

IV

DISKUSSION

4.1 Mutagencharakterisierung

TMP/UV

Für die Verwendung von 4,5',8-Trimethylpsoralen als Mutagenisierungsmittel für Säugerzellen waren zu Beginn dieser Arbeit keine Daten publiziert. Die Etablierung der Methodik in bezug auf die UV-Aktivierung orientierte sich an zwei älteren Publikationen (Piette, 1992 bzw. Papadopoulo und Averbeck, 1985), in denen die Mutagenität der Psoralen-Derivate 4'-Hydroxymethyl-TMP bzw. 5- und 8-Methoxypsoralen in Säugerzellkulturen (Lymphomzellen der Maus bzw. Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters) untersucht wurde. In Abschnitt 3.1.1 wurden ES-Zell-Überlebensraten in Abhängigkeit von der TMP-Konzentration und der UV-Dosis bestimmt. Der erhaltene Arbeitsbereich kann auf einem definierten Überlebensratenniveau mit den zitierten Studien verglichen werden. So stellte sich eine Überlebensrate von 50% mit 5-Methoxypsoralen bei einer UVA-Energiemenge von einem kJ/m^2 , mit 8-Methoxypsoralen bei 2 kJ/m^2 (Papadopoulo und Averbeck, 1985) und mit 4'-Hydroxymethyl-TMP bei knapp 4 kJ/m^2 (Piette, 1992) ein, während diese Rate mit TMP bereits bei etwa 0,4 kJ/m^2 erreicht wurde. Im vorliegenden Fall lag die Mutagenkonzentration dazu bei 0,1 μM - gegenüber 5 μM in den genannten Arbeiten. Die ES-Zellen reagierten also sensitiver auf die TMP/UV-Behandlung als andere Säugerzellen auf wiederum andere Psoralen-Derivate. Hierfür könnten beide Parameter - Zelltyp und Art des Psoralen-Derivats - verantwortlich sein: ES-Zellen haben eine besonders kurze Generationszeit. Man könnte daher argumentieren, dass ihnen nach der Mutagenisierung durchschnittlich weniger Zeit bis zur nächsten DNA-Replikation bleibt, induzierte Läsionen zu reparieren, als anderen Zelltypen. Damit wären sie insgesamt anfälliger für kovalente DNA-Modifizierungen durch Psoralene. Zum anderen hat TMP unter den relevanten Psoralenen mit $5,6 \cdot 10^{-5} \text{M}$ die niedrigste Dissoziationskonstante von nackter DNA *in vitro*, wobei für die Bestimmung des Gleichgewichts $K_D = \frac{[P] \cdot [S]}{[PS]}$ jedes DNA-Basenpaar als potenzielle Bindestelle S gewertet wurde. 8-Methoxypsoralen hat eine mehr als 40-fach geringere - und 4'-Hydroxymethyl-TMP eine immerhin gut 5-fach niedrigere DNA-Affinität als TMP (Daten aus Isaacs et al., 1977). So wird mit TMP ein definierter DNA-Sättigungsgrad bei geringerer Mutagenkonzentration erreicht. Neben der DNA-Dunkelbindungsaffinität ist für das Endergebnis *in vivo* - induzierte Zelltodesraten - die

Photoreaktivität ausschlaggebend: diese ist hoch für methylierte Psoralene wie TMP und vermindert z.B. für 8-Methoxypsoralen (Cimino et al., 1985).

Oben wurden zum Vergleich der mit verschiedenen Psoralen-Derivaten erzielten Überlebensraten die eingestrahlten UV-Energiemengen (in kJ/m^2) angegeben. Dies erscheint legitim, nachdem die ES-Zell-Überlebensraten bei Variation der UV-Intensität einen fast identischen Verlauf nahmen wie bei Veränderung der Expositionsdauer (Abb. 3.2 C und D), d.h. die Überlebensraten verringerten sich bei inkrementeller Erhöhung der jeweiligen Größe in vergleichbarer Weise. Dies suggeriert, dass die Photonenfluenz (die Gesamtzahl eingestrahler Photonen), also das Produkt aus UV-Intensität und Expositionsdauer, die Überlebensraten bestimmt - was sinnvoll erscheint angesichts der Absorption von Nah-UV-Photonen als Voraussetzung zur Photozykloaddition und damit zur Induktion kovalenter DNA-Modifizierungen durch TMP: es spielt nach der Interkalierung des Psoralens in DNA im Grunde keine Rolle, *wann* es zur Photoaktivierung kommt.

Der sigmoidale Verlauf der Überlebensratenkurven bei Veränderung der UV-Dosis könnte als Bestätigung des von Isaacs et al. (1977) vorgeschlagenen Modells der sukzessiven Absorption zweier Photonen als Bedingung der DNA-Quervernetzung durch bifunktionelle Psoralene interpretiert werden. Es gilt als akzeptiert, dass Diadduktbildungen gravierendere genetische Läsionen verursachen als Monoadduktbildungen (in Papadopoulo und Averbeck, 1985). Die Wahrscheinlichkeit, dass ein interkaliertes TMP-Molekül zwei Photonen absorbiert mit der Folge der DNA-Quervernetzung, ist proportional zum Quadrat der UV-Dosis. Unter der Voraussetzung, dass die Diadduktbildungen die hauptsächliche Ursache für das Absterben von ES-Zellen darstellen, würde man daher einen parabolischen Verlauf der Überlebensratenkurve erwarten - was auf den ersten Teil der Auftragungen in Abb. 3.2 C und D zuzutreffen scheint. Bei weiterer Erhöhung der UV-Dosis werden die Photonen aufgrund ihres Überangebots zunehmend unproduktiv - die Kurven gehen in eine Sättigung der Todesraten über (hinterer Teil der Auftragungen).

Im Gegensatz dazu folgte der Verlauf der Überlebensraten mit steigenden Mutagenkonzentrationen sowohl im Falle von TMP als auch mit ENU (Abb. 3.3) einem monoexponentiellen Abfall, wie die Linearisierbarkeit durch halblogarithmische Auftragung zeigte (Abb. 3.2 B). Dem könnte die Eigenschaft der e-Funktion zugrundeliegen, dass die Änderung der abhängig Variablen (hier die Anzahl lebender Zellen N) mit der Variablen (hier der Mutagenkonzentration c) proportional (hier umgekehrt proportional) ist zur Größe der abhängig Variablen: $-dN/dc \propto N$. Oder: bei Verdopplung der Mutagenkonzentration sterben auch doppelt so viele Zellen ab: $N = N_0 \cdot e^{-k \cdot c}$, wobei N_0 die Ausgangszahl an Zellen sei und die spezifische Konstante k unter anderem abhängen sollte vom eingesetzten Mutagen und vom Zelltyp.

