templat bleibt die Annahme alternativen bzw. spontanen Spleißens unter Deletion des zweiten Exons.

### Kit-Screen

Aus dem gleichen Grund mussten auch die Exons 13, 16 und 17 vom Screen ausgeschlossen werden. Generell wurden die *skipping*-Primer nach den Ergebnissen des letzten Abschnittes so gesetzt, dass sie mit maximal fünf Basen am Beginn des Folgeexons binden. Die *annealing*-Temperatur wurde jeweils so hoch eingestellt, dass die Wildtyp-

Nebenproduktbildung (Abb. 3.24 B, Fall 2) nahezu vollständig unterdrückt wurde. Die Vorverdünnung der ersten Kit-PCR betrug 1/100; bei einer Gesamt-Zyklusanzahl von 30 in beiden PCR-Schritten wurde 1µl davon als Templat in die 25µl-*skipping*-PCR überführt. Die Reaktionen wurden gemäß Abschnitt 2.2.5 als *touchdown*-PCRs durchgeführt.

Für mehrere Exons wurden einige wenige positive Signale detektiert, die sich jedoch durch Wiederholung beider PCR-Reaktionen nicht bestätigen ließen. Die Wiederholung *beider* PCRs erschien wegen der Möglichkeit sporadischer Artefaktbildung im *ersten* Amplifizierungsschritt (Abb. 2.23, trotz eines nur geringen *Taq*-Anteils) oder wegen spontaner Spleiß-Varianten als die einzige Möglichkeit, zwischen positiven und falsch positiven Signalen zu diskriminieren. Letztlich produzierten zwei benachbarte Proben im Screen für Exon 6 und eine für Exon 18 wiederholt positive Banden der korrekten Größen von 909 bzw. 1201bp (Abb. 3.25 A bzw. B). Der unwahrscheinliche Fall, in zwei benachbarten Proben positive Signale zu erhalten, bestätigte sich nicht: die *skipping*-PCR für Exon 6 war eine der Reaktionen, die etwas anfälliger waren für falsch positive Signale - womit zu erklären wäre, dass sich nach *rescreening* der beiden in Frage kommenden Pools für Exon 6 allein die rechte der beiden in Abb. 3.25 A markierten Proben als reproduzierbar positiv erwies.

#### A Screen für Kit Exon 6



#### B Screen für Kit Exon 18

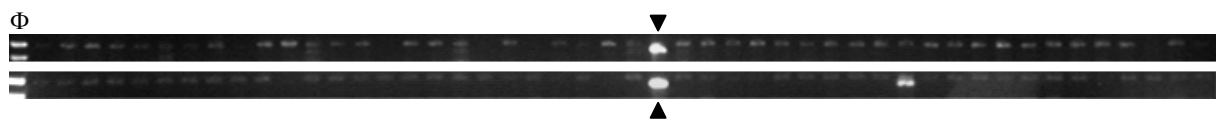


Abb. 3.25 Kit-Screen. Gezeigt sind je 48 *exon-skipping*-PCRs (1/8 aller aufgetragenen Proben) für Exon 6 (A) und Exon 18 (B). Die zugrundeliegenden cDNA-Proben waren gepoolt gemäß Abb. 3.20 A. Bei einfacher Wiederholung beider Screens waren die markierten Positionen die einzigen mit doppelt positiven Signalen. In einer weiteren Einzelwiederholung der Reaktionen für diese Kandidaten stellten sich allein die beiden mit ausgefüllten Pfeilen markierten Proben als reproduzierbar positiv heraus. Die in den Gelausschnitten für Exon 6 gezeigten Markerfragmente liegen bei 1078 bzw. 872bp und bestätigten damit die Spezifität der markierten Signale (909bp). Das gleiche gilt für Exon 18: theoretische Größe des deletieren Fragments: 1201bp; sichtbare  $\Phi$ -Markerbanden: 1353 und 1078bp. Die Hintergrundbanden höheren Molekulargewichts in A und B sind die WT-Nebenprodukte gemäß Abb. 3.24 B. Deren Größen betragen 1099bp für das Exon6-Amplikon bzw. 1313bp im Fall von Exon 18 (vgl. Primerliste im Anhang).

Den aufgrund des *pooling*-Schemas (Abb. 3.20 A) direkt ersichtlichen Positionskordinaten ( $\Delta$ Exon6: Position D6 der Poolplatte von 24er-Set Nr. 1,  $\Delta$ Exon18: D4 in Poolplatte für Set Nr. 3) war nun jeweils eine von 24 möglichen Plattennummern zuzuordnen. Die dazu jeweils durchgeführte Durchmusterung der 24 nach Abb. 3.20 B in Frage kommenden Alternativpools ergab in beiden Fällen eindeutige, positive Signale (Abb. 3.26).

