

## II

## METHODEN UND METHODENETABLIERUNG

## 2.1 Zellkulturbiologische Methoden

Die hier aufgeführten Techniken basieren zum großen Teil auf Standardprotokollen wie solchen in Matise et al. (2000), sind aber vielfach mehr oder weniger stark modifiziert und werden daher ausführlich dargestellt.

### 2.1.1 Kultivierung embryonaler Fibroblasten der Maus

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, werden embryonale Stammzellen der Maus standardmäßig auf einer Schicht mitotisch inaktiver embryonaler Maus-Fibroblasten (MEFs), einem sog. *feeder layer*, kultiviert, um spontane Differenzierung unterbinden. Da sich Fibroblasten in Kultur nicht unbegrenzt vermehren lassen, müssen sie in regelmäßigen Abständen frisch isoliert werden.

#### **Isolation embryonaler Fibroblasten**

Eine schwangere Maus, wegen erhöhter Wurfgröße vorzugsweise eines Auszuchtstammes wie CD1 oder eines F1-Hybrids wie B6xC3H, wurde am 13. Tag *p.c.* durch Genickbruch getötet. (Tag 1 sei hierbei der Tag, an dem der Vaginalplug beobachtet wurde.) Der zweihörnige Uterus mit den Embryonen darin wurde herausgeschnitten und in ein Becherglas mit PBS überführt. Die Embryonen wurden in einer Zellkulturschale isoliert, d.h. von Plazenta und Fruchtblase befreit. Anschließend waren der Kopf und dunkelrote Organe wie Leber und Herz, die im Wesentlichen keine Fibroblasten enthalten, zu entfernen. Die Überreste wurden mit Hilfe einer Rasierklinge soweit zerkleinert, bis sie pipettierbar waren. Die Gewebestückchen wurden dann mit 1ml Trypsin-EDTA pro Embryo-Äquivalent sowie 100 Kunitz-Units DNase I pro ml versetzt und zusammen mit einigen Glaskügelchen von ca. 5mm Durchmesser in ein 50ml-Falconröhrchen überführt. In waagerechter Position wurde das Röhrchen dann auf einem 37°C-Schüttler langsam für 15min geschwenkt, um eine Einzelzellsuspension zu erzeugen. Die DNase diente dabei dem Verdau durch eventuelle Zelllyse freigesetzter genomischer DNA und damit der Reduzierung der Viskosität. Der Trypsin-Verdau wurde gestoppt durch Zugabe von ca. 2 Vol MEF-Medium:

	DMEM
10% (v/v)	FCS
1% (v/v)	L-Glutaminlösung (100X = 200mM)
1% (v/v)	Penicillin-/ Streptomycinlösung (100X)

Unverdaute Gewebestückchen wurden anschließend innerhalb von einigen Minuten zu Boden sinken gelassen, so dass der Überstand als Einzelzellsuspension vorsichtig abgenommen und 5min bei 200g zentrifugiert werden konnte. Das Pellet wurde in warmem MEF-Medium aufgenommen, in einer Konzentration von einem Embryo-Äquivalent pro 10cm-Kulturschale ausplattiert und bei 37°C / 5% CO<sub>2</sub> / 95% Luftfeuchtigkeit (Standardbedingungen) inkubiert. Die Fibroblasten waren nun im Wesentlichen der einzige Zelltyp, der auf den Zellkulturschalen haftet. Die übrigen Zellen konnten daher durch Mediumwechsel am folgenden Tag entfernt werden. Sobald die Platten nach wenigen Tagen konfluent bewachsen waren, wurden die Fibroblasten eingefroren.

### **Einfrieren von MEFs**

Konfluent bewachsene Zellkulturplatten wurden trypsinisiert, d.h. mit PBS ein- bis zweimal gewaschen und anschließend mit einer Menge Trypsin-EDTA behandelt, die gerade ausreichte, um den Schalenboden zu bedecken. Sobald sich die Zellen vom Boden ablösten, wurde die Reaktion durch Zugabe eines mehrfachen Volumens MEF-Medium "gelöscht" und die Zellsuspension wie oben zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in kaltem Gefriermedium (10% (v/v) DMSO in MEF-Medium) aufgenommen und in Kryoröhrchen auf Eis überführt. Die Konzentration betrug im Fall frisch isolierter MEFs 1 Embryo-Äquivalent, d.h. eine konfluente 10cm-Schale, pro ml. Frisch isolierte Fibroblasten erhielten die Bezeichnung "Passage 0". Die Röhrchen wurden anschließend in einer vorgekühlten Styroporbox in einen -80°C-Gefrierschrank gestellt und am Folgetag bis zum weiteren Gebrauch in Flüssigstickstoff gelagert.

