

## 4 Methoden

### 4.1 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

#### 4.1.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen erkennen und spalten spezifische Basensequenzen in einer DNA-Doppelhelix. Der Reaktionsansatz enthält neben der zu spaltenden Nukleinsäure und der spezifischen Restriktionsendonuklease einen speziellen, vom Hersteller mitgelieferten, zehnfach konzentrierten Puffer sowie 100µg/ml BSA.

Ein 20µl Reaktionsansatz enthält entsprechend folgende Komponenten:

1µg	DNA
1u/µg DNA	Enzym
1/10 des Gesamtvolumens	10fach-Puffer
1/10 des Gesamtvolumens	10fach-BSA

---

ad 20µl H<sub>2</sub>O

#### 4.1.2 Dephosphorylierung von Plasmid DNA

Um die Religation eines restriktionsgeschnittenen Vektors zu verhindern, wird der Phosphatrest am 5'-Ende des DNA-Moleküls durch die „calf intestinal phosphatase“ entfernt. Dazu wird die DNA in 1x NEB Puffer resuspendiert (0,5µg/10µl) und 0,5 unit/µg Vektor DNA hinzugegeben. Der Ansatz wird 60min bei 37°C inkubiert und anschließend über ein 1%iges Agarose-Gel gereinigt.

#### 4.1.3 Auffüllen von 5'-Überhängen mit DNA Polymerase I (Klenow)

Die zu modifizierende DNA wird in 1x NEB Puffer gelöst und mit 33µM eines jeden dNTPs versetzt. Pro µg DNA wird dem Ansatz 1unit Klenow hinzugefügt und für 15min bei 25°C inkubiert. Die Auffüllreaktion zur Erzeugung glatter Enden wird durch Gabe von EDTA (10mM final) und Inkubation bei 75°C für 5min gestoppt.

#### 4.1.4 Glätten von überhängenden Enden mit T4 DNA Polymerase

Die T4 DNA Polymerase katalysiert die DNA Synthese in 5'→3' Richtung und ermöglicht ebenso wie das Klenow-Fragment, das Auffüllen von 5'-Überhängen. Durch die ebenfalls vorhandene 3'→5' Exonuklease Aktivität dieses Enzyms können zusätzlich 3'-Überhänge entfernt werden. In dem Ansatz werden 100µM eines jeden dNTP, 1x T4 DNA Polymerase Puffer sowie 1-3units DNA Polymerase/µg für 20min bei 12°C inkubiert. Die Hitze-Inaktivierung des Enzyms erfolgt bei 75°C für 5min.

#### 4.1.5 Ligation

Die Verknüpfung von DNA-Molekülen wird mithilfe der T4 DNA Ligase durchgeführt. Ein 20 µl Reaktionsvolumen enthält folgende Zusammensetzung:

Ligation von	glatte Enden	kohäsive Enden
Insert:Vektor Ratio (molar)	3:1	3:1
Vektor Enden (fmol)	15-60	3-30
Insert Enden (fmol)	45-180	9-90
Gesamt DNA (µg)	0,1-1,0	0,01-0,1
Ligase (units)	1,0	0,1
Temperatur (°C)	14	23-26
Zeit (h)	24	1

#### 4.1.6 Radioaktive „random primer“-Markierung von DNA

Die radioaktive Markierung von DNA wird mit dem „Multiprime DNA labelling system“ der Firma Amersham durchgeführt. Die zu markierende DNA (25µg/ml) wird zunächst denaturiert (95°C, 2min) und anschließend auf Eis gekühlt. Ein 50µl Reaktionsvolumen besteht aus folgenden Komponenten:

5µl	DNA (5µg/ml)
je 4µl	unmarkierte dNTPs (dCTP, dGTP, dTTP)
5µl	Reaktionspuffer
5µl	Primer/BSA
5µl	[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]dATP (6000 Ci/mmol)
2units	Klenow

Der Ansatz wird über Nacht bei RT inkubiert und nach ca.12h ein weiteres Mal mit Klenow versetzt (1unit). Es erfolgt eine weitere Inkubation bei RT (1h).

Mit diesem Verfahren beträgt die durchschnittliche spezifische Aktivität einer Sonde 1-2x10<sup>9</sup>dpm/µg.

#### 4.1.7 Endmarkierung von Oligonukleotiden

Durch die T4 Polynukleotidkinase wird der Transfer einer radioaktiv markierten ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)ATP-Phosphatgruppe an die 5' Hydroxylgruppe von synthetischen Oligonukleotiden katalysiert.

Ein 20µl Reaktionsansatz enthält folgende Substanzen:

2µl	Oligonukleotid (10pmol/µl)
2µl	Kinase Puffer (10fach)
5µl	[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]ATP (6000 Ci/mmol)

9µl	H <sub>2</sub> O
8units	T4 Polynukleotidkinase (4units/µl)

Nach 45-minütiger Inkubation des Ansatzes bei 37°C, werden weitere 8units T4 Polynukleotidkinase hinzugefügt und die Inkubation fortgesetzt (30min).

Der Ansatz wird ohne weitere Reinigungsschritte direkt zu dem Hybridisierungsansatz gegeben.

## 4.2 Transformation kompetenter Bakterien

Der Ligationsansatz wird mit 100µl der auf Eis aufgetauten kompetenten Bakterien gemischt und für 2min auf Eis, 90sec bei 42°C und wiederum 2min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wird direkt auf 37°C vorgewärmte Agarplatten ausplattiert, die über Nacht bei 37°C inkubiert werden.