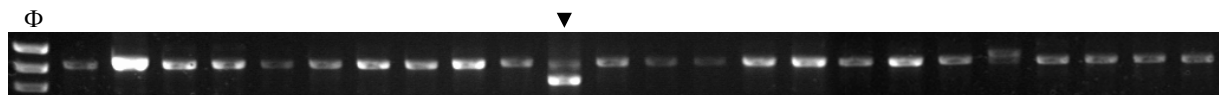
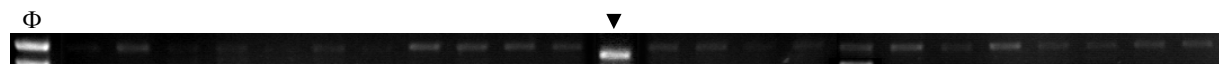
**A Exon 6****B Exon 18**

Abb. 3.26 Durchmusterung der 24 relevanten Alternativpools zur Identifizierung der Plattennummer. Die theoretischen Fragmentgrößen wurden bereits in der Legende zu Abb. 3.25 genannt und konnten auch hier bestätigt werden. Die Pfeile markieren die beiden positiven Pools, deren Position in der aufgetragenen Probenreihenfolge die Nummer der positiven Originalplatten bedeuten. In einigen Proben traten unspezifische Banden geringerer Größe auf, die hier und in Abb. 3.25 der Klarheit halber weggeschnitten wurden.

Mit der Identifizierung der Originalplatten - gemäß Abb. 3.26 Nummer 11 ( $\Delta$ Exon6) bzw. 12 ( $\Delta$ Exon18) und den zuvor ermittelten Positionskordinaten konnten nun die entsprechenden ungepoolten positiven cDNA-Proben für die Bestätigung herangezogen werden. Da diese durch im Mittel 4,1 Klone repräsentiert sind (vgl. Abschnitt 3.3.2), sollte die Amplifizierung mit den exonüberbrückenden Primern hier in einem einzigen PCR-Schritt möglich sein. Abb. 3.27 zeigt das Ergebnis dieser Reaktionen.

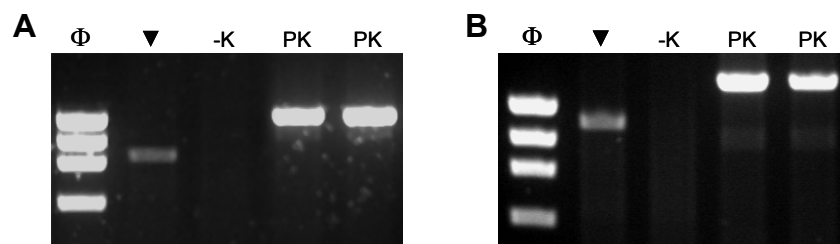


Abb. 3.27 Identifizierung von Kit-Deletionsklonen in ungepoolten cDNA-Proben. A:  $\Delta$ Exon6, B:  $\Delta$ Exon18. Die Pfeile markieren die Proben aus den zuvor identifizierten Positionen der positiven 96-well-Platten. -K: Als Negativkontrollen wurden weitere cDNA-Proben aus den jeweiligen Platten eingesetzt. PK: Den Matrizen aus Spur 1 und 2 entsprechende Erstrunden-Kit-PCRs als Positivkontrollen für die Integrität der cDNA (A: *Kit 1.H. außen*, B: *Kit 2.H. außen*). Sichtbare  $\Phi$ -Markerbanden: 1353, 1078, 872 und 603bp. Gele: 1,5 (A) bzw. 1,2% (B) Agarose.

Die erwarteten Fragmente von 909 ( $\Delta$ Exon6) bzw. 1201 ( $\Delta$ Exon18) waren in beiden Fällen amplifizierbar. Die Negativkontrollen hingegen lieferten keine Signale. Als naheliegende mögliche Erklärungen für die vergleichsweise geringe Intensität der deletionsspezifischen Banden kommen die nicht optimierten *skipping*-PCR-Bedingungen, die mögliche Herunterregulierung der mutierten Transkripte durch den NMD oder auch die Ausdünnung der Mutationen auf Klonebene innerhalb der zugrundeliegenden Zellproben in Frage.