### **Auftauen und Expansion**

Das Auftauen von Gefrieröhrchen erfolgte im 37°C-Wasserbad. Die Zellsuspension wurde danach in warmes MEF-Medium überführt und zentrifugiert, um das DMSO aus dem Gefriermedium zu entfernen. Die pelletierten Zellen wurden anschließend in MEF-Medium aufgenommen und im Vergleich zum eingefrorenen Titer im Verhältnis 1/2 bis 1/4 ausplattiert und kultiviert ("Passage 1"). Sobald die Kulturplatten erneut konfluent bewachsen (aber nicht überwachsen) waren, wurden sie zur weiteren Expansion wieder in oben genanntem Verhältnis auf neue Schalen verteilt (Trypsinierung - Zentrifugation - Ausplattieren) oder aber durch Mitomycin-C-Behandlung teilungsinaktiviert, wonach sie als *feeder layer* für embryonale Stammzellen dienen konnten (siehe nächster Abschnitt). Um nicht zu häufig primäre Fibroblasten isolieren zu müssen, sollten die Zellen frühestens nach zwei Passagen

der Mitomycin-C-Behandlung unterzogen werden. (Je nach Qualität der Präparation können MEFs ca. bis zu 5mal in einem Verhältnis von 1/3 umplattiert werden, bis sich ihr Proliferationstempo verlangsamt und sie sich damit nicht mehr für die Herstellung von *feeder layern* eignen. Da man andererseits Experimente nicht zu langfristig planen möchte, ist es sinnvoll, auch MEFs der zweiten bis vierten Passage einzufrieren.)

### Generierung von *feeder layern*

Eine subkonfluente Kulturschale wurde für zwei Stunden mit 10µg/ml des Teilungsspindelgiftes Mitomycin C (Martin und Evans, 1975) in MEF-Medium behandelt. Um dabei ggf. abgetötete Zellen auszusortieren, wurden die Fibroblasten umplattiert, und zwar in einem Verhältnis von ca. 3/4 bis 1 - je nachdem, wie dicht die Platte zuvor bewachsen war. Man kann hier mit einer sehr hohen Plattierungseffizienz rechnen. Ziel beim Umplattieren war es immer, eine optimale Zelldichte nach Wiederanwachsen zu erzielen: die Fibroblasten sollten den Kulturschalenboden nahezu vollständig bedecken, aber sich dabei nicht allzu sehr "in die Quere" kommen. Die Qualität der *feeder layer* ist sehr wichtig für die Qualität der ES-Zellen, die später darauf wachsen. Wichtigstes Kriterium ist neben der Zelldichte das Datum der Mitomycin-C-Behandlung: ES-Zellen sollten frühestens 24 Stunden und spätestens drei Tage danach ausplattiert werden.

## 2.1.2 Kultivierung embryonaler Stammzellen

### ES-Medium

Das Nährmedium zur Kultivierung embryonaler Stammzellen setzte sich wie folgt zusammen (vgl. Materialverzeichnis im Anhang):

		DMEM
15	% (v/v)	FCS
1	% (v/v)	L-Glutaminlösung (100X = 200mM)
1	% (v/v)	Penicillin-/ Streptomycinlösung (100X)
1	% (v/v)	LIF (100X = 10 <sup>5</sup> U/ml-Stocklösung in DMEM)
1	% (v/v)	Lösung nichtessentieller Aminosäuren (100X)
0,2	% (v/v)	Mercaptoethanol (500X = 50mM)

Mit Ausnahme des *leukemia inhibitory factor* wurden alle Komponenten gemäß der Hersteller-Empfehlungen gelagert. Um möglichen Kontaminationen vorzubeugen, wurden Aliquots der LIF-Stocklösungen in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zum Gebrauch bei -20°C aufbewahrt. Die Chargen an FCS können sich in ihrer Wirkung auf das Wachstum der ES-Zellen unterscheiden. Daher wurden für jede verwendete ES-Zelllinie mehrere Chargen von unterschiedlichen Herstellern getestet und letztlich diejenige ausgewählt, mit der nach mehrmaligem Umplattieren die besten Ergebnisse hinsichtlich Wachstumsgeschwindigkeit, Plattierungseffizienz und Kolonimorphologie zu erzielen

waren. Das ES-Medium wurde stets möglichst frisch angesetzt und in den Kulturschalen i.d.R. täglich gewechselt, um einer möglichen Ansäuerung durch die Zellen zuvorzukommen.

