



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Genetische Charakterisierung des Integrationsortes von PED112 und  
Expressionsanalysen der Kandidatengene *Tfap2d* und *Pkhd1* in der  
Mauslinie *Tg(PED112)273*

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasser: Daniel Zach  
Matrikel-Nummer: 0400334  
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt): A 441 Diplomstudium Genetik – Mikrobiologie (Stzw.)  
Betreuer: Prof. Dr. Werner Lubitz, Prof. Dr. Thomas Rüllicke

Wien, im Juni 2010



Diese Arbeit wurde durchgeführt am Institut für Labortierkunde,  
Veterinärmedizinische Universität Wien, unter der Leitung von  
Prof. Dr. Thomas Rüllicke.



## Danksagungen

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Thomas Rüllicke, Vorstand des Instituts für Labortierkunde, Veterinärmedizinische Universität Wien, für die Möglichkeit zu dieser Diplomarbeit danken und ihm seine unkomplizierte Übernahme der Betreuung in der letzten Phase meiner Arbeit hoch anrechnen.

Danke auch an Dr. Dirk Korthaus, für die Einführung in die Arbeit, stetiger Hilfestellungen, sowie humorvoller Zusammenarbeit.

Weiters möchte ich Prof. Dr. Werner Lubitz nennen, der mir die Freiheit zu einer Diplomarbeit außerhalb der Universität Wien gab.

Einen speziellen Platz bekommt hier Dr. Barbara Wallner. Danke für Einweisungen, Ratschläge, Korrekturen, eine wunderbare Betreuung und vieles mehr. Besser hätte der qRT-PCR-Teil nicht werden können.

Am meisten am Herzen liegt es mir, mich bei meiner Familie zu bedanken. Danke für euren Rückhalt, viel Vertrauen in meine Zeitplanung, finanzielle Unterstützung und natürlich all eure Liebe. Danke an meine Oma - sie hat mich mit ihren Anrufen immer wissen lassen, dass sie an mich denkt. Danke an meine Freundin Katharina für ihre Liebe und ihren Beistand während „unseres“ Studiums. Danke an die Katters und eine herzliche Aufnahme ins Burgenland.

Und als Abschluss noch einen Gruß an all meine Freunde, mit denen sich genügend Ablenkungsmöglichkeiten von der Lernerei gefunden haben.



<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 MUTAGENESE .....	1
1.2 „PHENOTYPE DRIVEN“ MUTAGENESE.....	2
1.2.1 Physikalische Mutagenese.....	2
1.2.2 Chemische Mutagenese.....	2
1.2.3 N-Ethyl-N-nitrosoharnstoff (ENU).....	3
1.3 „GENOTYPE DRIVEN“ MUTAGENESE.....	4
1.3.1 Gene-trapping.....	4
1.3.2 Gene-targeting.....	4
1.3.3 Pronukleare Mikroinjektion.....	5
1.4 GENETIC SCREENING .....	7
1.4.1 Hochauflösende genomische Analysemethoden.....	7
1.4.2 Identifizierung des Integrationsorts in der Mauslinie Tg(PED112)273.....	8
1.4.2.1 Genome Walker Kit.....	8
1.4.2.2 Klonierungsstrategie.....	10
1.4.2.3 Kopplungsanalyse.....	11
1.5 GENOTYP DER MAUSLINIE Tg(PED112)273.....	12
1.6 PHÄNOTYP DER MAUSLINIE Tg(PED112)273.....	13
1.6.1 Primary Congenital Glaucoma (PCG).....	13
1.6.2 Caroli Disease.....	16
1.7 KANDIDATENGENE .....	18
1.7.1 Tcfap2d.....	18
1.7.2 Pkhd1.....	18
1.8 ZIEL DER ARBEIT.....	19
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>20</b>
2.1 MATERIAL.....	20
2.1.1 Reagenzien und Chemikalien.....	20
2.1.2 Geräte.....	20
2.1.3 Enzyme, Oligos und molekularbiologische Kits.....	20
2.1.4 Software, Programme.....	21
2.1.6 Tiere.....	21
2.2 METHODEN.....	22
2.2.1 Transgenanalyse der Mäuse.....	22
2.2.1.1 PCR-Protokoll.....	22
2.2.2 Charakterisierung des transgenen Konstrukts PED112.....	24
2.2.2.1 Integrationskontrolle von PED112.....	25
2.2.2.2 Cre-Rekombinase Aktivitätstest.....	26
2.2.2.3 Orientierung von PED112.....	27
2.2.3 3 Primer PCR.....	28
2.2.4 Primeretablierung.....	32

2.2.4.1 Restriktionskontrolle mit BgIII.....	37
2.2.5 <i>Real-Time PCR</i> .....	39
2.2.5.1 RNA Isolierung durch MagNA Lyser (Roche).....	40
2.2.5.2 Spektrophotometrische Messung des RNA-Gehalts.....	41
2.2.5.3 cDNA-Synthese.....	41
2.2.5.4 Real-Time PCR.....	42
<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>45</b>
3.1 KONTROLLEN DER MÄUSE AUF DAS TRANSGEN <i>PED112</i> .....	45
3.2 <i>PED112</i> CHARAKTERISIERUNG.....	46
3.2.1 <i>PED112</i> Integrationskontrolle.....	46
3.2.2 Aktivitätstest der <i>Cre</i> -Rekombinase.....	47
3.2.3 Head-to-Tail Integration von <i>PED112</i> .....	48
3.3 PRIMERETABLIERUNG.....	49
3.3.1 BgIII Restriktionsverdau.....	55
3.4 ZUSAMMENFASSUNG DES GENOTYPS.....	57
3.5 qRT-PCR.....	61
3.5.1 Qualität und Quantität der isolierten RNA.....	61
3.5.2 Isolierte RNA.....	62
3.5.3 qRT-PCR.....	62
3.5.3.1 Expression <i>Tcfap2d</i> .....	64
3.5.3.2 Expression <i>Pkhd1</i> .....	66
<b>4. DISKUSSION.....</b>	<b>67</b>
4.1 TRANSGENANALYSE DER MÄUSE.....	67
4.2 CHARAKTERISIERUNG DES TRANSGENEN KONSTRUKTS <i>PED112</i> .....	67
4.2.1 Integrationskontrolle von <i>PED112</i> .....	67
4.2.2 <i>Cre</i> -Rekombinase Aktivitätstest.....	67
4.2.3 Orientierung von <i>PED112</i> .....	67
4.3 PRIMERETABLIERUNG.....	68
4.3.1 Restriktionskontrolle mit BgIII.....	70
4.4 qRT-PCR.....	71
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>73</b>
<b>6. SUMMARY.....</b>	<b>74</b>
<b>7. REFERENZEN.....</b>	<b>75</b>
<b>8. LEBENS LAUF / CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>83</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Mutagenese

Bevor die ersten Klonierungstechnologien zur Anwendung bereit standen, wurden Gene mit Hilfe eines veränderten Phänotyps identifiziert und beschrieben. Ist ein Gen mutiert und in seiner Funktion von der Norm abweichend, ändert sich dementsprechend der Phänotyp. Organismen mit einer hohen Empfänglichkeit für Mutationen und einer kurzen Generationszeit, wie Bakterien oder Hefe, eignen sich besonders gut für diese Technik der Beschreibung von Genen. Zur Mutation von Genen tragen Spontanmutationen bei (Alberts *et al.*, 2008). Diese treten allerdings viel zu selten auf ( $5 \times 10^{-6}$  pro Locus) (Stanford *et al.*, 2001) und es bedürfte viel zu großer Populationen, um aus dieser Quelle neue Mutanten erstellen zu können. Um die Mutationsrate zu beschleunigen wurden die verschiedensten Strategien zur Mutagenese entwickelt, die ein breites Wirkungsspektrum besitzen, verschiedene molekulare Veränderungen zur Folge haben und in der Frequenz der Mutationen variieren (van der Weyden *et al.*, 2002). Phänotypisch relevante Mutationen können so nach kurzer Zeit aus einer Population ausgewählt und für weitere Untersuchungen herangezogen werden (Alberts *et al.*, 2008). Im Wesentlichen werden zwei Mutagenese Strategien unterschieden. Zum einen die klassischen Strategien, bei denen ein unbekanntes, zufälliges Gen mutiert wird, dadurch ein veränderter Phänotyp hervorgerufen wird, den es in weiterer Folge zu untersuchen und zu beschreiben gilt. Diese werden „phenotype driven“ Mutagenesestrategien genannt. Im Gegensatz dazu steht die moderne „genotype driven“ Mutagenese, mit „gene trapping“ „gene targeting“ (van der Weyden *et al.*, 2002), und der pronuklearen Mikroinjektion (Rülicke und Hübscher, 2000).

Experimente zur Mutagenese sind am Menschen in erster Linie gesetzlich nicht zugelassen und sie wären aufgrund der langen Generationszeit des Menschen nicht effektiv. Die Wissenschaft behilft sich an dieser Stelle mit Modellorganismen. Viele Gene und vor allem Genfunktionen sind im Laufe der Evolution hoch konserviert geblieben und damit in weniger komplexen Organismen gleich oder ähnlich zu denen komplexerer Organismen (Alberts *et al.*, 2008). In der Klasse der Säugetiere ist die Maus der bedeutendste Modellorganismus. Aufgrund der großen Ähnlichkeit zum

menschlichen Genom können Entwicklung, biochemische Pathways, Physiologie und vor allem menschliche Krankheitsbilder in speziellen Mausmodellen studiert werden. Die meisten, zu wissenschaftlichen Zwecken genutzten Mäuse, sind sogenannte „knock-out“ Mäuse (KO-Mäuse), Mutanten, die ein verändertes Gen und dessen Krankheitsbild repräsentieren sollen. Allerdings wird derzeit nur ein geringer Prozentsatz aller Säugetiergene und deren Krankheitsbilder durch KO-Mäuse beschrieben (Kennedy et al., 2006). Zahlreiche Mutageneseprogramme haben es sich daher zur Aufgabe gemacht, möglichst viele weitere Gene und deren Krankheitsbilder mit Hilfe von zusätzlichen Mutagenesestrategien zu erstellen und zu beschreiben (Beier, 2000).

## 1.2 „Phenotype driven“ Mutagenese

### 1.2.1 Physikalische Mutagenese

Die ersten erfolgreichen Versuche, Mutationen durch Strahlung zu induzieren, wurden von Muller in *Drosophila* (Muller, 1927) und Stadler in Mais (Stadler, 1928) in den 20er Jahren des letzten Jahrhunderts durchgeführt. Sie nutzten Röntgenstrahlung als eine kurzwellige ( $10^{-8} - 10^{-12}$  m) und hochenergetische (100eV – 10MeV) Form der elektromagnetischen Strahlung, die zu einer Steigerung der Mutationsrate von  $5 \times 10^{-6}$  auf  $13 - 50 \times 10^{-5}$  pro Locus beitragen kann. Dabei kommt es vorwiegend zu chromosomalen Veränderungen von Deletionen und Inversionen bis hin zu komplexen Translokationen (Cattanach et al., 1993; Russel, 1951; Stanford et al., 2001). Hier ergibt sich das Problem, dass bei Veränderungen der chromosomalen Struktur meist nicht nur ein Gen betroffen ist. Dies erschwert die Beschreibung des Gens von Interesse und dessen Funktionsanalyse, da die Veränderung des Phänotyps mehrere mutierte Gene verursacht haben können (van der Weyden et al., 2002).

### 1.2.2 Chemische Mutagenese

Nach den Pionierarbeiten von Muller und Stadler, kommt es ab den 1940er Jahren zu Mutageneseversuchen mit Chemikalien in *Drosophila* und Pflanzen (Auerbach et al., 1946; Rapoport, 1946). Versuche mit Pflanzenöl, bei denen Pflanzensamen in Öl

getränkt werden, ergeben, dass das Pflanzenöl zu Veränderungen in den Chromosomen führt (Swaminathan et al., 1956), die sich allerdings auch chromosomale Mutationen, wie Deletionen und Duplikationen beschränken (Ehrenberg, 1971).

Zu den chemischen Substanzen, die heute einen großen Einsatzbereich finden, gehören alkylierende Agenzien (AA). Sie induzieren chromosomale Aberrationen in mitotischen und meiotischen Zellen. Grundsätzlich wird zwischen AA mit einem niedrigen s-Wert (EMS, BMS, PMS) und AA mit einem hohen s-Wert unterschieden (MMS, MES) (Rao et al., 1965). Studien an kultivierten Säugetierzellen zeigen eine direkte Korrelation zwischen Punktmutationen und AA mit einem niedrigen s-Wert. Besonders hervorzuheben sei an dieser Stelle das N-Ethyl-N-nitrosoharnstoff. AA mit hohem s-Wert führen verstärkt zu Chromosomenaberrationen und Zelltod (Natarajan, 2005).

### 1.2.3 N-Ethyl-N-nitrosoharnstoff (ENU)

ENU ist ein im Labor synthetisiertes, alkylierendes Agens, das Punktmutationen verursacht, in dem es eine Ethylgruppe auf Sauerstoff- bzw. Stickstoffradikale der DNA transferiert. Dadurch kommt es zu Fehlpaarungen und zum Austausch von Basen (Justice et al., 1999). Am häufigsten sind TA Transversionen und AT zu GC Transitionen (Popp et al., 1983; Noveroske et al., 2000). ENU eignet sich besonders zur Beschreibung von „phenotype driven“ Mutationen, da es zu zufälligen Punktmutationen führt, die für eine Vielzahl an Krankheiten verantwortlich sind (Balling, 2001). Weiters ist ENU mit einer Mutationsrate von  $15 \times 10^{-4}$  pro Locus das effektivste Mutagen für Mäuse. Das bedeutet, dass unter etwa 1000 Gameten eine mutiert ist (Rinchik, 1991). Die höchste *in vivo* Mutationsrate erzielen spermatogoniale Stammzellen, die mit ENU behandelt werden (Russel et al., 1979), in hohen Dosen wirkt es Karzinogen (Justice et al., 2000). Die besondere Wirkung von ENU lässt Wissenschaftler große Projekte starten, bei denen viele verschiedene biologisch und klinisch relevante Phänotypen erstellt und in weiterer Folge untersucht werden (Balling, 2001, Nelms und Goodnow, 2001; Kile et al., 2003; Inoue et al., 2004; Reinholdt et al., 2004)

## 1.3 „Genotype driven“ Mutagenese

### 1.3.1 Gene-trapping

Nachteil der physikalischen und chemischen Mutagenese ist ein fehlender Anhaltspunkt, der die Stelle der Mutation markiert. Diesen Wegweiser liefert das gene trapping, dass vor allem in ES-Zellen Anwendung findet. Es integriert in ein Gen, erzeugt damit eine „loss-of-function“ Mutation und liefert Hinweise auf die Expression dieses Gens (Stanford et al., 2001). Grundsätzlich wird zwischen „promotor trap“ und „gene trap“ unterschieden. Ersteres besitzt ein Reporter-gen ohne Promotor und einen selektierbaren Marker (Friedrich und Soriano, 1991; Reddy et al., 1991; Melchner und Ruley, 1989). Das Konstrukt integriert in eine Exon, damit wird das Gen mutiert. Bei der Expression entsteht ein Fusionsprotein. Außerdem kann durch den Marker, meist eine Antibiotikaresistenz, eine erfolgreiche Integration in ein Gen nachgewiesen werden (Friedrich und Soriano, 1991). Der Nachteil: Es sind nur transkriptionell aktive Gene in ES-Zellen damit selektierbar. Ein „Gene trap“ Vektor besitzt ebenfalls keinen Promotor vor dem Reporter-gen, dafür eine „splice acceptor site“. Damit kann das Konstrukt in ein Intron integrieren und ein Fusionstranskript mit dem upstream gelegenen Exon bilden. Eine 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) ermöglicht eine Klonierung des Zielgens (Skarnes et al., 1992). Nachteil: Da der Vektor in ein Intron integriert, kann dieser beim Spleißen verloren gehen (van der Weyden et al., 2002).

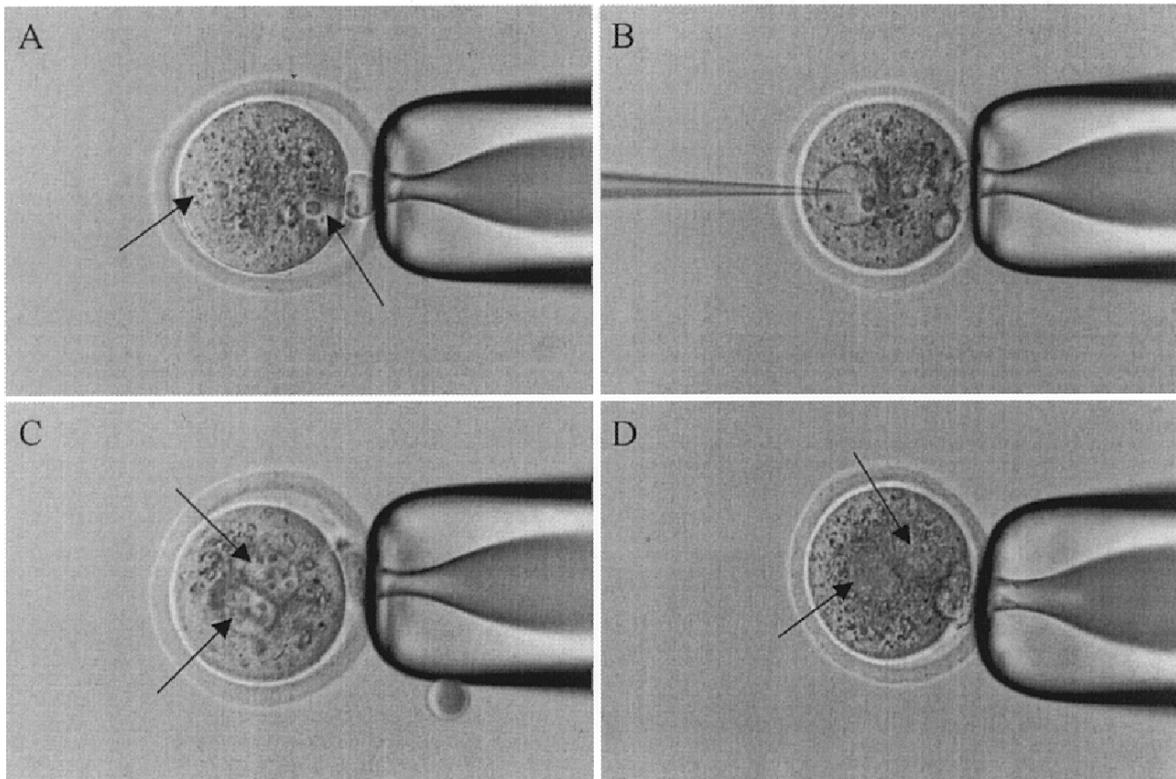
### 1.3.2 Gene-targeting

Ziel des Gene-targeting ist es, ein spezifisches Gen im Genom einer ES-Zellen zu verändern und diese dann in eine Blastocyste zu injizieren. Da die Sequenz des Gens, welches mutiert werden soll, bekannt ist, kann ein DNA-Fragment mit einer homologen Sequenz und einem Marker synthetisiert und durch Elektroporation in die ES-Zelle eingebracht werden. Durch den Vorgang der homologen Rekombination integriert das DNA-Fragment an gewünschter Stelle. Die Kultivierung in einem Agens erlaubt nur das Überleben der Zellen, die das Konstrukt integriert haben. Diese werden mittels PCR nochmals auf das Zielallel untersucht. Ist das Ergebnis positiv, können die genetisch veränderten ES-Zellen in den Uterus einer Amme injiziert

werden. Die Nachkommen sind Chimären (van der Weyden et al., 2002). Der Vorgang des gene-targeting wurde erstmals 1985 in Erythroleukämiezellen (Smithies et al., 1985) und Fibroblastenzellen (Lin et al., 1985) durchgeführt. Seitdem wird die Methode des Gene-targeting oft genutzt, um spezifische genetische Mutationen in ES-Zellen hervorzurufen. Auf diese Weise können knock-out, knock-in und conditionale Mausmodelle werden. Bei knock-out Mäusen wird ein bestimmter chromosomaler Locus durch die Integration des synthetisierten Vektors zerstört. Knock-in Mäuse sind ähnlich, nur dass das Endogen durch beispielsweise lacZ oder GFP ersetzt wird und loss-of-function des endogenen Erbfaktors die Folge ist. Stattdessen kann die Expression des „neuen“ Gens anhand der Marker während der Entwicklung beobachtet werden. Bei Mäusen mit conditionalen Mutationen ist das Ziel des Wissenschaftlers, loss-of-function (Verlust einer Genfunktion) bzw. gain-of-function (Zugewinn einer Genfunktion), je nach Zeitpunkt, Ort oder Gewebe, kontrollieren zu können. Dafür wird ein binäres Transgensystem benötigt, bei dem die Genexpression durch Interaktion von effector Protein und Zieltransgen reguliert wird (van der Weyden et al., 2002).

### 1.3.3 Pronukleare Mikroinjektion

Diese Strategie beschreibt die am häufigsten verwendete Methode um transgene Tiere und vor allem neue transgene Linien zu erzeugen. 1981 wurde von Gordon und Ruddle das englische Wort „transgene“ in Verbindung mit Mäusen eingeführt, die durch das Einbringen von Fremd-DNA in den frühen Embryo genetisch verändert wurden. Heute wird dieser Begriff in Zusammenhang mit Tiere genutzt, deren Genom durch dauerhafte Integration von in vitro rekombinierten genetischen Sequenzen verändert wurde (Rülicke und Hübscher, 2000). Dabei ist es wichtig, dass der Eingriff schon im frühen Embryo stattfindet, da eine Differenzierung zwischen somatischer Zelle und Keimzelle bei Säugetieren sehr früh passiert (Rülicke, 1996).



**Abbildung 1: Szenen einer Mikroinjektion.** A) Männlicher und weiblicher Pronukleus werden sichtbar. B) DNA Injektion in den männlichen Pronukleus C) Pronuklei dicht nebeneinander D) Pronuklei verschwinden vor der ersten Zellteilung. (Rülicke und Hübscher, 2000)

Weiblichen Mäusen, die mit Männchen verpaart wurden, werden nach der Superovulation befruchtete Eizellen entnommen. Die Eizelle wird mit einer Haltepipette fixiert. Unter dem Lichtmikroskop sind zwei Pronuklei zu erkennen, wobei der männliche Pronukleus aufgrund seiner Größe und Position für die Mikroinjektion bevorzugt wird (Rülicke und Hübscher, 2000). Es besteht allerdings kein Unterschied in der Anzahl der transgenen Nachkommen, wenn der weibliche Pronukleus für die Mikroinjektion gewählt wird (Brinster et al., 1985). 40 – 90% der Eizellen überleben den Eingriff, die dann in das Oviduct einer scheinchwangeren Amme eingebracht werden. Etwa 20% der Eizellen entwickeln sich, davon sind wieder etwa 20% transgen (Rülicke und Hübscher, 2000). Es besteht die Möglichkeit, dass die Mikroinjektion als invasiver Eingriff ansich, zufällige Chromosomenschäden verursacht und somit zu bevorzugten Integrationsstellen führt (Konopka, 1988).

## 1.4 Genetic Screening

Ist es erfolgreich gelungen, einen Organismus mit verändertem Phänotyp zu erstellen, werden, sofern der Integrationsort unbekannt ist, genetische screens durchgeführt, um diesen Phänotyp auf der Ebene der Gene untersuchen zu können. Je größer dabei das Genom, desto aufwändiger ist die Arbeit. Außerdem ist der Phänotyp entscheidend, welche Tests durchgeführt werden. Besonders schwierige Phänotypen sind solche, die mit Verhalten oder Lernen zu tun haben. Diese benötigen ausgefeilte Tests, die dennoch so einfach wie möglich gehalten werden und viele Mutanten auf einmal erfassen sollen (Alberts et al., 2008).

### 1.4.1 Hochauflösende genomische Analysemethoden

Um Integrationsorte von transgenen Konstrukten innerhalb des Genoms eines Organismus feststellen zu können, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Eine Methode ist FISH, Fluoreszenz In Situ Hybridisierung, bei der eine fluoreszenzmarkierte einzelsträngige DNA-Probe an die homologe einzelsträngige Region des Genoms des Organismus bindet (Winkler et al., 2003). Das Problem hierbei ist eine geringe Auflösung. Gibt es mehrere Integrationsorte dicht nebeneinander, können diese nicht voneinander unterschieden, sondern nur als ein Signal erkannt werden (Hultén, 2003). Eine Methode mit höherer Auflösung ist beispielsweise die Solexa-Sequenzierung. Dabei wird genomische DNA durch Restriktionsendonukleasen in kleine Stücke geschnitten, mit Adaptern ligiert, und auf die Innenseite einer „flow cell“ an komplementäre Adapter gebunden. Durch Amplifikation wird die genomische DNA in Cluster homologer Sequenzen angelegt. Primer werden hinzugefügt und fluoreszenzmarkierte dNTPs binden die entsprechenden Sequenzen. Ein Cluster bindet eines der vier dNTPs, welches mit Hilfe eines Lasers zum leuchten gebracht wird. Nach jedem Zyklus wird ein Bild aufgenommen und weitere dNTPs hinzugefügt. Anhand der Bilder kann die Sequenz der genomischen DNA ermittelt werden (Yale School of Medicine, 2010). Diese und weitere Methoden haben einen hohen Durchsatz und sparen viel Zeit, sind jedoch sehr kostenintensiv. Daher wird in dieser Arbeit auf PCR als kostengünstigere Methode zurückgegriffen.

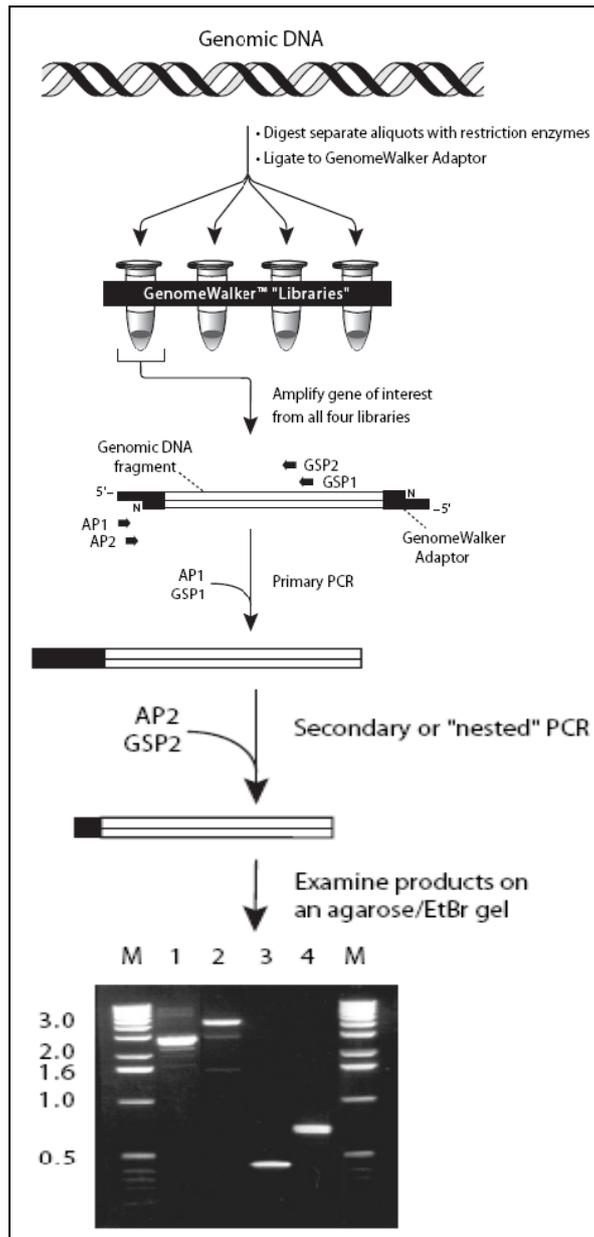
#### 1.4.2 Identifizierung des Integrationsorts in der Mauslinie *Tg(PED112)273*

Diese Arbeit ist eine Fortsetzung der Masterarbeit von Musashi Tsujita (2009) und knüpft direkt an diese an. Dazu wurden drei unterschiedliche Methoden verwendet. Eine vierte Methode soll in dieser Arbeit etabliert werden.