Die logischen nächsten Schritte waren die Reaktivierung der beiden entsprechenden ES-Zellpools, das Picken einzelner Kolonien (Subklone), deren Expansion und Überprüfung in bezug auf die jeweilige Exondeletion - um letztlich für die Generierung von Mausmutanten

Subklone zu etablieren, welche die  $\Delta$ Exon6- bzw. die  $\Delta$ Exon18-Mutation tragen. Die positiven 96-*well*-Zellproben der Masterplatten wurden auf 5cm-Schalen, d.h. in hoher Ausdünnung, rekultiviert. Die resultierende Koloniedichte betrug etwa  $1\text{cm}^{-2}$ , d.h. die Wahrscheinlichkeit, dass eine gegebene Kolonie zwei unterschiedliche Subklone enthielt, war sehr gering. Aus Aliquots expandierter Subklonproben wurde RNA isoliert, um nach reverser Transkription die mutationsspezifischen RT-PCRs durchführen zu können. Für beide Exons waren die in der einstufigen PCR erhaltenen Signale ähnlich schwach wie bereits in Abb. 3.27. Damit scheidet die zuvor angeführte Erklärungsmöglichkeit, dass die Mutationen auch in den (auf cDNA-Ebene) ungepoolten Proben zu stark ausgedünnt sein könnten, aus, denn hier stammte das Ausgangsmaterial ja aus individuellen Subklonen. Die Gelanalysen nach zweistufiger PCR für jeweils 13 Subklone sind in Abb. 3.28 gezeigt.

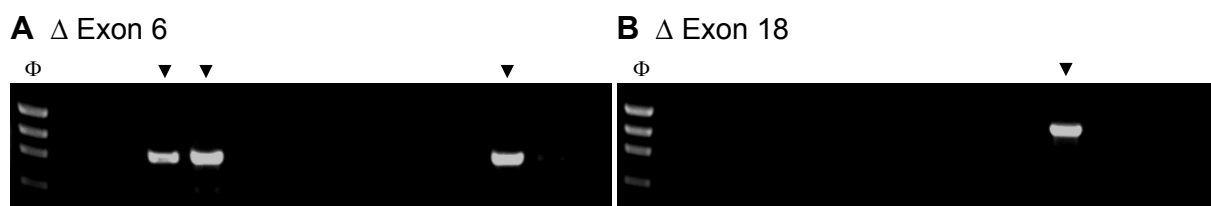


Abb. 3.28 *Rescreening* von Subklonen aus mutationspositiven Proben der Klonbibliothek. Die PCR-Reaktionen wurden hier zur Signalverstärkung zweistufig durchgeführt, doch auch die *skipping*-PCRs allein lieferten die hier sichtbaren Banden ( $\Delta$ Exon6: 909bp,  $\Delta$ Exon18: 1201bp). Die Spezifität der PCR-Reaktionen wurde durch Sequenzierung der Produkte bestätigt. Gemeinsames Gel: 1,5% Agarose.

Unter den expandierten Subklonen befanden sich damit drei positive für die Deletion von Kit Exon 6 und ein positiver für die von Exon 18. Die Weiterarbeit erfolgte mit Subklon Nr. 4 aus Abb. 3.28 A und der einzigen positiven ES-Zellprobe für die Deletion von Exon 18. Es stellte sich nun zunächst die Frage, warum die einstufigen *skipping*-PCRs nur schwache Banden lieferten. Die plausibelste Erklärung ist wohl die Instabilisierung der mutierten Transkripte durch den NMD, denn beide Exondeletionen lösen eine Verschiebung des Leserahmens aus (Exon 6 = 190bp, Exon 18 = 112bp), so dass vorzeitige Stopp-Kodons mehr als 50 Positionen vor der letzten Exon-Exon-Grenze eingeführt werden - der Bedingung für die Identifizierung und die Initiierung der Transkriptdegradation durch die NMD-Maschinerie (Frischmeyer und Dietz, 1999). Der NMD kann in Zellkultur nach Bateman et al. (1999) inaktiviert werden durch vierstündige Inkubation mit dem Translationsinhibitor Zyloheximid (100  $\mu\text{g/ml}$ ), vermutlich weil mindestens eine wichtige Komponente der NMD-Maschinerie einem hohen Protein-*turnover* unterliegt. Ein einfacher Test, die Aktivität des NMD zu überprüfen, bestünde also in dieser Weise der ES-Zell-Vorbehandlung, gefolgt von RNA-Isolation und Kit-RT-PCR. In Abb. 3.29 sind für beide Fälle ( $\Delta$ Exon6 und  $\Delta$ Exon18) PCR-Reaktionen von unbehandelten und Zyloheximid-inkubierten Proben aufgetragen. Als Kontrolle dienten entsprechend vorbereitete Wildtyp-Zellen. RNA-Ausbeuteunterschiede zwischen den Proben wurden durch Mengengleichung vor der cDNA-Synthese egalisiert.

Es wurden jeweils zwei unterschiedliche RT-PCR-Reaktionen durchgeführt, die einstufige *exon-skipping*-PCR und die Amplifizierung eines die Exondeletion enthaltenden Teils der Kit-Sequenz. Die wegen ihrer Allelspezifität naturgemäß geringere Ausbeute der *skipping*-PCR wurde für die Gelelektrophorese ausgeglichen durch Auftragung des doppelten PCR-Reaktionsvolumens.