### Kultivierung von ES-Zellen

Die verwendete ES-Zelllinie war E14.1, ein von Ralf Kühn selektierter Subklon (in Torres und Kühn, 1997) der von Hooper et al. (1987) aus dem Mausstamm 129/Ola etablierten Linie E14. Die ES-Zellen wurden mit wenigen Ausnahmen auf einem *feeder layer* aus teilungsinaktivierten Fibroblasten kultiviert (s.o.). Eingefrorene ES-Zellen wurden wie MEFs schnell im 37°C-Wasserbad aufgetaut, in warmes Medium überführt, abzentrifugiert, in frischem ES-Medium aufgenommen und in einer Dichte ausplattiert, die gerade zu gut separierten ES-Zellkolonien führt (um 500 Kolonien pro cm<sup>2</sup>). Dabei ist der Zelltitel und die Plattierungseffizienz nach dem Auftauen - d.h. der Anteil ausplattierter Zellen, die wachsende ES-Zellkolonien bilden - zu berücksichtigen. Da die Plattierungseffizienz zwischen unterschiedlichen Chargen eingefrorener Zellen variieren kann, wurde auf eine Bestimmung der Zellkonzentration in den Gefrier Röhrchen verzichtet. Vielmehr wurde der "effektive" Zelltitel durch Ausprobieren von Charge zu Charge neu bestimmt.

Routinemäßig - etwa zur einfachen Expansion oder zur Vorbereitung eines Experiments - wurden ES-Zellen maximal drei Tage lang auf derselben Schale kultiviert, denn bei längerer Kultivierung bestünde Gefahr, dass sie trotz *feeder layer* und exogener Zugabe von LIF zunehmend spontan differenzieren. Der Effekt von exogenem LIF und *feeder layer* auf die Morphologie junger ES-Zellkolonien unter dem Mikroskop wird durch Abb. 2.1 veranschaulicht. Neben der Abwesenheit von LIF und *feeder*-Zellen kann frühe spontane Differenzierung auch durch schlechte *feeder*-Qualität (s.o.) oder unzureichende Vereinzelung der ES-Zellen zum Zeitpunkt des Ausplattierens hervorgerufen werden.

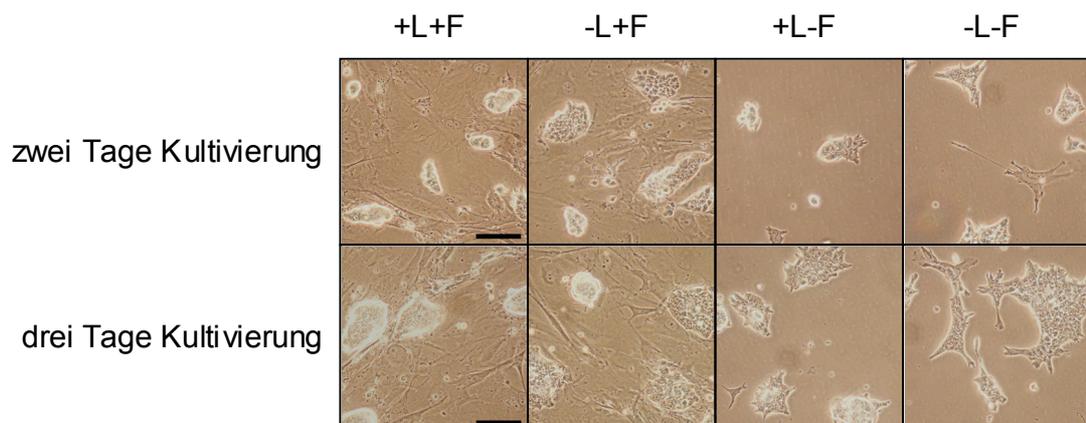


Abb. 2.1 Effekt von *feeder layer* und LIF auf die Gestalt von ES-Zellkolonien. Gezeigt sind Kolonien zwei bzw. drei Tage nach dem Ausplattieren. +L bzw. -L: Kultivierung mit bzw. ohne Zugabe von 1000 U/ml LIF ins ES-Medium; +F bzw. -F: Kultivierung mit bzw. ohne *feeder layer*. Erste Spalte: undifferenzierte ES-Zellkolonien (rundlich, hell) auf *feeder layer* (dunkles "Geflecht" unter den ES-Zellen, typische Fibroblasten-Morphologie). Die drei Tage alten Kolonien bestehen schätzungsweise je aus etwa 100 ES-Zellen. Zweite Spalte: einsetzende Differenzierung (dunkle Kolonien) bei Kultivierung ohne LIF im ES-Medium. Dritte Spalte: einsetzende Differenzierung bei Kultivierung ohne *feeder layer*. Im Gegensatz zu Spalte 2 differenzieren die ES-Zellen

hier weniger vom Inneren der Kolonien her sondern eher vom Kolonierand aus und bilden eckige Fortsätze. Diese Beobachtungen sind erklärbar mit der unterschiedlichen LIF-Lokalisation des in Kulturen ohne exogene Applikation des Faktors gegenüber solchen ohne *feeder layer* (Rathjen et al., 1990): Durch dessen EZM-assoziierte Spleiß-Form (siehe Einleitungsteil) werden die Kolonien quasi von unten her mit LIF versorgt, während die Differenzierungshemmung mit dem löslichem Peptid eher von oben auf die ES-Zellkolonien wirkt. Vierte Spalte: ohne LIF und *feeder*-Zellen schreitet die Differenzierung am schnellsten voran. Balken: 100µm.