- Genome Walker Kit
- Klonierungsstrategie
- Kopplungsanalyse
- 3 Primer PCR (Teil dieser Arbeit)

##### 1.4.2.1 Genome Walker Kit

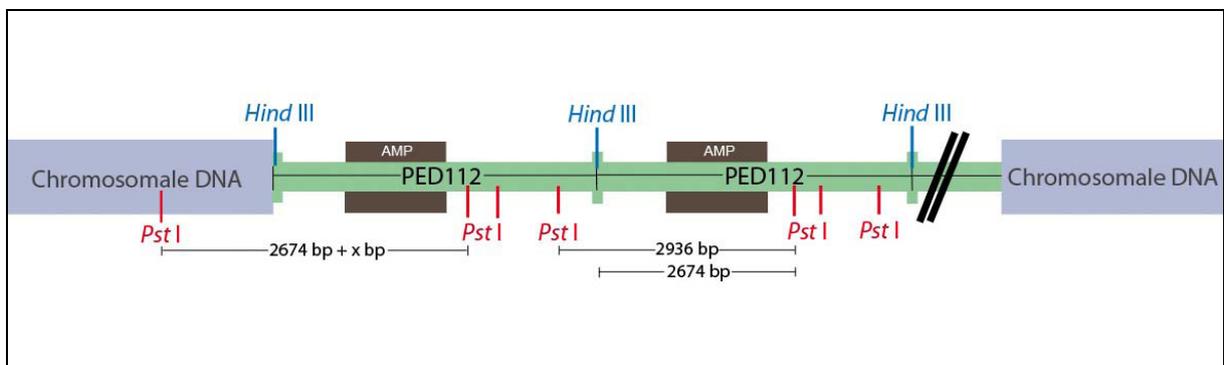
Durch Anwendung des Genome Walker Kits wird die eingesetzte genomische DNA in vier getrennten Ansätzen mit vier verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten. Damit werden vier so genannter Libraries gebildet. Sie enthalten das Genom in geschnittener Form. Es werden Adaptor-Fragmente hinzugefügt, die mit den einzelnen DNA-Stücken ligieren. Somit sind viele Fragmente vorhanden, die aus „Adaptor - genomischer DNA - Adaptor“ bestehen. Diesen Konstrukten werden Primer für das transgene Konstrukt PED112 der Linie *Tg(PED112)273* sowie Primer, die homolog zu den Adaptorsequenzen sind, beigemischt. Die bei der Primary PCR entstandenen Amplikons werden erneut mit Primern versehen, die wieder im Konstrukt sowie im Adaptor binden, sich von ihrer Position allerdings von den ersten Primern unterscheiden. Der „Upstream-Primer“ befindet sich weiter downstream als bei der primary PCR und der „Downstream-Primer“ weiter upstream. Die Amplikons dieser sogenannten „nested“ PCR werden in einem Agarose Gel aufgetrennt und sequenziert (Clontech.com, 2010). Es erfolgte ein BLAST mit Chromosom 1. Dabei lieferten zwei Fragmente aus zwei Libraries jeweils einen Integrationsort bei 18,4Mio bp. Ein Fragment aus einer dritten Library zeigt einen Integrationsort bei 18,7Mio bp (Tsujita, 2008).



**Abbildung 2:** Schema des „Genome Walking“ mit dem Genome Walker Kit. Quelle: Clontech.com

### 1.4.2.2 Klonierungsstrategie

Ziel der Klonierungsstrategie ist es, das transgene Konstrukt PED112 gemeinsam mit flankierender genomischer DNA zu isolieren, in einem Vektor zu verpacken und in weiterer Folge zu sequenzieren. Dazu wird ein PstI bzw. HindIII Verdau der genomischen DNA von einer homozygot transgenen *Tg(PED112)273* Maus angesetzt. Die erhaltenen Fragmente wurden kloniert und per Gelelektrophorese aufgetrennt. Im Vergleich mit NEBCutter können alle erwarteten Fragmente auf dem Gel nachgewiesen werden (Tsujiata, 2008).



**Abbildung 3: Schematischer Integrationsort von PED112.** Es werden die Schnittstellen des PstI bzw. HindIII Verdau und die Größe der erhaltenen Konstrukte dargestellt. (Tsujiata, 2008)

### 1.4.2.3 Kopplungsanalyse

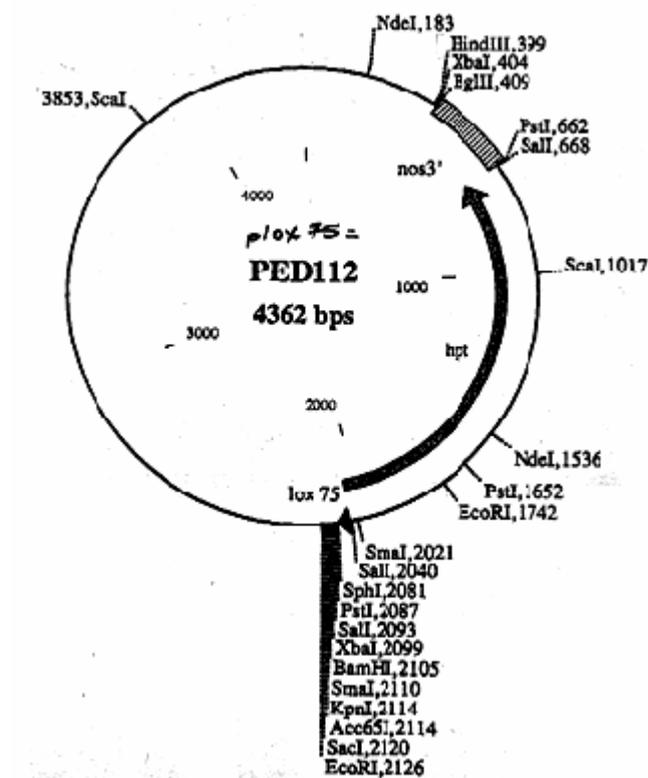
Bei dieser Methode können Positionen von Genen mit Hilfe von Markern, deren Lage im Genom bekannt ist, bestimmt werden. In diesem Versuch werden Mikrosatelliten als Marker hergenommen. Bei der Meiose kommt es zu Rekombinationen der Chromatiden von Vater und Mutter. Liegen zwei Mikrosatelliten nahe beieinander, so ist die Wahrscheinlichkeit, dass die beiden während der Rekombination getrennt werden, geringer als bei Satelliten, die weiter von einander entfernt positioniert sind. Weiters ist die Länge der Satelliten wichtig, denn diese ist nicht in allen Mausstämmen gleich. Anhand der Längenunterschiede können Rückschlüsse auf die Herkunft des Satelliten und des umliegenden Bereichs geschlossen werden. Da PED112 in den Pronucleus einer B6C3F1 Maus injiziert wurde, kommen nur B6 und C3H als Integrationsorte in Frage. Dies kann anhand der Mikrosatelliten bestätigt werden. Die grau hinterlegten Zeilen zeigen Mikrosatelliten, deren Länge der bekannten Länge von C3H entsprechen (Tsujita, 2008).

Chr1	197.195.432 bps	127 cM	BALBc/B6/129sv	C3H	Tg273 Blind 1	Tg273 Blind 2	Tg273 Blind 3	Tg273 Blind 4	Tg273 Blind 5	Tg273 Blind 6
D1Mit64	12.836.777	5	195/195/197	178	B6	B6	B6/129	B6	B6	B6
D1Mit430	14.271.356	10	145/136/141	145	B6	B6	B6/129	B6	B6	B6
D1Mit168	16.737.008	11	95/91/87	95	C3H	C3H	C3H	C3H	C3H	C3H
D1Mit230	18.323.882	11	224/224/204	224	B6,C3H	B6,C3H	B6,C3H	B6,C3H	B6,C3H	B6,C3H
PED112	18.406.861				PED112	PED112	PED112	PED112	PED112	PED112
D1Mit3	19.802.051	11	230/210/235	230	C3H	C3H	C3H	C3H	C3H	C3H
D1Mit169	24.071.806	15	109/105/105	109	B6/C3H	B6/C3H	C3H	C3H	B6/C3H	C3H
D1Mit211	25.567.955	15	153/139/148	148	129,C3H	129,C3H	129,C3H	129,C3H	129,C3H	129,C3H

**Abbildung 4: Auswertungstabelle einer Kopplungsanalyse.** Gelb markiert ist das transgene Konstrukt PED112. In Hellgrau ist der Satellit D1Mit230 dargestellt, der bei B6 und C3H die gleiche Länge hat und damit sowohl B6 als auch C3H als Integrationsbackground möglich macht. B6 als Integrationsbackground wird allerdings unwahrscheinlich bei der Betrachtung der in Dunkelgrau dargestellten Satelliten D1Mit168 und D1Mit3, deren Länge nur in C3H möglich ist. Chr1: Chromosom 1

## 1.5 Genotyp der Mauslinie *Tg(PED112)273*

Die Mausmutante *Tg(PED112)273* enthält das transgene Konstrukt PED112 (siehe Abbildung 1). Das Konstrukt ist 4360bp groß und enthält eine Ampicillinkassette zur Selektion. Mit dem HindIII Restriktionsenzym wurde die DNA linearisiert und durch Mikroinjektion in den Pronukleus einer B6C3F1 Maus eingebracht. Dort hat die DNA an einer zufälligen Position des Genoms integriert. Die Maus, die sich aus dieser befruchteten Eizelle entwickelt hat, ist der Founder der Linie *Tg(PED112)273*. Diese Linie besitzt allerdings durch die Beteiligung von C3H/He im genetischen Hintergrund die rd1 Mutation im Gen *Pde6b*, welche zu einer Retina Degeneration bei homozygoten Tieren führt. Um die rd1 Mutation aus dem Hintergrund zu entfernen, wird durch „Outcrossing“ der genetische Hintergrund in B6D2F1 geändert. Demnach setzt sich der genetische Hintergrund der Mäuse dieser Linie aus C57BL/6, DBA/2 und C3H zusammen. Der DBA/2 Hintergrund kann aufgrund des „Outcrossings“ als Integrationsort des transgenen Konstrukts PED112 ausgeschlossen werden (Plank, 2008; Tsujita, 2008).



**Abbildung 5:** Skizze des transgenen Konstrukts PED112 mit loxP 75, Ampicillin Resistenzkassette und HindIII Schnittstelle

Desweiteren enthält das transgene Konstrukt eine mutierte loxP-site. Diese ist für das Cre-loxP-System (Cre = Causes recombination, loxP = locus of crossover (X) of bactriophage P1) wichtig und war für spezifische Reaktionen mit einer weiteren loxP-site vorgesehen.

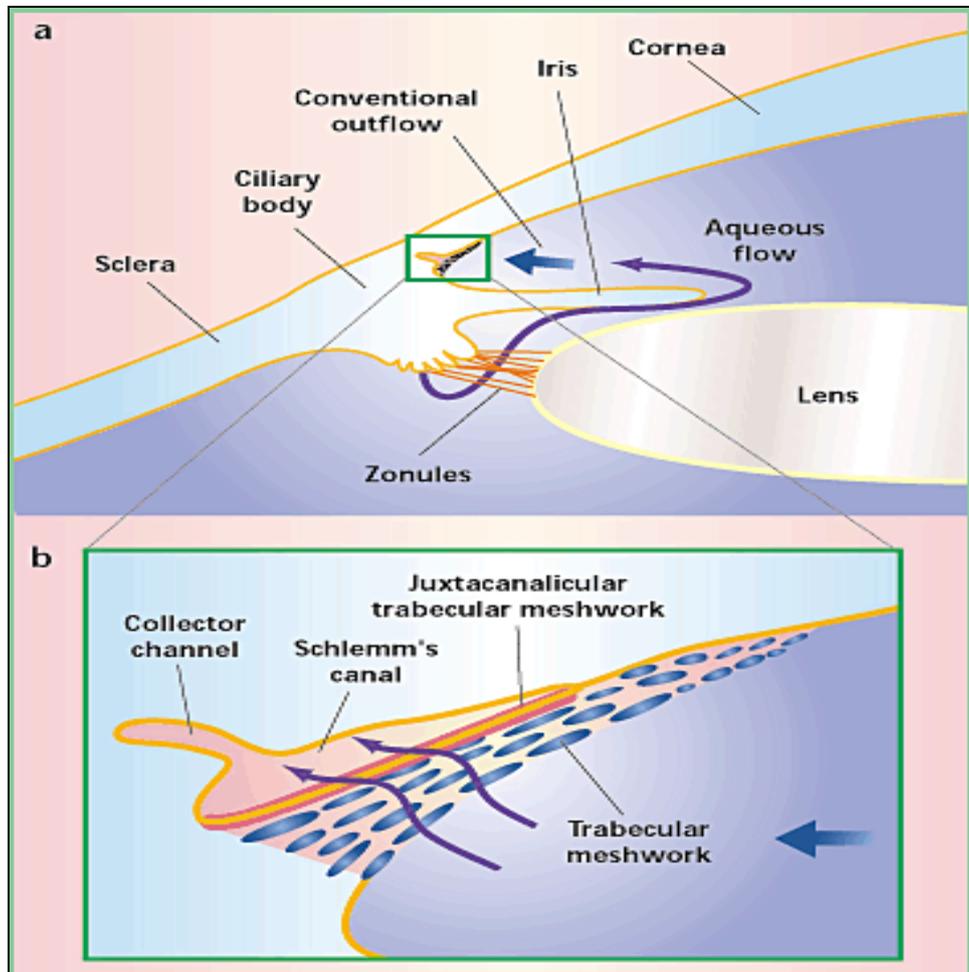
## *1.6 Phänotyp der Mauslinie Tg(PED112)273*

### 1.6.1 Primary Congenital Glaucoma (PCG)

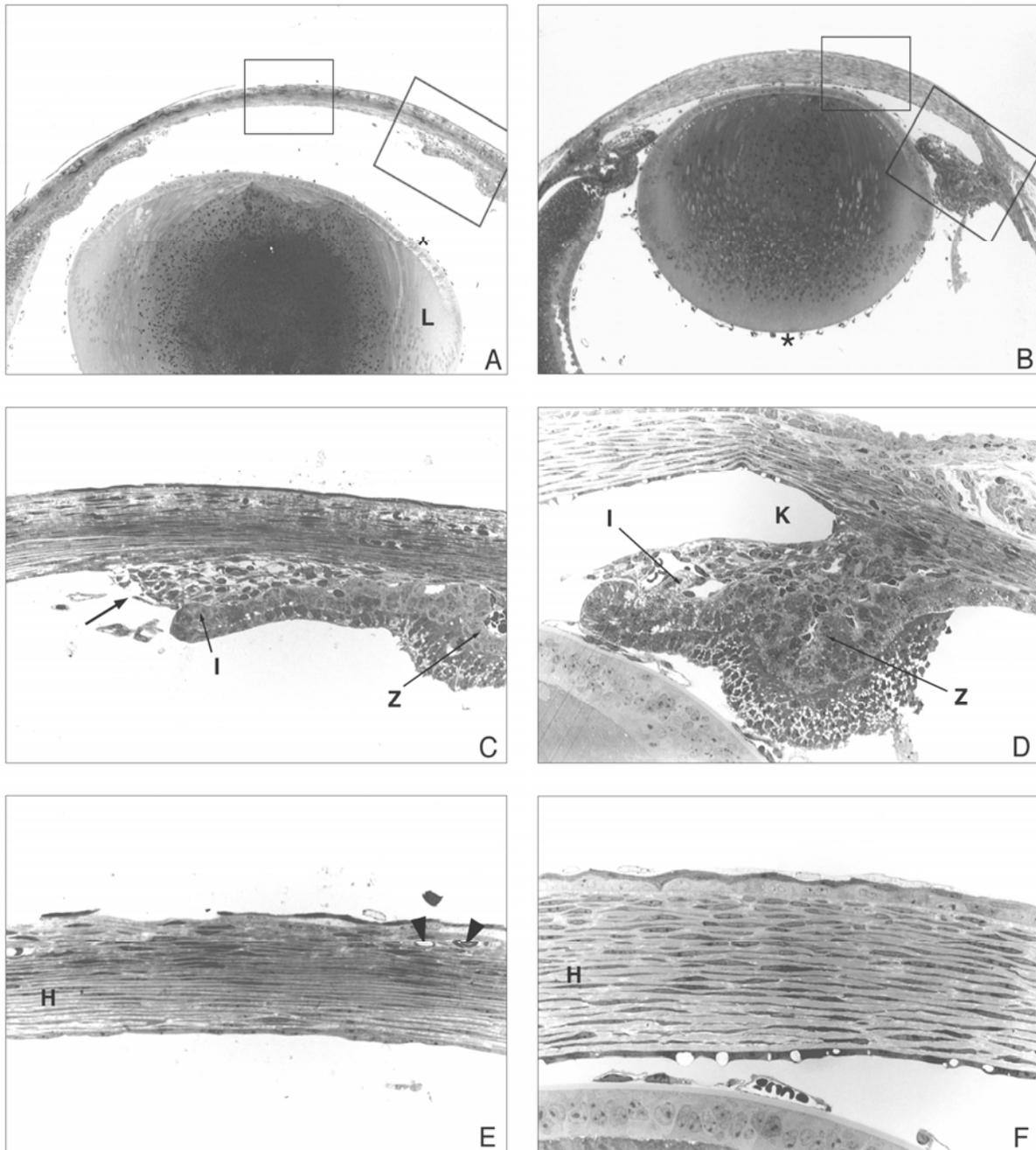
2002 waren weltweit 161 Millionen Menschen in ihrem Sehvermögen beeinträchtigt, 37 Millionen davon sind blind (Resnikoff et al., 2002). Laut WHO sind es im Jahre 2009 bereits 314 Millionen, wobei die Anzahl blinder Menschen auf 45 Millionen gestiegen ist. Erkrankungen am Auge und damit verbundene Verminderung der Sehkraft treten zunehmend im hohen Alter auf, wobei Frauen stärker betroffen sind als Männer. Außerdem leben 87% der Menschen mit Sehstörungen in Entwicklungsländern. 85% oben genannter Erkrankungen könnten mit entsprechenden Mitteln verhindert werden (WHO.int, 2009), der Großteil davon sicherlich in den ärmsten Gegenden der Welt. Für das Jahr 2000 wurde die Zahl von Menschen mit einer Glaukomerkrankung auf 66,8 Millionen geschätzt, beidseitig erblindete Glaukumpatienten sollten etwa 10% darstellen (Quigley, 1996). Das Glaukom zählt damit weltweit zur 3. häufigsten Ursache für Erblindungen (Merck.com, 2009).

Das Primary Congenital Glaucoma ist eine Unterteilung des Glaukoms, mit hohem Vorkommen und schwerwiegenden Auswirkungen. Es resultiert aus einer Entwicklungsstörung des Abflussapparates der Augenflüssigkeit, über die noch wenig bekannt ist (Libby et al., 2003). Die Produktion und der Abfluss der Augenflüssigkeit sind nicht mehr ausgewogen, der Augeninnendruck steigt. Im Normalfall wird die Augenflüssigkeit vom Ziliarkörper durch die Pupille zum vorderen Teil des Auges geleitet und verlässt diesen durch den Schlemmkanal wieder. Beim Glaukom ist dieser Kanal bedeckt, beschädigt oder nicht funktionsfähig. Dies hat eine Steigerung des Augeninnendrucks zur Folge, der den optischen Nerv beschädigt – diese Beschädigung wird Glaukom genannt - und damit zur Erblindung führt (Merck.com, 2009), sofern eine rasche medizinische Behandlung ausbleibt.

Dazu gehören chirurgische Eingriffe und Drainageimplantate (Bejjani et al., 2004). Weitere Symptome sind Schwellung der Cornea, Überempfindlichkeit des Auges gegenüber erhöhter Lichteinwirkung und Vergrößerung des Augapfels (Libby et al., 2003).



**Abbildung 6:** a) Kammerflüssigkeit wird im Ziliarkörper produziert, fließt von der posterioren Kammer durch die Pupille in die anteriore Kammer. Zum Abflussapparat (conventional outflow) gehören Trabeculum (trabecular meshwork), der Schlemmkanal und das episclerale Venensystem (episcleral venous system). b) Vergrößerung des Abflussapparates. Rote Linien markieren den blockierten Bereich, durch den im Normalfall die Kammerflüssigkeit abfließen würde (Tomarev, 2001).



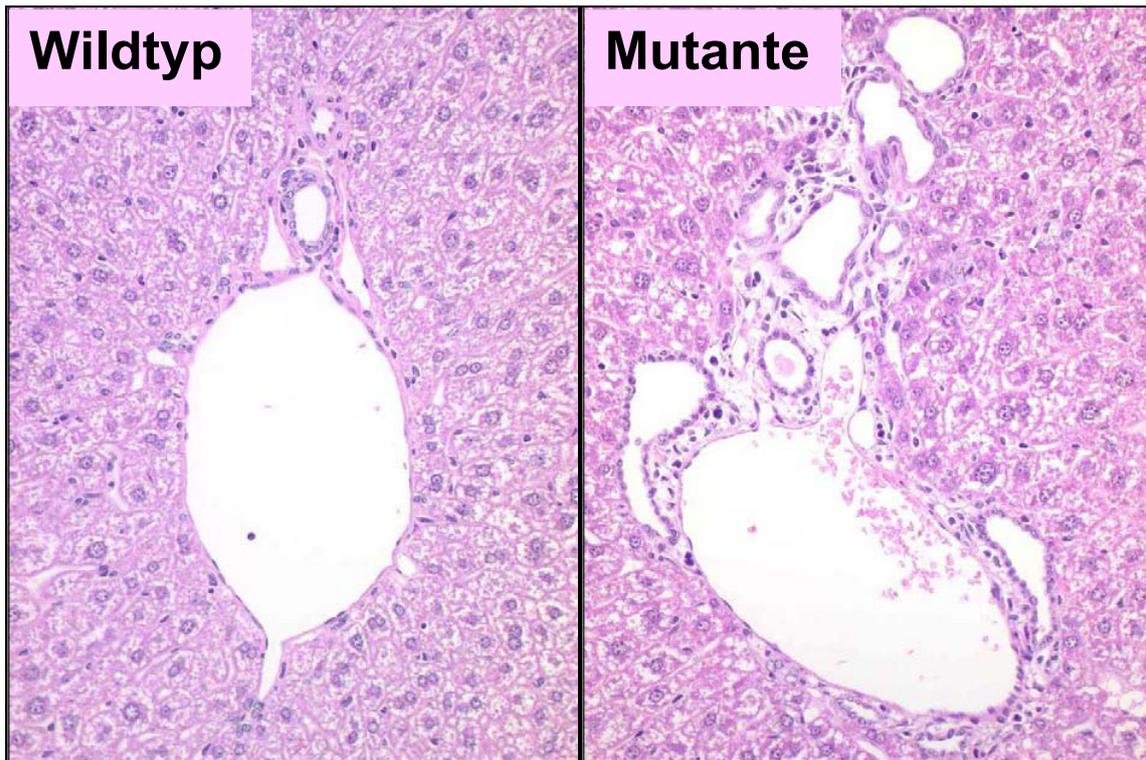
**Abbildung 7: Querschnitt durch die vordere Augenkammer neugeborener Mäuse.** Vergleich Auge homozygot transgener Mäuse (A, C, E) mit Wildtyp (B, D, F). A, C: Entwicklung der Mutante zeigt eine fehlende Einbuchtung, Irisgewebe das an Endothelgewebe der Cornea anhaftet und eine kleine doppelwandige Einfaltung des Ziliarkörpers. E: Cornea der Mutante ist im Vergleich mit Wildtyp dünner und zeigen ein abgeflachtes Epithel und Endothel. C-F: Detaillierte Ansicht der spezifischen Bereiche von A und B. H= Cornea, I= Iris, K= Kammerwinkel, L= Linse, Z= Ziliarkörper. (Rülicke, 2001)

Das Glaukom wird autosomal rezessiv vererbt, das bedeutet, 50% der Nachkommen von Anlagenträgern sind asymptotisch, 25% sind nicht betroffen und 25% erkranken am Glaukom (Bejjani et al., 2004). Es wird unterteilt in ein primäres und sekundäres Glaukom. Beim Primären gibt es ein Offenwinkel- und ein Engwinkelglaukom. Ersteres ist bedingt durch eine Blockierung des Trabeculums,

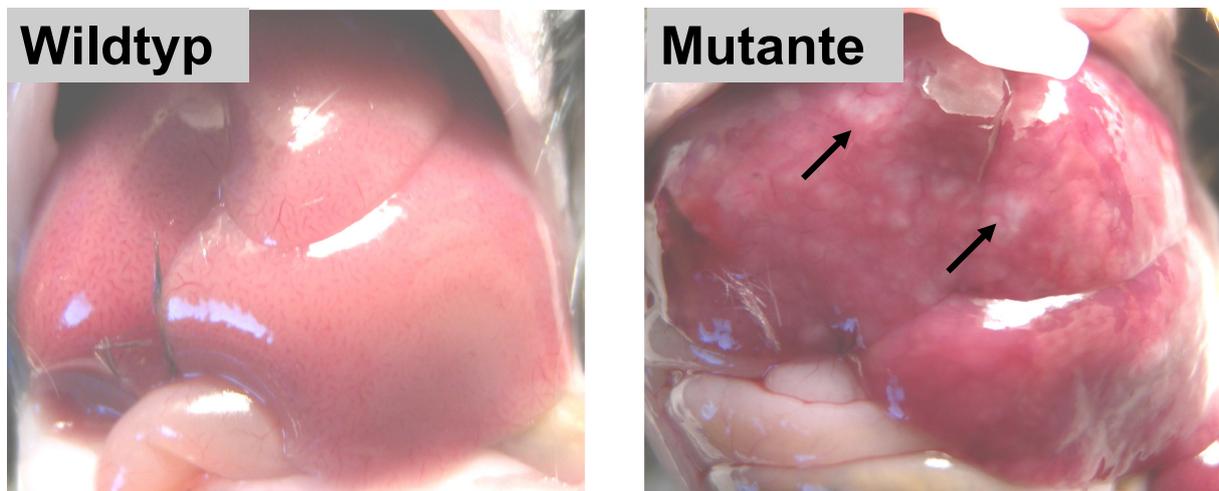
Kammerwasser kann nicht abfließen, der Druck steigt, es kommt zu einer Beschädigung des optischen Nervs. Ein fortschreitender Verlust der Größe des Blickfeldes ist die Folge. Beim Engwinkelglaukom kann das Kammerwasser aufgrund eines unnatürlichen Kontakts zwischen Iris und Trabeculum nicht abfließen. Die Krankheit nimmt ebenfalls einen graduellen Verlauf, wobei Rötung und Schmerzen die Symptome sind. Unschärfe und ein Lichtschleier bei hellem Licht beeinträchtigen das Sehvermögen. In diesem Fall stellt Laser Iridotomy eine Behandlungsmöglichkeit dar. Das sekundäre Glaukom wird begründet durch äußere Einflüsse, Chemikalien, Medikamente und andere Krankheiten (Paton und Craig, 1976).

### 1.6.2 Caroli Disease

Die Caroli Krankheit wurde durch Jacques Caroli im Jahr 1958 beschrieben und stellt eine seltene, erblich bedingte, zystische Erkrankung der Gallengänge dar und in Asien, besonders in Japan, am häufigsten auftritt (Bismuth et al., 1999). Frauen sind häufiger betroffen als Männer, bei jungen Erwachsenen ab dem Alter von etwa 22 Jahren kommt es zu den meisten Diagnosen, Kinder können ebenfalls betroffen sein (Romano, 2009) und es wurden bereits pränatale Diagnostiken beschrieben (Sgro et al., 2004). Die indirekte Sterblichkeit ist aufgrund auftretender Krankheiten, wie Cholangitis nach 5-10 Jahren, sehr hoch. Die Caroli Krankheit folgt, wie das PCG, einem autosomal rezessiven Erbgang und besitzt zwei Formen. Zum einen die Caroli Krankheit selbst, bei der es zu einer fehlerhaften Bildung der Gallengänge kommt. Dabei kann die Verteilung der missgebildeten Gallengänge diffus sein, oder sich auf nur einen Leberlappen beschränken (Jonas et al., 2001). Außerdem ist sie oft mit „autosomal recessive polycystic kidney disease“ (Bernstein und Slovis, 1992) verbunden und selten mit „autosomal dominant polycystic kidney disease“ (Jordan et al., 1989). Die zweite Form ist das Caroli Syndrom, dass mit „congenital hepatic fibrosis“ zusammenhängt (Karim, 2004).