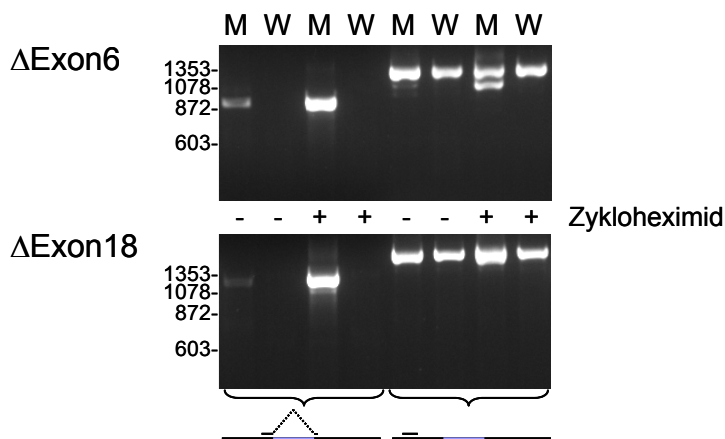


Abb. 3.29 Effekt der Zykloheximid-Vorbehandlung auf die Produktausbeute der *exon-skipping*-PCR für die mutierten Kit-Klone  $\Delta$ Exon6 und  $\Delta$ Exon18. M: mutierter ES-Zellklon; W: Wildtyp. Erste vier Spuren jeweils: *exon-skipping*-PCR, letzte vier  $\Delta$ Exon6: Primerpaar *Kit 1.H. außen*, letzte vier  $\Delta$ Exon18: Primerpaar *Kit 1.H. innen* (siehe Anhang). Links sind die Positionen einiger Markerbanden (in bp) angezeigt. Gemeinsames Gel: 1,4 Agarose.

Der Vergleich von Spur 1 und 3 (*exon-skipping*-PCRs der mutierten Klone) zeigt, dass die spezifische Produktausbeute stark verbessert ist mit Zykloheximid-Vorbehandlung. Die entsprechenden Wildtypkontrollen sind erwartungsgemäß negativ. (Spontane Spleiß-Varianten, die bei Ausschaltung des NMD nicht mehr unterdrückt werden, treten zu selten auf, als dass sie in einer einstufigen PCR-Reaktion amplifizierbar wären.) Die mehr oder weniger einheitlichen Bandenstärken für die deletionsunspezifischen PCRs (Spuren 5 bis 8) schließen größere Diskrepanzen in der Kit-Gesamtexpression als Ursache für die Intensitätsunterschiede zwischen Spur 1 und 3 aus. Damit sollte gezeigt sein, dass der NMD in beiden Deletionsklonen operativ ist, indem er die mutierten Kit-Transkripte zur teilweisen Degradation freigibt. Da die PCR-Reaktionen vor Erreichen der Sättigungsphase unterbrochen wurden (18 Zyklen mit End-Hybridisierungstemperatur nach *touchdown*, siehe Abschnitt 2.2.5) kann das Ausmaß der Transkriptpegelreduktion semiquantitativ abgeschätzt werden: im Gegensatz zur Deletion von Exon 18 ist die  $\Delta$ Exon6-Bande in Spur 7 aufgelöst. Deren Intensität ist annähernd so groß wie die der Wildtyp-Bande, d.h. der NMD war nach vierstündiger Zykloheximid-Inkubation nahezu vollständig inaktiviert. Damit kann das Verhältnis der  $\Delta$ Exon6-Produktmenge in Spur 1 zu der in Spur 3 direkt als Maß für die NMD-vermittelte Reduktion des Transkriptpegels aufgefasst werden. Durch Vergleich mit jeweils ähnlich intensiven  $\Phi$ -Markerbanden (nicht gezeigt) konnte so abgeschätzt werden, dass die mutierte mRNA in unbehandelten ES-Zellen auf etwas weniger als 20% ihres eigentlichen Levels herunterreguliert sein muss. Ähnliches gilt offensichtlich für den  $\Delta$ Exon18-Klon.

## Mausarbeit

Vor dem Versuch, aus ES-Zellen chimäre Mäuse zu generieren, ist es ratsam, die Integrität des Karyotyps der zu verwendenden Linien zu überprüfen, weil dieser in ES-Zellen oft instabil ist (Eggan et al., 2002). Zu diesem Zwecke wurden Chromosomenausstriche für die beiden Subklone präpariert. Repräsentative Beispiele sind in Abb. 3.30 gezeigt.