Das Umplattieren von ES-Zellen folgte im Grunde denselben Arbeitsschritten wie im Falle der MEFs, allerdings kann bei der Behandlung mit Trypsin-EDTA versucht werden, die ES-Zellen von den *feeder*-Zellen zu trennen, wenn es das anschließende Experiment erfordert (beispielsweise die ES-Zell-Injektion in Blastozysten, siehe weiter unten): dazu wurden die Kulturen nur kurz "antrysiniert" und die Schale solange kräftig hin- und hergerüttelt, bis sich die intakten ES-Zellkolonien vom *feeder layer* ablösen. Die in der Trypsinlösung schwimmenden Aggregate wurden sodann in ein Falcon-Röhrchen überführt und einige Minuten lang weiter trypsiniert, bis sich die ES-Zellen durch Pipettieren (mit einer 200µl-Spitze) vereinzeln ließen. Erst dann wurde Medium hinzugefügt etc.. Auf diese Weise konnten bei Bedarf im Wesentlichen MEF-freie ES-Zellen präpariert werden. Alternativ wurden ES-Zellen auch auf *feeder*-freie Kulturschalen umplattiert und ein Tag später "geerntet".

Das Einfrieren von embryonalen Stammzellen passierte analog zu dem von Fibroblasten (siehe oben), und zwar i.d.R. ohne die *feeder*-Zellen abzutrennen. Auch wurde die Anzahl der Passagen, denen die ES-Zellen im Laufe der vorangegangenen Kultivierung unterzogen wurden, notiert. Dies hat den Hintergrund, dass viele ES-Zelllinien in Kultur karyotypisch instabil sind (Eggan et al., 2002), was zu Problemen führen kann, sobald man aus ihnen via Blastozysteninjektion Mäuse generieren möchte. Zu diesem Zweck sind Zellen mit geringer Passagenanzahl zu bevorzugen, weil sich das Problem der karyotypischen Degenerierung von Passage zu Passage verschärft. Beim Ausplattieren von ES-Zellen wurde darauf geachtet, diese zuvor durch Pipettieren gut zu vereinzeln.

### **Zählen von ES-Zellen und -Zellkolonien**

Wie bereits erwähnt, wurden ES-Zellen während der Routine-Kultivierung nicht gezählt, wohl aber im Laufe einiger Experimente (siehe Ergebnisteil). Die Bestimmung von ES-Zelltitern erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer, in der sich ES-Zellen und MEFs deutlich hinsichtlich Größe und Gestalt (ES-Zellen sind relativ klein und kreisrund) unterscheiden.

ES-Zellkolonien wurden unter dem Mikroskop direkt auf der Kulturschale ausgezählt, und zwar i.d.R. drei Tage nach dem Ausplattieren mit Hilfe einer in Abb. 2.2 dargestellten Zählscheibe - eines Musters, das, auf transparenter Folie ausgedruckt, mit Hilfe eines Tropfen Wassers provisorisch unter die Kulturschale geklebt wurde. Je nach Koloniedichte

konnten dann für die Gesamtplatte repräsentative Sektoren geeigneter Größe ausgezählt werden.