## 4.3 Southernblot Hybridisierung

Restriktionsverdauete genomische DNA wird in einem Agarosegel aufgetrennt, mit einem Lineal fotografiert und mittels eines alkalischen Transfers mit 0,4M NaOH über Nacht auf positiv geladene Nylonmembranen geblottet. Für nachzuweisende Fragmente größer als 4kb, wird das Gel vor dem Blotten zur Depurinierung 15min in 0,25M HCL geschwenkt und anschließend in 0,4 M NaOH 30min neutralisiert. Nach dem Blotten wird die Membran mit 2fach SSC gewaschen, der Blot in ein Hybridisierungsröhrchen überführt und die Vorhybridisierung mit 5ml QuickHyb Lösung bei 68°C gestartet. Nach 20-30-minütiger Vorhybridisierung wird die Sonde denaturiert und zusammen mit 50 µl 20 mg/ml Heringsperma zu der Lösung gegeben. Die Hybridisierung wird nach 1-1,5 h beendet, die Membran bei 78°C für je 30min in Waschlösung I geschwenkt und ein Film aufgelegt.

## 4.4 Polymerasekettenreaktion

Für eine PCR wird folgender Standardansatz verwendet:

5µl Puffer	10fach
1,5µl MgCl <sub>2</sub>	25mM
0,4µl dNTPs	25mM
1,0µl Primer1	50µM
1,0µl Primer2	50µM
0,3µl Taq-Polymerase	5U/µl
H <sub>2</sub> O ad	50µl

Die Ansätze werden mit einem geeignetem Programm in Thermocyclern inkubiert.

## 4.5 Extraktion und Aufreinigung von Nukleinsäuren

### 4.5.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgt mithilfe des QiaexII-Kits der Firma Qiagen. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wird das Gel unter UV-Licht ausgeschnitten, gewogen, mit 3Vol. Puffer QX1 sowie 10-30 $\mu$ l der QiaexII Suspension (Silicapartikel) versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei 50°C folgen zwei Wasch- bzw. Zentrifugationsschritte. Anschließend wird das Pellet luftgetrocknet und die an die Silicapartikel gebundene DNA mit einem adäquaten Volumen H<sub>2</sub>O eluiert.

Mit dieser Methode können ca. 70-80% der eingesetzten DNA Menge isoliert werden.

### 4.5.2 Reinigung von zirkulärer DNA durch einen CsCl-Gradienten

Zur Reinigung von 500 $\mu$ g zirkulärer DNA durch einen CsCl-Gradienten, wird eine Lösung aus 1,01g CsCl/ml TE-Puffer angesetzt und mit der Plasmid DNA bei 30°C inkubiert bis das CsCl vollständig gelöst ist. Pro 100 $\mu$ g DNA werden 2 $\mu$ l 10mg/ml Ethidiumbromid zu der Lösung hinzugefügt und der Ansatz bei 50000rpm für 24h bei 25°C zentrifugiert (UZ:TL-100 Beckmann, Rotor:TLS55, Röhrchen: Quick-Seal-Tubes # 344625). Nach der Zentrifugation werden die Röhrchen vorsichtig aus dem Rotor genommen und die zirkuläre DNA mithilfe einer „21-gauge“ Nadel entnommen. Um das Ethidiumbromid aus dem Ansatz zu entfernen, wird die Lösung so oft mit Isoamylalkohol ausgeschüttelt bis die wässrige Phase klar ist. Anschließend folgt eine Ethanol-Präzipitation und das Pellet wird in einem adäquaten Volumen H<sub>2</sub>O gelöst.

## 4.6 Gelelektrophoretische Methoden

### 4.6.1 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die horizontale Gelelektrophorese wird als Standardmethode zur Bestimmung der Größe und zur Überprüfung von enzymatischen Modifikationen an DNA-Molekülen genutzt. Abhängig von der erwarteten Fragmentlänge werden 0,8-1%ige Agarosegele gegossen. Die Agarose wird in 1fach TAE-Puffer durch Kochen vollständig gelöst, auf ca. 55°C abgekühlt, mit 10 $\mu$ g/100ml Ethidiumbromid versetzt und in eine Horizontalkammer gegossen. Das Gel wird nach der Aushärtung in eine Elektrophoresekammer mit 1fach TAE Puffer überführt und die zu analysierenden Proben mit 0,1Vol. 10fach Gelladepuffer versetzt, in die Geltaschen pipettiert und bei einer Spannung von 60-220 V getrennt. Die Banden werden unter UV-Licht, über die Interkalation des Ethidiumbromids in die DNA sichtbar gemacht und mithilfe eines Polaroidsystems dokumentiert.

### 4.6.2 Polyacrylamid-Elektrophorese (PAGE)

PAGE-Gele werden bevorzugt zum Nachweis von Proteinen im Gel genutzt. Ein 10%iges Trenngel enthält folgende Zusammensetzung:

1,7ml            30%Acrylamid

2,5ml	Trenngelpuffer (0,75M pH8,8)
0,9ml	H <sub>2</sub> O
20µl	TEMED (10%)
20µl	APS (12,5%)

Durch Gabe der Radikalbildner APS und TEMED wird eine Kettenreaktion initiiert, durch die die Acrylamid/Bisacrylamid-Monomere zu langen Ketten bzw. einem Netzwerk polymerisieren. Die Lösung wird luftblasenfrei zwischen zwei Glaskammern gegossen und mit Isopropanol (p.A.) überschichtet. Nach Aushärtung des Trenngels wird ein Sammelgel mit folgender Zusammensetzung darüberschichtet:

0,5ml	30%Acrylamid
1,25ml	Sammelgelpuffer (0,25M)
0,75ml	H <sub>2</sub> O
30µl	TEMED (10%)
30µl	APS (12,5%)

Der Gellauf wird bei 100-120V durchgeführt.