$\Delta$ Exon6

$\Delta$ Exon18

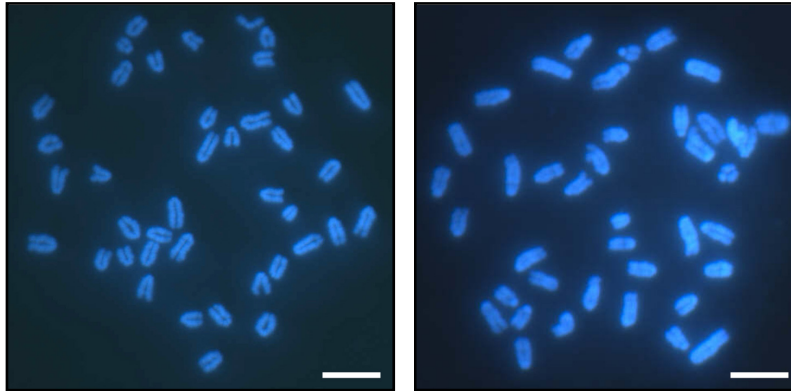


Abb. 3.30 Überprüfung des Karyotyps mutationspositiver Kit-Subklone. Die Chromosomen wurden mit DAPI angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Balken: 10 $\mu$ m.

Es wurden je Subklon 20 Ausstriche ausgezählt. In beiden Fällen ergaben 19 Zählungen die korrekte Anzahl von 40 Chromosomen. Es schien also, als habe sich die harsche Prozedur aus chemischer Mutagenese und insgesamt mehrwöchiger Kultivierung im 96-*well*-Format in dieser Hinsicht nicht negativ bemerkbar gemacht. Die beiden Subklone eigneten sich damit unter dem Aspekt der karyotypischen Intaktheit zur Produktion von chimären Mäusen. Der Schwerpunkt wurde dabei auf den Subklon mit Deletion von Exon Nr. 18 gelegt, weil dieses einen Teil der Tyrosin-Kinasedomäne im KIT-Protein kodiert (Abb. 3.31); die meisten charakterisierten phänotypisch wirksamen Kit-Mutationen liegen innerhalb dieses Bereichs (Besmer et al., 1993). So lokalisierten Nocka et al. (1990) die Punktmutation  $W^{A1}$  in dem von Exon 18 kodierten Abschnitt. Neben der schieren Deletion funktionell relevanter Aminosäuren würde das Überspringen von Exon 18 zudem den Leserahmen verschieben. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die Deletion dieses Exons in der Maus einen (Null-)Phänotyp auslösen würde.

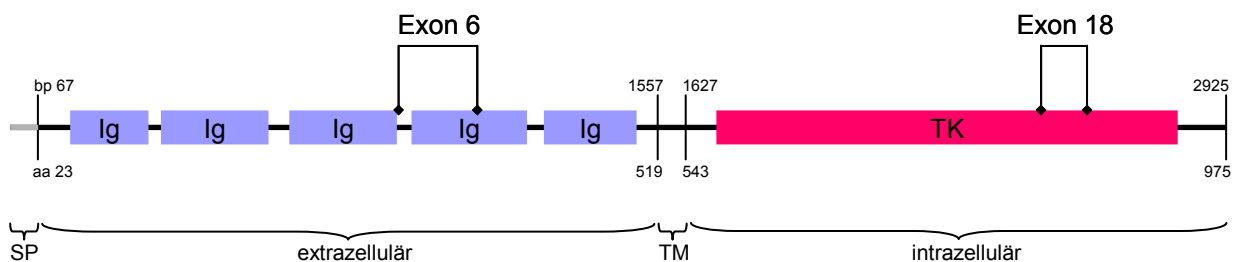


Abb. 3.31 Darstellung der von Exon 6 und 18 kodierten Bereiche im KIT-Protein. Oberhalb der Proteinstruktur sind die Positionen der kodierenden cDNA angegeben, unterhalb die zugehörigen Aminosäurepositionen. SP: Signalpeptid, TM: Transmembrandomäne, Ig: Immunglobulindomäne, TK: Tyrosin-Kinasedomäne. Die relativen Abstände sind maßstabsgetreu wiedergegeben. Die Grafik wurde anhand der Datenbankeinträge P05532 (Swiss-Prot: <http://www.expasy.org/>) bzw.



NM\_021099 (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) erstellt. Die Ermittlung der Exongrenzen erfolgte mit Hilfe des UCSC-Maus-Genombrowsers (<http://genome.ucsc.edu/>; Kent, 2002).

Exon 6 hingegen liegt unmittelbar stromabwärts des Bereichs, der die für die Ligandenbindung zuständigen ersten drei Immunglobulinodomänen kodiert (siehe Grafik). Es ist wahrscheinlich, dass auch die Deletion von Exon 6 die Funktion des Proteins beeinträchtigt, denn wie die  $\Delta$ Exon18-Mutation verursacht das basenpaargenaue *skipping* dieses Exons eine Verschiebung des Leserahmens. Aus diesem Grund wurde versucht, auch mit dem ausgewählten  $\Delta$ Exon6-Subklon chimäre Mäuse zu generieren.