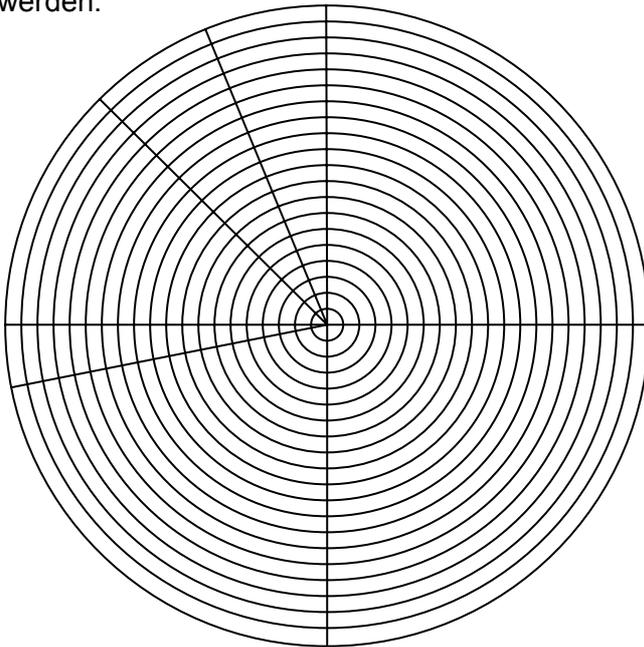


Abb. 2.2 Zählscheibe zum Auszählen von ES-Zellkolonien auf einer Kulturplatte (hier für eine 9cm-Platte). Je nach Koloniedichte wurde ein bestimmter Sektor ausgewählt (meist 1/32, 1/16 oder 1/8) dergestalt, dass er einige Hundert Kolonien enthielt. Die Kolonien darin wurden dann Ring für Ring unter dem Mikroskop quantifiziert. Um möglichen Unregelmäßigkeiten der Kolonieverteilung auf der Platte zu begegnen (hervorgerufen z.B. durch leichtes Schrägstellen der Schale im Inkubator), wurde der gleiche Sektor zwei weitere Male jeweils nach Drehen der Zählscheibe um 120° ausgezählt. Die Gesamtanzahl an ES-Zellkolonien auf der Kulturplatte ergab sich als Mittelwert der drei repräsentativen Zählungen multipliziert mit dem Kehrwert des dreifach ausgezählten Plattenanteils. Zählbar waren drei Tage alte Kolonien auf einer 9cm-Schale bis zu einer Gesamtanzahl von etwa 50.000.

### Picken von ES-Zell-Kolonien

ES-Zellkolonien waren frühestens eine Woche nach dem Ausplattieren groß genug, um zur weiteren Expansion mit einer 20µl-Pipette aufgenommen werden zu können. Der Größe der Kolonien entsprechend musste deren Dichte auf der Kulturschale gering sein. Um die spätere Trypsinierung zu erleichtern, wurde das ES-Medium ersetzt durch PBS. Mit Hilfe der schräg gehaltenen Pipettenspitze wurden einzelne Kolonien ein wenig auf dem *feeder layer* verschoben, um anschließend ruckartig in einem Volumen von maximal 20µl in die Pipettenspitze gesogen zu werden. Auf diese Weise aufgenommene Kolonien wurden dann überführt in 30µl Trypsin-EDTA und einige Minuten inkubiert, bis sich die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzeln ließen. Zur weiteren Expansion wurden die vereinzelteten Zellen anschließend zunächst in Näpfen von 24er-Multitierplatten (mit *feeder layer*) kultiviert.

### Chemische Mutagenese

Es wurden zwei Mutagene für die chemische Mutagenisierung von ES-Zellen verwendet, Trimethylpsoralen (TMP) und Ethylnitrosoharnstoff (ENU). Zur Mutagenisierung mit ENU wurden ES-Zellen als Suspension in ES-Medium (Titer:  $10^5$  bis  $10^6$  Zellen pro ml) versetzt mit dem Mutagen (Stocklösung 40mM in PBS, frisch angesetzt), 90 Minuten lang bei 37°C unter leichtem Schwenken inkubiert, anschließend abzentrifugiert, mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und in warmem Medium aufgenommen. Die mutagenisierten Zellen wurden anschließend entweder als solche eingefroren oder ausplattiert, um die Rate an überlebenden Zellen oder die Mutationsfrequenz zu bestimmen.

Die Mutagenisierung mit TMP erfolgte in Kombination mit Nah-UV-Bestrahlung der Zellsuspension, weil die Reaktion zwischen TMP und DNA aktiviert wird durch UV-Licht dieses Wellenbereichs. Realisiert wurde die UV-Bestrahlung durch Gebrauch einer einfachen Nah-UV-Handlampe ( $\lambda_{\max} \approx 365\text{nm}$ ), die über einer Kulturschale justiert wurde (siehe Abb. 2.3). Anders als mit ENU wurden die Zellen lediglich 15 Minuten lang mit TMP der gewünschten Konzentration vorinkubiert, um ein Gleichgewicht zwischen freiem TMP und in ES-Zell-DNA interkaliertem TMP einzustellen. (Kontrollexperimente zeigten, dass die Dauer der Vorinkubation nicht kritisch ist für die Überlebensraten der Zellen nach Mutagenisierung und damit für die Mutagenisierung selbst.) Die Exposition mit UV-Licht bestimmter Intensität und Dauer erfolgte unter Kontrolle eines Nah-UV-Meters. Anschließend wurden die Zellen wie mit ENU von überschüssigem Mutagen befreit und ausplattiert bzw. eingefroren.