So reproduzierbar und gesetzmäßig die Überlebensraten mit TMP/UV waren, so wenig waren es die entsprechenden Mutationsfrequenzen. Der Grund dafür war allerdings experimenteller Natur: die Raten lagen durchschnittlich nur etwa eine Größenordnung über der Frequenz spontaner Mutationen. Dadurch wurden stets nur wenige 6-TG-resistente Kolonien aus dem Hprt-Selektionstest erhalten, für den nach den Ausführungen in 3.1.2 bereits große Mengen an behandelten ES-Zellen eingesetzt werden mussten. Auf die mehrfache Wiederholung der Mutationsfrequenzexperimente zur statistischen Absicherung wurde verzichtet, als sich abzeichnete, dass weder unter Hoch-TMP- noch unter Hoch-UV-Bedingungen brauchbare Mutationsfrequenzen zu erzielen waren. Der Mittelwert von $3,5 \cdot 10^{-5}$ bei einer durchschnittlichen Überlebensrate von 12,5% ist nach den Ausführungen in Abschnitt 3.3.1 nicht ausreichend für die Generierung einer saturierten Klonbibliothek vertretbarer Größe. In *C. elegans* sind mit TMP höhere Mutationsraten von 10^{-4} (Yandell et al., 1994) bis maximal 10^{-3} (Gengyo-Ando und Mitani, 2000) zu erreichen. Diese Werte basieren zwar auf einem anderen Modellgen, doch sieht es so aus, als sei TMP in ES-Zellen schlicht weniger mutagen als in *C. elegans*. Der Grund dafür wäre unklar, doch wird die Folgerung gestützt durch Ergebnisse mit anderen Psoralen-Derivaten in Säugerzellen: auf vergleichbarem Überlebensratenniveau wurden auch mit 4'-Hydroxymethyl-TMP bzw. mit 5- und 8-Methoxypsoralen Mutationsraten zwischen $3,5 \cdot 10^{-5}$ und $5 \cdot 10^{-5}$ erzielt (Piette, 1992; Papadopoulo und Averbek, 1985). TMP scheint sich hier also ähnlich zu verhalten wie andere untersuchte Psoralen-Derivate, bzw. anders ausgedrückt, es bietet gegenüber Hydroxymethyl-TMP oder Methoxypsoralen keine Vorteile in bezug auf die Mutationsfrequenz.

Die Motivation zur Verwendung von TMP rührte her aus der Hoffnung, ein Mutagen für die Maus etablieren zu können, dass kleine Deletionen im Genom auslöst, welche besser zu detektieren wären als Punktmutationen und mit höherer Wahrscheinlichkeit Genfunktionen auslöschen. Von 17 nichtredundanten 6-TG-resistenten ES-Zellklonen waren jedoch lediglich zwei bis maximal vier auf genomischer Ebene deletiert (Abschnitt 3.1.3). Trotz der relativ geringen Anzahl charakterisierter Mutationen ist somit der Schluss zulässig, dass TMP in ES-Zellen primär andere Typen von Läsionen auslöst, nämlich Basensubstitutionen. Diese betrafen interessanterweise zu 100% TA-Basenpaare, was die bekannte Tatsache reflektiert, dass Psoralene bevorzugt mit Thymidinen reagieren (Cimino et al., 1985). In *C. elegans* beträgt der Anteil genomischer Deletionen am TMP-Mutationsspektrum etwa 50% (Yandell et al., 1994), wobei auch diese Zahl auf einem limitierten Set an charakterisierten Mutationen beruht. Interessanterweise jedoch sind auch mit Mutagenen, die in der Maus als reine Punktmutationsagenzien gelten, wie ENU oder EMS, in *C. elegans* Deletionen zu induzieren, und zwar für die genannten Beispiele mit einer Effizienz, die immerhin halb so groß ist wie mit TMP (Liu et al., 1999). Es ist daher möglich, dass sich die Reparaturmechanismen in *C.*

elegans von denen in der Maus dahingehend unterscheiden, dass tendenziell eher genomische Deletionen die Folge sind.

TMP eignete sich damit aus zwei Gründen nicht als Mutagen für die Generierung einer ES-Zell-Klonbibliothek, wegen der geringen erzielbaren Mutationsfrequenzen und des geringen Anteils genomischer Deletionen im Mutationsspektrum.

ENU

ENU ist im Gegensatz zu TMP ein Standardmutagen für die Maus. Auch für die Mutagenisierung von ES-Zellen lagen zu Beginn der Arbeit bereits vergleichbare Daten einer anderen Gruppe vor (Chen et al., 2000). Die ES-Zell-Überlebensraten unter Variation der ENU-Konzentration nahmen wie im Falle von TMP einen Verlauf, der sich mit der Funktion eines monoexponentiellen Abfalls beschreiben ließ (Abb. 3.3). Für dieselben Proben wurden parallel die Mutationsfrequenzen mit Hilfe des 6-TG-Tests gemessen. Im Gegensatz zum Verlauf der Überlebensraten ergab sich eine lineare Abhängigkeit der Mutationsraten von der ENU-Konzentration. Diese Gesetzmäßigkeit ist allgemein gültig für Punktmutagene (Cole und Arlett, 1984) und wurde auch bei ENU-Mutagenisierungen *in vivo* beobachtet (Noveroske et al., 2000). Theoretisch folgt der lineare Anstieg der Mutationsfrequenzen einer Verzögerungsphase, die durch DNA-Reparaturmechanismen hervorgerufen wird. Dieser im Bereich geringer Mutagendosen auftretende Effekt war im vorliegenden Fall allerdings nicht relevant und wurde daher nicht analysiert. Die mehr oder (durch die mögliche Verzögerungsphase) weniger strenge Proportionalität zwischen Mutationsrate und ENU-Konzentration ist leicht zu erklären durch die Annahme, dass bei Ver-k-fachung der Mutagendosis auch die Anzahl dadurch ausgelösten DNA-Modifizierungen ver-k-facht werden muss. Bei 3mM ENU betrug die Mutationsfrequenz ca. 1 zu 1600 - ein Wert, der im Einklang steht mit der von Chen et al. (2000) bei einer Überlebensrate von unter einem Prozent erzielten Rate von etwa 10^{-3} und der ein für die spätere Klonbanketablierung mehr als ausreichendes Niveau markierte. Mit Hilfe der als Eichkurve zu betrachtenden Abhängigkeit aus Abb. 3.3 konnte eine gewünschte Mutationsrate bequem über die ENU-Dosis eingestellt werden.