#### **4.7 Transfer von Proteinen auf Membranen**

Der Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosefilter erfolgt durch ein Semi-Dry-Verfahren in Transferpuffer durch Anlegen eines konstanten Stroms von 250mA für 1h. Nach dem Transfer werden die Filter mit 1fach TBST-Puffer gewaschen, 5min in PonceauS gefärbt und die Molekulargewichtsstandards auf der Membran markiert. Durch Inkubation der Membran für 1h bei RT in 5%Trockenmilch/TBST werden unspezifische Bindungen abgesättigt. Die jeweiligen Antikörper bzw. Antiseren werden in einer entsprechenden Verdünnung in 1% Trockenmilch/TBST entweder für 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C zu der Membran gegeben. Die Nitrocellulosefilter werden dreimal 5min bei RT in 1fach TBST gewaschen und 1h bei RT mit einem Spezies-spezifischen Meerettich-Peroxidase-gekoppelten Anti-IgG-Antikörper (1:1000 in TBST) inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit 1fach TBST wurden die immunoreaktiven Banden durch Chemilumineszenz nach Herstellerangaben detektiert und durch Auflegen von geeignetem Filmmaterial dokumentiert.

#### **4.8 Waschen und abermaliges markieren von Membranen**

Die Membran wird für 30min bei 50°C unter Schütteln im Wasch-Puffer inkubiert, um die gebundenen Antikörper zu entfernen und anschließend zweimal 10min in 1fach TBST gewaschen. Zur wiederholten Proteindetektion wird wie unter 4.7 beschrieben verfahren.

#### **4.9 Herstellung von Cholatextrakten**

Die isolierten Gewebe werden mechanisch zerkleinert und in einem möglichst geringen Volumen des hypotonen Homogenisierungspuffers aufgenommen. Die Homogenisierung erfolgt bei 4°C mithilfe eines Ultra-Turrax (5-10mal, 15sek). Kerne und nicht

homogenisiertes Gewebe werden bei 4°C (500xg, 5min) abzentrifugiert. Das Homogenat wird bei 12000xg (4°C, 20min) pelletiert und in dem 4-5fachen Volumen eisgekühlten Extraktionspuffer aufgenommen. Der Ansatz wird 1h bei 4°C gevortext und anschließend 15min zentrifugiert (4°C, 12000xg). Der Überstand (Cholatextrakt) wird abgenommen und kann für weitere Versuche eingesetzt werden.

## **4.10 Extraktion, Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

### **4.10.1 Isolation genomischer DNA aus Gewebe**

100mg Gewebe bzw. 0,5cm Mausschwanz werden 1-2h bei 56°C und 1400rpm mit 300µl Lysispuffer inkubiert. Nach vollständiger Lyse erfolgt eine Phenol/Chloroform-Extraktion zur Reinigung der Lösung von Proteinen und Metaboliten. Dazu wird das Lysat je 1x mit 300µl Phenol, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, bzw. Isoamylalkohol extrahiert und die wässrige Phase mit 1ml Ethanol<sub>abs.</sub> und 1/10 vol. NaAc pH7,4 gefällt. Das aus einer Zentrifugation (3min, 14000rpm) resultierende Pellet wird mit 70%igem Ethanol gewaschen, abermals zentrifugiert, getrocknet und in einem adäquaten Volumen H<sub>2</sub>O gelöst.

### **4.10.2 Minipräparation von Plasmid DNA**

Einzelkolonien werden über Nacht in 4ml LB-Medium mit 100mg/l Ampicillin bei 37°C geschüttelt. Die Übernachtskulturen werden bei 2000rpm pelletiert, in 250µl P1 resuspendiert und zur Lyse der Bakterien für 5min bei RT mit P2 inkubiert. Nach Gabe von 500µl P3 folgt eine Zentrifugation (10min, 14000rpm, RT). Der klare Überstand wird mit 0,7Vol. Isopropanol gefällt, das Pellet gewaschen, getrocknet und gelöst (4.10.1).

### **4.10.3 Maxipräparation von Plasmid-DNA**

Maxi-Plasmid-DNA-Präparationen werden nach dem Protokoll des Maxi-Plasmid-Präparationskits der Firma Qiagen, Düsseldorf, durchgeführt. Um höhere Konzentrationen an Plasmid-DNA als bei der Minipräparation zu erhalten, werden die Volumina der Bakterienkultur und der Pufferkomponenten den Herstellerangaben zu Folge erhöht.

### **4.10.4 Konzentrationsbestimmung am Photometer**

Die Konzentration der Nukleinsäuren berechnet sich nach folgender Formel:

$$cDNA = (E_{260} - E_{320}) \cdot f \cdot c$$

cDNA = Konzentration der gemessenen Nukleinsäure in µg/ml

E<sub>260</sub> = Extinktion von Nukleinsäuren

E<sub>320</sub> = Nullwert

f = Verdünnungsfaktor

c = Extinktionskoeffizient

Bei einer OD von 1,0 und einer Küvettenschichtdicke von 1cm wird von folgenden Nukleinsäurekonzentrationen in Lösung ausgegangen:

ds-DNA	50µg/µl
ssDNA	25µg/µl
RNA	40µg/µl

Neben der Nukleinsäurekonzentration lassen sich eventuelle Verunreinigungen durch Salze und/oder organische Lösungsmittel ( $OD_{230}$ ) sowie durch Proteine ( $OD_{280}$ ) bestimmen. Der Quotient aus  $OD_{260}/OD_{280}$  dient als Maß für die Reinheit der Nukleinsäurelösung, die bei Werten zwischen 1,6 und 1,8 als proteinarm bezeichnet wird.

#### **4.10.5 Isolation genomischer DNA aus ES-Zellen**

Zur Isolation von genomischer DNA aus ES-Zellklonen werden die Zellen in 24well Platten kultiviert. Konfluente Klone werden mit 500µl Lysis-Puffer für ES-Zellen versetzt und für mindestens 3h bei 37°C inkubiert. Die Fällung erfolgt durch Gabe von 500µl Isopropanol zu den Zellen. Die pelletierte DNA wird mit 70%igem Alkohol gewaschen, das Pellet getrocknet und in 50µl H<sub>2</sub>O gelöst.