Nah-UV-Strahlungsintensität  
vs. Abstand Lampe - Sensor

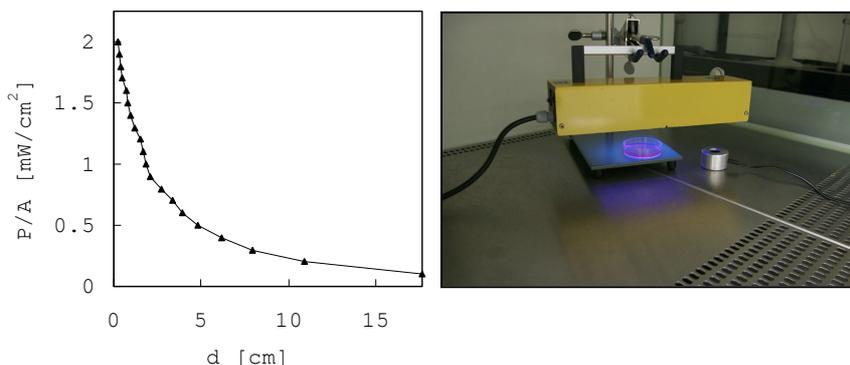


Abb. 2.3 Mutagenisierung von ES-Zellen mit TMP und Nah-UV-Licht. Die UV-Intensität, die mit einem UV-Meter gemessen werden konnte (Messkopf siehe Photo), ist abhängig vom Abstand der UV-Röhre zum Sensor bzw. der Kulturschale mit ES-Zellen, wie im Diagramm links gezeigt. Durch Veränderung dieses Abstands konnte daher die gewünschte Strahlungsstärke eingestellt werden.

Die ES-Zellen wurden in einer Konzentration von bis zu  $10^6$  Zellen pro ml als Suspension in einer 5cm-Kulturschale exponiert (siehe Photo). Wegen seiner schlechten Wasserlöslichkeit wurde TMP frisch als 10mM Stocklösung in DMSO gelöst und durch mehrstufige Verdünnung in ES-Medium auf die Arbeitskonzentration gebracht.

## Karyotypisierung

Bevor ES-Zellen für wichtige Experimente verwendet werden, sollte ihr Karyotyp überprüft werden, weil sie, wie oben erwähnt, karyotypisch instabil sein - d.h. nach längerer Zeit der Kultivierung eine anomale Anzahl von Chromosomen aufweisen können. Dazu wurden ES-Zellen einer semikonfluenten, d.h. aktiv wachsenden, 5cm-Kultur präpariert, nach Zentrifugation in einem Restvolumen ES-Medium aufgenommen und innerhalb von 20min tropfenweise mit 10ml warmer, hypotonischer (75mM) Kaliumchloridlösung verdünnt. Anschließend wurden drei Tropfen eiskalten Fixativs (3 Vol Methanol : 1 Vol Eisessig, frisch zubereitet) hinzugefügt und zentrifugiert. Das Pellet wurde im Restvolumen durch Fingerschnippen gegen das Falcon-Röhrchen resuspendiert und tropfenweise unter ständiger Agitierung mit 10ml Fixativ versetzt. Diese Schritte wurden ein bis zweimal wiederholt bis schließlich die in ca. 0,5ml Fixativ resuspendierten Zellkerne aus einer

Entfernung von etwa 10cm auf Objektträger getropft wurden. Die Anfärbung der Chromosomen erfolgte mit 10<sup>-4</sup>% (w/v) DAPI. Der Farbstoff wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 364nm angeregt. Die Aufnahme der Karyogramme erfolgte bei maximaler Vergrößerung (100-facher Abbildungsmaßstab) unter Immersionsöl.

### 2.1.3 Zellkultur im Multititerplattenformat

Die Kultivierung von MEF- bzw. ES-Zellen in Multititerplatten erfolgte weitgehend analog zu der in Kulturschalen. Der Hauptunterschied bestand darin, dass auf Zentrifugationsschritte verzichtet wurde. Für das selektive Auftauen einer Position einer eingefrorenen 96-*well*-Platte wurde die interessierende Probe mit Hilfe einer sterilen Nadel als Eisblock aus dem betreffenden Napf herausgehoben und zur Kultivierung sogleich in einige ml warmen ES-Mediums überführt. Die noch in gefrorenem Zustand befindliche Multititerplatte wurde dann sofort in eine vorgekühlte Styroporbox auf -80°C überführt.