Dazu wurden die Methoden angewandt, die im Abschnitt 2.4 beschrieben sind. Aggregationstechniken wie die Kombination von frühen Morula-Embryonen mit ES-Zellklumpen oder die Injektion von ES-Zellen unter die Zona pellucida früher Morulae lieferte nach Embryotransfer ausschließlich schwarzfellige Nachkommen, d.h. keine Chimären. Dabei wurden eine Reihe von Parametern wie die Anzahl aggregierter ES-Zellen pro Embryo (3 bis 15), der Rezipienten-Mausstamm (B6, CD1, NMRI) und verschiedene technische Varianten durchdekliniert. Parallel wurde mit der Injektion der ES-Zellen in Blastozysten begonnen. Als sich dort erste Erfolge einstellten, wurde der Schwerpunkt auf diese Technik verlagert.

Mit dem  $\Delta$ Exon6-Subklon gelang die Produktion von chimären Tieren nicht. Signifikanterweise jedoch wurden nach Transfer injizierter Embryonen auch nur selten Nachkommen mit schwarzem Fell geboren (vier Jungtiere gegenüber rund 150 transferierten Embryonen). Es hatte allerdings den Anschein, als würden regelmäßig Schwangerschaften in den Empfänger-Weibchen ausgelöst, was aus der Verdickung ihrer Bäuche geschlossen werden konnte. In der zweiten Schwangerschaftshälfte aber wurden die Weibchen i.d.R. wieder schlanker. In einem Fall wurde ein zuvor als klar trächtig eingestuftes Tier am 20. Tag *p.c.* geopfert, um den Uterus zu examinieren. Dieser war dem Normalfall gegenüber deutlich verdickt und es fanden sich degradierte Überreste von Föten. Interessanterweise zeichnete sich eines der vier erhaltenen, ansonsten vollkommen schwarzfelligen Nachkommen durch einen pigmentlosen Streifen im Bauchbereich aus (Abb. 3.32) - ein Phänotyp ähnlich dem, der für heterozygote Tiere mit funktioneller Mutation in *Kit* zu erwarten wäre.



Abb. 3.32 Schwarze Maus mit weißem Streifen im Ventralbereich. Das Männchen ist eines von vier erhaltenen Mäusen nach Blastozysteninjektion des  $\Delta$ Exon6-Subklons. Abgesehen von dem hier gezeigten Merkmal wies keines der Tiere Anzeichen von Chimarismus auf. Bei der Rückkreuzung des gezeigten Individuums mit B10-Weibchen wurde es im Genitalbereich verletzt und verstarb einige Zeit später. 10 Junge aus zwei vorherigen Verpaarungen hatten zu 100% schwarzes Fell.

Mit dem  $\Delta$ Exon18-Subklon gelang durch Blastozysteninjektion und Transfer reexpandierter Embryonen in Uteri bzw. Ovidukte scheinchwangerer Weibchen die Generierung von etwa zehn chimären Tieren männlichen Geschlechts. Die Ausbeute an Chimären betrug nach einer Reihe von technischen Verbesserungen i.d.R. 1 bis 2 pro Wurf, bei einer durchschnittlichen Wurfgröße von etwa vier Tieren. Der Anteil lebendig geborener Jungtiere an der Gesamtanzahl transferierter Embryonen war mit ca. 1/5 gering, weshalb zur Erzielung ausreichend hoher Würfgrößen letztlich bis zu 40 Embryonen in jede Leihmutter überführt wurden mussten. Der Prozentsatz braunen Fells als Maß für den Beitrag der ES-Zellen zum chimären Mauskörper variierte von schätzungsweise zehn bis 80%. Die drei in Abb. 3.33 gezeigten Chimären kamen unter diesem Gesichtspunkt für Verpaarungen mit Weibchen in Frage.