### **4.11 Embryonale Stammzellkultur**

#### **4.11.1 Gelatinieren von Kulturschalen für die ES-Zellkultur**

Zellkulturschalen werden mit einer Gelatine Lösung (0,1%ig in PBS) überschichtet und für >5min bei 4°C inkubiert. Vor der weiteren Verwendung der Zellkulturschalen wird die Gelatine Lösung entfernt.

#### **4.11.2 Isolierung embryonaler Fibroblasten**

Zur Isolierung embryonaler Fibroblasten werden männliche, transgene Mäuse die das Neomycinresistenzgen tragen mit C57bl/6 Weibchen verpaart. Die Weibchen werden täglich auf Vaginalplugs untersucht. Am Tag 12-14 p.c. werden die Weibchen getötet und die Uteri entnommen. Nach mehreren Waschschritten mit sterilem PBS werden die Embryonen aus dem Uterus isoliert, decapitiert, und nach dem Entfernen der inneren Organe in kleine Stücke geschnitten. Die Gewebestücke werden zusammen mit einem sterilen Rührstab, 5mm Glaskugeln und 50ml Trypsin/EDTA in einem Erlenmeyerkolben bei 37°C 30min gerührt. Zur Inaktivierung des Trypsins werden 25ml Feedermedium hinzugefügt. Die Zellsuspension wird in Zentrifugenröhrchen überführt und 5min bei 1000rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wird in Feedermedium resuspendiert und die Zellen in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/10cm Schale in 10ml Feedermedium ausgesät. Nach 3-4 Tagen sind die Zellen konfluent und können in Aliquots eingefroren werden.

#### 4.11.3 Kultur embryonaler Fibroblasten

Embryonale Fibroblasten werden in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/10cm Schale in 10ml Feedermedium ausgesät. Nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens (4-5x10<sup>6</sup> Zellen/10cm Schale) werden die Zellen 1:4 gesplittet. Dazu werden die Platten 2x mit PBS gewaschen, mit 2ml 1fach Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert, vereinzelt und in 6ml Feedermedium zentrifugiert. Das Zellpellet wird in Feedermedium resuspendiert und die Zellen werden ausgesät.

#### 4.11.4 Vorbereitung von „Feederlayern“ für die ES-Zellkultur

Die Kultivierung embryonaler Stammzellen erfolgt auf einem konfluenten Zellrasen inaktivierter embryonaler Fibroblasten (Feederlayer).

Konfluente Feederschalen werden zur Inaktivierung 2-3h mit MitomycinC (10µg/ml) in Feedermedium inkubiert. Danach werden die Zellen 3x mit PBS gewaschen, trypsiniert, vereinzelt und zentrifugiert. Das Zellpellet wird in Feedermedium aufgenommen und auf  $2-3 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Die Zellen werden nach folgender Tabelle auf gelatinisierten Platten ausgesät:

Platte	Fläche (cm <sup>2</sup> )	Relative Größe	Feederzellsuspension ml	Anzahl der Platten
10cm	78,5	1	10	1
6cm	28	1:2,8	3,3	3
6well	9,6	1:8	1,25/well	8wells
24well	1,8	1:44	0,2/well	2
96well	0,38	1:100	0,05/well	2

#### 4.11.5 Kultivierung embryonaler Stammzellen

Undifferenzierte embryonale Stammzellen (ES-Zellen) bilden bei geeigneten Kulturbedingungen klar voneinander abgegrenzte Kolonien. ES-Zellen werden bei 37°C und 7,5%CO<sub>2</sub> kultiviert. Dem ES-Zellmedium wird muriner Leucocyte inhibitory factor zugesetzt, der die Zellen bei täglichem Mediumwechsel, über einen längeren Zeitraum in ihrem undifferenzierten Zustand hält (Smith et al., 1992). ES-Zellen werden in einer Dichte von max.  $1 \times 10^6$  Zellen/10cm Schale auf einem Feederlayer ausgesetzt und zwei bis drei Tage kultiviert. Zum Splitten werden die Zellen 2x mit DMEM gewaschen, trypsiniert, vereinzelt und zentrifugiert (1000rpm, 5min). Das Zellpellet wird in ES-Zellmedium resuspendiert und die Zellen erneut auf einem Feederlayer ausgesät.

#### 4.11.6 Elektroporation von ES-Zellen

4-5h vor der Elektroporation wird ein Mediumwechsel durchgeführt, um die Anzahl der Zellen die sich zum Zeitpunkt der Elektroporation in der S-Phase befinden zu erhöhen. Die Zellen werden 2x mit DMEM gewaschen, trypsiniert, vereinzelt und pelletiert (1000rpm, 5min). Das Pellet wird in Transfektionsmedium resuspendiert und die Zellsuspension wie



oben zentrifugiert.  $1 \times 10^7$  Zellen werden mit 800  $\mu$ l Transfektionsmedium und 25  $\mu$ l des zu elektroporierenden Vektors gemischt und in eine Elektroporationsküvette gegeben. Nach Applikation eines Pulses von 250  $\mu$ F und 400V wird die Küvette für 10min auf Eis inkubiert. Die ES-Zellen werden in ES-Medium in einer Dichte von  $2 \times 10^6$  (bei Einfachselektion mit G418) bzw.  $5 \times 10^6$  (Doppelselektion mit G418 und Gancyclovir) auf Feederlayern ausgesät und täglich einem Mediumwechsel unterzogen.