## 2.2 Molekularbiologische Standardmethoden

### 2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Proben von Nukleinsäuren (im Wesentlichen genomische DNA, RNA, PCR-Produkte) wurden routinemäßig per Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die Agarose-Konzentration betrug in Abhängigkeit vom interessierenden Größenbereich i.d.R. 1% (w/v) für Fragmente oberhalb von 1000bp, 1,5% zwischen 600 und 1000bp, 2% zwischen etwa 400 und 600bp sowie 3% zwischen 150 und 400bp. Die Elektrophoresen wurden spannungslimitiert in TAE-Puffer (40mM Tris-acetat pH 8,2, 1mM EDTA) durchgeführt. Spannung und Laufdauer richteten sich nach erforderlicher Qualität und gewünschter Auflösung. Die Fragmente wurden sichtbar gemacht durch UV-Fluoreszenzanregung des in den Gelen in einem Anteil von 10<sup>-5</sup>% (w/v) enthaltenen Ethidiumbromids.

### 2.2.2 DNA-Isolation aus ES-Zellen und Mausschwanzbiopsien

Genomische DNA aus ES-Zellen wurde i.d.R. im 6-*well*-Plattenformat isoliert, und zwar ausschließlich zu dem Zwecke, sie als Templat für die Polymerase-Kettenreaktion zu verwenden - was keine hohe Anforderungen an ihre Qualität und Reinheit stellt. Gemäß Matisse et al. (2000) wurden ES-Zellen ohne *feeder layer* bis zur Konfluenz kultiviert, zweimal mit PBS gewaschen, mit 1ml Lysispuffer (10mM Tris-Cl pH 7,5, 10mM NaCl, 10mM EDTA, 0,5% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) Proteinase K) versetzt und über Nacht in einer feuchten Tupperwarebox bei 55°C inkubiert. Die freigesetzte DNA wurde gefällt durch Zugabe von 2ml

75mM NaCl in eiskaltem Ethanol. Nach einstündiger Inkubation wurde die Platte vorsichtig auf sauberen Papiertüchern invertiert, wobei die DNA am Boden der Kulturplatte als weißer Niederschlag haften blieb. Die Proben wurden anschließend dreimal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und nach Trocknung aufgenommen in 2ml TE (10mM Tris-Cl pH 8,0, 1mM EDTA). Abb. 2.4 zeigt ein typisches Endergebnis nach Agarose-Gelelektrophorese:

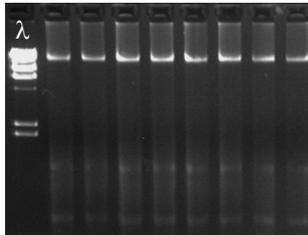


Abb. 2.4 Agarose-Gel mit einigen Proben genomischer DNA aus ES-Zellen, isoliert im 6-well-Format. Es wurden jeweils 0,5‰ der isolierten Mengen aufgetragen (entspricht ca. 100ng DNA aus Vergleich mit bekannten Mengen der  $\lambda$ -Fragmente links). Die DNA wurde in Lösung gebracht durch Auf- und Abpipettieren und dadurch gesichert auf eine durchschnittliche Größe von ca. 20kb, was jedoch anschließenden PCR-Reaktionen nicht abträglich war. Die beiden schwachen Banden weiter unten stellen die in geringem Umfang mitisolierten 28- und 18s-RNAs der Ribosomen dar.

Etwa 3mm große Mausschwanz-Endstücke wurden lysiert durch Inkubation über Nacht bei 55°C in 500µl 50mM Tris-Cl pH 8.0, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% (w/v) SDS und 0,1% (w/v) Proteinase K auf einem Schüttler. Die Extraktion erfolgte durch Agitation der Probe nach Zugabe von 1Vol Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Mischungsverhältnis 25:24:1). Die nach zehnminütiger Zentrifugation (10.000g) im Überstand befindliche DNA wurde gefällt durch Zugabe von 100µl 5M NaCl und 1,5Vol eiskalten Ethanols. Das Präzipitat wurde pelletiert durch erneute Zentrifugation und gewaschen mit 70% (v/v) Ethanol. Die DNA wurde aufgenommen in 200µl Tris-EDTA (s.o.). 1µl dieser Lösung wurde als Templat für 25µl-PCR-Reaktionen eingesetzt.