Die Sequenzierung der proteinkodierenden Hprt-Sequenz von 31 nichtredundanten 6-TG-resistenten ES-Zellklonen offenbarte Sequenzänderungen in 29 Fällen (Abb. 3.8). Diese Quote machte deutlich, dass funktionelle Mutationen in den meisten Fällen im offenen Leserahmen der cDNA detektiert werden können. Erwartungsgemäß waren die meisten Sequenzänderungen Basensubstitutionen, von denen TA/AT-Transversionen mit knapp 50% den größten Teil ausmachten. Die hohe Rate dieser Art von Punktmutationen reflektierte die Präferenz von ENU, Thymin am Hydroxyl-Sauerstoff zu ethylieren (Justice et al., 1999). Die analoge Erklärung gilt für den zweithäufigsten Typ von Basensubstitutionen, GC/AT-

Transitionen, die bevorzugt durch Ethylierungen der O⁶-Positionen von Guaninen hervorgerufen werden könnten (Shibuya und Morimoto, 1993). Möglicherweise greift hier die Aktivität der O⁶-Alkylguanin-alkyltransferase zur Reparatur der Guanin-Ethylierungen nur teilweise. Neben Basensubstitutionen machten Spleiß-Mutationen knapp 20% aller Läsionen aus. Diese Beobachtung deckt sich mit mehreren Publikationen, die kompilierte Daten über ENU-induzierte Mutationen in der Maus enthalten (Chen et al., 2000; Justice et al., 1999; Noveroske et al., 2000; Shibuya und Morimoto, 1993), wobei der Anteil an Spleiß-Mutationen darin zwischen rund 10 und 20% variiert. Wie bereits in 3.1.3 angesprochen, ist anzunehmen, dass Exondeletionen in einem Mutationsspektrum, das auf einem funktionellen Selektionstest basiert, überrepräsentiert sind, weil sie mit höherer Wahrscheinlichkeit als Punktmutationen die selektierte Proteinfunktion auslöschen. Das gleiche gilt für Mutationsspektren, die auf phänotyp-getriebenen Ansätzen beruhen. Im Gegensatz dazu sequenzierten Chen et al. (2000) den proteinkodierenden Bereich der Hprt-cDNA von rund 1700 ENU-behandelten ES-Zellklonen, um die so gefundenen Mutanten anschließend auf 6-TG-Sensitivität zu überprüfen. Sämtliche Klone mit Spleiß-Mutationen waren 6-TG-resistent, also funktionell beeinträchtigt. Von den Punktmutationsklonen waren hingegen mehrere 6-TG-insensitiv, was die zuvor gemachte Annahme unterstreicht, dass Exondeletionen in funktionell determinierten Mutationsspektren überrepräsentiert sind. Für den in dieser Arbeit letztlich gewählten Ansatz der Fokussierung auf Exondeletionen war jedoch nicht der Anteil dieser Mutationen am Mutationsspektrum, sondern allein ihre Frequenz in einem Klonarchiv gegebener Größe relevant (Abschnitt 3.3.1). Diese kann auf der Basis des 6-TG-vermittelten Selektionstest allenfalls geringfügig unterschätzt werden.

4.2 Durchmusterungsstrategien

Nachdem nahezu sämtliche ENU-induzierten Hprt-Mutationen in der proteinkodierenden Region der cDNA lokalisiert waren, erschien ein *screening*-Ansatz auf Transkriptebene sinnvoll, zumal hier die Möglichkeit bestand, den gesamten Leserahmen eines Gens in einem einzigen PCR-Produkt zu erfassen. Weiterhin ist es nur auf der Transkriptebene möglich, Spleißmutationen als interne Deletionen zu detektieren. Deshalb wurden im Ergebnisteil 3.2 auch PCR-basierte Verfahren evaluiert, die ausschließlich geeignet sind für die Detektion von Deletionen. Zwischen Punkt- und Spleiß-Mutationen besteht neben ihren verschiedenartigen Auswirkungen auf die Transkriptsequenz ein weiterer fundamentaler Unterschied: im Gegensatz zu ENU-induzierten Basensubstitutionen sind Exondeletionen durch die bekannte Exon-Struktur auf cDNA-Ebene in ihrer Lokalisation klar definiert. Basenpaargenaue Exondeletionen sind der bei weitem häufigste Typ von Spleiß-Mutationen, keiner der entsprechenden 6-TG^R-Klone aus Abb. 3.7 und 3.8 bildete in dieser Hinsicht eine

Ausnahme. Unter den in 3.2 miteinander verglichenen Mutationsdetektionsmethoden befanden sich zwei, *poison*-Primer-PCR und *exon-skipping*-PCR, die ebendiese Tatsache bereits in der cDNA-Amplifizierung ausnutzen und deshalb besonders sensitiv sind. Für eine Klonbankdurchmusterung auf cDNA-Ebene ist die dadurch ermöglichte Poolbarkeit von Proben äußerst vorteilhaft, weil die im 96-*well*-Format zu isolierende Menge an RNA andernfalls limitierend sein kann. Die Vereinigung von Proben ist zudem wünschenswert vor dem Hintergrund der Arbeits- und Kostenersparnis.

Unter dem Gesichtspunkt der Sensitivität schneiden Verfahren zur Identifizierung unbekannter Punktmutationen naturgemäß schlechter ab als Methoden zur Deletionsdetektion. Die behandelten Ansätze denaturierende HPLC, MALDI-vermittelte Resequenzierung und Heteroduplexspaltung mit CEL1 bieten aber den Vorteil, dass mit ihnen sowohl Punkt- als auch kleine Deletionsmutationen erfasst werden können. Besonders die beiden zuerst genannten Methoden leiden unter der systemimmanenten Tatsache, dass sich das separate Mutantensignal mit ansteigenden Ausdünnungen gegen Wildtyp immer weiter abschwächt. Dabei wird die Detektion letztlich durch das Ausmaß unspezifischer Signale im Hintergrund limitiert. Eine Empfindlichkeitssteigerung der dHPLC könnte folglich durch spezifische Fluoreszenzdetektion der DNA-Fragmente erzielt werden (Xiao et al., 2001), was im Falle der Fragmentanalyse mit Kapillarelektrophorese zu hohen Signal-Rausch-Verhältnissen führte (Abschnitt 3.2.4). Vielversprechender noch erscheint allerdings die Kombination aus beidem, die Temperaturgradienten-Kapillarelektrophorese (TGCE), in der die Heteroduplexanalyse nicht mehr in separaten Läufen unter Variation der Heiztemperatur durchgeführt wird, sondern vorteilshalber in einem über die Kapillare angelegten Temperaturgradienten. Im Gegensatz zur dHPLC sind zudem Multikapillarsysteme zur Steigerung des Probendurchsatzes erhältlich (Li et al., 2002). Für diese Arbeit bestand kein Zugang zu einer TGCE-Anlage.