#### **4.11.7 Selektion von ES-Zellen und Isolierung resistenter Einzelklone**

Zur Einfachselektion wird das ES-Zellmedium nach 48h mit 200  $\mu$ g/ml aktivem G418 versetzt. Bei einer Doppelselektion wird bereits nach 2 Tagen 200  $\mu$ g/ml aktives G418 zu dem ES-Zellmedium gegeben, während nach weiteren 48h die Doppelselektion mit 200-280  $\mu$ g/ml aktivem G418 und 0,2  $\mu$ M Gancyclovir-Natriumsalz beginnt. Nach 8-12 Tagen werden makroskopisch sichtbare, undifferenzierte Zellklone unter einem Binokular gepickt, indem man die Klone mit einer 200  $\mu$ l Spitze anhebt und in eine 96well U-Bodenschale überführt, in die 30  $\mu$ l Trypsin/EDTA vorgelegt wurden. Die 96well Schale wird im Brutschrank inkubiert, die Zellen mit 200  $\mu$ l ES-Medium versetzt, einer 8-Kanalpipette vereinzelt und auf eine 96well Schale mit Feederlayer transferiert. Nach max. 3 Tagen mit täglichem Mediumwechsel und ständigem Selektionsdruck wird eine Replikplatte angelegt. Dazu wird die Originalplatte 1:1 gesplittet und weggefroren, während die Replikplatte zur Gewinnung von genomischer DNA weiterkultiviert wird. Um die DNA Ausbeute zu erhöhen werden die Klone von der 96well Schale nach 2 Tagen auf gelatinierte 24well Platten umgesetzt. Zur Isolierung der genomischen DNA wird wie unter (4.10.5) beschrieben verfahren.

#### **4.11.8 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Die einzufrierenden Zellen werden trypsinisiert, zentrifugiert (1000rpm, 5min), das Pellet in einem adäquaten Volumen Einfriermedium resuspendiert, in Einfriergefäße überführt und in einem Isopropanolbad bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Eine längerfristige Lagerung der Zellen erfolgt in flüssigem Stickstoff.

Nachdem die Zellen direkt in einer Mehrfachwellplatte eingefroren wurden, werden nach der Trypsinierung die well-Schalen mit Einfriermedium aufgefüllt. Die Kulturschale wird in einer Styroporbox bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die gefrorenen Zellen werden bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut, um möglichst schnell das toxische DMSO zu entfernen, und in ein Zentrifugenröhrchen mit Feedermedium überführt. Nach Zentrifugation (1000rpm, 5min) wird das Pellet in dem entsprechenden Medium resuspendiert und die Zellen werden ausplattiert.

### **4.12 Erzeugung chimärer Tiere**

#### **4.12.1 Superovulation und Ammenmütter**

Mithilfe eines hormonellen Stimulus wird die Anzahl der sich entwickelnden Eizellen und damit die Menge isolierbarer Blastozysten gegenüber unbehandelten Tieren signifikant erhöht. Im Allgemeinen werden vier bis sechs Wochen alte C57bl/6 Mäuse verwandt und es wird nach folgendem Zeitplan verfahren:

Tag 0	10units PMS i.p. injizieren
Tag 2 (max. 48 nach PMS Gabe)	10units HCG i.p. injizieren Verpaarungen ansetzen
Tag 3	Weibchen mit Vaginalplug absetzen
Tag 5	Blastozysten isolieren

Parallel zu den Mäusen die als Spendertiere für Blastozysten dienen, werden Verpaarungen der Ammenmütter angesetzt. Als Ammenmütter dienen 8-16 Wochen alte MF1 Weibchen, die mit vasektomierten Männchen verpaart und am nächsten Tag auf Vaginalplug untersucht wurden.

#### **4.12.2 Blastozystenisolation**

Zur Blastozystenisolation werden die Spendertiere getötet, das Fell mit 70%igem Alkohol desinfiziert und die obere Hautschicht ohne Verletzung der Peritonealhöhle geöffnet. In einem zweiten Schritt wird die Peritonealhöhle geöffnet und der Uterus mit anhängendem Eileiter freipräpariert. Fett und Blutgefäße werden vom Uterus getrennt, der in eine 6cm Schale mit M2 Medium überführt wird. Zum Ausspülen der Uteri wird von einer 26Gauge Nadel die Spitze abgeschnitten und die unteren 10-20mm der Nadel werden in einem 45° Winkel gebogen. Diese Nadel wird an eine mit M2 Medium gefüllte Spritze gesteckt und die Nadel in das vaginal zugewandte Ende des Uterus eingeführt. Durch Zufuhr von Medium in den Uterus wird der Übergang zum Eileiter eindeutig sichtbar, der aufgeschnitten wird, sodass die Blastozysten in das Medium gespült werden. Die Blastozysten werden nachdem sie sich im Medium abgesetzt haben, (ca. 5min) mit einer Pipette aus dem Medium aufgesammelt, in M16 Medium gespült und in Mikrotropfenkulturen mit vorinkubiertem M16 Medium unter embryogetestetem Paraffinöl bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> bis zur Injektion aufbewahrt.

#### **4.12.3 Injektion von ES-Zellen in Blastozysten**

Die ES-Zellen werden trypsiniert und das Pellet in ES-oder M2-Medium aufgenommen und auf Eis gelagert. In die Injektionskammer werden zwei bis drei Blastozysten sowie mehrere hundert ES-Zellen gegeben. Die ES-Zellen werden perlschnurartig in der Injektionskapillare gesammelt. Die Blastozyste wird durch Mediumausstoß so orientiert, dass sich die innere Zellmasse entweder an der Öffnung der Haltekapillare oder um 90° gedreht befindet. Die Blastozyste wird so fixiert, dass in der Focusebene zwischen Halte- und Injektionskapillare im Trophektoderm eine Zellgrenze sichtbar wird. Die Injektionsnadel wird soweit angenähert, dass ein leichter Druck auf die Zona Pellucida an der späteren Einstichstelle ausgeübt wird. Die Injektion in das Trophektoderm erleichtert die Penetration, minimiert Blastozystenschädigungen und verringert ein Verstopfen der Injektionskapillare. Ist die Injektionskapillare eingedrungen, werden 7-15 ES-Zellen möglichst direkt auf der inneren Zellmasse abgelegt, die Injektionsnadel herausgezogen und die Blastocyste freigegeben. Injizierte Blastozysten kollabieren zunächst, zeigen aber bei erfolgreicher Injektion bereits nach 1-4h in Kulturmedium wieder eine normale Morphologie.