**Abbildung 8: HE-Färbung der Leber von Wildtyp und Mutante.** Histologische Schnitte der mutierten Leber zeigen eine verstärkte Bildung von zystisch vergrößerten Gallengängen und allgemeine Abweichungen von Gewebestrukturen einer gesunden Leber. Dies entspricht Beobachtungen an humanen Patienten mit der Caroli-Krankheit. (Plank, 2008)



**Abbildung 9:** Vergleich gesunde Leber und mutierte Leber mit vergrößerten Gallengängen (siehe Pfeile).

## 1.7 Kandidatengene

Die beiden Gene *Tfap2d* und *Pkhd1* sind für die Entwicklung bzw. korrekte Funktion von Auge bzw. Leber verantwortlich, jene Organe, die in der Mauslinie *Tg(PED112)273* einen mutierten Phänotyp zeigen. Desweiteren befinden sich die beiden Gene in unmittelbarer Umgebung zum Integrationsort von PED112 und sind außerdem die nächsten organspezifischen Gene im näheren Umfeld.

### 1.7.1 *Tcfap2d*

*Tfap2d* steht für Transcription factor AP-2 Delta und gehört zur Activating Protein 2 (AP-2) Transcription Familie. Es ist wichtig für die postimplantative Entwicklung der Maus, vor allem in der Augenentwicklung (Retinaepithel) (Zhao et al., 2002). Es liegt auf Chromosom 1 bei 19.093.103 bis 19.156.427 bp. *Tfap2d* hat zwei Transkripte, wobei nur eines translatiert wird (ensembl.org, 2009). Organe, in denen es zur Transkription kommt, sind vor allem Gehirn (Theilerstage 28 entspricht postnatal) und Retina (Theilerstage 21-22 entspricht Embryonalstadium E13.5).

### 1.7.2 *Pkhd1*

*Pkhd1* steht für Polycystic kidney and hepatic disease 1 und beschreibt die Mutation eines Genes, die beim Menschen sowohl zu Leber als auch Nierenschädel führt (siehe Caroli Disease) (Williams et al., 2007). *Pkhd1* liegt auf Chromosom 1 bei 20.047.860 bis 20.608.145 bp. Drei Transkripte werden vor allem in Niere (E12.5 bis 3 Monate postnatal) und Leber (adultes Tier) transkribiert (ensembl.org, 2009). KO-Mäuse, bei denen Exon 1-3 in *Pkhd1* durch ein lacZ Reportergen ersetzt werden, zeigen im homozygoten Zustand ein Fehlen der *Pkhd1* Expression und dieselben Leberschäden (Williams et al., 2007), die bei homozygoten Mäusen der Linie *Tg(PED112)273* beobachtet werden können. Außerdem können bei den KO-Mäusen Zysten an den Nieren beobachtet werden (Williams et al, 2007), die bei *Tg(PED112)273* ausbleiben.

### 1.7.3 Regulatorische Elemente

Der Integrationsort stellt einen Bereich vieler regulatorischer Elemente dar, die für die korrekte Expression von Genen wichtig sind, da sie die Produktion von mRNA erhöhen bzw. vermindern oder zeitlich und örtlich regulieren können. Ein Eingriff in diesem Bereich, wie im Falle von PED112 ist eine Störung des Gleichgewichts und der naturgemäßen Funktion der regulatorischen Elemente und in weiterer Folge der Gene.

### 1.8 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, an die Arbeit von Plank (2008) und Tsujita (2008) anzuknüpfen und den Integrationsort des transgenen Konstrukts PED112 näher zu charakterisieren. Dafür werden zwei Mauslinien verwendet, *Tg(PED112)273/CMV-Cre* und *Tg(PED112)273(m)*. Außerdem werden Expressionsanalysen in den Organen Auge, Gehirn, Leber und Niere durchgeführt. Diese sollen Aufschluss über die Expression der Kandidatengene in genannten Organen liefern und einen Vergleich der transkribierten mRNA von Wildtyp Mäusen zu mutierten Mäusen zulassen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Reagenzien und Chemikalien

- 10x Restriktionspuffer "Orange", Fermentas, St. Leon-Rot, D
- LE Agarose, Biozym Scientific GmbH, Hess, D
- Bromphenolblau, Merck, Darmstadt, D
- Ethanol (100%), Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- Ethidiumbromid, Sigma-Aldrich, Steinheim, D
- Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>), Roth, Karlsruhe, D
- Wasser, Molecular Biology Grade, VWR International GmbH, Darmstadt, D

#### 2.1.2 Geräte

- Pipette Research<sup>®</sup> 1-10 µl, Eppendorf, Hamburg, D
- Stratagene Mx3000P
- Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg, D
- Vortex Mixer NeoLab VM-300, Heidelberg, D
- Zentrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg, D
- Zentrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg, D

#### 2.1.3 Enzyme, Oligos und molekularbiologische Kits

- BioTaq DNA- Polymerase, Dialat Ltd., Moskau, RU
- dNTPs (2mM), MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
- DNA Gel Extraction Kit Xact, GenXpress, Wiener Neudorf, A
- GeneRuler™ DNA ladder mix, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
- Restriktionsenzym *Bgl*II, Fermentas, St. Leon-Rot, D
- Primers, Invitrogen, Lofer, A
- Proteinase K, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
- Solis BioDyne HotFire Polymerase

#### 2.1.4 Software, Programme

- BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- BLAT, UCSC Genome Bioinformatics, <http://genome.ucsc.edu/>
- CodonCode Aligner 2.0, CodonCode Corporation, Dedham, USA
- GeneScan<sup>®</sup>2.1, Applied Biosystems, Fostercity, CA
- In-silico PCR, <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>
- INTAS Gel Jet Imager, INTAS, Göttingen, D
- Mfold, <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold>
- MxPro, Stratagene
- NEBcutter, <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>
- Primer3, <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>

#### 2.1.5 Hilfsmittel

- Filter tips, 1000 µl, 200 µl, 20 µl, Greiner Bio-One, Kremsmünster, A
- Pipette tips 200 µl, 1000 µl, Sarstedt, Nümbrecht, D
- Pipette tips 10 µl, 200 µl, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, A
- PCR Multiply<sup>®</sup>- µ Strip 0,2 ml chain, Sarstedt, Nümbrecht, D
- Reaktionstubes 1,5 ml, Eppendorf, Hamburg, D

#### 2.1.6 Tiere

Für die Methoden dieser Arbeit wird DNA von homo- und hemizygoten Tieren, sowie von Wildtypen verwendet. Die bereits isolierte DNA stammt zum Teil vom Vorgänger zu dieser Arbeit, Musashi Tsujita, der die DNA Proben aus präparierten Nieren der entsprechenden Tiere gewonnen hat. DNA-Proben, die nicht von Musashi Tsujita isoliert wurden, werden aus Schwanzspitzen, der für den jeweiligen Versuch benötigten Tiere, gewonnen.

Die Tiere, die für diese Versuche benötigt werden, stammen aus der transgenen Mauslinie *Tg(PED112)273* mit gemischt genetischem Background aus C57BL/6, DBA/2 und C3H.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Transgenanalyse der Mäuse

Um neue Verpaarungen der Mauslinien *Tg(PED112)273(129)* und *Tg(PED112)273(m)* ansetzen zu können, müssen die Mäuse auf das Vorhandensein des transgenen Konstrukts untersucht werden. Da 21 Tage nach der Geburt jeder Maus eine Schwanzbiopsie durchgeführt wird, kann die DNA aus diesen Schwanzspitzen extrahiert und analysiert werden. Die Schwanzspitzen werden in einem -80°C Kühlschrank gelagert. Die DNA-Extraktion erfolgt nach einem PKII-Protokoll. Die DNA der Schwanzbiopsien, der in Abbildung 1 aufgelisteten Mäuse, wird extrahiert und untersucht.

<b>Mauslinie</b>	<b>Mausnummer</b>
<i>Tg(PED112)273(129)</i>	152-159
<i>Tg(PED112)273(m)</i>	677-684

**Tabelle 1:** Gelistet sind die Nummern von Mäusen zweier Mauslinien, die auf das Vorhandensein des transgenen Konstrukts untersucht werden.

Zur Schwanzspitze, die sich bereits in einem Reaktionsgefäß befindet, werden 100µl PK-II Puffer und 2µl Proteinase K hinzugefügt. Das Reaktionsgefäß wird über Nacht (ü.N) auf einem Heizblock bei 60°C inkubiert. Die Proteinase K wird dann bei 95°C für 10' inkubiert und somit deaktiviert, das Reaktionsgefäß anschließend bei 13.000 rpm für 3' abzentrifugiert. 2µl des Überstandes, in dem sich die DNA befindet, werden direkt für PCR verwendet.

#### 2.2.1.1 PCR-Protokoll

Mit Hilfe der Primer P1 und P2 (siehe Tabelle 2), die beide im Transgen binden, soll herausgefunden werden, welche Mäuse das Transgen integriert haben.

Primer	Amplicon bp	Primer Sequenzen	bp
P1	518	5' CAC GCC CTC CTA CAT CG 3'	17
P2		5' CGA GGA AGC GGA AGA GC 3'	17

**Tabelle 2:** Auflistung der Primer mit Bezeichnung, Ampliconlänge in Basenpaaren (bp), der Primer Sequenz und der Länge der Primer.

$\mu\text{L}$ pro Reaktion	Komponente	Stock		Final	
13,7	ddH <sub>2</sub> O				
2,5	PCR buffer	10	x	1	x
3,3	MgCl <sub>2</sub>	15	mM	2	mM
2,5	dNTPs	2	mM	0,2	mM
0,38	P1	10	$\mu\text{M}$	100	nM
0,38	P2	10	$\mu\text{M}$	100	nM
0,2	Taq DNA Pol	5	U/ $\mu\text{L}$		
2	DNA				
25	Gesamt				

**Tabelle 3:** Mengenangaben ( $\mu\text{l}$ ) der Komponenten pro Reaktion. Stock gibt die Konzentration der Komponente im Stock an, Final die Konzentration im Reaktionsansatz.

Der Reaktionsansatz wird nach Mengenangaben in Tabelle 3 und der angegebenen Reihenfolge in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Die DNA wird erst zu einem späteren Zeitpunkt hinzugefügt. Es ist darauf zu achten, dass die Taq DNA Polymerase nur so kurz wie möglich Raumtemperatur ausgesetzt ist. Die PCR-Reaktionsgefäße stehen in einem Kühlblock parat, in die jeweils die Differenz von Gesamtmenge (in diesem Fall 25 $\mu\text{l}$ ) und DNA (in diesem Fall 2 $\mu\text{l}$ ) in Form des fertigen Reaktionsansatzes pipettiert werden. Erst dann wird die angegebene Menge DNA zum Erreichen der Gesamtmenge in jedes Reaktionsgefäß einzeln ergänzt. Dieses Pipettierschema bleibt für alle PCRs dieser Arbeit gleich, lediglich die Mengenangaben können variieren.

Das Temperaturprofil für diese PCR mit den Primern P1 und P2 entspricht folgender Tabelle:

Abschnitt	Anzahl der Zyklen	Zeit	Temperatur
Initialisierung	1 Zyklus	4 min	95°C
Denaturierung	40 Zyklen	30 s	95°C
Annealing		30 s	58°C
Extension		30 s	72°C
Finale Extension	1 Zyklus	7 min	72°C

**Tabelle 4:** Die Tabelle zeigt das Temperaturprofil der PCR

Die PCR Produkte werden auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und bei 60V etwa 60' lang aufgetrennt. Dieses und alle weiteren Agarosegele dieser Arbeit werden wie folgt zubereitet:

Kleine Apparatur		Große Apparatur	
50ml	10x TBE	100ml	10x TBE
0,5g	Agarose	1g	Agarose
2µl	Ethidiumbromid	4µl	Ethidiumbromid

**Tabelle 5:** Mengenangaben zur Erstellung von Agarosegelen für kleine und große Apparaturen.

## 2.2.2 Charakterisierung des transgenen Konstrukts PED112

Die Charakterisierung erfolgt an zwei Mauslinien, *Tg(PED112)273/CMV-Cre* und *Tg(PED112)273(m)*. Die Integrationsorte von PED112 sind bereits von Musashi Tsujita an der Position 18.406.861 bp und 18.728.739 bp beschrieben worden. Folgende Punkte sollen anhand von *Tg(PED112)273/CMV-Cre* Mäusen geklärt werden:

1. Hat eine Integration von PED112 stattgefunden?
2. Wird der Bereich zwischen den Positionen 18,4Mio bp und 18,7Mio bp aufgrund der loxP sites der PED112 Transgene bei aktiver Cre-Rekombinase deletiert?
3. Wie ist die Orientierung der Konstrukte?

Anhand von Wildtyp (WT), hemizygot transgener (+/T) und homozygot transgener (T/T) DNA von *Tg(PED112)273(m)* Mäusen werden Primeretablierungen

durchgeführt und „Upstream“ als auch „Downstream“ Bereiche der Integrationsorte beschrieben.

### 2.2.2.1 Integrationskontrolle von PED112

Der Nachweis des PED112 Fragments erfolgt mit den Primern P1 und P2 die beide im Transgen binden.

Primer	Amplicon bp	Primer Sequenzen	bp
P1	518	5' CAC GCC CTC CTA CAT CG 3'	17
P2		5' CGA GGA AGC GGA AGA GC 3'	17

**Tabelle 6:** Auflistung der Primer mit Bezeichnung, Ampliconlänge in Basenpaaren (bp), der Primer Sequenz und der Länge der Primer.

µL pro Reaktion	Komponente	Stock		Final	
13,72	ddH <sub>2</sub> O				
2,5	PCR buffer	10	x	1	x
3,33	MgCl <sub>2</sub>	15	mM	2	mM
2,5	dNTPs	2	mM	0,2	mM
0,375	P1	10	µM	100	nM
0,375	P2	10	µM	100	nM
0,2	Taq DNA Pol	5	U/µL		
2	DNA				
25	Gesamt				

**Tabelle 7:** Mengenangaben (µl) der Komponenten pro Reaktion. Stock gibt die Konzentration der Komponente im Stock an, Final die Konzentration im Reaktionsansatz.

Die DNA stammt von Mäusen der Nr. 183, 184, 185 der Linie *Tg(PED112)273/CMV-Cre* und einer homozygot transgenen Maus (T/T) der Linie *Tg(PED112)273(m)*.

Abschnitt	Anzahl der Zyklen	Zeit	Temperatur
Initialisierung	1 Zyklus	4 min	95°C
Denaturierung	40 Zyklen	30 s	95°C
Annealing		30 s	58°C
Extension		30 s	72°C
Finale Extension	1 Zyklus	7 min	72°C

**Tabelle 8:** Die Tabelle zeigt das Temperaturprofil der PCR, sowie Anzahl und Dauer der Zyklen für die jeweiligen Schritte der PCR.

Die PCR Produkte werden gemeinsam mit den Produkten von drei anderen PCRs auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

### 2.2.2.2 Cre-Rekombinase Aktivitätstest

Der Test, ob die Cre-Rekombinase aktiv ist, wird mit den Primern „Amp short R“, der im Transgen bindet, und „WT Chr1 2,6 R“, der „downstream“ vom Konkatermer der Position 18,4 bindet, durchgeführt. Wird der Teil des Chromosoms 1 zwischen den Positionen 18,4 und 18,7 von der Cre-Rekombinase deletiert, kann „Wt Chr1 2,6 R“ nicht mehr binden und die PCR zeigt kein Produkt.

Primer	Amplicon bp	Primer Sequenzen
Amp short R	1308	5' TTGCCGGGAAGCTAGAGTAA 3'
Wt Chr1 2,6 R		5' AGCCCATGTATAGGCTTTCCAA 3'

**Tabelle 9:** Auflistung der Primer mit Bezeichnung, Ampliconlänge in Basenpaaren (bp), der Primer Sequenz und der Länge der Primer.

µL pro Reaktion	Komponente	Stock		Final	
14,97	ddH2O				
2,5	PCR buffer	10	x	1	x
3,33	MgCl <sub>2</sub>	15	mM	2	mM
2,5	dNTPs	2	mM	0,2	mM
0,25	Amp short R	10	µM	100	nM
0,25	Wt Chr1 2,6 R	10	µM	100	nM
0,2	Taq DNA Pol	5	U/µL		
1	DNA				
25	Gesamt				

**Tabelle 10:** Mengenangaben (µl) der Komponenten pro Reaktion. Stock gibt die Konzentration der Komponente im Stock an, Final die Konzentration im Reaktionsansatz.

Die DNA stammt von Mäusen der Nr. 183, 184, 185 der Linie *Tg(PED112)273/CMV-Cre* und einer homozygot transgenen Maus (T/T) der Linie *Tg(PED112)273(m)*.

Abschnitt	Anzahl der Zyklen	Zeit	Temperatur
Initialisierung	1 Zyklus	4 min	95°C
Denaturierung	40 Zyklen	30 s	95°C
Annealing		30 s	62°C
Extension		30 s	72°C
Finale Extension	1 Zyklus	7 min	72°C

**Tabelle 11:** Die Tabelle zeigt das Temperaturprofil der PCR, sowie Anzahl und Dauer der Zyklen für die jeweiligen Schritte der PCR.

Die PCR Produkte werden gemeinsam mit den Produkten von drei anderen PCRs auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

### 2.2.2.3 Orientierung von PED112

Die Orientierung der Konstrukte wird durch drei unterschiedliche PCRs untersucht. „Head to Tail“, „Head to Head“ und „Tail to Tail“. Es werden die Primer „PED112L“, und „PED112U“ verwendet. Die Mengenangaben für die Mastermixes bleiben gleich, es variieren nur die Primer.

„Head to Tail“:

Primer	Amplicon bp	Primer Sequenzen
PED112U	1308	5' TTGCCGGGAAGCTAGAGTAA 3'
PED112L		5' AGCCCATGTATAGGCTTTCCAA 3'

**Tabelle 12:** Auflistung der Primer mit Bezeichnung, Ampliconlänge in Basenpaaren (bp), der Primer Sequenz und der Länge der Primer.

µL pro Reaktion	Komponente	Stock		Final	
12,20	ddH <sub>2</sub> O				
3	PCR buffer	10	x	1	x
4,00	MgCl <sub>2</sub>	15	mM	2	mM
3	dNTPs	2	mM	0,2	mM
0,3	PED112L	10	µM	100	nM
0,3	PED112U	10	µM	100	nM
0,2	Taq DNA Pol	5	U/µL		
2	DNA				
25	Gesamt				

**Tabelle 13:** Mengenangaben (µl) der Komponenten pro Reaktion. Stock gibt die Konzentration der Komponente im Stock an, Final die Konzentration im Reaktionsansatz.

Abschnitt	Anzahl der Zyklen	Zeit	Temperatur
Initialisierung	1 Zyklus	4 min	95°C
Denaturierung	40 Zyklen	30 s	95°C
Annealing		30 s	59°C
Extension		30 s	72°C
Finale Extension	1 Zyklus	7 min	72°C

**Tabelle 14:** Die Tabelle zeigt das Temperaturprofil der PCR, sowie Anzahl und Dauer der Zyklen für die jeweiligen Schritte der PCR.

„Head to Head“:

Primer „PED112U“ wird weggelassen und stattdessen 3,6µl „PED112L“ eingesetzt.

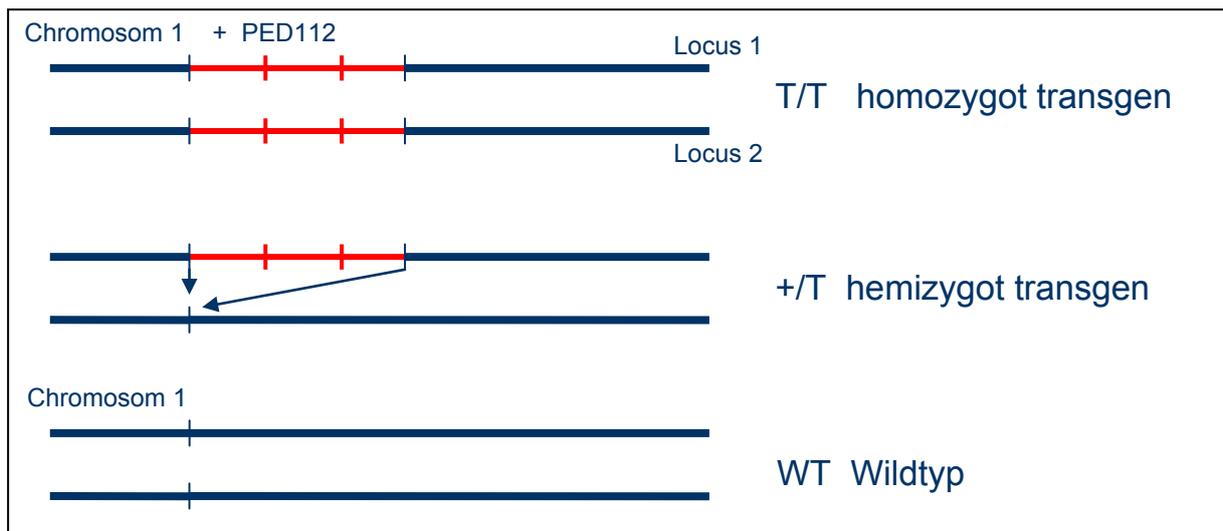
„Tail to Tail“:

Primer „PED112L“ wird weggelassen und stattdessen 3,6µl „PED112U“ eingesetzt.

Die PCR Produkte werden gemeinsam mit den Produkten von drei anderen PCRs auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

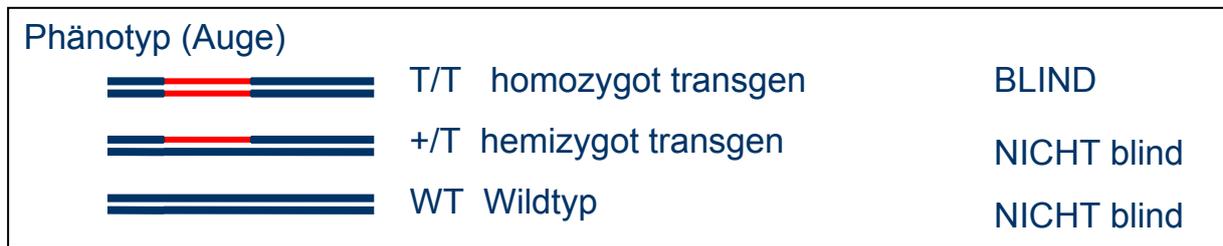
### 2.2.3 3 Primer PCR

Bei den vorhandenen Mäusen werden drei Genotypen unterschieden: Wildtyp, hemizygot transgen und homozygot transgen.



**Abbildung 10:** Schematische Darstellung der drei Genotypen T/T, +/T und WT. In Blau sind die beiden Loci (nicht zu verwechseln mit DNA Einzelsträngen) der genomischen DNA von Chromosom 1 dargestellt. Rot kennzeichnet das konkatemere PED112 Konstrukt.

Wird der Phänotyp betrachtet, so kann zwischen homozygot transgenen Mäusen und heterozygoten Mäusen bzw. Wildtypen unterschieden werden.



**Abbildung 11:** Beschreibung der drei Phänotypen anhand der genomischen Situation

Wird eine standardmäßige 2 Primer PCR hergenommen, so können homozygot bzw. hemizygot transgene Mäuse von Wildtypen unterschieden werden.

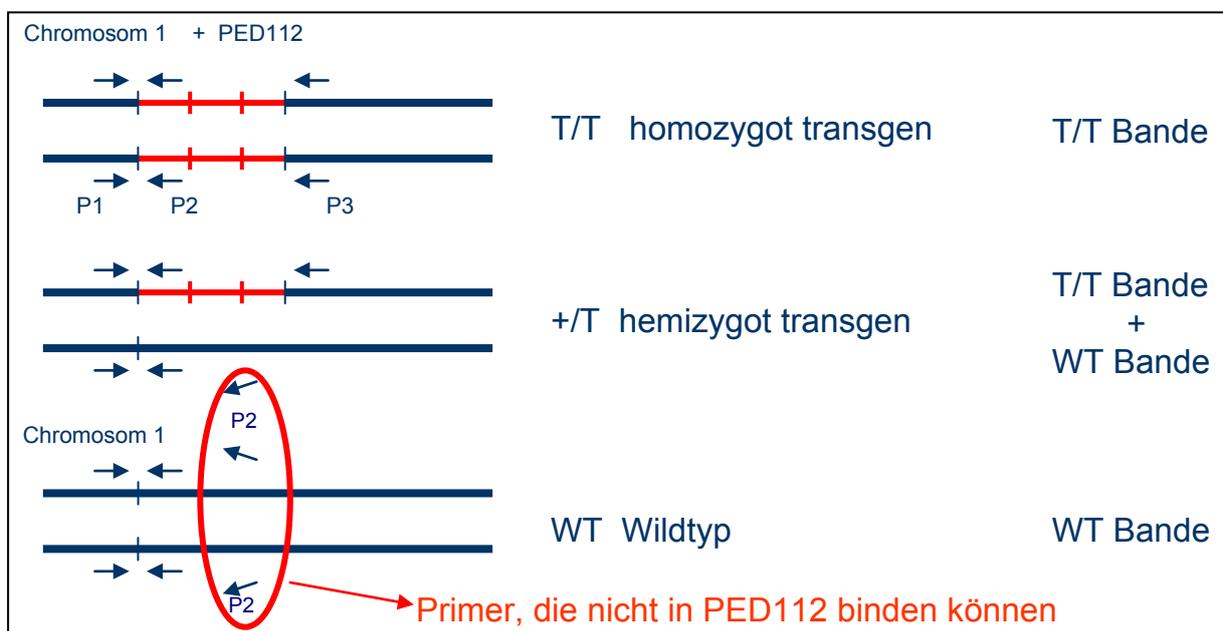


**Abbildung 12:** Schematische Darstellung der Bindepositionen und –möglichkeiten der Primer. Die Pfeile von links nach rechts stellen Primer, die im Genom binden, Pfeile von rechts nach links Primer die im Transgen binden, dar.

Da für diese Arbeit Wildtyp-Mäuse und homozygot transgene Tiere benötigt werden und heterozygote Tiere nicht geeignet sind, können diese beiden Kriterien (Phänotyp und 2 Primer PCR) als Selektionsmittel herangezogen werden. Beim Phänotyp des Glaukoms handelt es sich allerdings um eine progressive Krankheit. Das bedeutet sie prägt sich erst im Jung- bzw. adulten Tier aus. Eine Unterscheidung auf der Ebene des Phänotyps kann daher nur in späteren Lebensphasen erfolgen. Bei Feten und Neugeborenen kann makroskopisch noch kein phänotypischer Unterschied am Auge zwischen den Genotypen festgestellt werden. Hier soll die Technik der 3 Primer PCR genutzt werden.