Denaturierende HPLC mit UV-Detektion ist aber aus historischen Gründen immer noch das am weitesten verbreitete Verfahren zur Mutationsdetektion in großem Stil. Unter Verwendung dieser Methode gelang kürzlich Vivian et al. (2002) die erste zielgerichtete Isolation von ES-Zellklonen der Maus aus einem Archiv chemisch mutagenisierter Zellen. Die Bibliothek hatte eine Größe von rund 2000 Klonen und wurde ohne Probenvereinigung durchmustert. Das *screening* erfolgte auf RT-PCR-Basis. Dazu musste der kodierende Bereich der cDNA in mehrere Subfragmente von durchschnittlich unter 500bp unterteilt werden, weil dHPLC keine Analyse größerer Fragmente erlaubt (vgl. Tab. 3.3). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die denaturierende HPLC als Verfahren zur Detektion auch unbekannter Mutationen funktioniert; sie hat allerdings für den Einsatz in großem Stil mehrere Nachteile: die geringe Poolbarkeit von Proben, die Notwendigkeit, jede Probe bei mehreren Temperaturen zu analysieren oder die Laufbedingungen zuvor für jedes

einzelne Fragment zu optimieren, die Limitierung des Probendurchsatzes durch das Ein-Säulen-Prinzip sowie die geringen Maximalgrößen für die zu analysierenden PCR-Fragmente.

Unter den für diese Arbeit zugänglichen Methoden erlaubte der CEL1-assay die stärksten Ausdünnungen von Mutationen, weil die Intensität der Produktbanden in degressiver Weise abnimmt mit dem Mutantenanteil in der Ausgangsprobe (Abb. 3.11). Da der Heteroduplex-Verdau mit CEL1 zudem einfach und zuverlässig ist, wäre er die Methode der Wahl zur Mutationsdetektion auf genomischer Ebene.

Doch ist auch die Detektion mit CEL1 letztlich limitiert in bezug auf die zu analysierenden Fragmentgrößen und die Poolbarkeit von Proben. Für einen *screening*-Ansatz auf cDNA-Ebene erschien daher die Konzentration auf Exondeletionen mit Hilfe eines mutationsanreichernden PCR-assays - auch wegen des Neuwertes der Methode - attraktiver. Die *exon-skipping*-PCR ist hierbei der *poison*-Primer-PCR überlegen, weil sie wegen der Spezifität im zweiten Amplifizierungsschritt sauberere Ergebnisse liefert und stärkere Ausdünnungen von Mutationen erlaubt (3.2.5 - 3.2.7). Weiterhin ist die cDNA-Materialersparnis zusätzlich größer durch den Vorteil, dass in der ersten Amplifizierungsstufe zunächst ein den gesamten Zielgen-Leserahmen umfassendes PCR-Produkt gebildet werden kann, das dann für die spezifischen Reaktionen im zweiten Schritt als Templat dient. Die Fokussierung auf Exondeletionen hat nach gemäß Abschnitt 3.3.1 zur Folge, dass man der vergleichsweise geringen Auftretshäufigkeit dieser Art von Läsionen mit einer besonders großen Klonbank entgegentreten muss. Die Erstellung der Klonbibliothek ist allerdings ein einmaliges Ereignis. Die Anzahl der cDNA-Proben kann danach stark reduziert werden angesichts der außergewöhnlich hohen Detektionssensitivität der zweistufigen *exon-skipping*-PCR. Der hohe Aufwand im Zusammenhang mit der Erstellung und Prozessierung des Klonarchivs wird somit durch die *pooling*-bedingte Arbeitersparnis bei den eigentlichen *screening*-Durchgängen überkompensiert. Unter diesem Aspekt erschien eine solche Strategie letztlich effizienter zu sein als ein Ansatz zur Detektion von Punktmutationen.

4.3 Ein gen-getriebener Ansatz zur Generierung von Spleiß-Mutanten aus ENU-behandelten ES-Zellen der Maus

Klonbanketablierung

Gemäß Abschnitt 3.3.1 bestimmten im Wesentlichen zwei Parameter die Mindestgröße der erstellten ES-Zell-Klonbibliothek: der vergleichsweise geringe Anteil von Spleiß-Mutationen am ENU-Mutationsspektrum und die gewünschte mittlere Mutationsfrequenz von ca. 1/2500. Um den angepeilten Umfang von 40.000 Klonen bewältigen zu können, wurde auf ein Picken

mutagenisierter ES-Zellkolonien verzichtet zugunsten einer statistischen Verteilung von Zellen auf 96-*well*-Platten durch einfaches Ausplattieren einer Suspension geeigneter Verdünnung. Um dabei die Plattenanzahl zu reduzieren, wurden die ES-Zellen bereits auf Klonebene gepoolt, und zwar in einer Dichte von durchschnittlich etwas mehr als vier Kolonien pro Position (3.3.2), was in folgender Hinsicht einen Kompromiss darstellte: einerseits reduzierte sich so bereits hier die Probenanzahl deutlich um ca. 75%, andererseits bleibt es gut möglich, einen Mutationsträger durch Ausplattieren einer mutationspositiven Probe, Picken und *re-screening* einer überschaubaren Anzahl von Kandidaten-Kolonien zur Klonalität zu isolieren.

Eine bisher unerwähnte Komplizierung ergibt sich aus der Tatsache, dass bei der DNA-Modifizierung durch ENU immer nur eine von zwei in der DNA-Doppelhelix gegenüberliegenden Basen ethyliert wird. Beim Ablesen des unmodifizierten Stranges im Laufe der folgenden DNA-Replizierung sollte an dieser Stelle demnach keine Mutation entstehen. Damit aber ergeben sich nach Schwesterchromatidentrennung in der Mitose und anschließender Zellteilung zwei unterschiedliche Klone mit jeweils individueller Verteilung von heterozygoten Mutationen im Genom. Diese Läsionen bleiben dann in den folgenden Zellteilungen konserviert, doch ist die entstehende ES-Zellkolonie in Wirklichkeit nicht klonal sondern mosaisch (Chen et al., 2003; Noveroske et al., 2000). Diese Überlegung war für die Bestimmung von Mutationsraten nicht relevant, weil die ES-Zellen im Laufe der MF-Experimente wiederholt subkultiviert wurden (vgl. Teil 3.1.2). Dies war jedoch vor der Etablierung des Klonarchivs nicht der Fall. Vielmehr wurden dazu mutagenisierte Zellen unmittelbar nach der ENU-Behandlung eingefroren und nach dem Auftauen sogleich auf 96-*well*-Platten kultiviert. Es ist daher anzunehmen, dass das die Bibliothek mehr distinkte Klone enthält als es die Anzahl quantifizierter Kolonien einige Tage nach dem Ausplattieren zunächst nahelegte. Aufgrund verschiedener Effekte wie der geringen Überlebensrate von 10% nach ENU-Behandlung ist aber anzunehmen, dass die Bibliothek deutlich weniger als doppelt so viele Klone wie Kolonien beinhaltet. Da hier genauere Zahlen nicht rekonstruiert werden können, wurde die Frage aus pragmatischen Gründen im Wesentlichen ausgeklammert, zumal die tatsächliche Bibliotheksgröße auf diese Weise nicht überschätzt sondern eher unterschätzt würde. Das gilt auch für die folgende Bewertung. Das generierte Klonarchiv enthielt - auf der Basis ausgezählter ES-Zellkolonien - etwa 38.000 auf 96 96-*well*-Platten verteilte Klone. Durchschnittlich sollten darin $38.000 \cdot 1/2500 \approx 15$ funktionelle Mutationen für jedes *Hprt*-ähnliche Gen enthalten sein. Bei Annahme eines Spleiß-Mutationsanteils von 10 bis 20% ergibt sich ein Gehalt von jeweils 1,5 bis 3 Exondeletionsklonen. Diese Schätzung bestätigt, dass die Mutationsrate hoch genug angesetzt wurde. Wie in Teil 3.3.1 erwähnt, sollte die Mutationsrate nicht auf maximale Werte eingestellt werden, weil dies Probleme bei der Generierung von Mäusen und bei der

späteren Abtrennung parallel induzierter Mutationen durch mendelsche Kreuzung aufwerfen kann.