#### **4.12.4 Narkose und Embryotransfer**

Zum Transfer werden sechs bis acht der injizierten Blastozysten mit M2 perlschnurartig in einer Transferpipette angeordnet und durch eine Luftblase in beide Richtungen begrenzt. Als Narkotikum werden Avertin bzw. Pentobarbital benutzt. Im ersten Fall werden 2,5g 2,2,2-Tribromethanol bei 50°C unter Rühren in 5ml 2-Methyl-2-Butanol gelöst und 200ml H<sub>2</sub>O hinzugefügt. Für die Narkose mit Avertin wird eine Dosis von 0,2-0,35ml/g Körpergewicht verwendet, die intraperitoneal injiziert wird. Dient Pentobarbital als Narkotikum, wird eine Pentobarbital-Lösung (5,4mg) hergestellt und 70-90µl/g Körpergewicht werden intraperitoneal appliziert.

Das Fell der narkotisierten Tiere wird im Rückenbereich mit ETOH (70%) desinfiziert und mit einem Schnitt entlang des Rückrates in Höhe der Uteri geöffnet. Nach Lokalisation der Eileiter wird das Peritoneum geöffnet und ein Uterushorn an dem anhängenden Fettgewebe herausgezogen. An diesem Fettgewebe wird ein Serafinclip befestigt und das Uterushorn fixiert. Mit einer Injektionsnadel erfolgt eine Punktion in Richtung der Uterushöhle. In die Punktionsstelle wird die Transferpipette eingeführt und die Blastozysten werden in den Uterus transferiert. Die aufgenommenen Luftblasen dienen als optisches Hilfsmittel während des Transfers. Nach der Injektion wird der Uterus ohne Druck in den Peritonealbereich zurückgeführt. Nach gleichem Schema wird mit dem zweiten Uterushorn verfahren.

#### **4.12.5 Test der Chimären auf Keimbahntransmission**

Chimäre Tiere werden mit wildtypischen Mäusen aus dem gleichen Stamm verpaart, aus dem die für die Injektion genutzten Blastozysten isoliert wurden.

Da die ES-Zellen aus 129ola Tieren stammen, einem Mausstamm mit cremefarbenen Fell, sind Nachkommen der Verpaarungen mit einem gemischten genetischen Hintergrund an der Fellfarbe eindeutig von denjenigen Geschwistern zu unterscheiden, bei denen keine Keimbahntransmission vorliegt.

### **4.13 Thrombozytenexperimente**

#### **4.13.1 Präparation von Thrombozyten**

Die Mäuse werden anästhesiert, die Haut und das Peritoneum geöffnet und die Vena cava freigelegt. Zuvor wird eine Spritze mit einer „21gauge“ Nadel und 150µl ACD (Anticoagulant, 150µl/ml Blut) vorbereitet. Pro Maus wird ca. 1ml Blut entnommen und mit 0,75ml vorgewärmten (37°C) Tyrode-Puffer gemischt. Eine weitere Möglichkeit der Blutentnahme besteht darin die Mäuse mit Äther zu betäuben und das Blut mithilfe von heparinisierten Glaskapillaren aus dem retro-orbitalen Plexus zu entnehmen. Wieder werden 150µl ACD in Eppendorfgefäßen vorgelegt, ca. 1ml Blut pro Maus entnommen und wie bei der peritonealen Blutentnahme verfahren. Es folgt eine Zentrifugation bei 250g (8min, 37°C). Anschließend wird vorsichtig das PRP (platelet rich plasma) abgenommen und für 5min bei 37°C inkubiert. Vor der nächsten Zentrifugation (1000g, 5min, 37°C) werden 5µl PGI<sub>2</sub>/ml (0,1mM) zu dem Ansatz gegeben. Das Thrombozytenpellet wird vorsichtig in 1ml Puffer (Tyrode-Puffer, 5µl PGI<sub>2</sub> (0,1mM), 2µl Heparin (25000I.E.) resuspendiert und 5min bei 37°C

inkubiert. Direkt vor der folgenden Zentrifugation (1000g, 5min, 37°C) werden weitere 5µl/ml PGI<sub>2</sub> (1mM) hinzugefügt. Das Pellet wird in Tyrode-Puffer und 5µl/ml PGI<sub>2</sub> (1mM) resuspendiert und die Zahl der Thrombozyten/ml bestimmt.

#### **4.13.2 Retroorbitale Blutentnahme**

Alternativ zu der unter 4.13.1 beschriebenen Blutentnahme, besteht die Möglichkeit für Thrombozytenexperimente Blut aus dem retroorbitalen Plexus ätherbetäubter Mäuse zu entnehmen. Dazu werden Glaskapillaren mit einem Diamantsplitter auf ca. 1,5cm Länge geschnitten und heparinisiert. Diese Kapillaren werden durch eine vorsichtige Drehbewegung hinter das Auge geführt und der Druck auf die Kapillare solange erhöht, bis Blut über die Kapillare in ein Eppendorfgefäß läuft. Die Aufbereitung des so gewonnen Blutes erfolgt wie unter 4.13.1 beschrieben.