Ziel der Etablierung einer 3 Primer PCR soll es sein, die drei vorhandenen Genotypen Wildtyp (+/+), heterozygot Transgen (+/T) und homozygot Transgen

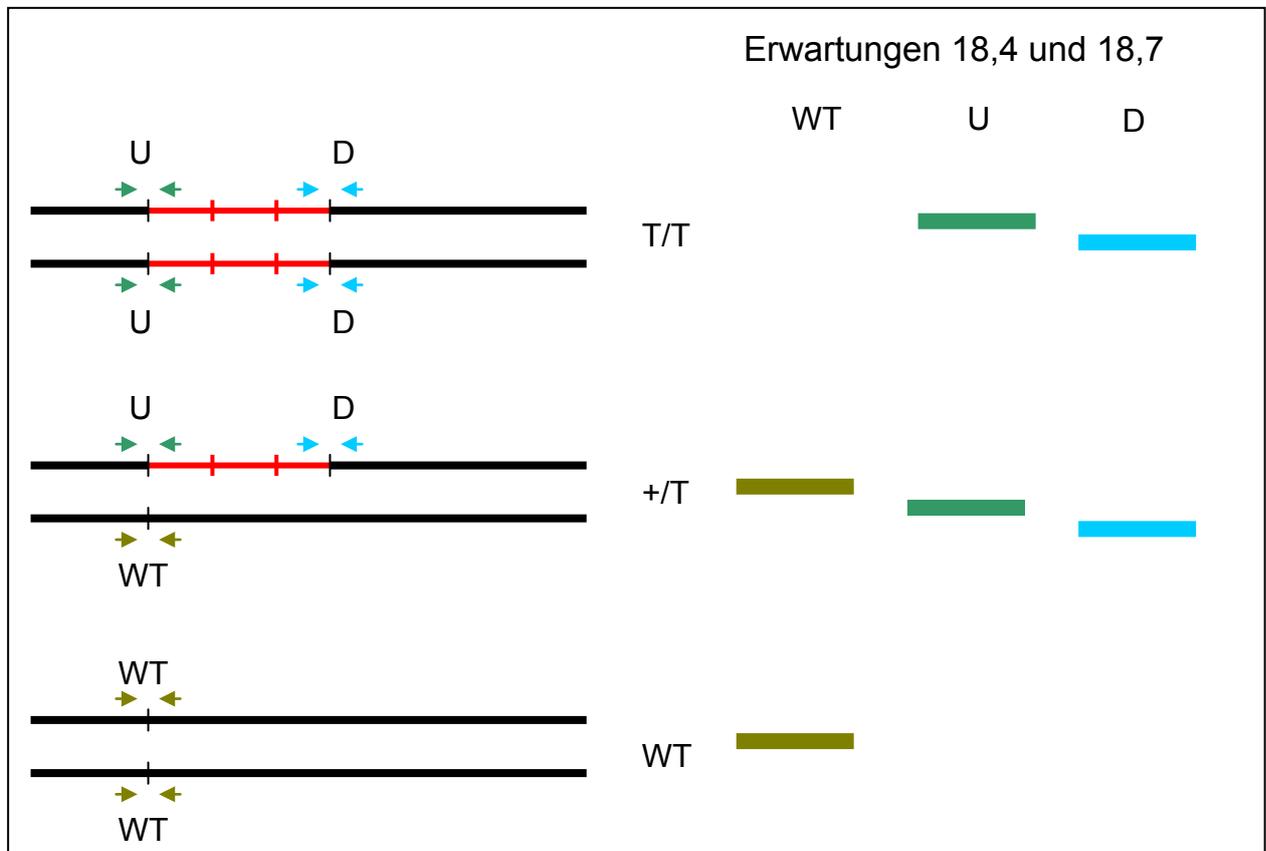
(T/T), ohne Kenntnisse über den Phänotyp, mittels einer PCR mit 3 unterschiedlichen Primern unterscheiden zu können. Dabei sind die Positionen der Primer ausschlaggebend. Wird ein transgener Locus betrachtet so würde ein Primer im Transgen (P2) liegen, einer upstream zum transgenen Konstrukt (P1), der dritte downstream (P3) davon. Somit käme ein Amplikon zustande, nämlich das vom upstream gelegenen Primer zum Primer im Transgen. Der dritte Primer kann mit dem Primer im Transgen kein Amplikon bilden, da beide Primer in die gleiche Richtung weisen. Ein Amplikon zwischen up- und downstream Primer ist nicht möglich, da das Transgen dazwischen liegt und das Amplikon zu lang für eine Polymerisation wäre.



**Abbildung 13:** Schematische Darstellung einer 3 Primer PCR. P1 und P3 binden im Genom, P2 bindet im Transgen. Ist PED112 nicht vorhanden, wie bei WT und einem Locus von +/T, kann P2 nicht binden und bildet somit mit P1 kein Amplikon. Ist PED112 vorhanden, sind P1 und P3 räumlich zu weit entfernt, um ein Amplikon zu bilden, siehe T/T und ein Locus von +/T.

Wird ein Wildtyp Locus hergenommen, so kann nur ein Amplikon zwischen up- und downstream Primer gebildet werden. Das transgene Konstrukt ist hier nicht vorhanden, der Primer der darin binden würde, kann also nicht verwendet werden. Somit kann aufgrund der resultierenden Amplikons, per Gelelektrophorese, der Genotyp der zu untersuchenden Maus bestimmt werden. Eine einzelne Bande als Amplikon von P1 und P3 weist auf einen Wildtyp Locus hin, eine Bande von P1 und P2 bestätigt einen transgenen Locus. Treten beide Banden auf, so liegt DNA einer hemizygoten transgenen Maus vor.

Folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse, die theoretisch anhand der Primer und ihrer Bindepositionen je nach Genotyp zu sehen sein sollten.



**Abbildung 14:** Darstellung der Primer, die an den vom Autor benannten Stellen Upstream (U), Downstream (D) und Wildtyp (WT) binden. Es werden nur Primer dargestellt die in den jeweiligen Genotypen T/T, +/T oder WT binden können. Olivgrün, Grün und Blau stellen die Amplicons dar, die anhand von Gelelektrophorese bei den jeweiligen Genotypen sichtbar sein sollten.

## 2.2.4 Primeretablierung

Die Primeretablierung bedient sich der Gradienten-PCR, bei der die ideale Annealing Temperatur für die jeweiligen Primer ermittelt werden kann. Anhand der PCR Produkte können Aussagen über die Beschaffenheit des Integrationsortes getätigt werden. Sämtliche gelagerten Primer werden in eine Excelliste aufgenommen und jene Primerkombinationen für PCRs genutzt, die aufgrund von Berechnungen geeignete Amplicongrößen erzeugen.

Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze bleibt für alle Primerpaare, die zur PCR herangezogen werden, gleich. Das gleiche gilt für das Temperaturprofil, bei der die PCRs durchgeführt werden. Ausnahmen werden extra beschrieben.

<b>µL pro Reaktion</b>	<b>Komponente</b>	<b>Stock</b>		<b>Final</b>	
14,97	ddH <sub>2</sub> O				
2,5	PCR buffer	10	x	1	x
3,33	MgCl <sub>2</sub>	15	mM	2	mM
2,5	dNTPs	2	mM	0,2	mM
0,25	Primer Forward	10	µM	100	nM
0,25	Primer Reverse	10	µM	100	nM
0,2	Taq DNA Pol	5	U/µL		
1	DNA				
25	Gesamt				

**Tabelle 15:** Mengenangaben (µl) der Komponenten pro Reaktion. Stock gibt die Konzentration der Komponente im Stock an, Final die Konzentration im Reaktionsansatz.

Die DNA für die PCRs stammt von der Mauslinie *Tg(PED112)273(m)*. Es werden Wildtyp DNA, hemizygot transgene und homozygot transgene DNA eingesetzt.

<b>Abschnitt</b>	<b>Anzahl der Zyklen</b>	<b>Zeit</b>	<b>Temperatur</b>
Initialisierung	1 Zyklus	4 min	95°C
Denaturierung	40 Zyklen	30 s	95°C
Annealing		30 s	58-66°C
Extension		30 s	72°C
Finale Extension	1 Zyklus	7 min	72°C

**Tabelle 16:** Die Tabelle zeigt das Temperaturprofil der Gradienten-PCR, sowie Anzahl und Dauer der Zyklen für die jeweiligen Schritte der PCR. Die Annealingtemperatur gibt den Temperaturbereich des Gradienten an.

Für eine Gradienten PCR wird eine eigene PCR-Maschine verwendet, die in zwölf Reihen, in welche die Reaktionsgefäße mit der DNA gestellt werden, zwölf

unterschiedliche Temperaturen erzeugt. Mit einem Gradient-Calculator kann im Voraus ermittelt werden, in welcher Reihe die richtige oder annähernd erwünschte Temperatur herrscht. Die Temperaturen der zwölf Reihen sind in Tabelle 17 aufgelistet. Da fünf Proben zur Verfügung stehen und diese in 2°C Schritten untersucht werden sollen, werden die Reaktionsgefäße in die Reihen 1, 5, 6, 8 und 12 gestellt.

<b>Reihe Nr.</b>	1	2	3	4	5	6
<b>Temperatur (°C)</b>	58,0	58,2	58,7	59,3	60,3	61,5

<b>Reihe Nr.</b>	7	8	9	10	11	12
<b>Temperatur (°C)</b>	62,8	64	64,8	65,4	65,9	66,0

**Tabelle 17:** Die Tabelle gibt die Temperatur (58-66°C) der zwölf Reihen des PCR-Maschine an.

Die PCR Produkte werden mit einem 1%igen Agarose Gel aufgetrennt.

Integrationsort: 18,4 Millionen bp, WT

Primer	Amplicon bp	Primer Sequenzen	Temperatur °C
WT long F	2034	5' GCTGGTTTGGGGACTGATTA 3'	58-62
WT Chr1 2,6 R		5' AGCCCATGTATAGGCTTTCCAA 3'	

Primer	Amplicon bp	Primer Sequenzen	Temperatur °C
WT long F	2692	5' GCTGGTTTGGGGACTGATTA 3'	62-64
Con 2,3 long R		5' CCTCCCCATTCTGAGAGAAG 3'	

Primer	Amplicon bp	Primer Sequenzen	Temperatur °C
WT short F	1093	5' GCCAGCAAACATGCTACAGA 3'	62-66
WT Chr1 2,6 R		5' AGCCCATGTATAGGCTTTCCAA 3'	

Primer	Amplicon bp	Primer Sequenzen	Temperatur °C
WT short F	1751	5' GCCAGCAAACATGCTACAGA 3'	64-66
Con 2,3 long R		5' CCTCCCCATTCTGAGAGAAG 3'	

Primer	Amplicon bp	Primer Sequenzen	Temperatur °C
WT Chr1 2,6 F	652	5' CCTCCCCTTTCCACCTCCAT 3'	56-64
Con 2,3 short R		5' AAACCAATGCACACTTTCTCC 3'	

Primer	Amplicon bp	Primer Sequenzen	Temperatur °C
WT Chr1 2,6 F	984	5' CCTCCCCTTTCCACCTCCAT 3'	64
Con 2,3 long R		5' CCTCCCCATTCTGAGAGAAG 3'	

Primer	Amplicon bp	Primer Sequenzen	Temperatur °C
Seq F	448	5' CACTGGGGCATACTTCCATT 3'	62-66
Con 2,3 short R		5' AAACCAATGCACACTTTCTCC 3'	

Primer	Amplicon bp	Primer Sequenzen	Temperatur °C
Seq F	780	5' CACTGGGGCATACTTCCATT 3'	64
Con 2,3 long R		5' CCTCCCCATTCTGAGAGAAG 3'	

**Tabelle 18:** Auflistung der Primer mit Bezeichnung, Ampliconlänge in Basenpaaren (bp), der Primer Sequenz und der idealen Temperatur für die jeweilige Primerkombination.

Integrationsort: 18,4 Millionen bp, Upstream

Primer	Amplicon bp	Primer Sequenzen	Temperatur °C
WT long F	2147	5' GCTGGTTTGGGGACTGATTA 3'	X
PED112U		5' GCCGGTCTTGCGATGATTA 3'	

Primer	Amplicon bp	Primer Sequenzen	Temperatur °C
WT short F	1206	5' GCCAGCAAACATGCTACAGA 3'	X
PED112U		5' GCCGGTCTTGCGATGATTA 3'	

Primer	Amplicon bp	Primer Sequenzen	Temperatur °C
WT Chr1 2,6 F	439	5' GCCAGCAAACATGCTACAGA 3'	X
PED112U		5' GCCGGTCTTGCGATGATTA 3'	

Primer	Amplicon bp	Primer Sequenzen	Temperatur °C
Seq F	235	5' CACTGGGGCATACTTCCATT 3'	X
PED112U		5' GCCGGTCTTGCGATGATTA 3'	

Primer	Amplicon bp	Primer Sequenzen	Temperatur °C
WT short F	1335	5' GCCAGCAAACATGCTACAGA 3'	X
WT short F UR		5' CACTCGGGTGATCTGACTGA 3'	

Primer	Amplicon bp	Primer Sequenzen	Temperatur °C
Seq F	1018	5' CACTGGGGCATACTTCCATT 3'	X
Seq F UR		5' ATTCGGCTCCAACAATGTC 3'	

**Tabelle 19:** Auflistung der Primer mit Bezeichnung, Ampliconlänge in Basenpaaren (bp) und der Primer Sequenz. Ein X gibt an, dass keine Ergebnisse vorliegen.

Integrationsort: 18,4 Millionen bp, Downstream

Primer	Amplicon bp	Primer Sequenzen	Temperatur °C
Amp short R	1308	5' TTGCCGGGAAGCTAGAGTAA 3'	62
WT Chr1 2,6 R		5' AGCCCATGTATAGGCTTTCCAA 3'	

Primer	Amplicon bp	Primer Sequenzen	Temperatur °C
PED112 L	384	5' GGGTGTGGCGGGTGTC 3'	62
WT Chr1 2,6 R		5' AGCCCATGTATAGGCTTTCCAA 3'	

Primer	Amplicon bp	Primer Sequenzen	Temperatur °C
PED112 L	710	5' GGGTGTGGCGGGTGTC 3'	66
Con 2,3 short R		5' AAACCAATGCACACTTTCTCC 3'	

Primer	Amplicon bp	Primer Sequenzen	Temperatur °C
PED112 L	1042	5' GGGTGTGGCGGGTGTC 3'	64
Con 2,3 long R		5' CCTCCCCATTCTGAGAGAAG 3'	

**Tabelle 20:** Auflistung der Primer mit Bezeichnung, Ampliconlänge in Basenpaaren (bp), der Primer Sequenz und der idealen Temperatur für die jeweilige Primerkombination.

Integrationsort: 18,7 Millionen bp, Wildtyp

Primer	Amplicon bp	Primer Sequenzen	Temperatur °C
Chr1 long R	693	5' CGGTGTTCTGCACATTGGTA 3'	58-66
Amp short R DR2		5' TTGCGGCAGTAGATGATGAG 3'	

Primer	Amplicon bp	Primer Sequenzen	Temperatur °C
Chr1 long R	916	5' CGGTGTTCTGCACATTGGTA 3'	58-66
Amp short R DR1		5' CCCAAACTTCAAAGCGAGAG 3'	

**Tabelle 21:** Auflistung der Primer mit Bezeichnung, Ampliconlänge in Basenpaaren (bp), der Primer Sequenz und der idealen Temperatur für die jeweilige Primerkombination.

Integrationsort: 18,7 Millionen bp, Upstream

Primer	Amplicon bp	Primer Sequenzen	Temperatur °C
Chr1 long R	808	5' CGGTGTTCTGCACATTGGTA 3'	X
PED112 U		5' GCCGGTCTTGCGATGATTA 3'	

Primer	Amplicon bp	Primer Sequenzen	Temperatur °C
Chr1 short R	339	5' TCCCTGTCTTTGTTGTGCAG 3'	X
PED112 U		5' GCCGGTCTTGCGATGATTA 3'	

Primer	Amplicon bp	Primer Sequenzen	Temperatur °C
Chr1 long R	955	5' CGGTGTTCTGCACATTGGTA 3'	X
WT short F UR		5' CACTCGGGTGATCTGACTGA 3'	

Primer	Amplicon bp	Primer Sequenzen	Temperatur °C
Chr1 long R	1175	5' CGGTGTTCTGCACATTGGTA 3'	X
Chr1 long R UR		5' GTAGATGCCGACCGAACAAG 3'	

**Tabelle 22:** Auflistung der Primer mit Bezeichnung, Ampliconlänge in Basenpaaren (bp) und der Primer Sequenz. Ein X gibt an, dass keine Ergebnisse vorliegen.

Integrationsort: 18,7 Millionen bp, Downstream

Primer	Amplicon bp	Primer Sequenzen	Temperatur °C
Amp short R	1287	5' TTGCCGGGAAGCTAGAGTAA 3'	58-66
Amp short R DR2		5' TTGCGGCAGTAGATGATGAG 3'	

Primer	Amplicon bp	Primer Sequenzen	Temperatur °C
Amp short R	1510	5' TTGCCGGGAAGCTAGAGTAA 3'	58-66
Amp short R DR1		5' CCCAAACTTCAAAGCGAGAG 3'	

**Tabelle 23:** Auflistung der Primer mit Bezeichnung, Ampliconlänge in Basenpaaren (bp), der Primer Sequenz und der idealen Temperatur für die jeweilige Primerkombination.

### 2.2.4.1 Restriktionskontrolle mit BgIII

Da bei der Wildtyp PCR der Position 18,4 mit den Primern „Seq F“ und „Con 2,3 long R“ unerwarteter Weise ein Amplicon bei der homozygot transgenen Maus zu sehen ist, soll kontrolliert werden, ob die durch Amplifikons sichtbar gemachten DNA-Fragmente den erwünschten und vorhergesagten Ampliconlängen entsprechen. Dazu werden Restriktionsenzyme benutzt, die dieses DNA-Fragment schneiden. Die Produkte dieser Restriktion haben eine definierte Größe, die anhand eines Agarosegels sichtbar gemacht werden soll. Als Kontrolle wird ein Restriktionsverdau bei den Amplifikaten der Primer „PED112 L“ und „Con 2,3 long R“ angesetzt.

Seq F / Con 2,3 long R

<b>µL pro Reaktion</b>	<b>Komponente</b>	<b>Stock</b>		<b>Final</b>	
14,97	ddH <sub>2</sub> O				
2,5	PCR buffer	10	x	1	x
3,33	MgCl <sub>2</sub>	15	mM	2	mM
2,5	dNTPs	2	mM	0,2	mM
0,25	SeqF	10	µM	100	nM
0,25	Con2,3longR	10	µM	100	nM
0,2	Taq DNA Pol	5	U/µL		
1	DNA				
25	Gesamt				

**Tabelle 24:** Mengenangaben (µl) der Komponenten pro Reaktion. Stock gibt die Konzentration der Komponente im Stock an, Final die Konzentration im Reaktionsansatz.

### Temperaturprofil

<b>Abschnitt</b>	<b>Anzahl der Zyklen</b>	<b>Zeit</b>	<b>Temperatur</b>
Initialisierung	1 Zyklus	4 min	95°C
Denaturierung	40 Zyklen	30 s	95°C
Annealing		30 s	64°C
Extension		30 s	72°C
Finale Extension	1 Zyklus	7 min	72°C

**Tabelle 25:** Die Tabelle zeigt das Temperaturprofil der PCR, sowie Anzahl und Dauer der Zyklen für die jeweiligen Schritte der PCR.

## PED112 L / Con 2,3 long R

<b>µL pro Reaktion</b>	<b>Komponente</b>	<b>Stock</b>		<b>Final</b>	
14,97	ddH <sub>2</sub> O				
2,5	PCR buffer	10	x	1	x
3,33	MgCl <sub>2</sub>	15	mM	2	mM
2,5	dNTPs	2	mM	0,2	mM
0,25	PED112L	10	µM	100	nM
0,25	Con2,3longR	10	µM	100	nM
0,2	Taq DNA Pol	5	U/µL		
1	DNA				
25	Gesamt				

**Tabelle 26:** Mengenangaben (µl) der Komponenten pro Reaktion. Stock gibt die Konzentration der Komponente im Stock an, Final die Konzentration im Reaktionsansatz.

## Temperaturprofil

<b>Abschnitt</b>	<b>Anzahl der Zyklen</b>	<b>Zeit</b>	<b>Temperatur</b>
Initialisierung	1 Zyklus	4 min	95°C
Denaturierung	40 Zyklen	30 s	95°C
Annealing		30 s	66°C
Extension		30 s	72°C
Finale Extension	1 Zyklus	7 min	72°C

**Tabelle 27:** Die Tabelle zeigt das Temperaturprofil der PCR, sowie Anzahl und Dauer der Zyklen für die jeweiligen Schritte der PCR.

Es werden jeweils 48µl des Reaktionsansatzes in die Reaktionsgefäße pipettiert, 2µl DNA hinzugegeben und damit PCR mit den entsprechenden Temperaturprofilen gemacht.

Das Restriktionsenzym BglII stammt von der Firma Fermentas. Auf deren Homepage [www.fermentas.com](http://www.fermentas.com) ist in der Produktbeschreibung zu lesen, dass 1µl des Fast Digest Restriktionsenzym etwa 0,2µg DNA in einer halben Stunde verdauen kann. Um den Gehalt der DNA, die bei der PCR mit den Primern „PED112 L / Con 2,3 long R“ vervielfältigt wurde, abschätzen zu können, wird die Intensität der Amplikons mit jenen des Markers verglichen. Die Intensität entspricht in etwa der des 1200er Amplikons, welche einen DNA Gehalt von 9ng/5µl hat. Auf das Agarosegel sind 10µl aufgetragen worden, d.h. etwa 0,9ng/µl. Im Reaktionsgefäß für den

Restriktionsverdau befinden sich noch 40µl, die ca. 36ng DNA enthalten. Demnach ist 1µl BglII ausreichend. Die Menge der DNA der PCR von „Seq F / Con 2,3 long R“ beträgt ca. 0,12µg/40µl.

Ein Ansatz, wie in Tabelle 28 beschrieben, wird für die PCR-Produkte in je einem Reaktionsgefäß zusammen pipettiert.

Menge	Komponente
40µl	DNA
1µl	BglII
4,5µl	10x Fast Digest Buffer
45µl	Total Volume

**Tabelle 28:** Angabe der Komponenten und der Mengen für den Restriktionsverdau.

Die Ansätze werden 30 Minuten bei 37°C inkubiert und danach auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

## 2.2.5 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR wird zur quantitativen Analyse von Expressionsunterschieden der beiden Gene Pkhd1 und Tfp2d in Wildtyp und Mutante genutzt. Dazu werden sieben Wildtyp-Mäuse mit sieben mutierten Tieren verglichen.

Nummer der Maus		
Wildtyp	Mutante	Kürzel
208	207	III
211	210	IV
215	216	VI
218	212	V
588	410	α
617	395	II
619	499	x

**Tabelle 29:** Auflistung der verwendeten Mäuse in Zweiergruppen und deren Kürzel.

Da nicht jedes Organ der Maus eine Expression der beiden Gene zeigt, werden zwei Organe, die einen phänotypischen Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante zeigen, ausgewählt. Außerdem dienen zwei Organe, in denen kein Unterschied in der Expression zwischen Wildtyp und Mutante erwartet wird, als Kontrolle.

<b>Gen</b>	<b>krankes Organ</b>	<b>Kontrollorgan</b>
Pkhd1	Leber	Niere
Tfap2d	Auge	Gehirn

**Tabelle 30:** Liste mit den Targetgenen, von der Mutation betroffenen Organen und den Kontrollorganen.

#### 2.2.5.1 RNA Isolierung durch MagNA Lyser (Roche)

Stücke der Organe in der Größenordnung von 50mg werden in „MagNA Lyser Green Beads tubes“ in etwa 900µl TRI-Reagenz inkubiert. Bei den Augen wird aufgrund der geringen Größe nur 500µl Flüssigkeit verwendet. Die Röhrchen werden in dem MagNA Lyser Instrument mit hoher Geschwindigkeit (6000rpm) für rund 20 Sekunden in eine oszillierende Bewegung versetzt. Die Keramikbeads homogenisieren so das Zellmaterial. Reichen 20 Sekunden dafür nicht aus, kann die Homogenisierung nach Einschätzungen des Experimentators wiederholt werden. Das Homogenisat wird fünf Minuten auf Raumtemperatur gestellt. Anschließend werden die Tubes für zehn Minuten bei 4°C und 12000rpm zentrifugiert, damit sich unlösliches Zellmaterial absetzt. Der Überstand wird in ein neues Tube transferiert und 1/10 des Volumen an BCP (1-Bromo-3-chloropropan) hinzugefügt. Die Tubes werden verschlossen und 15 Sekunden stark geschüttelt, danach 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für 15 Minuten bei 4°C und 12000rpm zentrifugiert. Die obere, aquatische Phase, in der sich die RNA befindet wird in ein neues Tube überführt, Interphase und organische Phase mit DNA und Proteinen verbleiben im alten Tube. Im nächsten Schritt wird der aquatischen Phase ein Volumenanteil Isopropanol hinzugefügt. Die Tubes werden bei mittlerer Geschwindigkeit zehn Sekunden gevortext, zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend acht Minuten bei 4°C und 12000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt, das RNA-Pellet in ½ Volumenanteil des TRI-Reagenz 75%igem Ethanol aufgenommen und solange geschüttelt bis das Pellet schwimmt. Es wird erneut fünf Minuten bei

4°C und 7500rpm zentrifugiert, der Überstand wird abgesaugt, das Pellet für etwa fünf Minuten luftgetrocknet und in 100µl sterilem Wasser aufgenommen.

### 2.2.5.2 Spektrophotometrische Messung des RNA-Gehalts

Mittels eines Spektrometers wird die RNA-Konzentration in den Proben bestimmt. Dies ist wichtig, da bei der qRT-PCR die gleiche Menge an RNA (respektive cDNA in weiterer Folge) jeder Probe einzusetzen ist. Dazu werden die Proben 1:25 mit Wasser verdünnt. Die gemessene OD sollte zwischen 0,1 und 1 liegen, Proben mit Werten darüber werden erneut verdünnt und gemessen.

### 2.2.5.3 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese wird RNA in DNA umgeschrieben. Hierzu wird der iScript cDNA-Synthese Kit verwendet.

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
5x iScript Reaction Mix	4µl
iScript Reverse Transcriptase	1µl
RNA	1µg
Wasser	xµl
<b>Gesamt</b>	<b>20µl</b>

**Tabelle 31:** Liste der Komponenten des iScript cDNA-Synthese Kits

1µg RNA jeder Probe wird mit den restlichen Komponenten vermengt und mit Wasser auf 20µl aufgefüllt.

<b>Inkubationszeit</b>	<b>Temperatur</b>
5 Minuten	25°C
30 Minuten	42°C
5 Minuten	85°C
Kühlung auf Eis	
5 Minuten	85°C
Kühlung auf Eis	

**Tabelle 32:** Temperaturprofil der cDNA-Synthese

Weiters wird von jeder Probe eine negativ Kontrolle, die RT(-)-Kontrolle erstellt. Dazu wird die gleiche Menge an RNA (1µg) verwendet und mit Wasser auf 20µl aufgefüllt. Der „Reaction Mix“ sowie die reverse Transkriptase werden weggelassen.

#### 2.2.5.4 Real-Time PCR

In dieser Arbeit wird zwischen einem Protokoll für die Target-Gene (*Tfap2d* und *Pkhd1*) und einem Protokoll für die Endogenkontrolle (*Ube2d2*) unterschieden. Der wesentliche Unterschied ist die verwendete Sonde bzw. der Farbstoff (Evagreen) im quantifizierenden Schritt. Für *Tfap2d* und *Pkhd1* werden kommerzielle Assays der Firma Qiagen (<https://www.qiagen.com> Bestellnummer QT00148736 für *Pkhd1* und QT00151606 für *Tcfap2d*) verwendet, bei *Ube2d2* handelt es sich um einen Assay mit einer Taqman Sonde (<http://www.med.unc.edu/anclinic/Tm.htm>). Zunächst wird ein Reaktions-Mix für die qRT-PCR erstellt. Die Menge des Mixes richtet sich nach der Probenzahl. Alle Komponenten des Mixes werden vermengt und 25µl in spezielle qRT-PCR-Tubes pipettiert. Die DNA-Probe wird erst dort hinzugefügt.

#### Evagreen Assay

n	µL	µL/rxn	Komponente	Endkonzentration
		2	DNA	
1	2,5	2,5	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2.5 mM
1	2,5	2,5	Primermix quiagen (10x)	1 x
1	0,25	0,25	EvaGreen (20 x stock)	0.2 x
1	0,2	0,2	HotfirePol (5 U/µl)	1 U/rxn
1	2,5	2,5	dNTP mix (2 mM each)	200 nM
1	2,5	2,5	10 x Hotfire B Buffer	1 x
1	12,55	12,55	Wasser	
		25		

**Tabelle 33:** Tabelle der Komponenten für den Evagreen Assay mit Mengenangaben in µl für einen Ansatz (n).

## Temperaturprofil

Temperatur	Zeit	Durchgänge
95°C	15 min	
95°C	30 sec	x 40
60°C	40 sec	
Schmelzkurve		

**Tabelle 34:** Temperaturprofil des Evagreen Assays.

Bei auf Fluoreszenzfarbstoff basierenden Assays muss im Anschluss an die Amplifikationsschritte eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden, um sicher zu gehen, dass es sich bei dem Signal um das korrekte Amplikon handelt (<http://www.uic.edu/depts/rrc/cgf/realtime/melt.html>).