Auf ebendiese Schwierigkeiten stießen Vivian et al. (2002), deren Arbeit über die Durchmusterung eines ENU-mutagenisierten Archivs von ES-Zellklonen nach zwei nichtselektierbaren Genen bereits weiter oben erwähnt wurde - im Zusammenhang mit der denaturierenden HPLC als *screening*-Methode auf cDNA-Basis. Die Zielgene, deren Funktionen hier nicht interessieren soll, waren *Smad2* und *Smad4*, für die bereits durch homologe Rekombination erzeugte *knock-out*-Allele - bei Homozygotie jeweils mit embryonal letalem Phänotyp - als Kontrollen existierten. Teilweise entgegen des Tenors ergibt sich bei sorgfältiger Lektüre des Artikels folgendes Szenario: mit einer auf die Zielgene bezogenen, sequenzbasierten Mutationsfrequenz von ca. 1/150 (!) gelang für beide Gene zusammen zunächst die Isolation von beachtlichen 29 ES-Zellklonen mit Sequenzänderungen im proteinkodierenden Bereich. Davon stellten neun Mutationen konservative Basensubstitutionen dar, die also keine Änderung der Aminosäuresequenz im Protein bewirken würden. Von den übrigen 20 Klonen waren 13 karyotypisch normal. Diese konnten eingesetzt werden für die Produktion von Chimären durch Blastozysteninjektion. Jedoch gelang die Transmission der Läsion durch die Keimbahn lediglich mit fünf der 13 verwendbaren ES-Zelllinien. Davon entfiel eine Mutation auf *Smad2* und vier auf *Smad4*. Drei der vier *Smad4*-Mutationen zeigten keinen homozygoten Phänotyp. Beide verbliebenen Allele (je eines für *Smad2* und *Smad4*) führten im homozygoten Zustand zu früher embryonaler Letalität bzw. zur gänzlichen Vereitelung der Embryogenese, nahezu in derselben Weise wie die *knock-out*-Allele der Kontrollen. Es ist zu vermuten, dass die Autoren in Wirklichkeit nicht besonders glücklich waren über den geschilderten Fortgang, zumal ihr Hauptargument für den gewählten Ansatz des *screenings* nach Punktmutationen die Generierung einer allelischen Serie, d.h. hypomorpher Allele, war. Die genannten Zahlen illustrieren die Schwierigkeit und Vielschichtigkeit des gesamten Prozesses. Dazu sollen zwei Aspekte nochmals betont werden. Erstens: sehr hohe Mutationsraten erleichtern zwar die Isolation von mutationstragenden ES-Zellklonen, erschweren oder vereiteln aber auf der anderen Seite die Generierung von Mäusen daraus. Auch die Veränderung des Karyotyps in vielen der isolierten Klone könnte auf die Überfrachtung der Zellen mit ENU-induzierten DNA-Modifizierungen zurückzuführen sein. Zweitens: im Vergleich mit dem in dieser Arbeit gewählten Ansatz der Konzentration auf Spleiß-Mutationen erlaubt ein *screening* (beispielsweise) mit dHPLC insgesamt die Isolation von mehr Klonen mit Sequenzänderungen im interessierenden Gen. Auch auf cDNA-Ebene sind die meisten Mutationen Basensubstitutionen, bei Vivian et al. (2002) waren es über 90%. Man muss aber sehen, dass viele davon konservativ sind - die entsprechenden Klone können und müssen aussortiert werden - und dass weiterhin ein Großteil der Punktmutationen keinen Phänotyp

verursacht - was man in aller Regel nicht wissen kann, solange man keine homozygoten Mäuse generiert hat. Wie schon gesagt, trugen drei der vier *Smad4*-Klone, mit denen Vivian und Kollegen die Transmission durch die Keimbahn gelang, Punktmutationen und zeigten keinen Phänotyp. Der vierte Klon verursachte einen Null-Phänotyp - und war signifikanterweise eine Spleiß-Mutante mit Exondeletion im *Smad4*-Transkript.

Die RNA-Isolation aus Zellproben des Klonarchivs erfolgte aus Kostengründen durch Guanidinisothiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion, einer Übertragung der üblichen Arbeitsschritte auf das 96er-Format folgend (2.2.3). Die Integrität der RNA war damit insgesamt zufriedenstellend, der Anteil leerer bzw. qualitativ schlechter Proben lag bei geringen $\approx 5\%$ und die Ausbeute im Mittel bei ca. 2µg Gesamt-RNA pro Probe - einem der Isolation mit Präparationskits ebenbürtigen Wert (Chen et al., 2003). Aufgrund der hohen Sensitivität der zweistufigen *exon-skipping*-PCR war es nach reverser Transkription der RNA möglich, die 96 Platten durch Probenvereinigung auf vier Stück zu komprimieren (3.3.3). Die für eine PCR-Reaktion eingesetzte Menge an cDNA pro Ursprungsprobe entsprach etwa dem Äquivalent von 4ng RNA. Damit ist der Ansatz sehr materialsparend, zumal für ein gegebenes Gen theoretisch nur eine einzige PCR-Amplifizierung mit cDNA-Templat nötig ist. Die spezifischen Reaktionen mit exonüberbrückenden Primern - eine Reaktion pro screenbares Exon - basieren auf dem Produkt aus dem ersten PCR-Schritt, in dem nach Möglichkeit die gesamte proteinkodierende Region der cDNA abzudecken ist. Die Durchmusterung nach einer gegebenen Exondeletion bedeutete dann die Durchführung von $4 \cdot 96$ PCR-Reaktionen in einem Tetra-Thermocycler mit anschließender Analyse auf einem großen Agarosegel mit Kapazität für all diese Proben. Die Stärke der *screening*-Methode liegt dabei in der Tatsache, dass für positive Positionen klare Banden von vorhersagbaren Größen zu erwarten sind, während negative Pools idealerweise keine Signale liefern (siehe Hprt-Kontrollscreen in Abb. 3.21).