#### **4.13.3 Bestimmung von Blutungszeiten**

Die Mäuse werden wie unter 4.12.4 beschrieben anästhesiert. Ca. 0,5 cm der Schwanzspitze werden mit einem Skalpell abgeschnitten, die Schwanzspitze in isotope Kochsalzlösung (37°C) gelegt und der Blutstrom beobachtet. Die Tiere werden solange als blutend bezeichnet, bis es zu einem Reiß des „Blutfadens“ kommt.

#### **4.13.4 Bestimmung der Aggregation von Thrombozyten am Aggregometer**

Die Aggregationsmessung erfolgt in einem optischem Aggregometer, das über die Lichttransmission bei einer festgesetzten Wellenlänge den Grad der Aggregation misst, wobei die optische Aggregation proportional zu der kontinuierlich gemessenen Veränderung der Lichttransmission zwischen Test- und Referenzprobe ist.

Pro Aggregationsmessung werden  $1,5 \times 10^8$  Thrombozyten in 250µl Lösung benötigt. Vor dem eigentlichen Versuch erfolgt eine einstündige Inkubation bei 37°C. Zu Beginn dieser Inkubation werden dem Ansatz 7,5µl Apyrase (0,02u)/ml Thrombozyten zugesetzt. In einigen Experimenten werden weitere 8µl (62,5u/ml) 2min vor dem eigentlichen Experiment zu 250µl Thrombozyten hinzugegeben. Nach Gabe verschiedener Agonisten wird die Aggregation optisch in einem Aggregometer gemessen.

### **4.14 Immunologische Methoden**

#### **4.14.1 Isolation von Zellen aus Mausorganen**

Lymphknoten, Milz, Peyer'sche Plaques, Thymus: Nach der Entnahme werden die verschiedenen Organe in vorgekühltem PBS auf Eis gelagert und anschließend mit 3ml PBS mithilfe der Rückseite des Stempels einer Einwegspritze durch ein Metallsieb gerieben. Die Gewebesuspension wird in einer 10well Schale aufgefangen und von dort in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach 5min. Zentrifugation bei 4°C und 1500rpm wird das Zellpellet in DMEM oder FACS-Puffer gewaschen.

#### 4.14.2 Durchflusszytometrie

Die Zellen werden zweimal mit PBS und einmal in FACS-Puffer (2% FCS, 0,1% Azid in PBS) gewaschen, in FACS-Puffer in einer Konzentration von  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml aufgenommen und 30min auf Eis inkubiert. Zu jeweils 200 $\mu$ l der Zellsuspension ( $5 \times 10^5$  Zellen) werden 0,1-2 $\mu$ l markierte Antikörper gegeben und eine weitere Stunde auf Eis inkubiert. Pro Ansatz wird 1ml FACS-Puffer zugegeben, 5min bei 540 rpm zentrifugiert und der Überstand mit nicht gebundenen Antikörpern abgenommen. Bei Verwendung von biotinylierten Antikörpern werden die Zellen in 200 $\mu$ l FACS-Puffer mit 1,0-1 $\mu$ l Streptavidin-Phycoerythrin, Streptavidin-FITC oder Streptavidin-APC resuspendiert und 1h auf Eis inkubiert. Zu jedem Ansatz wird 1ml FACS-Puffer mit 1 $\mu$ g/ml Propidiumjodid zugegeben und 5min bei 540xg zentrifugiert. Das Pellet wird in 500 $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen und vor jeder Messung gründlich resuspendiert. Durch Propidiumjodid werden tote Zellen angefärbt, „gegatet“ und somit aus der Messung herausgenommen. Für Doppel- bzw. Dreifachmarkierungen werden die Zellen parallel mit verschiedenen Antikörpern gefärbt, die mit unterschiedlich fluoreszierenden Molekülen (FITC, PE, APC) markiert waren.

#### 4.15 Partielle Hepatektomie

Zur Anästhesie der Mäuse werden Xylazin (2%), Ketanest (50mg/ml) und sterilfiltriertes NaCl (0,9%) im Verhältnis 1:1:9 verdünnt und pro 25g Maus 330 $\mu$ l i.p. injiziert.

Die zu operierende Maus wird am Bauch rasiert, desinfiziert und auf dem Rücken liegend auf einer Wärmematte fixiert. Die Haut wird von der Symphyse bis kurz über das Sternum geöffnet und die Hautränder beiseite geschoben. Das Peritoneum wird in derselben Länge geöffnet und die Öffnung durch Haken fixiert. In regelmäßigen Abständen wird der Darm mit 37°C warmen 0,9%igem NaCl befeuchtet. Das Ligamentum falciforme hepatis wird soweit wie möglich durchtrennt und der linke sowie der vordere Leberlappen werden mit einem Faden abgebunden. Die abgebundene Leber wird so nah wie möglich an der Ligatur abgeschnitten und das Abdomen mit erwärmtem 0,9%igen NaCl gespült. Der Vorgang wird am rechten Leberlappen wiederholt, sodass 70% der Gesamtleber entfernt wurden. Das Abdomen wird vor dem Setzen der Peritoneal- und der Hautnaht zwei- bis dreimal mit 400 $\mu$ l erwärmtem NaCl gespült. Nach 72h wird die Maus getötet, die Restleber gewogen und zu dem Gewicht des Resektats ins Verhältnis gesetzt.