## Taqman Assay

n	µL	µL/rxn	Komponente	Endkonzentration
		2	DNA	
1	4	4	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4 mM
1	0,75	0,75	<i>Ube2d2</i> forward (10 µM)	300 nM
1	0,75	0,75	<i>Ube2d2</i> reverse (10 µM)	300 nM
1	0,25	0,25	<i>Ube2d2</i> -fam Sonde (10µM)	100 nM
1	0,2	0,2	HotfirePol (5 U/µl)	1 U/rxn
1	2,5	2,5	dNTP mix (2 mM each)	200 nM
1	2,5	2,5	10 x Hotfire B Buffer	1 x
1	12,05	12,05	Wasser	
		25		

**Tabelle 35:** Tabelle der Komponenten für den Taqman Assay mit Mengenangaben in µl für einen Ansatz (n).

## Temperaturprofil

Temperatur	Zeit	Durchgänge
95°C	15min	
95°C	20sec	x45
60°C	1min	

**Tabelle 36:** Temperaturprofil des Taqman Assay.

## Primer und Sonde

Primer	Primersequenz
<i>Ube2d2</i> forward	5'- AGG TCC TGT TGG AGA TGA TAT GTT -3'
<i>Ube2d2</i> reverse	5'- TTG GGA AAT GAA TTG TCA AGA AA -3'
<i>Ube2d2</i> -fam Sonde	5' FAM-CCA AAT GAC AGC CCC TAT CAG GGT GG-BHQ1

**Tabelle 37:** Sequenzen der forward und reverse *Ube2d2* Primer, sowie der Sonde *Ube2d2* mit einer 5' FAM-Markierung und BHQ1 bei 3'.

Bei Assays mit Taqman Sonde wird keine Schmelzkurve benötigt. Hier bindet die Sonde spezifisch an das amplifizierte DNA-Stück und zeigt nur dann ein Signal.

## Auswertung

Für die Auswertung der Proben wird der Wert Ct (dR) ermittelt. Dieser gibt an, in welchem Amplifikationszyklus die Menge an PCR-Produkt einen bestimmten Schwellenwert überschritten hat. Die Werte werden weiters in eine vorbereitete Tabelle eingefügt und dort ausgewertet.

- Messung der Proben in Duplikaten
- Bildung des Mittelwertes

Im ersten Schritt wird die Effizienz und Genauigkeit der Assays mittels Standardkurve ermittelt. Dabei wird von einer Probe eine 1:8 Verdünnungsreihe erstellt, sodass für die Messung vier Werte vorhanden sind. Die ermittelten  $C_T$ -Werte werden gegen den Verdünnungsfaktor geblottet. Entspricht die Standardkurve bestimmten Kriterien, können die Ergebnisse der Proben als korrekt angenommen und miteinander verglichen werden. Dabei sind vor allem zwei Werte zu beachten.

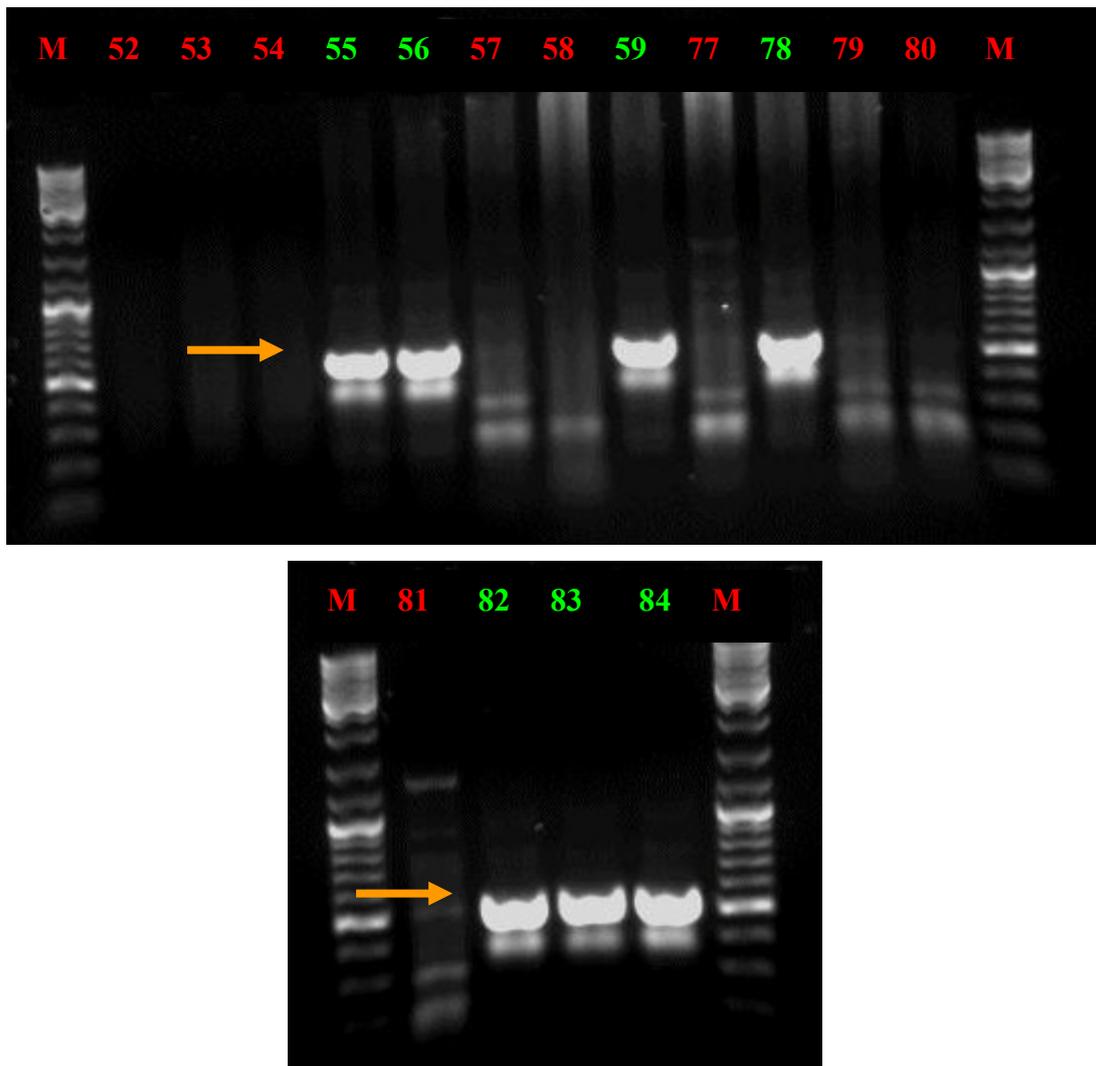
- Reproduzierbarkeit  $RSq$  – sollte im Bereich von 0,990 liegen
- Amplifikationseffizienz – sollte im Bereich von 100%

Zur Auswertung der Proben wurde die  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Methode angewendet (Schmittgen und Livak, 2008). Dabei wird die relative Genexpression des Targetgens zu einem internen Kontrollgen dargestellt. Zur statistischen Signifikanzbestimmung wird ein lineares Regressionsmodell (ANOVA) durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Kontrollen der Mäuse auf das Transgen PED112

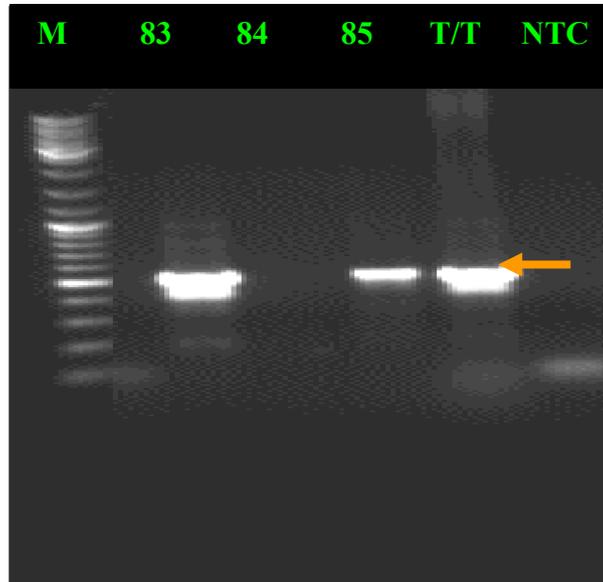
Die DNA aus den Schwanzspitzen wird auf das Transgen untersucht. Die erwartete Fragmentlänge des Amplikons beträgt 518bp. In Abbildung 8 grün markierte Mäuse enthalten das Transgen.



**Abbildung 15:** Fotos eines Agarosegelelektrophoresegeles: Gelistet sind Mäuse Nr. 152-159 und Nr. 677-680(oben), sowie Nr. 681-684 (unten). Rot markierte Mäuse enthalten das Transgen. Eine „No Template Control“ (NTC) wurde vergessen

## 3.2 PED112 Charakterisierung

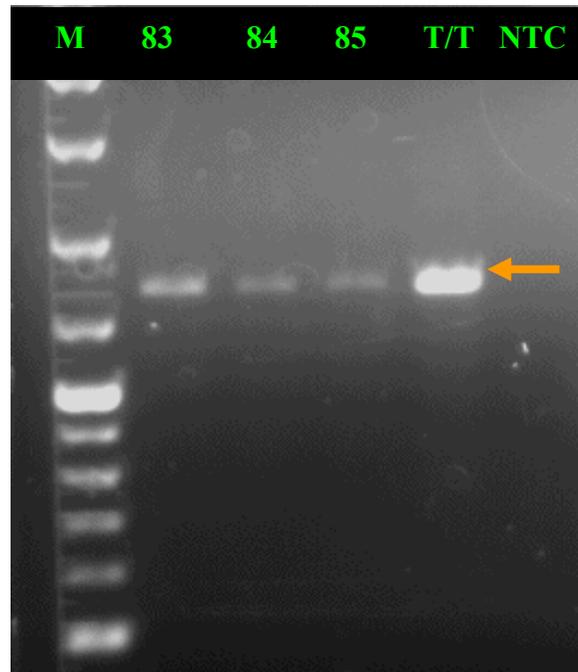
### 3.2.1 PED112 Integrationskontrolle



**Abbildung 16:** Foto eines Agarosegelelektrophoresegels mit Amplikons, die auf eine Integration von PED112 schließen lassen (518bp, orangener Pfeil).

Die Gelelektrophorese zeigt Amplikons bei 518bp bei den Mäusen 183, 185 und T/T. NTC bleibt leer.

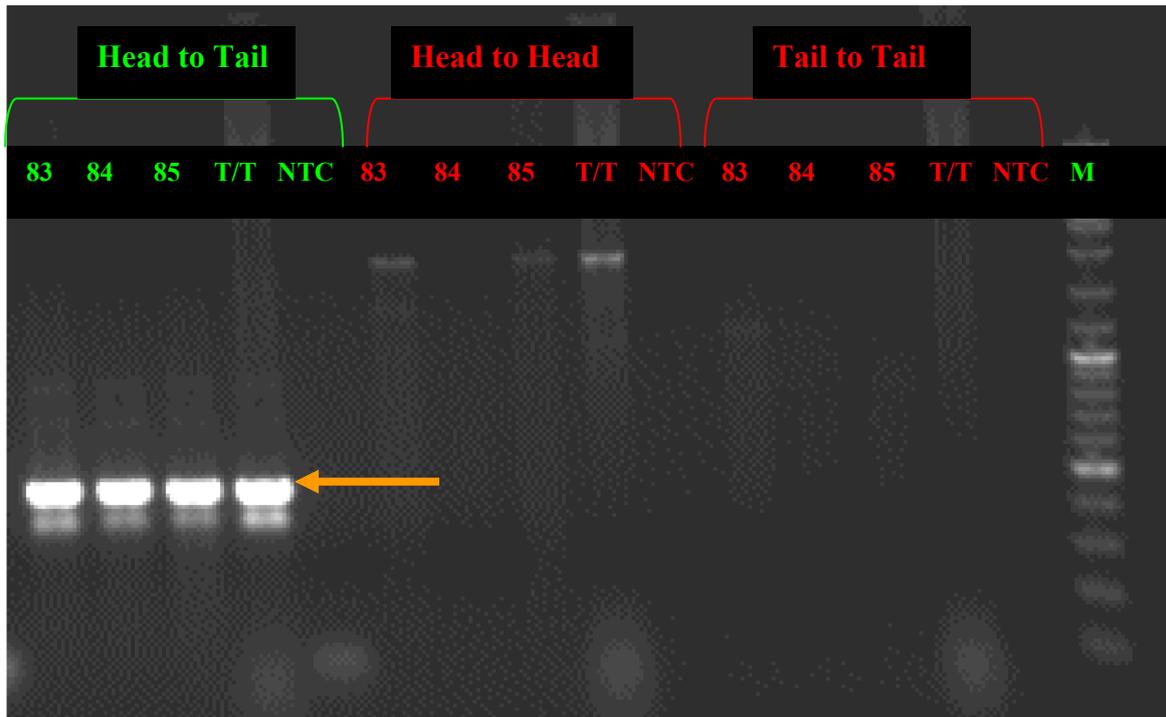
### 3.2.2 Aktivitätstest der Cre-Rekombinase



**Abbildung 17:** Foto eines Agarose-gelelektrophoreseegels. Amplikons (1308bp, orangener Pfeil) sind vorhanden, wenn die Cre-Rekombinase nicht aktiv ist.

Ein Amplikon bei 1308bp ist bei den Mäusen 183, 184, 185 und T/T zu sehen. Die NTC bleibt leer.

### 3.2.3 Head-to-Tail Integration von PED112



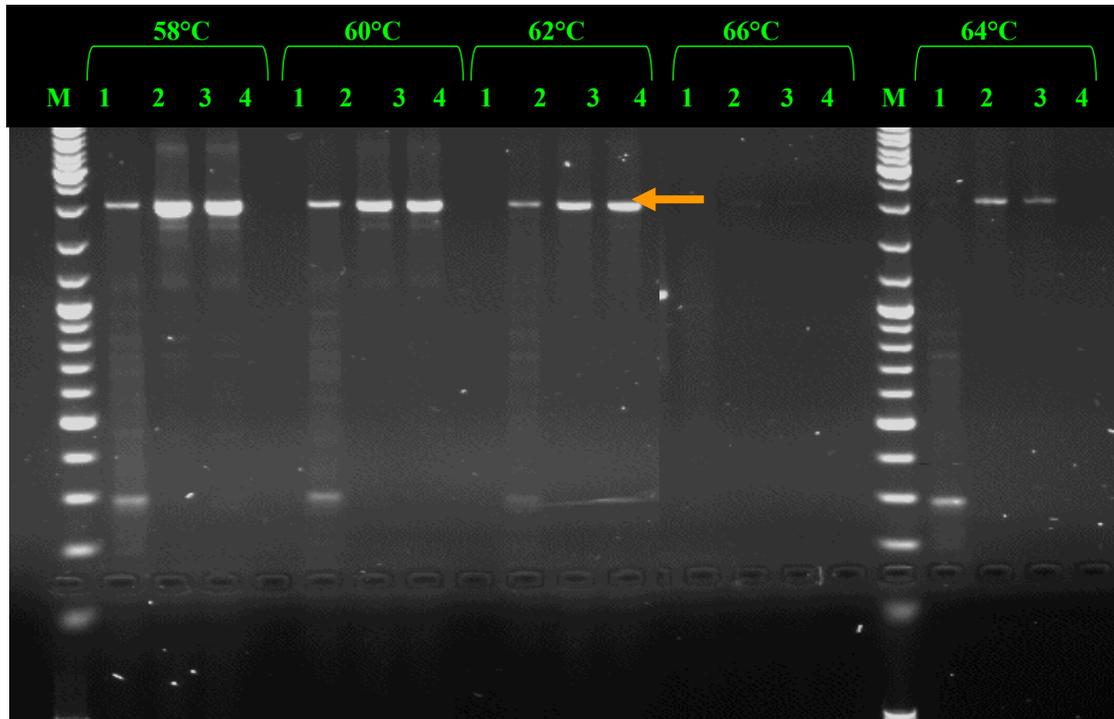
**Abbildung 18:** Foto eines Agarosegelelektrophoresegeles. Untersucht wird die Orientierung der Konstrukte. Amplikons (498bp, orangener Pfeil) weisen auf einen Head to Tail Einbau hin. NTC bleibt leer.

Amplikons der Größe 498bp sind bei den Mäusen 183, 184, 185 und T/T bei der „Head to Tail“ Konstellation zu sehen. NTC bleibt leer.

### 3.3 Primeretablierung

Integrationsort 18,4 Mio bp, WT

WT long F / WT Chr1 2,6 R

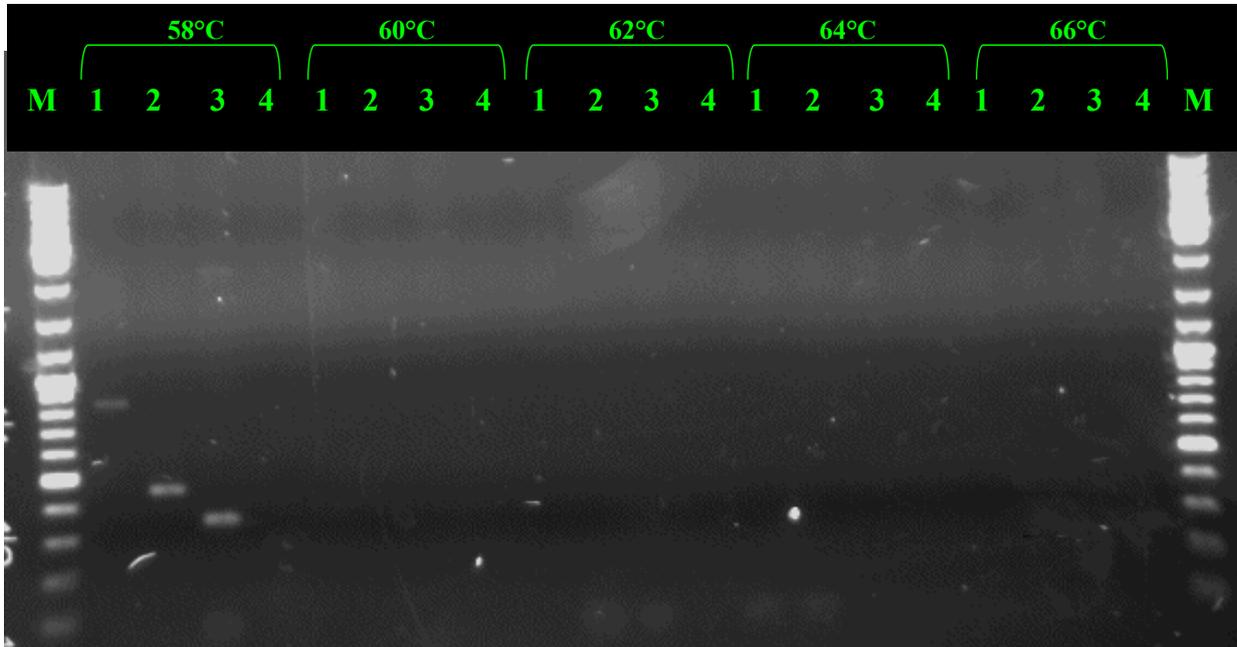


**Abbildung 19:** Foto eines Agarosegelelektrophoresegeles. Amplikons der Größe 2034bp sind bei WT, +/T und T/T zu sehen. M=Marker, 1= Wildtyp, 2=+/T, 3=T/T, 4=NTC. Die Klammern zeigen an, bei welchen Temperaturen (58-66°C) die jeweilige PCR durchgeführt wurde.

Es sind Amplikons der Größe 2034bp bei Wildtyp, +/T und T/T bei 58°C, 60°C, 62°C und bei +/T und T/T bei 64°C zu sehen.

Integrationsort 18,4 Mio bp, U

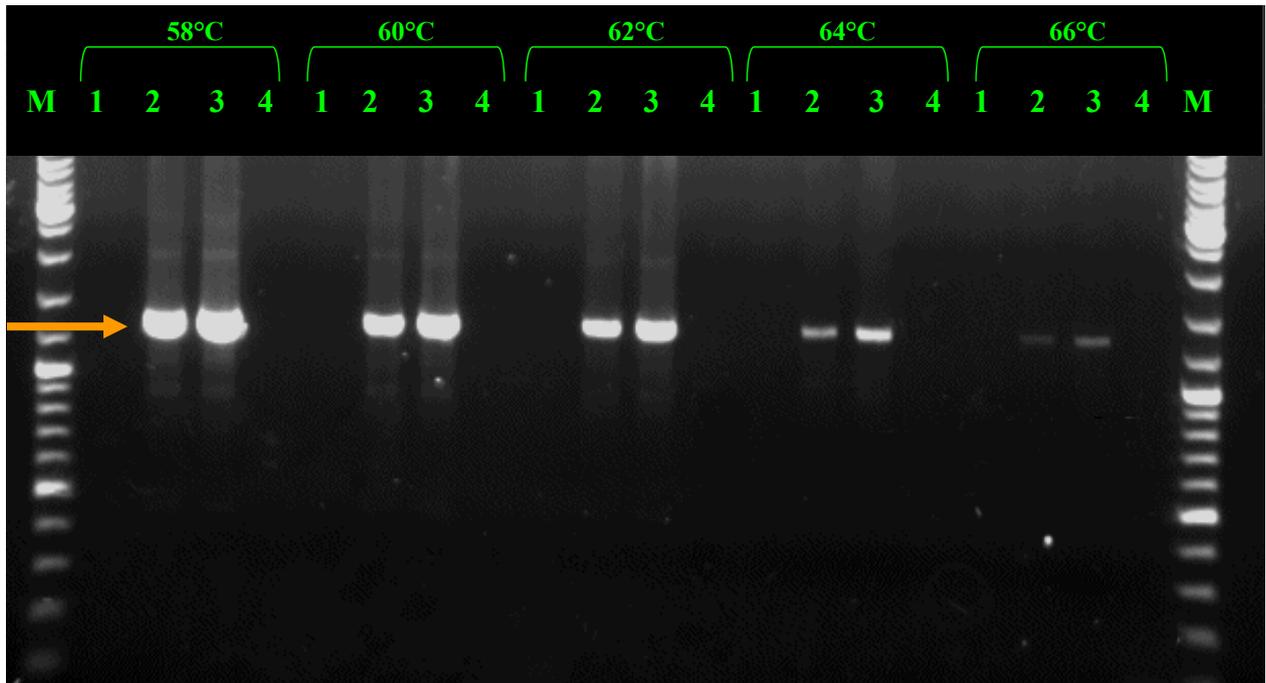
SeqF / PED112 U:



**Abbildung 20:** Foto eines Agarosegelelektrophoresesegels. Es sind keine spezifischen Amplikons zu sehen. M=Marker, 1= Wildtyp, 2=+/T, 3=T/T, 4=NTC. Die Klammern zeigen an, bei welchen Temperaturen (58-66°C) die jeweilige PCR durchgeführt wurde.

Es sind keine Amplikons der Größe 235bp zu sehen, weder bei Wildtyp, +/T noch T/T.

Integrationsort 18,4 Mio bp, D

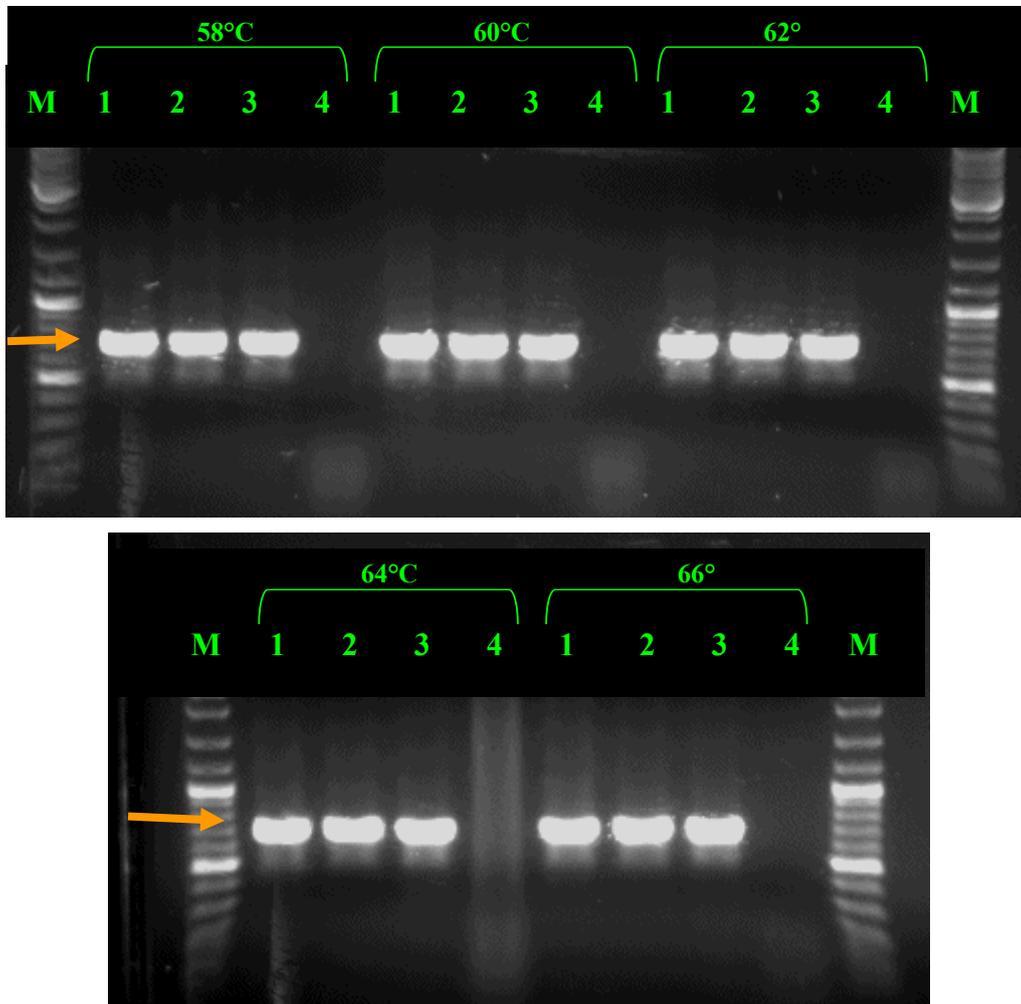


**Abbildung 21:** Foto eines Agarosegelelektrophoresesgels. Es sind Amplikons der Größe 1308bp bei +/T und T/T zu sehen (orangener Pfeil). M=Marker, 1= Wildtyp, 2=+/T, 3=T/T, 4=NTC. Die Klammern zeigen an, bei welchen Temperaturen (58-66°C) die jeweilige PCR durchgeführt wurde.

Es sind Amplikons der Größe 1308 bp bei den Mäusen +/T und T/T bei Temperaturen von 58-66°C zu sehen. Die Wildtyp Maus sowie NTC zeigen keine Amplikons.