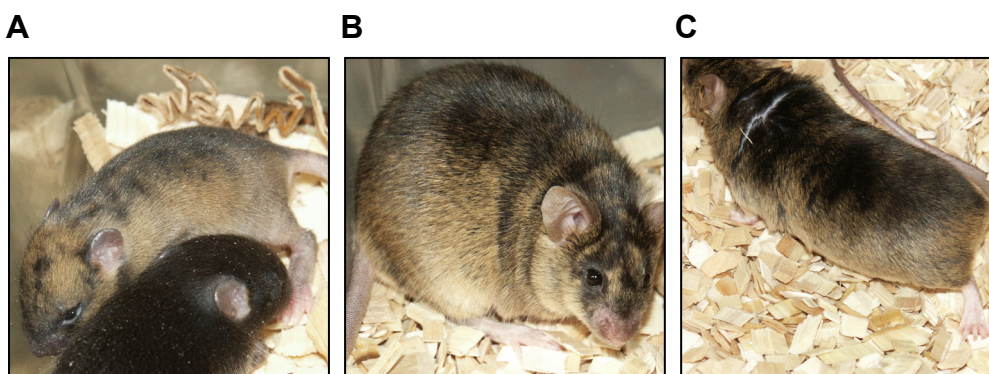


Abb. 3.33 Drei aus dem  $\Delta$ Exon18-Subklon generierte Chimären. Die drei Tiere unterschieden sich geringfügig im Braunanteil des Fells und sind in entsprechender Reihenfolge angeordnet. Die beiden Tiere B und C wurden für reguläre Verpaarungen eingesetzt. Die links als Jungtier gezeigte beste Chimäre A konnte aufgrund einer durch einen Käfiginsassen zugefügten Verletzung im Genitalbereich nicht verwendet werden. Die Rettung der Keimbahn im Alter von 10 Wochen durch *In-Vitro*-Fertilisation (im Methodenteil nicht beschrieben) scheiterte an dem hohem Anteil immobilisierter Spermien und ihrem insgesamt geringen Gehalt in diesem Tier.

Interessanterweise wiesen die Chimären eine ähnliche Verteilung brauner gegenüber schwarzer Zonen im Fell auf: schwarz dominierte dorsal entlang der Wirbelsäule, während die Tiere seitlich und vor allem ventral braunes bzw. hellbraunes Fell hatten.

Die für Verpaarungen einsetzbaren Tiere B und C in Abb. 3.33 unterschieden sich deutlich in der Ausbeute an Nachkommen. Diese war mit Tier C etwa zehn mal höher als mit Chimäre B. Unter den innerhalb von drei Monaten erzielten rund 30 Nachkommen von Chimäre C waren - mit einer Ausnahme - nur schwarzfellige Tiere. An diesem Tier konnte der in 50% der braunfelligen Nachkommen zu erwartende Phänotyp pigmentloser Bereiche beobachtet werden: diese waren beschränkt auf die Pfoten und das Schwanzende. Das bedeutete, dass die Keimbahntransmission des  $\Delta$ Exon18-Subklons geglückt war (Abb. 3.34):



Abb. 3.34 Keimbahntransmission mit dem  $\Delta$ Exon18-Subklon. Das Weibchen ging hervor aus Verpaarungen von Chimäre C aus Abb. 3.33 mit Weibchen des Stammes B6. Die braune Fellfarbe zeigt an, dass es sich nur um ein von den ES-Zellen abgeleitetes Tier handeln kann. Die Maus ist Träger eines heterozygoten Phänotyps, der typisch ist für Null-Mutationen: die pigmentlosen Bereiche beschränken sich auf die Pfoten und das Schwanzende. Zusätzlich fand sich dorsal ein kleiner Fleck weißen Fells (hier nicht gezeigt).

Wie zuvor angesprochen, verursachen Null-Mutationen in *Kit* mildere Phänotypen als eine Reihe von funktionell relevanten Basensubstitutionen (Besmer et al., 1993). Bernex et al. (1996) inserierten durch *gene targeting* ein Reportergen in das erste *Kit*-Exon, um so einen Null-Phänotyp zu kreieren. Die in den heterozygoten Tieren beobachteten Merkmale - Pfoten und Schwanzende ohne Pigmentierung - decken sich vollständig mit dem Phänotyp des in Abb. 3.34 gezeigten Individuums.

In dem vorliegenden Fall löste die zugrundeliegende Mutation bereits im heterozygoten Zustand einen offensichtlichen Phänotyp aus. Dieser Vorteil wäre aber nur für eine Minderheit potenziell "screenbarer" Gene gegeben. Für den Anspruch genereller Anwendbarkeit der Durchmusterungsmethode ist es notwendig zu zeigen, dass mutierte Mäuse unabhängig von ihrer äußeren Erscheinung als solche identifiziert werden können. Die direkteste Möglichkeit dazu bestünde in der Entnahme von Gewebeproben zur RNA-Isolation, um die Exondeletion mit RT-PCR verifizieren oder falsifizieren zu können. Viele Gene sind jedoch nicht in adulten Geweben - geschweige denn ubiquitär - exprimiert. Deshalb ist eine auf genomischer DNA basierende Genotypisierungsmethode zu bevorzugen. Dazu muss zunächst die im Transkript zur Exondeletion führende Mutation auf genomischer Ebene identifiziert werden. In der Literatur finden sich Beispiele für solche Korrelationen, z.B. in Vivian et al. (2002) und Hayashi et al. (1991). In beiden Fällen war der die Exondeletion auslösende Defekt eine Basensubstitution in der hochkonservierten Spleißdonorsequenz "GT" am 5'-Ende des im Genom stromabwärts gelegenen Introns (Burset et al., 2001). Daher wurde das 18. *Kit*-Intron des  $\Delta$ Exon18-Klons sequenziert (Primerpaare *Kit in18 außen & innen*). In der Tat wurde eine Punktmutation in der