Kit-Screen

Um die Machbarkeit des Ansatzes unter Beweis zu stellen, wurde exemplarisch ein Screen nach Exondeletionen in dem nichtselektierbaren Gen *Kit* durchgeführt, das die in Abschnitt 3.3.5 genannten Kriterien, wie z.B. die Expression in ES-Zellen, erfüllte. Dabei mussten nach Vorversuchen mit Wildtyp-cDNA vier Kit-Exons aussortiert werden, für die spontane Spleiß-Varianten die Durchmusterung unmöglich machten. Diese Tatsache beleuchtete eine prinzipielle Limitierung des *screening*-Ansatzes. Interessanterweise befanden sich unter den vom Screen ausgeschlossenen Exons 2, 13, 16 und 17 drei von insgesamt vier Fällen, in denen die Exonlängen ganzzahlig durch drei teilbar sind (Exons 2, 3, 13 und 17 - vgl. Primerliste im Anhang). Bei Deletion solcher Exons durch sporadische Fehler beim Spleißen der Kit-Prä-mRNA käme es nicht zu einer Verschiebung des Leserahmens und damit nicht

zum Auftreten vorzeitiger Stopp-Kodons. Also könnten diese Spleiß-Varianten nicht durch den bereits erwähnten *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) als fehlerhaft identifiziert werden und würden folglich auch nicht degradiert. Die zweistufige *exon-skipping*-PCR jedoch ist anscheinend sensitiv genug, diese seltenen, deletierten Transkripte zu detektieren, denn das war, wie gesagt, bei den Test-Amplifikationen auf Wildtyp-cDNA der Fall, und zwar bevorzugt für solche Exons (Nr. 2, 13 und 17), deren Größen jeweils ganzzahlig durch drei teilbar sind (in Abb. 3.24 wurde dies exemplarisch für Exon 2 gezeigt). Das vierte Exon, dessen spontane Deletion durch den NMD unerkannt bleiben muss, Exon Nr. 3, wurde dem Screen nach Deletionsmutanten unterzogen, weil die Testreaktionen nach Optimierung der PCR-Bedingungen keine Detektionsprobleme erahnen ließen (Abb. 3.24). Doch im eigentlichen Screen für Exon 3 traten für viele Proben eine Reihe von Produkten spezifischer Größe auf, die sich durch Wiederholung *beider* PCR-Schritte nicht reproduzieren ließen. Hingegen erschienen bei Wiederholung der *skipping*-PCR auf demselben Erstrunden-PCR-Templat auf dem Gel exakt die gleichen Banden. Diese Beobachtungen legen auch hier die Annahme spontaner Exondeletionsvarianten nahe, deren Degradation durch den NMD nicht initiiert werden konnte. Es scheint sich demnach folgender ambivalenter Zusammenhang zu ergeben: einerseits arbeitet der NMD gegen die Detektion von echten Exondeletionsmutationen, sofern diese für die NMD-Maschinerie identifizierbar sind (theoretisch 2/3 aller Fälle): solche Transkripte werden zum Teil degradiert - nur zum Teil, weil der NMD für die Totaleliminierung *konstitutiver nonsense*-Mutationen nicht gemacht ist (Frischmeyer und Dietz, 1999). Zum anderen begünstigt er die Detektion echter Spleiß-Mutationen, indem er - theoretisch in zwei Dritteln aller Fälle - spontane Spleiß-Varianten eliminiert, die zu falsch positiven Signalen führen und dadurch mit der Mutationsdetektion interferieren. Beide Effekte treffen dabei theoretisch auf dieselben Exons zu. Man könnte sagen, die Aktivität des NMD spaltet die Exons eines Gens - mehr oder weniger strikt - in zwei Kategorien auf, in screenbare und nicht screenbare Exons, denn für das restliche Drittel an Exons, deren Deletion vom NMD nicht erkannt werden kann, bestehen erfahrungsgemäß wenig Chancen, echte Spleiß-Mutanten vor dem Hintergrund falsch positiver Signale zu isolieren.

Als Untermauerung dieser Beobachtungen sei angemerkt, dass Skandalis et al. (2002) eine ähnliche Korrelation zwischen der Frequenz spontanen *exon-skippings* und NMD-vermittelter mRNA-Instabilität für die Exons des menschlichen *Hprt*-Gens fanden. Die Tatsache, dass der NMD in bezug auf die Eliminierung spontaner Spleißformen aktiv ist in solchen Exons, deren Deletion stromabwärts vorzeitige Stopp-Kodons einführt, wurde in ES-Zellen der Maus überprüft für das *Hprt*-Gen am Beispiel von Exon 3: dessen Länge ist nicht ganzzahlig durch drei teilbar (siehe Primerliste im Anhang) und Spleiß-Varianten, die sich durch ein Fehlen dieses Exons auszeichnen, sind im Normalfall nicht detektierbar (siehe Abschnitt 3.3.4). Der

NMD kann in Zellkultur nach Bateman et al. (1999) inaktiviert werden durch mehrstündige Inkubation mit Zykloheximid. Diese Art der Vorbehandlung vor RNA-Isolation und anschließender RT-PCR mit dem Primerpaar *Hprt skip ex 3* führte bei Verwendung von Wildtyp-cDNA zur Bildung des deletionspezifischen PCR-Produkts. In der Kontrollprobe hingegen, cDNA von unbehandelten ES-Zellen, waren spontane Exon3-Deletionsformen nicht detektierbar (Gelbild nicht gezeigt). Dieses Ergebnis bestätigte die Rolle der NMD-Maschinerie, spontanes *exon-skipping* zu unterbinden. Zugleich war damit die mögliche Strategie ausgeschlossen, echte Deletionsmutationen in Proben der Klonbibliothek zu stabilisieren durch Zykloheximid-Vorbehandlung der ES-Zellen unmittelbar vor der RNA-Isolation.

Dennoch war die Durchmusterung des Klonarchivs nach Spleiß-Mutationen in *Kit* letztlich erfolgreich, denn sie führte zur Isolation von zwei Exondeletionsklonen, Δ Exon6 und Δ Exon18 (siehe Teil 3.3.5 - "Kit-Screen"). Beide Deletionen führen zur Generierung vorzeitiger Terminationskodons mehr als 50 Nukleotide vor der letzten Exon-Exon-Grenze - der Bedingung für die Identifizierung und die Initiierung der Transkriptdegradation durch die NMD-Maschinerie (Frischmeyer und Dietz, 1999). Die Tatsache, dass die mutierten ES-Zellklone isoliert werden konnten, bestätigt, dass dieser Mechanismus nicht in der Lage ist, konstitutive *nonsense*-Mutationen auf Transkriptebene vollständig zu inaktivieren. Vielmehr sollten die Δ Exon6- und Δ Exon18-mRNA-Pegel lediglich reduziert sein. In Übereinstimmung damit ergaben sich nur schwache Banden, wenn die entsprechenden exonüberbrückenden RT-PCRs einstufig auf cDNA-Templat der isolierten Subklone durchgeführt wurden. Die Ausbeute verbesserte sich stark bei Vorbehandlung der Deletionsklone mit Zykloheximid (Abb. 3.29), ohne dass die entsprechenden Produkte in der Wildtyp-Kontrolle gebildet wurden. Dieses Ergebnis legte nahe, dass der NMD in ES-Zellen die Destabilisierung der mutierten Transkripte bewirkt und stützt im Nachhinein die Vorsicht bei der cDNA-Probenvereinigung, wo die Möglichkeit der NMD-vermittelten mRNA-Degradation in Deletionsklonen bereits berücksichtigt wurde (Abschnitt 3.3.3).