Integrationsort 18,7 Mio bp, WT

Chr1 long R / Amp short R DR2

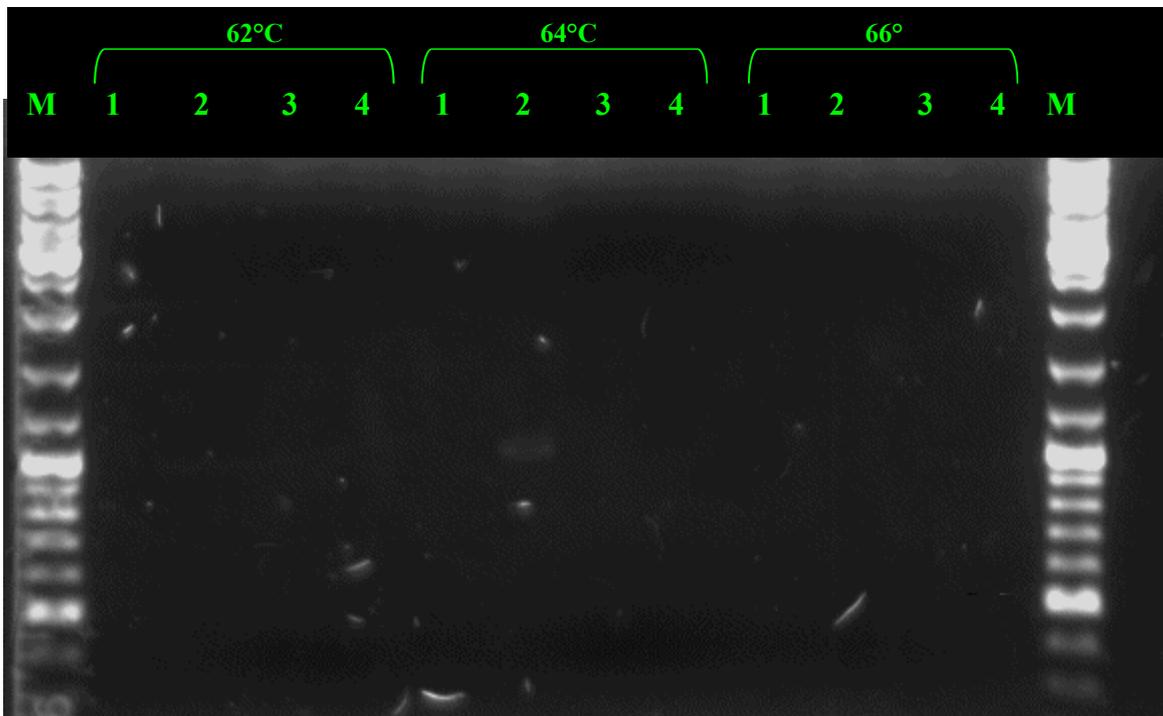
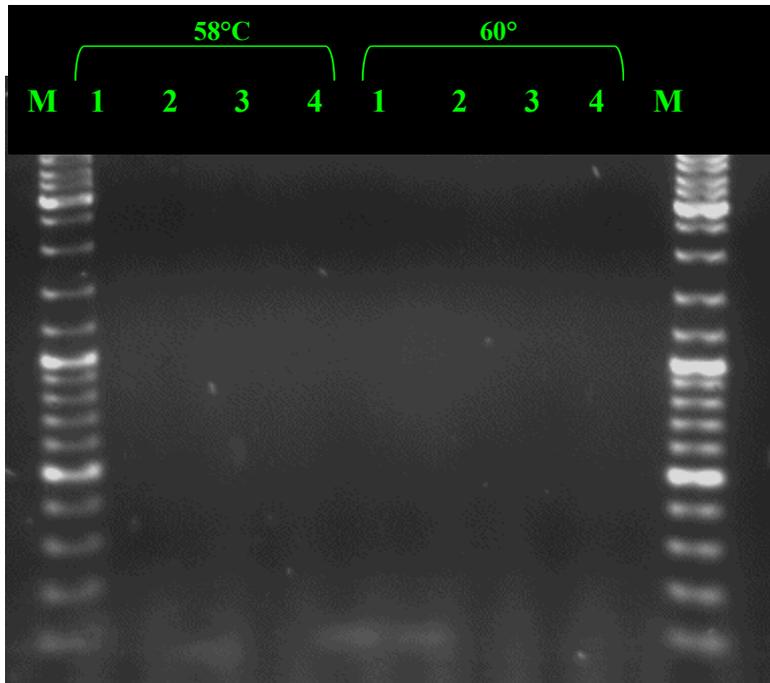


**Abbildung 22:** Foto eines Agarosegelelektrophoresegeles. Es sind Amplikons der Größe 693bp bei WT, +/T und T/T zu sehen (orangener Pfeil). M=Marker, 1= Wildtyp, 2=+/T, 3=T/T, 4=NTC. Die Klammern zeigen an, bei welchen Temperaturen (58-62°C oben, 64°C und 66°C unten) die jeweilige PCR durchgeführt wurde.

Es sind Amplikons der Größe 693 bp bei den Mäusen Wildtyp, +/T und T/T bei Temperaturen von 58°C-66°C zu sehen, NTC bleibt leer.

Integrationsort 18,7 Mio bp, U

Chr1 long R / PED112 U

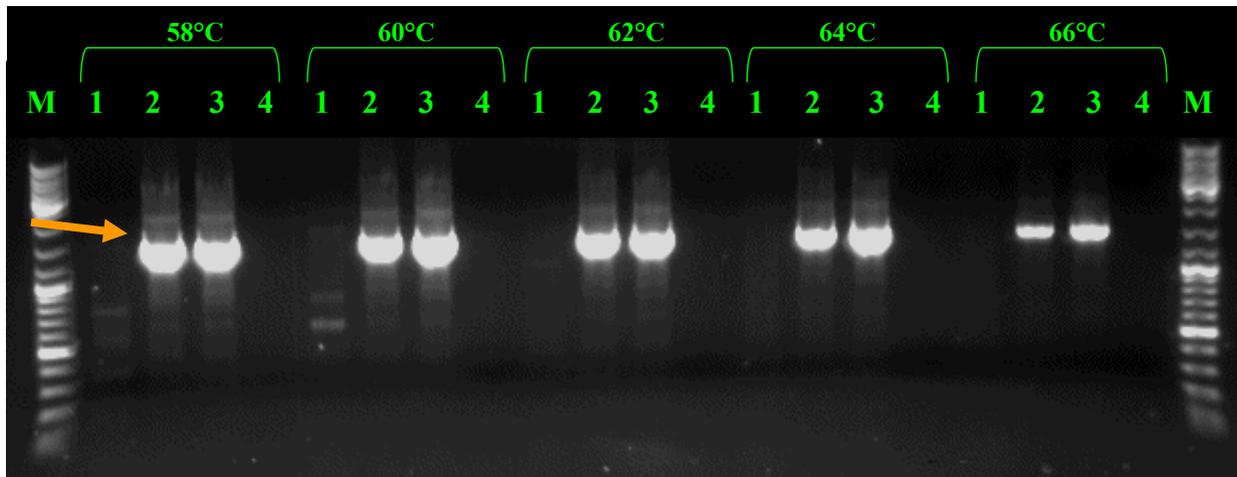


**Abbildung 23:** Foto eines Agarosegelelektrophoresegels. Es sind keine Amplikons zu sehen. M=Marker, 1= Wildtyp, 2=+/T, 3=T/T, 4=NTC. Die Klammern zeigen an, bei welchen Temperaturen (58°C und 60°C oben, 62°C-66°C unten) die jeweilige PCR durchgeführt wurde.

Es sind keine Amplikons zu sehen.

Integrationsort 18,7 Mio bp, D

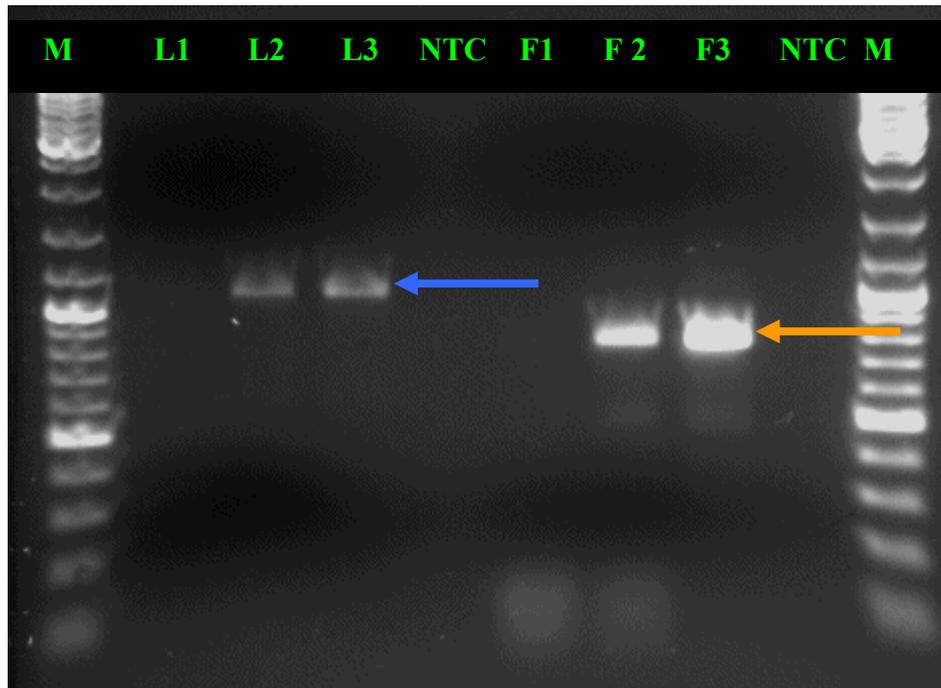
Amp short R / Amp short R DR1



**Abbildung 24:** Foto eines Agarosegelelektrophoresegeles. Es sind Amplikons der Größe 1510bp bei +/T und T/T zu sehen (orangener Pfeil). M=Marker, 1= Wildtyp, 2=+/T, 3=T/T, 4=NTC. Die Klammern zeigen an, bei welchen Temperaturen (58-66°C) die jeweilige PCR durchgeführt wurde.

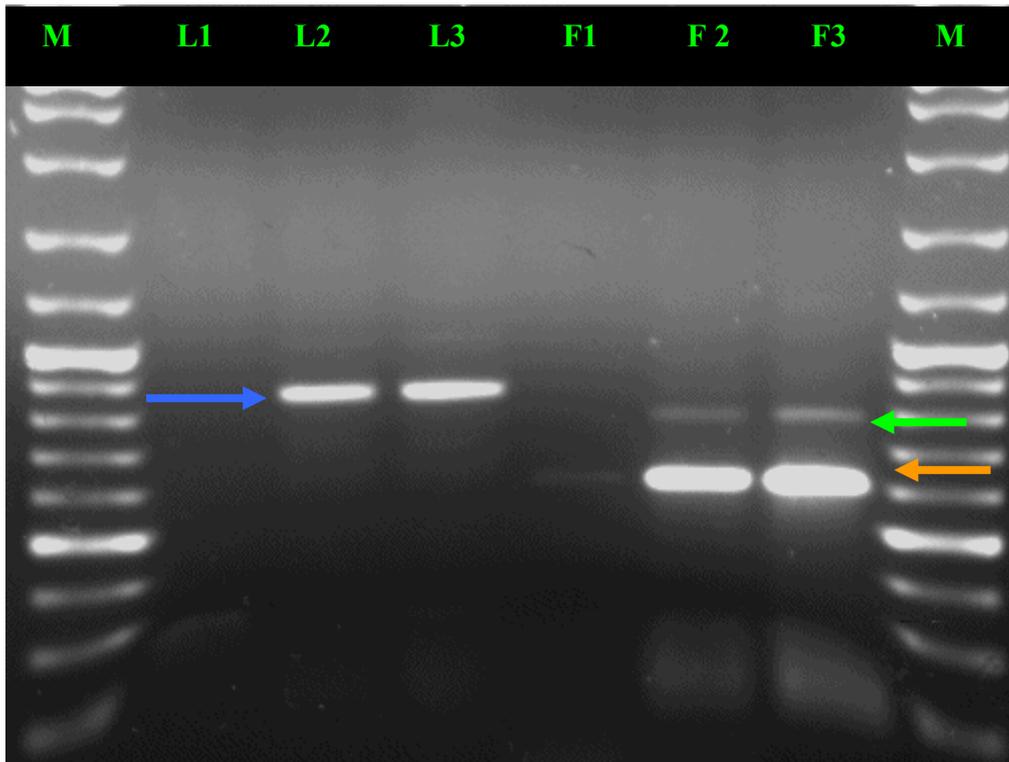
Es sind Amplikons der Größe 1510 bp bei Mäusen der Genotypen +/T und T/T bei Temperaturen von 58-66°C zu sehen, Wildtyp Mäuse zeigen keine Amplikons und NTC bleibt leer.

### 3.3.1 BglIII Restriktionsverdau



**Abbildung 25:** Foto eines Agarosegelelektrophoresegeles. Es sind Amplikons der Größe 1042bp bei L2 und L3 (blauer Pfeil), sowie Amplikons der Größe 780bp bei F2 und F3 (orangener Pfeil) zu sehen. L1 und F1=Wildtyp, L2 und F2=+/T, L3 und F3=T/T, NTC=No Template Control, M=Marker.

Es sind Amplikons der Größe 1042 und 780 bei Mäusen des Genotyps +/T und T/T zu sehen, Wildtyp Mäuse und NTC zeigen keine Amplikons.



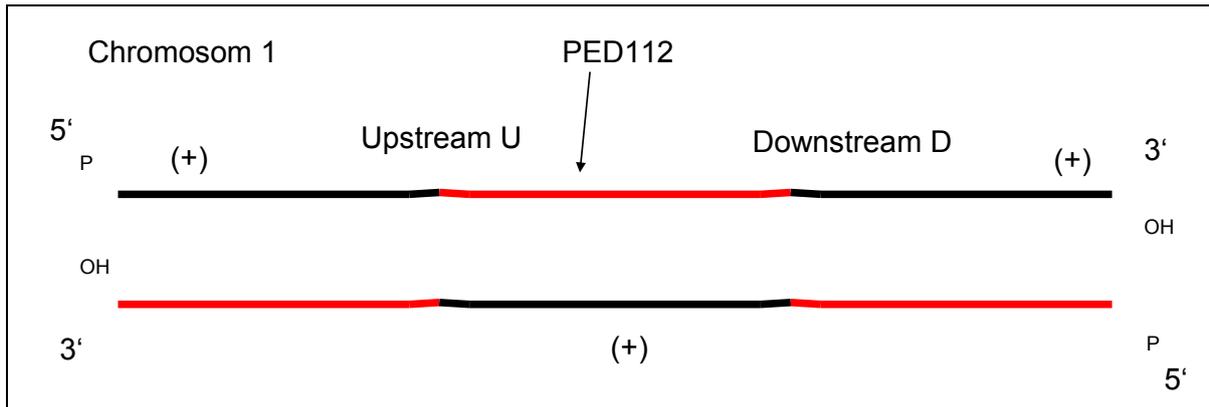
**Abbildung 26:** Foto eines Agarosegelelektrophoresegels. Es sind Amplikons der Größe 860bp bei L2 und L3 (blauer Pfeil), Amplikons der Größe 600bp bei F2 und F3 (orangener Pfeil) und Amplikons der Größe 780bp (grüner Pfeil) zu sehen. L1 und F1=Wildtyp, L2 und F2=+/T, L3 und F3=T/T, NTC=No Template Control, M=Marker.

Es sind deutliche Amplikons der Größe 860bp und 600bp bei Mäusen der Genotypen +/T und T/T zu sehen. Wildtyp Mäuse zeigen schwache Amplikons bei 600bp, Mäuse der Genotypen +/T und T/T bei 780bp.

### 3.4 Zusammenfassung des Genotyps

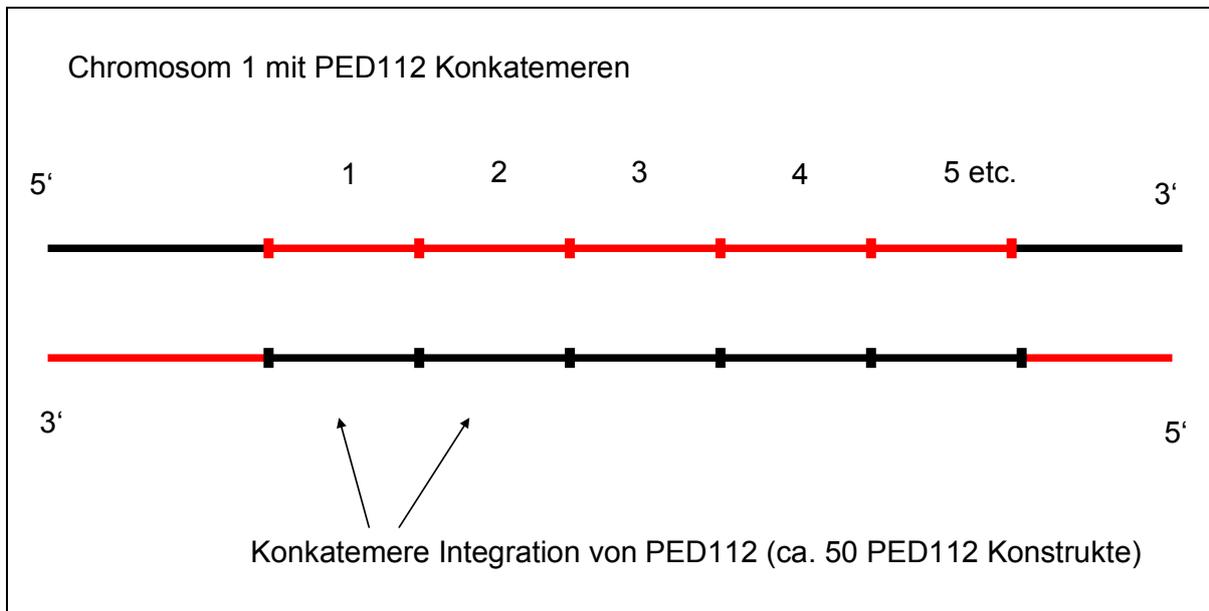
Anhand der Ergebnisse der PCRs können folgende Schlüsse bezüglich der Integration von PED112 gezogen werden.

#### Revers komplementäre Integration



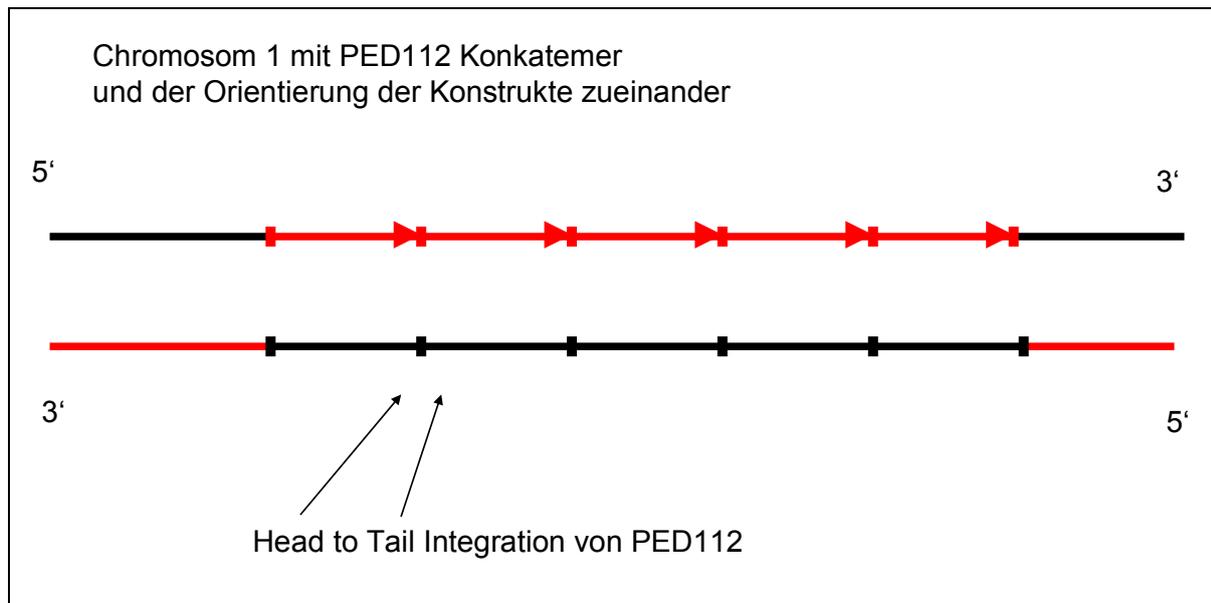
**Abbildung 27:** Ausschnitt aus Chromosom 1 mit revers komplementär integriertem PED112 Konstrukt. (+) markiert den kodierenden Strang (leading strand)

#### Konkatemere Integration



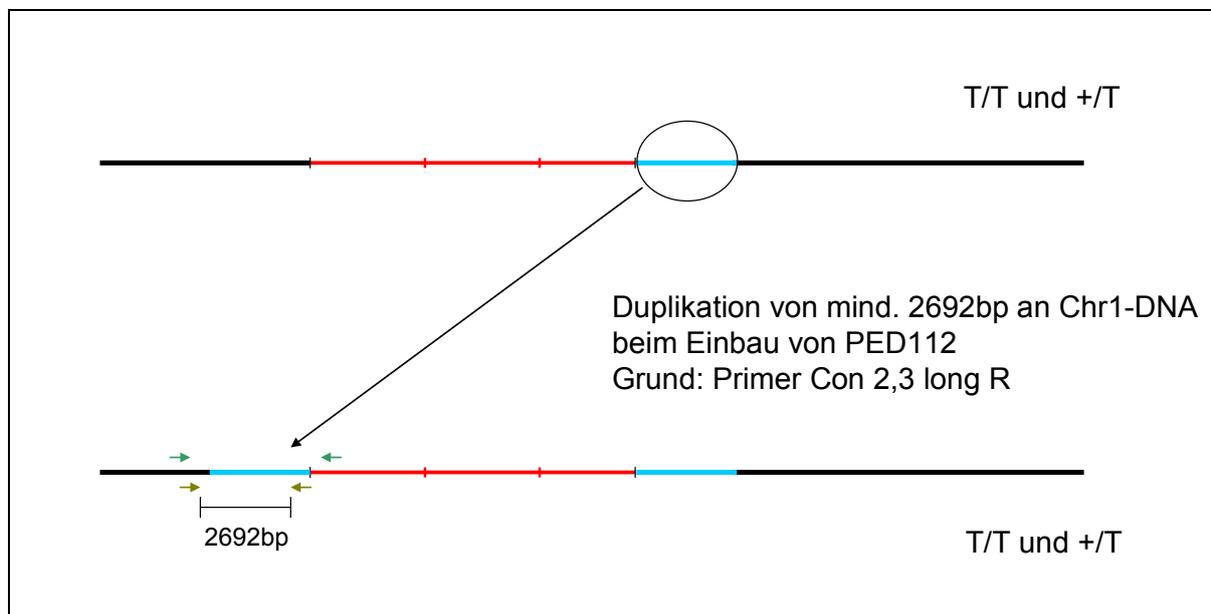
**Abbildung 28:** Konkatemere Anordnung der PED112 Konstrukte im Chromosom 1.

## Head-to-Tail Integration der Konkatemere



**Abbildung 29:** Die Orientierung der konkatemeren PED112 Konstrukte folgt einer Head-to-Tail Anordnung.

## Duplikation von Chromosom 1



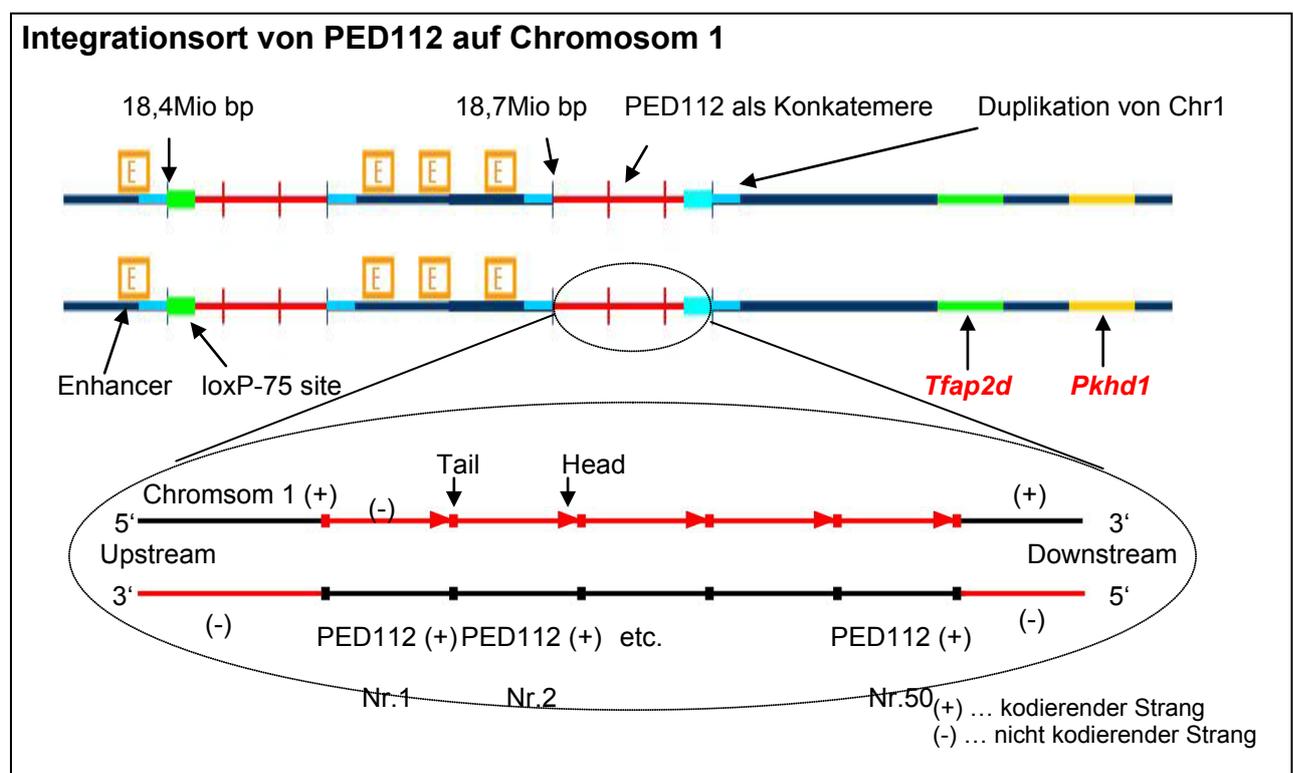
**Abbildung 30:** Vereinfachte Darstellung der Duplikation eines mindestens 2692 bp langen Bereichs von Chromosom 1.

Aufgrund der PCR "WT\_long\_F" und "Con2,3\_long\_R", die trotz der Integration von PED112 eine Bande bei homozygot transgenen Mäusen zeigt, kann darauf geschlossen werden, dass es zu Duplikationen der Chromosom 1-DNA während der Integration gekommen ist. Das duplizierte Stück befindet sich Upstream bzw.

Downstream der PED112 Konkatemere. Diese Duplikation ist vermutlich der Grund für das fehlende Signal bei den Upstream PCRs mit den vorhandenen Primern, die im Chromosom 1, aber upstream der Duplikation binden. Somit vergrößert sich der Abstand um mindestens 2692 bp und die PCR funktioniert nicht mehr.