Spleißdonorstelle detektiert (GT → AT). Mit Sicherheit ist dies die gesuchte Sequenzänderung:

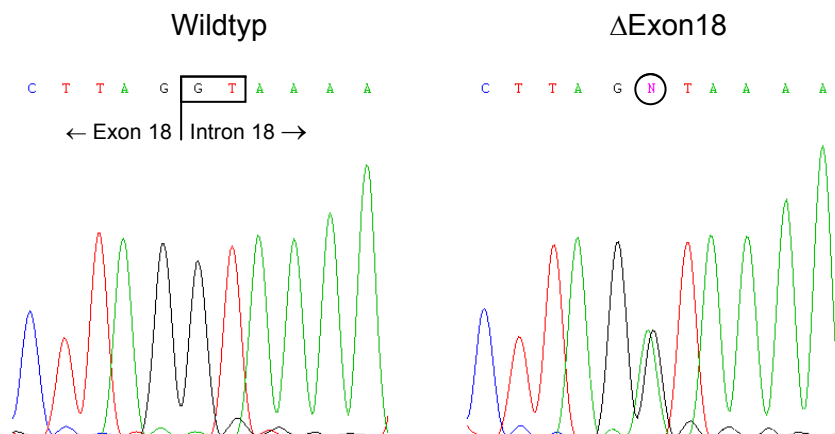


Abb. 3.35 Sequenzierung des 18. Introns von Wildtyp- und ΔExon18-ES-Zell-DNA. Gezeigt sind Ausschnitte der Spektren um die Exon18-Intron18-Grenze. Die hochkonservierte Spleißdonorsequenz ist links durch Umrahmung gekennzeichnet. Im ΔExon18-Klon liegt an dieser Stelle eine heterozygote Punktmutation vor (siehe eingekreiste Position rechts).

Als generelle Genotypisierungsstrategie käme die DNA-Sequenzierung selbst in Frage, jedoch bietet sich der CEL1-assay als einfache, zuverlässige und schnelle Alternative an. Das für die Sequenzierung eingesetzte 270bp-Amplikon *Kit in18 innen* enthält die heterozygote Mutation an Position 72. Die Endonuklease würde das PCR-Fragment demnach in zwei Subfragmente von 71,5 und 198,5bp spalten. Zur Genotypisierung der Maus aus Abb. 3.34 wurde von diesem Individuum genomische DNA aus einer Schwanzspitzenbiopsie isoliert, um die Intron18-PCR durchzuführen und das Produkt mit CEL1 zu verdauen. Als Positivkontrolle diente eine entsprechende Probe des ΔExon18-ES-Zellklons; als Ausgangsmaterial für Negativkontrollen wurde unmutagenisierte ES-Zell-DNA (Stamm 129/Ola) sowie ein Gemisch derselben mit DNA des Stammes B6 (Hintergrundstamm bei Blastozysteninjektion und Chimärenverpaarung) eingesetzt.

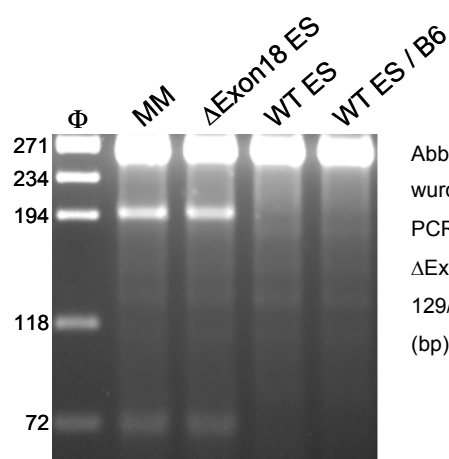


Abb. 3.36 DNA-basierte Genotypisierung mit CEL1. Das 270bp-Intron18-Fragment wurde gemäß Abschnitt 2.3.3 partiell mit der Endonuklease CEL1 verdaut. Intron18-PCR-Matrizen: MM - DNA von der Mausmutante aus Abb. 3.3.4, ΔExon18 ES - ΔExon18-ES-Zell-DNA; WT ES - DNA aus unmutagenisierten ES-Zellen (Stamm 129/Ola); WT ES / B6 - Mischung aus ES-Zell- und B6-DNA. Links sind die Größen (bp) δερ ηιερ σιχητηβαρεν Φ-Markerbanden angegeben. Gel: 4,5% Agarose.

Der partielle Verdau führte, wie zu erwarten war, allein in der Mausmutanten- und der ΔExon18-ES-Zellprobe zu den vorhergesagten Produkten der Längen 71,5 und 198,5bp. Somit konnte die sich als Pigmentierungsphänotyp manifestierende Mutation des Spleißdonors von *Kit* Intron 18 in der Mausmutante aus Abb. 3.34 nachgewiesen werden.