Beide Deletionsklone wiesen einen normalen Karyotyp auf und boten sich damit an für die Injektion in Blastozysten zur Produktion von Chimären. Die Priorität genoss dabei der Klon mit Deletion von Exon 18, weil hier abgesehen von der Verschiebung des Leserahmens klar zu sein schien, dass die Mutation phänotypisch wirksam sein würde, denn das 18. Exon kodiert einen Teil der funktionsrelevanten Kinase-Domäne (Abb. 3.31). Doch wurde die Chimärenproduktion auch mit dem Δ Exon6-Klon versucht - allerdings erfolglos. Da in den Leihmüttern nach Embryotransfer regelmäßig Schwangerschaften ausgelöst wurden, die Föten jedoch in der zweiten Schwangerschaftshälfte regelmäßig abstarben, ist anzunehmen, dass hier neben der Mutation in *Kit* dominante Läsionen vorlagen, welche die Entwicklung über dieses Stadium hinaus bereits in chimären Tieren verhindern. Andererseits können hier

technische Probleme im Zusammenhang mit der Chimärenproduktion nicht völlig ausgeschlossen werden. Die wenigen geborenen Tiere hatten mit einer Ausnahme gänzlich schwarzes Fell. Das in Abb. 3.32 gezeigte Individuum hatte, dem dominanten Kit-Phänotyp nahekommend, einen asymmetrischen pigmentlosen Streifen am Bauch. Es ist unwahrscheinlich, dass dieses Merkmal unabhängig ist von der Mutation in *Kit*. Der Sachverhalt wurde jedoch nicht weiter verfolgt, weil das Tier ansonsten keinerlei Anzeichen von Chimärismus aufwies und dementsprechend ausschließlich schwarzfellige Nachkommen produzierte, bevor es durch eine Verletzung unbrauchbar wurde.

Mit dem Δ Exon18-Klon konnten mehrere Chimären mit einem Braunanteil von bis zu 80% generiert werden. Dabei war auffällig, dass sich die Zonen schwarzen Fells im Wesentlichen auf den Rücken entlang der Wirbelsäule und den Kopf beschränkten (Abb. 3.33). Dies könnte im Zusammenhang stehen mit der Migrationsbeeinträchtigung Kit-mutierter, aus der Neuralleiste stammender Melanoblasten in der Embryonalentwicklung, obwohl man intuitiv dann wohl eher die umgekehrte Fellfarbverteilung erwarten würde. Wie auch immer - mit einer von zwei verpaarten Chimären gelang die Transmission der Δ Exon18-Mutation durch die Keimbahn. Als phänotypisch relevante Merkmale waren die Pfoten und das Schwanzende der ansonsten braunfelligen Maus pigmentlos (Abb. 3.34). Durch Sequenzierung eines mit Δ Exon18-ES-Zell-DNA generierten genomischen PCR-Produkts konnte die Punktmutation, welche die Exondeletion im Kit-Transkript bewirkt, in der Spleißdonorstelle von Intron 18 lokalisiert werden (Abb. 3.35). Damit war die bislang nicht genannte Möglichkeit auszuschließen, dass die Deletion von Exon 18 nicht konstitutiv sei. Dieser Fall ist prinzipiell denkbar und er hätte auch die schlechte einstufige Amplifizierbarkeit der Exondeletion auf Einzelklonebene erklären können. Der Nachweis der NMD-Aktivität als Ursache dafür sowie die Lage der genomischen Punktmutation im hochkonservierten Spleißdonor von Intron 18 sprechen jedoch klar gegen diese Möglichkeit. Interessanterweise liegt der historischen Kit-Mutante *W*, die auf Transkriptebeine zur Deletion des die Transmembrandomäne kodierenden Exons Nr. 10 führt, eine entsprechende Punktmutation im Spleißdonor von Intron 10 zugrunde (Hayashi et al., 1991).

Die Identifizierung der genomischen Punktmutation ermöglichte im vorliegenden Fall weiterhin die Genotypisierung der heterozygoten Mutante aus Abb. 3.34 mit Hilfe des CEL1-assays unter Verwendung von genomischer DNA als Startmaterial. Wie aufgrund des spezifischen Phänotyps zu erwarten war, ließ sich das mutierte Allel nachweisen (Abb. 3.36). Für diesen Zweck präsentierte sich der CEL1-assay als bequeme und schnelle Methode.

Der vergleichsweise milde heterozygote Phänotyp ist vor dem Hintergrund der KIT-Dimerisierung charakteristisch für Null-Mutationen (Bernex et al., 1996) und war aus drei Gründen zu erwarten: Erstens kodiert das konstitutiv deletierte Exon 18 einen Teil der für die Transducer-Funktion essentiellen Tyrosin-Kinasedomäne. Zweitens wird durch die

sequenzierungsbestätigte basenpaargenaue Exondeletion eine Verschiebung des Leserahmens ausgelöst, der auf Proteinebene zu einer alternativen Aminosäureabfolge und zu einem vorzeitigen Translationsstopp führt. Drittens wurde das mutierte Transkript in ES-Zellen durch den NMD destabilisiert und es liegt kein Grund vor anzunehmen, dass dies nicht auch *in vivo* passieren würde. Die letzten beiden Effekte ergeben sich als direkte bzw. indirekte Folge der Exondeletion. Nach den weiter oben dargelegten Zusammenhängen ist es allgemein wahrscheinlich, mit dem entwickelten *screening*-Ansatz Klone mit solchen Exondeletionen zu isolieren, die alle drei Effekte bewirken. Die Durchmusterung zielt demnach primär ab auf *exon-skipping*-Mutationen, sekundär jedoch zugleich auf *nonsense*-Mutationen. Zusammen mit der NMD-vermittelten Destabilisierung der mutierten Transkripte ist schließlich ein Funktionsverlust sehr wahrscheinlich.