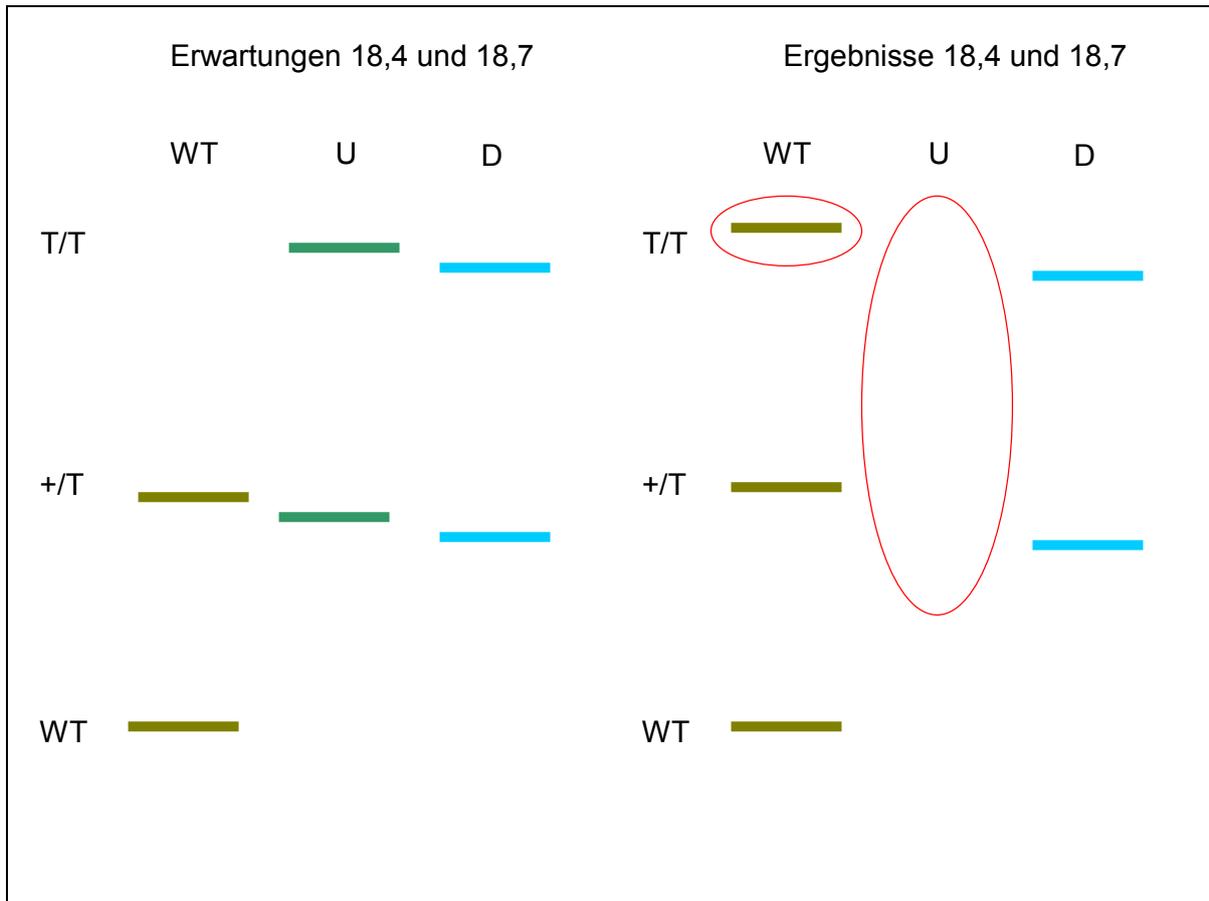
Weiters wird vermutet, dass es sich bei den beiden Integrationsstellen von PED112 nicht um zwei unabhängig voneinander passierte Integrationen handelt, sondern um nur einen einzigen Integrationsort. Durch chromosomale Umstrukturierung sind Konkatemere von PED112 auf die Position 18,7Mio bp verschoben worden.

### Zusammenfassung des Integrationsortes von PED112 auf Chromosom 1



**Abbildung 31:** Graphische Zusammenfassung des Integrationsortes von PED112 auf Chromosom 1 mit detaillierter Ansicht der konkatemern angeordneten PED112 Konstrukte.

Die folgende Abbildung zeigt eine Gegenüberstellung der theoretischen Voraussagen und der tatsächlichen Ergebnisse der PCRs der Primeretablierungen.

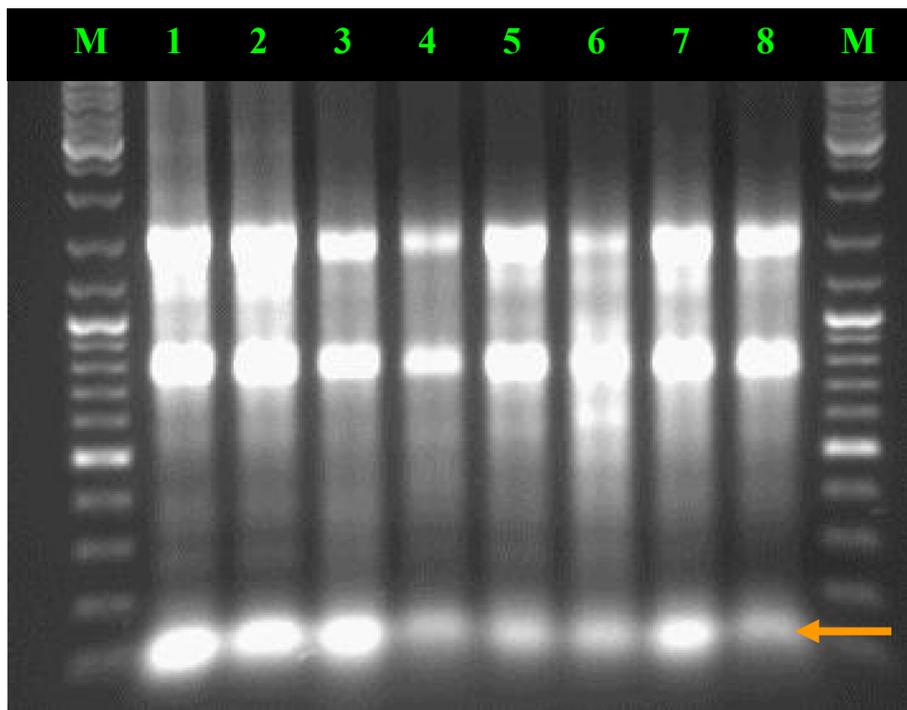


**Abbildung 32:** Vergleich der theoretischen Vorhersagen und der tatsächlichen PCR-Ergebnisse an den drei möglichen Stellen WT, U und D. Die roten Kreise zeigen eine Abweichung von der Vorhersage. Im Upstream-Bereich von T/T und +/T konnten keine PCR-Ergebnisse erzielt werden. T/T zeigt bei der Stelle WT eine Bande, die nicht den Vorhersagen entspricht.

### 3.5 qRT-PCR

#### 3.5.1 Qualität und Quantität der isolierten RNA

Die isolierte RNA wird auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die Banden der 18S und 28S Untereinheit sind ein gutes Zeichen für erfolgreich isolierte RNA und gut zu erkennen, der Smear zeigt den restlichen Anteil der RNA.



**Abbildung 33:** Auftrennung der isolierten RNA des Mäusepaars. Gut zu erkennen sind 18S und 28S UE. Dies weist auf nicht vollständig degradierte RNA hin. Der orangene Pfeil zeigt den degradierten Anteil an. M: Marker; 1: Gehirn M, 2: Gehirn WT, 3: Auge WT, 4: Auge M, 5: Leber M, 6: Leber WT, 7: Niere WT, 8: Niere M; (WT = Wildtyp, M = Mutante)

### 3.5.2 Isolierte RNA

Die Menge an isolierter RNA wird in  $\mu\text{g/ml}$  angegeben.

		Isolierte RNA in $\mu\text{g/ml}$			
		Mäuse (Kürzel)			
		$\alpha$	II	x	III
Gewebe	Auge WT	173	162	370	639
	Auge M	195	242	335	898
	Gehirn WT	807	515	644	623
	Gehirn M	616	986	620	459
	Niere WT	721	714	839	483
	Niere M	1430	414	595	494
	Leber WT	912	837	538	451
	Leber M	385	815	872	582

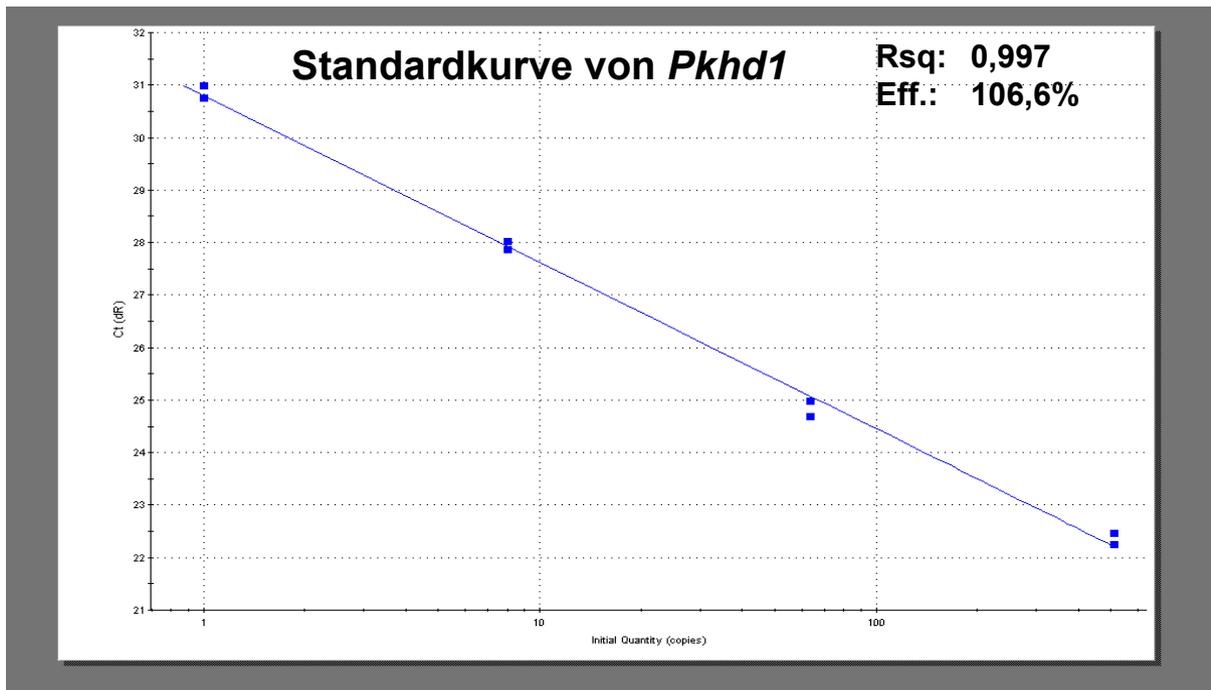
		Isolierte RNA in $\mu\text{g/ml}$		
		Mäuse (Kürzel)		
		IV	V	VI
Gewebe	Auge WT	919	632	484
	Auge M	637	746	580
	Gehirn WT	628	420	520
	Gehirn M	513	420	411
	Niere WT	489	442	465
	Niere M	644	387	344
	Leber WT	434	478	408
	Leber M	437	790	492

**Tabelle 37:** Isolierte RNA der zu untersuchenden Mäusegruppen in  $\mu\text{g/ml}$ .

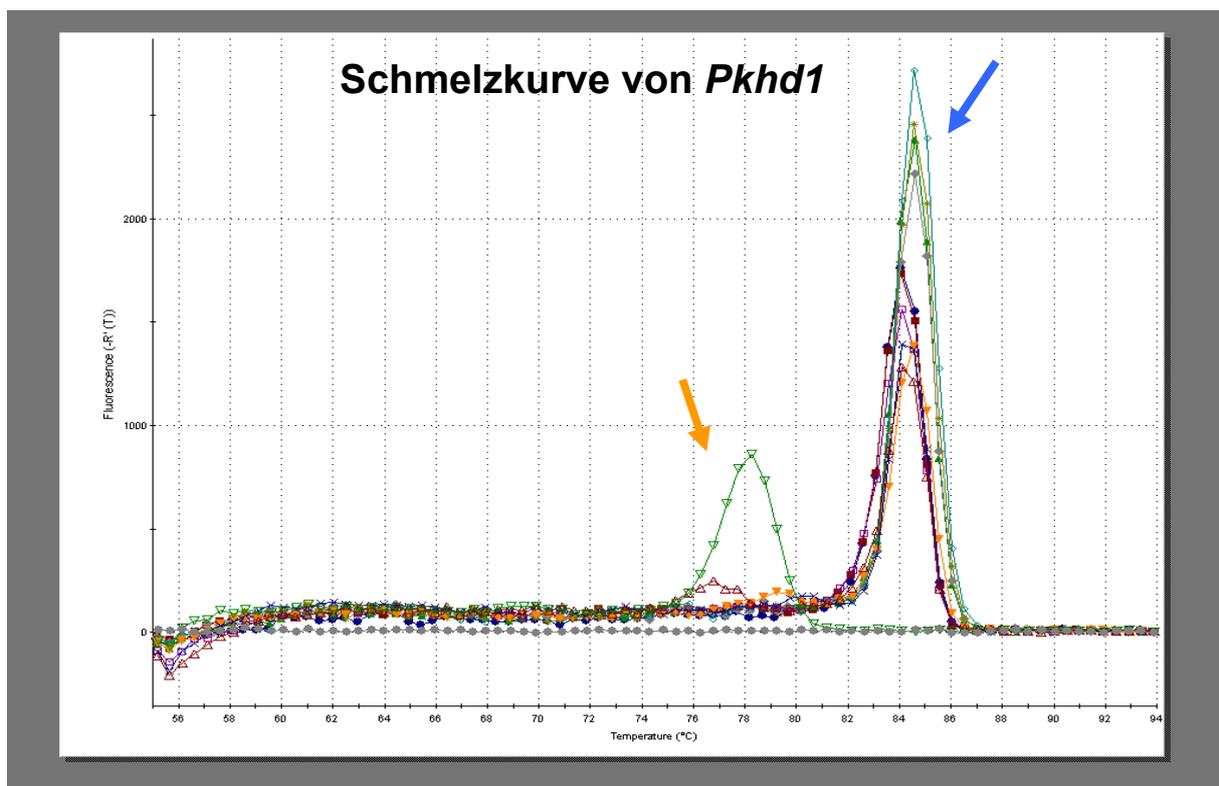
Insgesamt sind je nach Organ und Maus zwischen 10 und 500 $\mu\text{g}$  RNA vorhanden.

### 3.5.3 qRT-PCR

Anhand der Standard- und Schmelzkurven kann gezeigt werden, dass das gewählte Setup geeignet ist und brauchbare Werte liefert. Es wird je ein Beispiel einer Standard- und Schmelzkurve dargestellt. Außerdem ist zu erwähnen, dass sämtliche RT(-) – Kontrollen und Leerwerte (Wasser) negativ waren.

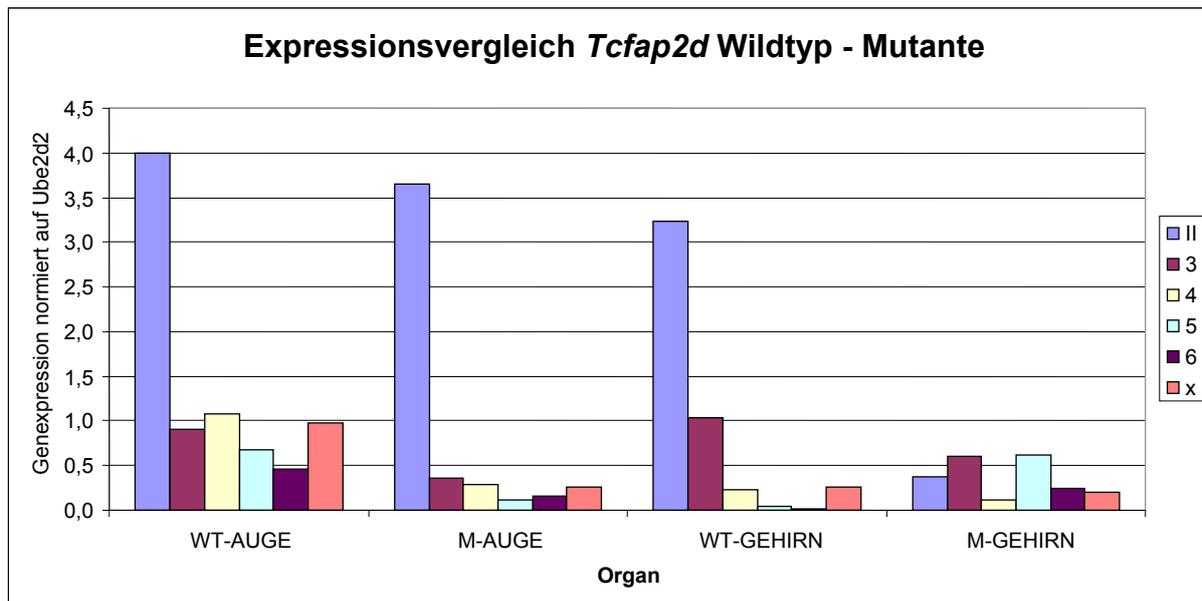


**Abbildung 34:** Beispiel einer Standardkurve bei der qRT-PCR von *Pkhd1* mit Reproduzierbarkeit (Rsq) und Amplifikationseffizienz (Eff.).



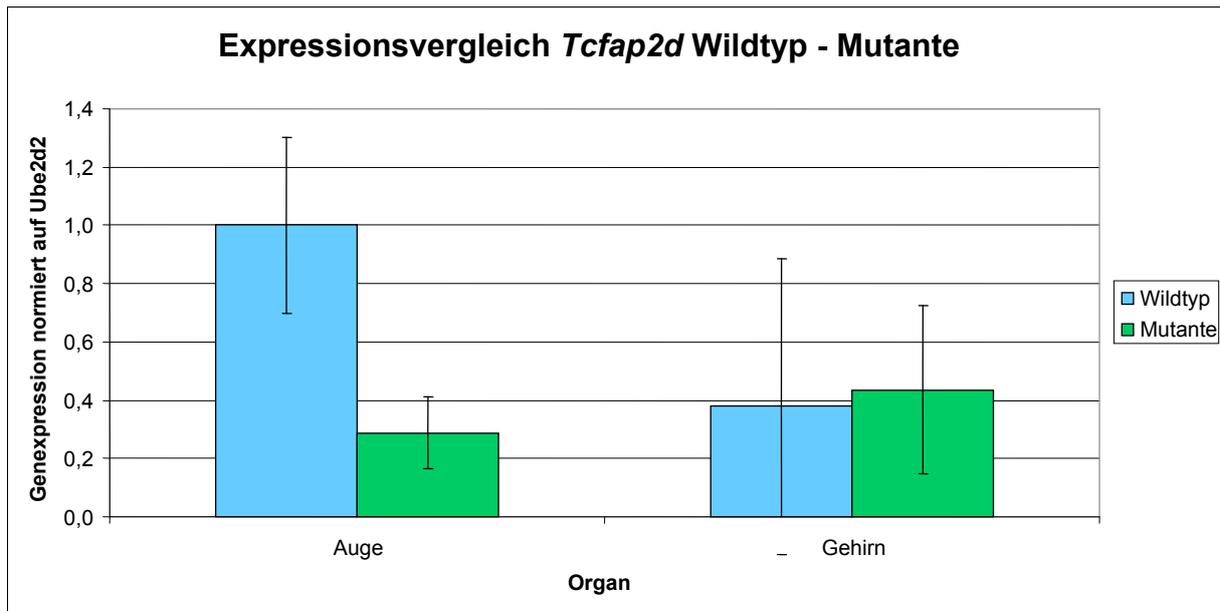
**Abbildung 35:** Beispiel einer Schmelzkurve von *Pkhd1* mit zwei Peaks, wobei die Proben (blauer Pfeil) ein einheitliches Schmelzprofil zeigen, die NTC (orangener Pfeil) hingegen einen unspezifischen Peak.

### 3.5.3.1 Expression *Tcfap2d*



**Abbildung 36:** Darstellung der Expressionsunterschiede von Wildtyp (WT) und Mutante (M) in den Organen Auge und Gehirn. Deutlich zu erkennen sind die Ausreißer der Mäusegruppe II.

Die Tabelle zeigt die Genexpression von *Tcfap2d* in Wildtyp und Mutante in den Organen Auge und Gehirn. Aufgrund der Tatsachen, dass die Mäusegruppen  $\alpha$  und II zur Etablierung der qRT-PCR genutzt wurden und der Experimentator noch nicht ganz mit der Handhabung der qRT-PCR vertraut war, werden die Werte von  $\alpha$  (nicht gezeigt) und II aufgrund der starken Ausreißer aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen.



**Abbildung 37:** Gemittelte *Tcfap2d* Expressionsunterschiede aller Mäusegruppen zwischen Wildtyp (blauer Balken) und Mutante (violetter Balken) mit Standardabweichung. Auge Wildtyp wurde auf den Wert 1 gesetzt, alle anderen Werte wurden dazu normiert.

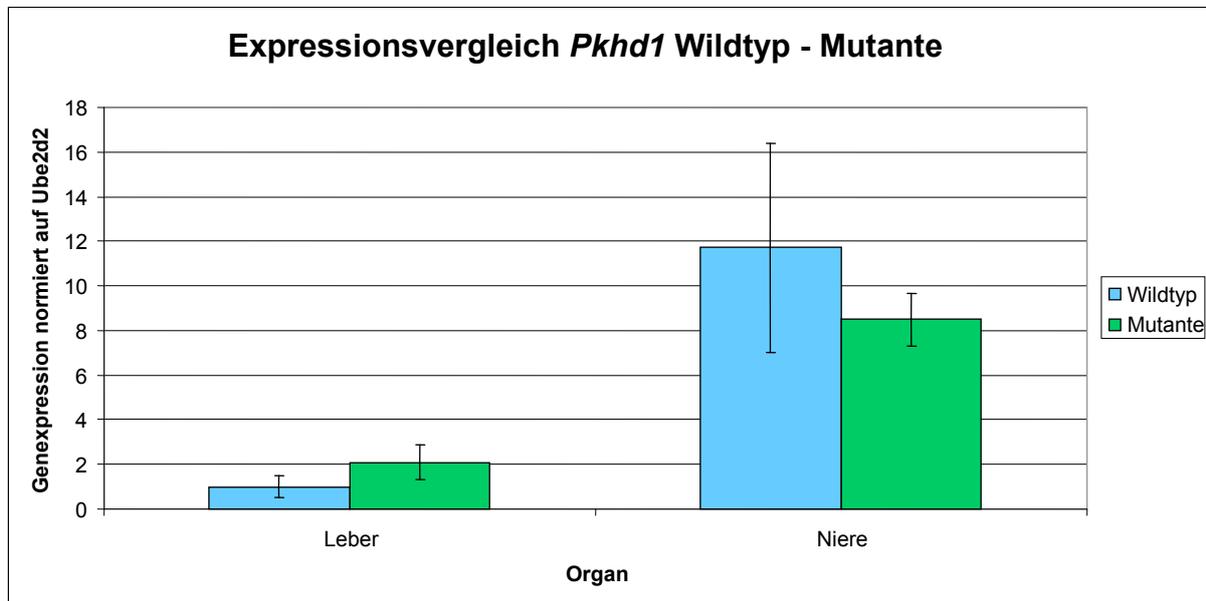
	normierte Genexpression	Standardabweichung
<b>WT-Auge</b>	1,00	0,30
<b>M-Auge</b>	0,29	0,12
<b>WT-Gehirn</b>	0,38	0,51
<b>M-Gehirn</b>	0,44	0,29

**Tabelle 39:** Zahlenwerte der Expressionsunterschiede zu Abbildung 38.

Die Ergebnisse der einzelnen qRT-PCRs werden zusammengefasst und in der Abbildung dargestellt. Der Wert von Auge Wildtyp wird willkürlich als 1 festgelegt, die restlichen Werte werden darauf normiert. Es zeichnet sich, trotz einer relativ geringen Probenzahl von fünf Wildtyp-Mäusen und fünf Mutanten, ein Trend ab. *Tcfap2d* wird im Auge der Mutanten um etwa 70% weniger exprimiert als im gesunden Wildtyp-Auge. Der Unterschied steht mit  $p = 0,074$  an der Signifikanzgrenze ( $p = 0,05$ ). Das Gehirn als Kontrollorgan zeigt in etwa die gleiche Expression in Wildtyp und Mutante, zeigt mit  $p = 0,17$  ebenfalls keine Signifikanz. Zu beachten ist die teils sehr große Standardabweichung.

### 3.5.3.2 Expression *Pkhd1*

Die hier präsentierten Ergebnisse finden, wie beim Gen *Tcfap2d*, unter Ausschluss der Mausgruppe II statt.



**Abbildung 38:** Gemittelte *Pkhd1* Expressionsunterschiede aller Mäusegruppen zwischen Wildtyp (blauer Balken) und Mutante (violetter Balken) mit Standardabweichung. Leber Wildtyp wurde auf den Wert 1 gesetzt, alle anderen Werte wurden dazu normiert.

	normierte Genexpression	Standardabweichung
<b>WT-Leber</b>	1,0	0,5
<b>M-Leber</b>	2,1	0,8
<b>WT-Niere</b>	11,7	4,7
<b>M-Niere</b>	8,5	1,2

**Tabelle 40:** Zahlenwerte der Expressionsunterschiede zu Abbildung 39.

Die Expression in der Wildtyp Leber wird auf 1 gesetzt, die restlichen Werte werden normiert. Mutierte Mäuse weisen in der Leber die doppelte Menge an Expression von *Pkhd1* der Wildtyp-Mäuse auf. Das Kontrollorgan Niere zeigt die gleiche Expression in Wildtyp und Mutante. In der Niere wird rund das 10fache an *Pkhd1* der Leber exprimiert. Die Expressionsunterschiede in der Leber sind mit  $p = 0,004$  hoch signifikant, in der Niere mit  $p = 0,54$  nicht signifikant.

## 4. Diskussion

### 4.1 Transgenanalyse der Mäuse

16 Mäuse der Line *Tg(PED112)273* sind auf das Vorhandensein des Transgens untersucht worden. Bei neun Mäusen wurde es gefunden. Maus 152 entwickelte ein Glaucom und sollte daher homozygot für das Transgen sein. Eventuell ist die DNA verloren gegangen. Aufgrund dieser Analyse können die transgenen Mäuse für zukünftige Verpaarungen und Untersuchungen verwendet werden.

### 4.2 Charakterisierung des transgenen Konstrukts PED112

#### 4.2.1 Integrationskontrolle von PED112

Die Gelelektrophorese zeigt, dass die Integration in den Mäusen 183 und 185 vorhanden ist. Die homozygot transgene Maus T/T dient als Positivkontrolle. Bei Maus 184 sind keine Amplikons zu sehen. Da diese Maus auf beiden Augen blind war, liegt die Vermutung nahe, dass die DNA verloren gegangen ist.

#### 4.2.2 Cre-Rekombinase Aktivitätstest

Das transgene Produkt ist bei den Mäusen 183, 184, 185 und der Positivkontrolle T/T zu finden. Das bedeutet, dass die Cre-Rekombinase während der Entwicklungsphase nicht aktiv war, oder die mutierte loxP-site nicht funktioniert.

#### 4.2.3 Orientierung von PED112

Bei den Mäusen 183, 184, 185 und der Positivkontrolle T/T ist ein Amplikon bei der „Head to Tail“ Anordnung des in Konkatemeren vorliegenden transgenen Konstrukts zu sehen. PED112L bindet im „downstream“-Bereich von PED112, PED112U bindet im „upstream“-Bereich. So kommt es zu PCR Produkten, die durch eine Amplifizierung des Bereichs zwischen „PED112L“ im „Head“ des einen transgenen Konstrukts und „PED112U“ im „Tail“ des nächsten Konstrukts entstehen. Die Tests

auf eine „Head to Head“ und „Tail to Tail“ Anordnung bleiben leer. Damit steht fest, dass die transgenen Konstrukte alle Head to Tail integriert haben.

### *4.3 Primeretablierung*

Es werden nicht alle Gelfotos der durchgeführten Primeretablierungen aufgelistet, sondern repräsentative Beispiele. Diskutiert werden jedoch alle Ergebnisse.

#### Position 18,4 Mio bp, WT

Die Primer bei der WT-PCR liegen im WT-Genom. Bei WT und beim transgenfreien Allel von +/T liegen die Primer in räumlicher Nähe, wodurch ein PCR-Produkt zustande kommen kann. Beim transgenen Allel von +/T und beiden Allelen von T/T werden die Primer durch die konkatemere Integration von PED112 voneinander getrennt und ein Amplifikat ist unter den gewählten PCR-Bedingungen nicht möglich. Die Ergebnisse von acht WT PCRs zeigen alle die gleichen Ergebnisse. Die Amplikons der WT-DNA und der +/T-DNA erscheinen wie erwartet, NTC zeigt keine Amplikons. Es treten allerdings Amplikons der gleichen Größe bei der T/T-DNA auf. Eventuell sind bei der Integration Duplikationen der WT-DNA aufgetreten, wodurch es zu Sequenzwiederholungen vor und hinter dem konkatemeren Konstrukt kommt. Die Primer können in diesem Fall bei homozygot transgenen Tieren im duplizierten Bereich binden und ein Amplikon liefern.

#### Position 18,4 Mio bp, U

Sechs PCR Amplifikationen wurden durchgeführt, um den „upstream“ Integrationsort zu untersuchen. In der Theorie bindet der „forward“ Primer „upstream“ im Wildtyp Genom, der „reverse“ Primer weiter „downstream“ im Transgen. Da keine der PCR Amplifikationen ein Ergebnis liefert, muss davon ausgegangen werden, dass es im „upstream“ Bereich während der Integration eventuell zu Duplikationen, Deletionen oder Neuansordnungen gekommen ist. Diese Änderungen sind eventuell der Grund, dass eine Ausbildung von Amplifikaten innerhalb der Primer durch Erhöhen der Distanz der Primer zueinander, nicht möglich ist.