#### 4.16 Endothelzell-Präparation

##### 4.16.1 Isolierung von Endothelzellen aus Maus Aorta

Nach Anästhesie der Mäuse wird die Aorta unter sterilen Bedingungen entnommen, in PBS ohne  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$  gespült und sorgfältig von periaortalen Fett sowie anderen Geweben gesäubert. Das Gefäß wird longitudinal aufgeschnitten und in 1-2mm große Stücke geschnitten. Diese Fragmente werden mit der intimalen Seite nach unten auf Matrigel beschichtete 6well Platten gelegt und mit 200 $\mu$ l endotheliale WachstumsmEDIUM bei 37°C und 5%  $CO_2$  inkubiert. Nach Adhäsion der Aortenstücke wird das Mediumvolumen auf 1ml erhöht. Nach jeweils 48h werden 60% des Mediums abgenommen und gegen frisches

Medium ausgetauscht. Nach 7-10 Tagen beginnt das Auswachsen von Endothelzellen aus den Aortensegmenten. Die Aortenstücke werden entfernt und die Endothelzellen bis zur Konfluenz weiterkultiviert.

#### **4.16.2 Passagieren und Wachstum von Endothelzellen**

Zum Passagieren der Zellen auf den Matrigelplatten wird das Medium entfernt und die Zellen werden für 60-90s bei 37°C in 2ml/10cm<sup>2</sup> (100u) Dispase inkubiert. Um die Dispase-Aktivität zu stoppen wird Wachstumsmedium zu dem Dispaseverdau gegeben. Die Zellen werden geerntet und pelletiert (5min, 1000rpm). Das Zellpellet wird in DMEM resuspendiert und der Waschschritt zweimal wiederholt. Nach Resuspension des Pellets in Endothelzell-Medium wird die Suspension auf gelatierte 6well Platten ausgesät und 60% des Mediums werden nach jeweils 48h durch frisches Medium ersetzt. Sind die Zellen konfluent, werden sie zweimal mit Kalzium-freiem PBS mit 0,1mM EDTA gewaschen, für 180s trypsinisiert und wieder auf Matrigel-beschichtete 6well Platten ausgesät .

#### **4.16.3 Immunhistochemische Techniken zur Identifizierung von Endothelzellen**

Die zu untersuchenden Zellen werden auf autoklavierten Glasplättchen ausgesetzt und für 48h unter o.g. Bedingungen kultiviert. Zu Versuchsbeginn werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und das Glasplättchen aus der Kulturschale entfernt. Die Fixierung der Zellen auf dem Glasplättchen erfolgt bei -20°C (20min) in einem Methanol/Aceton Gemisch (7/3). Die Permeabilisierung wird bei RT mit 0,25%TritonX100 in TBS (30min) durchgeführt. Als 1. Antikörper wurde entweder der Kaninchen Anti-humane vonWillebrandt-Faktor Antikörper (1:300 in TBS, 1%BSA) oder der Ratten Anti-mouse monoklonale PECAM-1 (CD31) Antikörper (1:50 in TBS, 1%BSA) verwendet. Die Inkubation mit dem 1. Antikörper wird über Nacht bei 4°C durchgeführt. Die Zellen werden dreimal mit 0,1% Tween in TBS gewaschen und 1h bei RT mit dem 2. Antikörper inkubiert (Alkaline-Phosphatase konjugierter, monoklonaler Anti-Kaninchen IgG Antikörper für vWF Antikörper, Ziege Anti-Ratte IgG spezifischer polyklonaler Antikörper für den PECAM-1 Antikörper). Nach dreimaligem Waschen mit TBS erfolgt die Farbreaktion mit NBT und BCIP als Substrate im alkalischen Phosphatasepuffer. Dazu werden 672µl NBT und 700µl BCIP mit 200µl Färbepuffer gemischt und die Lösung auf die Plättchen gegeben. Die Farbreaktion erfolgt im Dunkeln und ist nach 3-5min abgeschlossen.

#### **4.17 Isolierung von Kardiomyozyten**

Zur Isolierung von Kardiomyozyten werden Mäuse wie unter 4.12.4 beschrieben anästhesiert. Das Herz wird isoliert und in eisgekühltem Ca<sup>2+</sup>-freiem Perfusionspuffer gehalten. Nichtkardiales Gewebe wird entfernt und eine Kanüle über die Aorta ins Herz gelegt. Für 4min wird eine nicht rezirkulierende, Ca<sup>2+</sup>-freie Perfusion durchgeführt (3.5-4ml/min), gefolgt von einer 15-minütigen, rezirkulierenden Perfusion in einem enzymatischen Verdau-Puffer. Dazu wird der Perfusionspuffer mit 0,08% Collagenase, 0,1% Trypsin, 0,1% BSA, 10 mM Butandion Monoxim (BDM) und 25µM Ca<sup>2+</sup> vesetzt. Bei erfolgreichem Verdau werden

die Herzen weich und farblos, die Ventrikel entfernt und in 5-6 kleine Stücke geschnitten. Durch das Zerkleinern werden Kardiomyozyten freigesetzt. Die Ventrikelstücke werden in  $\text{Ca}^{2+}$ -freies Medium, angereichert mit 20mM BDM, gelegt. Diese Suspension wird mit einer serologischen Pipette (Innendurchmesser 4mm) dispergiert, die dispergierten Zellen werden durch ein 200 $\mu\text{M}$  Nylonnetz gefiltert und durch zweimalige Zentrifugation bei 50xg für 1min gewaschen. Das resultierende Pellet wird in Perfusionsmedium mit 0,1% BSA und 20 mM BDM suspendiert.  $\text{CaCl}_2$  wird aus einem 1M Stock schrittweise, in 4min Abständen, unter sanftem Schwenken dazugegeben, bis Konzentrationen von 50, 100, 200, 500 und 1000 $\mu\text{M}$  erreicht werden. Anschließend werden die Zellen abermals zentrifugiert und in Medium mit 1mM  $\text{Ca}^{2+}$ , ohne BDM resuspendiert. Die frisch isolierten Kardiomyozyten werden umgehend für die entsprechenden Experimente genutzt (Hilal-Dandan et al., 2000).