Allgemeine Beurteilung des *screening*-Ansatzes

Durch die Isolation von Exondeletionsklonen für das Beispiel-Gen *Kit* und der Transmission einer Läsion durch die Keimbahn wurde die Machbarkeit des entwickelten Ansatzes zur Gendisruption demonstriert. Die auf Spleiß-Mutationen gerichtete *screening*-Methode hat dabei Vorteile gegenüber alternativen Verfahren, deren Prinzip im zweiten Ergebnisteil evaluiert wurde und die zum Teil schon Anwendung gefunden haben. Für die Maus waren dies bislang Durchmusterungsansätze mit dHPLC: Vivian et al. (2002) isolierten auf diese Weise ES-Zell-Mutanten aus einer ENU-behandelten Klonkollektion. Die Publikation wurde weiter oben bereits ausführlich analysiert. Ebenfalls schon erwähnt wurde die Arbeit von Coghill et al. (2002), in der ein rund 2200 Individuen repräsentierendes Archiv an DNA-Proben von ENU-mutagenisierten F1-Männchen, deren Spermata parallel kryokonserviert wurde, für vier Gene durchmustert wurde. Für eines der Gene wurden drei Punktmutationen isoliert, die drei anderen Durchmusterungen waren erfolglos. Von den drei Kodon-verändernden Mutationen wiederum erschien den Autoren eine funktionell relevant zu sein. Angesichts der geringen Sensitivität der dHPLC wurden die zu analysierenden Proben in keiner der beiden Arbeiten gepoolt. Aufgrund der Fragmentgrößenlimitierung der dHPLC musste zudem die kodierende Sequenz eines jeden Gens in mehrere Subfragmente unterteilt werden. Dies galt insbesondere für den auf genomischer DNA basierenden Ansatz von Coghill und Kollegen, wo die Anzahl an Exons die minimale Anzahl an dHPLC-Fragmenten markierte. Auch mit der vorliegenden Strategie der Klonbank-Durchsuchung nach Exondeletionen in cDNAs werden mehrere Amplifikationen pro Gen benötigt, jedoch basiert diese Methode auf stark gepoolten Proben - ein Pool repräsentiert hier im Durchschnitt ca. 100 Klone. Die hohe Sensitivität der Mutationsdetektion ermöglichte es hier überhaupt erst, sich auf eine Teilmenge an Läsionen zu konzentrieren, denn dafür ist eine entsprechend größere Klonbibliothek nötig. Deren Minimalgröße stieg weiter durch das

Anliegen, die Mutationsfrequenz nicht auf Maximalwerte einzustellen. Beide bibliotheksvergrößernden Effekte aber wurden durch das hohe Ausmaß der Probenvereinigung überkompensiert, so dass hier im Vergleich mit den beiden zitierten Arbeiten pro Gen deutlich weniger Proben zu analysieren sind. Ein *screening* auf Poolbasis ist zudem äußerst materialsparend - ein Aspekt, der vor allem für cDNA-basierte Ansätze Relevanz hat.

Der Erfolg einer Klonbankdurchmusterung ist nicht allein an der Anzahl gefundener Mutationen zu messen. So konnten Vivian et al. (2002) für zwei Gene zusammen zunächst 29 mutierte ES-Zellklone isolieren, von denen sich letztlich jedoch pro Gen nur ein Klon als brauchbar erwies. Die restlichen (Punkt-)Mutationen verursachten entweder keine Funktionsstörung oder sie gingen - höchstwahrscheinlich aufgrund der extrem hohen Mutationsfrequenz - nicht durch die Keimbahn. Das Verhältnis von Mauslinien mit Phänotyp geteilt durch die Anzahl gefundener Mutationen ist im vorliegenden Ansatz verbessert aufgrund der gemäßigten Mutationsrate und der Fokussierung auf einen Mutationstyp, der im Durchschnitt mit deutlich höherer Wahrscheinlichkeit Genfunktionen beeinträchtigt als es Punktmutationen tun. Hohe Mutationsfrequenzen limitieren die Produktion von Mäusen in dem Ansatz von Coghill et al. (2002) weniger, weil die kryokonservierten Spermaproben von mutierten Mäusen stammen, die ihre Lebensfähigkeit bereits unter Beweis gestellt haben. Auch ist die Produktion von Mäusen durch *in-vitro*-Fertilisation einfacher und schneller als die aus ES-Zellklonen. Dass mit dem vorliegenden Ansatz grundsätzlich nur wenige mutierte Klone pro Gen isoliert werden können, ist in dieser Hinsicht kaum als Vorteil zu werten. Vielmehr markiert die Bibliotheksgröße von 40.000 Klonen bei einer Mutationsrate von 1 zu 2500 den unteren Rand, um mit vertretbarer Wahrscheinlichkeit regelmäßig Spleiß-Mutationen isolieren zu können. Eine Erhöhung dieser Wahrscheinlichkeit wäre erstrebenswert und könnte bewerkstelligt werden durch Vergrößerung der Klonbank (z.B. durch Erhöhung der Klonanzahl pro Probe) oder durch gemäßigte Anpassung der Mutationsfrequenz, ohne sich die damit verbundenen Nachteile einzuhandeln.

Das vorliegende Verfahren zur Isolation von Spleiß-Mutationen basiert weiterhin auf relativ einfachen Mitteln (Zellkultur, molekularbiologische Standardmethoden), es erfordert keinen besonders hohen Arbeitsaufwand bei der Etablierung der Bibliothek (kein Picken von ES-Zellklonen, keine Einzelentnahme von Spermaproben) und keine kostspieligen Großgeräte. Auf der anderen Seite ist damit der Nachteil der schlechten Automatisierbarkeit des *screening*-Prozesses verbunden; zudem ist die Durchführung der PCR-Reaktionen selbst wegen der Gefahr falsch positiver Ergebnisse und Artefaktbildungen kein Routineakt. Auch stellt die Abhängigkeit von der endogenen Genexpression eine Limitierung dar, die sich der in dieser Arbeit gewählte cDNA-basierte Ansatz allerdings mit anderen Methoden teilt, z.B. auch mit dem der Genfallen, um auf eine der im Einleitungsteil 1.3 genannten, etablierten

Gendisruptionsverfahren zurückzukommen. Da die Ausschaltung von Genen mit Genfallen allerdings nicht zielgerichtet erfolgt, wäre das hauptsächliche Konkurrenzverfahren das als *knock-out*-Strategie eingesetzte, klassische *gene targeting*, dessen Hauptnachteil im relativ hohen Zeitaufwand für die Generierung der entsprechenden ES-Zellklone besteht. In dieser Hinsicht sind allerdings kürzlich Verbesserungen erzielt worden (Valenzuela et al., 2003). Die gen-getriebene chemische ES-Zell-Mutagenese ermöglicht die Durchmusterung einer großen Anzahl an Kandidatenproben und die selektive Isolation positiver ES-Zellklone durch eine Einzelperson in kurzer Zeit, im vorliegenden Fall innerhalb von etwa drei Wochen unter optimierten Bedingungen.

Es gilt, die Genfunktionen von 30.000 Genen aufzuklären. Mausmutanten sind dabei von hoher Bedeutung. Neben den Standardmethoden zur Gendisruption bietet sich der erarbeitete Ansatz als komplementierende Alternative an, auch unter dem Aspekt, dass Spleiß-Mutationen eine spezifische, möglicherweise unterschätzte Rolle bei der Ausprägung menschlicher Krankheiten spielen (Faustino und Cooper, 2003).