#### Position 18,4 Mio bp, D

Vier PCR Amplifikationen wurden durchgeführt, um den „downstream“ Integrationsort zu untersuchen. Im Gegensatz zum „upstream“ Integrationsort bindet der „forward“ Primer im Transgen und der „reverse“ Primer im Wildtyp Genom. Bei drei der vier PCRs treten die Amplikons der Theorie entsprechend bei +/T und T/T auf und fehlen bei Wildtyp und NTC. Bei der vierten PCR ist ein schwaches Amplikon bei Wildtyp sichtbar. Die Ursache für ein Amplikon bei der Wildtyp Maus ist, sofern es keine Kontamination ist, derzeit noch unbekannt.

#### Position 18,7 Mio bp, WT

Es wurden zwei PCR Amplifikationen durchgeführt, welche Amplikons bei den Mäusen Wildtyp, +/T und T/T zeigen. Die Primerkonstellation entspricht der des 18,4 Mio bp-Bereichs. Sie liegen im Wildtyp Genom und sollten bei transgenen Tieren durch das konkatermer eingebaute Transgen getrennt sein. Theoretisch sind Amplikons daher bei Wildtyp und +/T zu sehn. Die Ursache für die Amplikons bei homozygot transgenen Tieren T/T ist derzeit nicht bekannt, könnte ebenso wie im 18,4 Mio bp-Bereich die Folge von Duplikation, Deletion oder Neuordnung während der Integration des Transgens sein.

#### Position 18,7 Mio bp, U

Es wurden vier PCRs durchgeführt, die keine Amplikons zeigen. Zu Erwarten wären Amplikons der Größe 808bp bei Mäusen des Genotyps +/T und T/T. Der forward Primer bindet im Wildtyp Genom, der reverse Primer im Transgen. Die Ursache für das Fehlen der Amplikons ist derzeit noch unbekannt. Es kann, wie im 18,4 Mio bp-Bereich zu Duplikationen der Wildtyp-DNA bei der Integration des Konstrukts gekommen sein.

#### Position 18,7 Mio bp, D

Es wurden zwei PCRs durchgeführt. Bei beiden entspricht das Ergebnis den Erwartungen. Der „forward“ Primer bindet im Transgen, der „reverse“ Primer im

Wildtyp Genom. Somit zeigen Mäuse der Genotypen +/T und T/T Amplikons, da die „forward“ Primer im transgenen Konstrukt binden können. Bei Wildtyp Mäusen ergibt sich keine Bindungsmöglichkeit für den „forward“ Primer.

Aufgrund obiger PCR Ergebnisse kann eine Aussage über die Orientierung des transgenen Konstrukts im Verhältnis zur chromosomalen DNA gemacht werden. Im Sinne der Konvention, dass kodierende Sequenzen in 5'-3'-Richtung angegeben werden, hat PED112 im Vergleich zur chromosomalen DNA „verkehrt“ integriert. Der codierende Strang (5'-3'-Richtung) der chromosomalen DNA ist durch den nichtcodierenden Strang (5'-3'-Richtung) von PED112 unterbrochen. Da die Sequenz des codierenden Strangs von PED112 entscheidend ist, wird diese angegeben, auch in 5'-3'-Richtung. Da der codierende Strang von PED112 *in vivo* gegenüber des codierenden Stranges liegt, ist die 5'-3'-Richtung entgegengesetzt der 5'-3'-Richtung der chromosomalen DNA und somit verkehrt.

#### 4.3.1 Restriktionskontrolle mit BgIII

Die PCR Produkte und Restriktionsverdau werden auf einem Agarosegel überprüft und die erwarteten Amplikons sind bei den PCR Produkten zu sehen. Bei den Restriktionsverdauen sind die großen Fragmente zu sehen, 860bp bei „PED112L/Con2,3longR“ bei den Genotypen +/T und T/T und 600bp bei „SeqF/Con2,3longR“ bei den Genotypen Wildtyp (sehr schwach). +/T und T/T. Die Amplikons bei L2 und L3 bei 1048bp und bei F2 und F3 bei 780 sind unverdaute PCR-Produkte. Die kleinen Teile der geschnittenen Fragmente sind möglicherweise wegen der geringen Einlagerung von Ethidiumbromid nicht sichtbar. Der Restriktionsverdau gibt Gewissheit, dass jene Amplikons, die mittels PCR amplifiziert wurden, die erwarteten Amplikons sind. Damit lässt sich das Auftreten der Amplikons bei homozygot transgenen Mäusen nicht auf eine unspezifische Bindung der Primer zurückführen. Die Ursache für das Auftreten der Amplikons ist unklar, eine Theorie wäre die Neuordnung des Wildtyp Genoms im Bereich der Integrationsorte.

#### 4.4 qRT-PCR

Die qRT-PCR wird mit sieben Wildtyp-Mäusen und sieben homozygot transgenen Mäusen durchgeführt. Die ersten Versuche zwecks Etablierung der qRT-PCR wurden mit der Mäusegruppe  $\alpha$  und II durchgeführt und der Experimentator war noch nicht mit der Handhabung vertraut. Daher werden die Gruppen  $\alpha$  und II aufgrund ihrer stark abweichenden Ergebnisse von der Auswertung ausgeschlossen (siehe Abbildung 36). Damit ist die Probenzahl von insgesamt 10 Tieren für handfeste Aussagen zu klein, die Versuche müssten mit weiteren Tieren durchgeführt werden. Diese standen gegen Ende dieser Arbeit leider nicht mehr zu Verfügung, neue Zuchten wurden angesetzt. Die hier beschriebenen Ergebnisse sind daher nur als Trend anzusehen.

#### *Tcfap2d*

Die Expression des Gens *Tcfap2d* ist unter anderem für die Entwicklung von Auge und Gehirn zuständig und kann ebendort beobachtet werden (Zhao et al., 2002). Eine Untersuchung der beiden Organe liegt insofern nahe, da das Auge im Gegensatz zum Gehirn einen veränderten Phänotyp, also ein Krankheitsbild zeigt. Das Gehirn dient als Kontrollorgan. Der Expressionsvergleich zwischen Wildtyp und Mutante zeigt annähernd signifikante Unterschiede im Auge, wobei das mutierte Auge eine Expressionsverminderung von etwa 70% aufweist. Diese Verminderung bestärkt die Vermutung der Fehlfunktion regulatorischer Elemente aufgrund der Integration des transgenen Konstrukts PED112. Das Gehirn als Kontrollorgan zeigt die gleiche Expressionsrate in Wildtyp und Mutante und bestätigt damit den Phänotyp des Gehirns, der in beiden Genotypen von keiner Veränderung betroffen ist.

Ein wichtiger Punkt wäre die vollständige Etablierung der 3-Primer-PCR, die Aufschluss über den Genotyp von Embryos bzw. Jungtieren geben könnte und damit Expressionsvergleiche von *Tcfap2d* in Entwicklungsstadien zuließe. Ergebnisse im Embryonalstadium, im Jungtier und in der adulten Maus würden ein breites Informationsspektrum zum Krankheitsbild des Glaukoms darstellen und könnten durchaus als Modell für das humane Glaukom dienen.

## *Pkhd1*

Die korrekte Expression von *Pkhd1* ist für die Entwicklung von Leber und Niere wichtig. KO-Mäuse, in denen *Pkhd1* nicht mehr voll funktionsfähig ist, zeigen einen Leberschaden (Williams et al., 2007), der dem der Mauslinie *Tg(PED112)273* entspricht. Der in der Einleitung erwähnte Nierenschaden bleibt bei *Tg(PED112)273* aus. Dieses Organ zeigt in unserer Mutante keinen veränderten Phänotyp. Dies kann mit Hilfe der qRT-PCR bestätigt werden, die Expression bei Wildtyp und Mutante ist gleich. Die Expression in der Leber der Mutante ist etwa das Doppelte der des Wildtyps und hoch signifikant. Auffallend sind die umgekehrten Expressionsunterschiede in Auge und Leber. Im Auge ist die Expression in der Mutante vermindert, in der Leber hingegen im Vergleich zum WT erhöht. Die Mutation eines Geneabschnittes, oder regulatorischer Elemente, ist nicht zwingend mit einer Expressionsverminderung gleichzusetzen. Regulatorische Elemente können sowohl positive als auch negative Auswirkungen auf die Produktion von mRNA haben, also ein Gen hoch- als auch runterregulieren. Die Regulation muss weiters nicht in allen Geweben bzw. Organen gleich sein. Leider ist zu wenig über die molekularen Mechanismen der hier mutierten, regulatorischen Elemente und den davon betroffenen Genen *Tcfap2d* sowie *Pkhd1* bekannt, um diese hier anführen zu können.

Wie bei *Tcfap2d* wäre eine Expressionsanalyse im Embryo und Jungtier das Ziel zukünftiger Arbeiten. Die untersuchten Mäuse waren adulte Tiere und die Entwicklung der Organe damit abgeschlossen. Wenn es sich bei besagten regulatorischen Elementen um entwicklungsrelevante Bereiche handelt, können deutlichere Unterschiede in der Expression der Gene womöglich im Embryo bzw. Jungtieren beobachtet werden. Dafür sprechen die in der Einleitung erwähnten Expressionsfenster von *Tcfap2d* und *Pkhd1*, die gerade in den Entwicklungsstadien der jeweiligen Organe besonders stark transkribiert werden.

## 5. Zusammenfassung

Nachdem Plank und Tsujita durch ihre Vorarbeit zur Untersuchung der Mauslinie *Tg(PED112)273* wertvolle Informationen geliefert haben, kann durch die Fortsetzung des Projekts mit Hilfe dieser Arbeit eine Beschreibung des Phänotyps und Genotyps weiter vervollständigt werden.

Die Mäuse gehören zu einer Linie, die das transgene Konstrukt PED112 integriert hat. Die Integration fand an einer Stelle des Genoms mit regulatorischen Elementen statt. Anhand kostengünstiger PCRs konnte eine revers komplementäre Head-to-Tail Integration des Konstrukts PED112 beschrieben werden. Weiters wird vermutet, dass es während der Integration zu Duplikationen von mindestens 2692 bp an Chromosom 1-DNA gekommen ist. Damit befindet sich die gleiche Sequenz von 2692 bp Länge vor und nach den PED112 Konkaternen. Die Integration von PED112 hat zur Folge, dass die Mäuse am Primary Congenital Glaucoma, einer Form des Glaukoms und am Caroli Syndrom leiden. Beide Phänotypen werden nur in homozygot transgenen Tieren sichtbar und da es sich um eine progressive Krankheit handelt, auch frühestens bei juvenilen Tieren. Die beiden Gene *Tcfap2d* und *Pkhd1*, die in unmittelbarer Umgebung des Integrationsortes liegen und vermutlich von den regulatorischen Elementen gesteuert werden, sollen Expressionsanalysen unterzogen werden. Dabei wird die Bildung von mRNA in Wildtyp und Mutante verglichen. Unterschiede konnten in Auge und Leber festgestellt werden. Die Expressionsrate in Gehirn und Niere ist bei Wildtyp und Mutante gleich.

Außerdem wurde versucht, eine 3 Primer PCR zu etablieren. Damit könnten in Zukunft Wildtyp Mäuse, heterozygote und homozygote Mäuse durch eine einfache PCR unterschieden werden, ohne den Phänotyp zu kennen, wie z.B. bei Embryos. Anhand der vermuteten Duplikationen kam es dabei allerdings zu Schwierigkeiten, die es noch zu klären gilt. Als Alternative zur 3 Primer PCR könnte eine qRT-PCR zur Identifizierung von hemizygoten Tiere entwickelt werden.

## 6. Summary

According to the work of Plank and Tsujita, who gathered useful information for the analysis of the mice strain *Tg(PED112)273*, further investigations relating to the phenotype and genotype could be done.

The mice belong to a strain, which contains a transgene construct, named PED112. The integration into the genome occurred in an area of regulatory elements. Furthermore a reverse complementary head-to-tail integration of PED112 can now be described. It is assumed, that due to the integration of PED112, a duplication of 2692 bp of chromosome 1-DNA happened. Thus, there is the same sequence of chromosome 1 upstream and downstream of the PED112 concatemers. The consequences of the integration are two disease patterns, the primary congenital glaucoma and the caroli syndrom. Both mutations will only be represented by a distinct phenotype, if the mice are homozygote transgene. Additionally, the diseases are progressive, so the phenotype will be shown in adult mice. Two genes, which are located in the surrounding area and are supposed to be operated by the regulatory elements, will be analysed on the basis of expression analysis. The expression of wildtype and mutant has been compared and differences in eye and liver could be determined. The average expression in brain and kidney is the same in wildtype and mutant.

In addition a 3 primer PCR should be established. With its help, it would be possible to distinguish wildtype, heterozygote and homozygote by a cheap and simple PCR, without any knowledge of the phenotype, like in embryos. Due to the duplication of chromosome 1, problems interfered the accomplishment of the 3 primer pcr. As an alternative, heterozygote animals could be analysed with qRT-PCR.

## 7. Referenzen

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

Aaron, C. S., van Zeeland, A. A., Mohn, G. R. and Natarajan, A.T., Molecular dosimetry of the chemical mutagen–ethyl methanesulfonate in *Escherichia coli* and in V-79 Chinese hamster cells. *Mutat. Res.*, 1978, 50, 419–426.

Aaron, C. S., van Zeeland, A. A., Mohn, G. R., Natarajan, A. T., Knaap, A. G. A. C., Tate, A. D. and Glickman, B. W., Molecular dosimetry of the chemical mutagen ethyl methanesulfonate: Quantitative comparison of mutation induction in *Escherichia coli*, V79 Chinese hamster cells and L5178 mouse lymphoma cells, and some cytological results in vitro and in vivo. *Mutat. Res.*, 1980, 69, 201–206.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., (2008). *Molecular Biology Of The Cell* 5th Edition

Allen, L., H. M. Burian, A. E. Braley, *Arch. Ophthalmol.* 53, 783 (1955).

Auerbach, C. and Robson, J. M., Chemical production of mutations. *Nature*, 1946, 157, 302.

Balling R (2001) ENU mutagenesis: analyzing gene function in mice. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2,463–492.

Beier DR (2000) Sequence-based analysis of mutagenized mice. *Mamm Genome* 11,594–597.

Bejjani, B.A., et al., *Hum. Mol. Genet.* 9, 367 (2000).

Bejjani, B.A., Edward, D.P. Primary Congenital Glaucoma. GeneReviews [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. 2004 Sep 30 [updated 2007 Dec 03].

Bernstein J, Slovis TI. Polycystic diseases of the kidney. In: Edelmann CM Jr, editors. Pediatric Kidney Disease. Vol 2, Boston: Little Brown; 1992: p 1139-1153.

Brinster, R. L., Allen, J. M., Behringer, R. R., Gelinas, R. E. & Palmiter, R. D. (1988). Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 85, 836—840.

Cattanach BM, Burtenshaw MD, Rasberry C, and Evans EP. Large deletions and other gross forms of chromosome imbalance compatible with viability and fertility in the mouse. Nat Genet 3: 56–61, 1993.

Cheng, C., K. Ying, M. Xu, W. Zhao, Z. Zhou, Y. Huang, W. Wang, J. Xu, L. Zeng, Y. Xie, and Y. Mao. Cloning and characterization of a novel human transcription factor AP-2 $\beta$  like gene (TFAP2BL1). Int J Biochem Cell Biol 2002. 34:78–86.

Ehrenberg, L., Higher plants. In Chemical Mutagens. Principles and Methods for their Detection (ed. Hollaender, A.), Plenum Press, New York, 1971, vol. 2, pp. 365–386.

Friedrich G and Soriano P. Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. Genes Dev 5: 1513–1523, 1991.

Gencik, A., A. Gencikova, A. Gerinec, Clin. Genet. 17, 241 (1980).

Gichner, T. and Veleminsky, J., The mutagenic activity of 1-alkyl-1-nitrosoureas and 1-alkyl-nitro-1-nitrosoguanidines. Mutat. Res., 1967, 4, 207–212.

Gould, D.B., S. W. M. John, Hum. Mol. Genet. 11, 1185 (2002).

Hulten, M.A., Dhanjal, S., Pertl, B.(2003). Rapid and simple prenatal diagnosis of common chromosome disorders: advantages and disadvantages of the molecular methods FISH and QF-PCR. *Reproduction* (2003) 126, 279–297

Jonas MM, Perez-Atayde AR. Fibrocystic liver disease. In: Suchy FJ, Sokol RJ, Balistreri WF, editors. *Liver Disease in Children*. 2nd edition. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins; 2001. p 904-905.

Jordan D, Harpaz N, Thung SN. Caroli's disease and adult polycystic kidney disease: a rarely recognized association. *Liver* 1989; 9:30-35.

Justice MJ, Noveroske JK, Weber JS, Zheng B and Bradley A (1999) Mouse ENU mutagenesis. *Hum Mol Genet* 8,1955–1963.

Justice MJ, Carpenter DA, Favor J, Neuhauser-Klaus A, Hrabe de Angelis M, Soewarto D, Moser A, Cordes S, Miller D, Chapman V et al. (2000) Effects of ENU dosage on mouse strains. *Mamm Genome* 11,484–488.

Karim B (August 2007). "Caroli's Disease Case Reports". *Indian Pediatrics* 41 (8): 848–50.

Kennedy C. L., O'Bryan M. K. (2006). N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) mutagenesis and male fertility research. *Human Reproduction Update* 12(3): 293–301.

Konopka, A. K. (1988). Compilation of DNA strand exchange sites for nonhomologous recombination in somatic cells. *Nucleic Acids Research* 16, 1739—1758.

LIBBY R. T., SMITH R. S., SAVINOVA O. V., ZABALETA A., MARTIN J. E., GONZALEZ F. J., JOHN S. W. (2003). Modification of ocular defects in mouse developmental glaucoma models by tyrosinase. *Science* 299(5612): 1578-81.

Lin FL, Sperle K, and Sternberg N. Recombination in mouse L cells between DNA introduced into cells and homologous chromosomal sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 1391–1395, 1985.

Muller, H. J., The problem of genetic modification, Fifth Int. Genetics Congress, Berlin. *Z. Ind. Abst. Vererb. Lehre*, 1927, I (suppl.), 234–260.

Natarajan, A. T. (2002). Chromosome aberrations: past, present, future. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* Volume 504, Issues 1-2, Pages 3-16

Nishimura, D.Y., et al., *Nature Genet.* 19, 140 (1998).

Noveroske JK, Weber JS and Justice MJ (2000) The mutagenic action of Nethyl-N-nitrosourea in the mouse. *Mamm Genome* 11,478–483.

Palmiter RD and Brinster RL. Germ-line transformation of mice. *Annu Rev Genet* 20: 465–499, 1986.

Paton D, Craig JA (1976). "Glaucomas. Diagnosis and management". *Clin Symp* 28 (2): 1–47.

PLANK N. (2008). Genotypic and phenotypic characterization of a mouse model for primary congenital glaucoma. Master-Thesis.

Popp RA, Bailiff EG, Skow LC, Johnson FM and Lewis SE (1983) Analysis of a mouse alpha-globin gene mutation induced by ethylnitrosourea. *Genetics* 105,157–167.

Quigley H. A., Broman A. T. (2006). The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *British Journal of Ophthalmology* 90: 262–267.

Rinchik EM (1991) Chemical mutagenesis and fine-structure functional analysis of the mouse genome. *Trends Genet* 7,15–21.

Russell WL, Kelly EM, Hunsicker PR, Bangham JW, Maddux SC and Phipps EL (1979) Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 76,5818–5819.

Rao, R. N. and Natarajan, A. T., Mutagenicity of some alkyl alkanesulfonates in barley. *Mutat. Res.*, 1965, 2, 132–148.

Rapoport, I. A., Carbonyl compounds and the chemical mechanisms of mutations. *C. R. Acad. Sci. USSR*, 1946, 57, 65–67.

Reddy S, DeGregori JV, von Melchner H, and Ruley HE. Retrovirus promoter-trap vector to induce lacZ gene fusions in mammalian cells. *J Virol* 19: 17–23, 1991.

RESNIKOFF S., PASCOLINI D., ETYA'ALE D., KOCUR I., PARARAJASEGARAM R., POKHAREL G. P., MARIOTTI S. P. (2004). Global data on visual impairment in the year 2002. *Bulletin of the World Health Organization* 2004 82: 844-851.

Ritch, R., M. B. Shields, T. Krupin, in *The Glaucomas, Clinical Science*, R. Ritch, M. B. Shields, T. Krupin, Eds. (Mosby, St. Louis, MO, ed. 2, 1996), vol. 2.

Rülicke, T. (1996). Transgenic technology: an introduction. *International Journal of Experimental Pathology* 77, 243—245.

Rülicke T, Hübscher U: Germ line transformation of mammals by pronuclear microinjection. *Exp Physiol* 85:589-601 (2000).

Th. Rülicke

Transgene, Transgenese, transgene Tiere: Methoden der nichthomologen DNA-Rekombination. Monographie, Karger Verlag (2001)

Russell WL. X-ray induced mutations in mice. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 16: 327–336, 1951.

Williams, S., Cobo-Stark, P., James, L.R., Somlo, S., Igarashi, P. (2008). Kidney cysts, pancreatic cysts, and biliary disease in a mouse model of autosomal recessive polycystic kidney disease. *Pediatr Nephrol* (2008) 23:733–741

Schmittgen, T., Livak, K., (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative  $C_T$  method. *Nature Protocols*, Vol.3 No.6; 2008; 1101-1108

Sarfarazi, M., I. Stoilov, *Eye* 14, 422 (2000).

Savinova, O.V., R. S. Smith, S. W. M. John, unpublished data.

Stadler, L. J., Genetic effects of X-rays in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1928, 14, 69–75.

Sgro M, Rossetti S, Barozzino T, Toi A, Langer J, Harris PC, et al. Caroli's disease: prenatal diagnosis, postnatal outcome and genetic analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. Jan 2004;23(1):73-6.

Skarnes WC, Auerbach BA, and Joyner AL. A gene trap approach in mouse embryonic stem cells: the lacZ reported is activated by splicing, reflects endogenous gene expression, and is mutagenic in mice. *Genes Dev* 6: 903–918, 1992.

Smith, R.S., A. Zabaleta, O. V. Savinova, S. W. M. John, *BMC Dev. Biol.* 1, 3 (2001); available at [www.biomedcentral.com/1471-213X/1/3](http://www.biomedcentral.com/1471-213X/1/3).

Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, and Kucherlapati RS. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal  $\alpha$ -globin locus by homologous recombination. *Nature* 317: 230–234, 1985.

Stanford WL, Cohn JB, and Cordes SP. Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. *Nat Rev Genet* 2: 756–768, 2001.

Swaminathan, M. S. and Natarajan, A. T., Chromosome breakage induced by vegetable oils and edible fats. *Curr. Sci.*, 1956, 25, 382–384.

Tomarev S. I. (2001). Eyeing a new route along an old pathway. *Nature Medicine* 7(3): 294-5.

Tsujita, M. (2008) Verschiedene Methoden zur Identifikation der Integrationsstelle des transgenen Konstrukts PED112 bei dem transgenen Mausstamm *Tg273*. Master Thesis

van der Weyden L., Adams J. D., Bradley A. (2002) Tools for targeted manipulation of the mouse genome. *Physiological Genomics* 11: 133–164.

Vincent, A.L., et al., *Am. J. Hum. Genet.* 70, 448 (2002).

von Melchner H and Ruley HE. Identification of cellular promoters by using a retrovirus promoter trap. *J Virol* 63: 3227–3233, 1989.

Williams SS, Cobo-Stark P, James LR, Somlo S, Igarashi P (2008). Kidney cysts, pancreatic cysts, and biliary disease in a mouse model of autosomal recessive polycystic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2008 May;23(5):733-41. Epub 2008 Feb 20.

Winkler, R., Perner, B., Rapp, A., Durm, M., Cremer, C., Greulich, K.O., Hausmann, M., (2002). Labelling quality and chromosome morphology after low temperature FISH analysed by scanning far-field and near-field optical microscopy. *Journal of Microscopy*, Vol. 209, Pt 1 January 2003, pp. 23–33

Zhang, M., Mai, W., Li, C., Cho, S., Hao, C., Moeckel, G., Zhao, R., Kim, I., Wang, J., Xiong, H., Wang, H., Sato, Y., Wu, Y., Nakanuma, Y., Lilova, M., Pei, Y., Harris, R., Li, S., Coffey, R., Sun, L., Wu, D., Chen, X., Breyer, M., Zhao, Z., McKanna, J., Wu, G. (2003). PKHD1 protein encoded by the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease associates with basal bodies and primary cilia in renal epithelial cells. *PNAS*: vol. 101: no. 8: 2311–2316

Zhao, F., Lufkin, T., Gelb, B.D. (2003) Expression of Tfap2d, the gene encoding the transcription factor Ap-2 delta, during mouse embryogenesis *Gene Expr. Patterns*, 3, 213–217

[http://www.clontech.com/products/detail.asp?product\\_id=10396&tabno=2](http://www.clontech.com/products/detail.asp?product_id=10396&tabno=2)

<http://emedicine.medscape.com/article/364733-overview> (Author: William J Romano, MD, FRCPC, Director, Interventional Radiology Research, Department of Radiology, William Beaumont Hospital)

[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG000000008197](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG000000008197)

<http://keck.med.yale.edu/microarrays/solexa/technology.html>

<http://www.merck.com/mmhe/sec20/ch233/ch233a.html> (Last full review/revision August 2008 by Douglas J. Rhee, MD)

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full\\_report&list\\_uids=83741](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=83741)

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs282/en/>

## **8. Lebenslauf**

Name: Daniel ZACH  
Geburtsort/-datum: WIEN, am 14.04.1985  
Staatsbürgerschaft: Österreich  
Familienstand: ledig

### **Ausbildung**

1995-2003: Goethe Gymnasium (Astgasse) 1140 Wien  
Unterstufe: Sportrealgymnasium  
Oberstufe: Naturwissenschaftliches Realgymnasium mit  
ergänzendem Unterricht in Biologie/Chemie/Physik  
Matura: 11.06.2003

2003: Sprachkurs in Saffron Walden, Cambridge, England mit  
Abschluss durch Course Certificate

2004 - 2006: Diplomstudium Astronomie an der Universität Wien

Seit 2005: Diplomstudium Biologie (Genetik/Mikrobiologie) an der  
Universität Wien

### **Wissenschaftliche Berufserfahrung**

2006: Ferialjob bei Fa. BAXTER (Industrie)

2008: Ferialjob bei Boehringer Ingelheim RCV GmbH & Co KG  
(Krebsforschung als Labortechniker)

2009: Diplomarbeit am Institut für Labortierkunde,  
Veterinärmedizinische Universität Wien

2010:

Wahlbeispiel und Ferialjob bei Boehringer Ingelheim RCV  
GmbH & Co KG (Krebsforschung als Labortechniker)

## **Curriculum Vitae**

Name: Daniel ZACH  
Place / Date of birth: Vienna, Austria, 14.04.1985  
Nationality: Austrian  
Marital status: unmarried

## **Education**

1995-2003: Goethe Gymnasium (Astgasse) 1140 Vienna  
Secondary School with main focus on sport  
Upper School with main focus on natural sciences  
(biology/chemistry/physics)  
School Leaving Examination (Matura): 11.06.2003

2003: Language course in Saffron Walden, Cambridge, England  
with Course Certificate

2004 - 2006: Entering Diploma Study of Astronomy at the University of  
Vienna

Since 2005: Entering Diploma Study of Biology (Genetics/Microbiology)  
at the University of Vienna

## **Scientific Work Experience**

2006: Student Apprentice at Baxter International (Industry)

2008: Student Apprentice at Boehringer Ingelheim RCV GmbH &  
Co KG (Oncology as a laboratory technician)

2009: Diploma Thesis at the University of Veterinary Medicine  
Vienna, Institute for Laboratory Animal Science

2010: Internship at Boehringer Ingelheim RCV GmbH & Co KG  
(Oncology as a laboratory technician)