### 2.2.3 RNA-Isolation aus ES-Zellen

Gesamt-RNA aus ES-Zellen wurde durch Guanidinisothiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion unter Verwendung des TRIZOL-Reagenz (Invitrogen; Chomczynski und Sacchi, 1987) isoliert. Die Prozedur für Einzelproben richtete sich exakt nach den Herstellerempfehlungen. Für die RNA-Isolation im 96er-Multititerplattenformat jedoch wurde die Methode modifiziert und wird hier daher detailliert beschrieben:

In 96-well-Kulturplatten mindestens bis zur Subkonfluenz kultivierte ES-Zellen wurden unter Gebrauch einer Mehrkanalpipette trypsiniert, als Suspension vollständig in 96er-PCR-Platten überführt und in einer Plattenzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde unmittelbar nach Beendigung der Zentrifugation entfernt durch Invertieren der offenen Platten auf sauberen Papiertüchern. Letzte Reste an Flüssigkeit wurden durch zentrifugale Arm-Rotationsbewegungen der in der Hand gehaltenen, umgekehrten Platten-Papier-Kombinationen entfernt. Die Zellpellets wurden aufgenommen in je 150µl TRIZOL-Reagenz unter schnellem Auf- und Abpipettieren. Nach frühestens fünf Minuten wurden die Proben mit je 30µl Chloroform versetzt, durch heftiges Pipettieren gemischt und bei 4°C 15 Minuten lang zentrifugiert (3000g). Die wässrige obere Phase wurde vorsichtig angenommen und in einer

frischen Platte mit 1Vol kalten Isopropanols versetzt. Nach 10-minütiger Fällung auf Eis wurde wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wurde unvollständig durch vorsichtiges Dekantieren auf Papiertüchern entfernt, um die losen Pellets anschließend zu waschen durch Zugabe von je 200µl eiskalten, 80%igen (v/v) Ethanol in DEPC-behandeltem (s.u.) Wasser. Nach erneuter Zentrifugation für 5min wurde der größte Teil des Überstandes wieder durch Dekantieren entfernt, die Überreste dann jedoch durch kurzes Anzentrifugieren der invertierten Platten auf sauberen Papiertüchern bis ca. 200g. (Die Pellets hafteten nun ausreichend fest am Plattenboden). Unmittelbar danach wurden die Proben in je 20µl DEPC-Wasser (0,1% (v/v), Inkubation ü.N., dann autoklaviert) rekonstituiert.

Die Ausbeute an Gesamt-RNA wurde durch Vergleich mit einem RNA-Größenstandard auf einem Agarose-Gel quantifiziert und betrug mit dieser Methode für die Isolation von ES-Zell-RNA aus 96er-Multititerplatten typischerweise wenige Mikrogramm pro Probe. Vor dem Arbeiten mit RNA wurden der Arbeitsplatz und alle relevanten Geräte mit RNaseZap (Ambion), einem kommerziellen Spray zur Inaktivierung von Ribonukleasen, behandelt. RNA wurde bei -80°C gelagert.

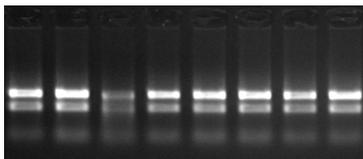


Abb. 2.5 Agarosegel mit Gesamt-RNA aus ES-Zellen. Es wurde jeweils 1/5 der im 96er-Format erhaltenen Mengen aufgetragen. Das Intensitätsverhältnis zwischen 28s-RNA (obere Hauptbande) und 18s-RNA deutet hier für 7 der 8 Proben auf hohe Integrität der RNA hin, was in etwa die Erfahrungen mit der RNA-Isolation im Großmaßstab widerspiegelt (siehe Ergebnisteil 3.3).

## 2.2.4 Reverse Transkription

Der Reaktionsansatz für die reverse Transkription - die einzelsträngige Synthese komplementärer DNA (cDNA) auf einer mRNA-Matrize - setzte sich wie folgt zusammen (vgl. Verbrauchsmaterialliste im Anhang):

```
ad 50µl Wasser
  10µl 5X-Puffer für M-MuLV RT
  5µl 5mM MgCl2
  1µl dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 25mM)
  1µl 0,1% (w/v) Oligo-dT-Primer
  ≈1µg Gesamt-RNA
  0,5µl (100U) M-MuLV RT
```

Dabei wurden zunächst allein RNA und *Oligo-dT*-Primer miteinander vermischt, 5min bei 65°C denaturiert und erst nach Abkühlen, d.h. nach *annealing* der *Oligo-dT*-Primer an die Poly-A-Schwänze der mRNAs, durch eine Mischung der restlichen Komponenten ergänzt. Die reverse Transkription erfolgte bei 37°C für eine Stunde. Die synthetisierte cDNA wurde i.d.R. nicht weiter quantifiziert oder gereinigt - typischerweise wurden 1 bis 4µl eines RT-Reaktionsansatzes als Templat für eine 25µl-PCR-Reaktion (s.u.) verwendet. Nach ihrer

Synthese wurden cDNA-Proben möglichst wenigen Zyklen des Einfrierens und Auftauens unterworfen. cDNA wurde mittelfristig bei -20°C und langfristig bei -80°C gelagert.

## 2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion

PCR-Reaktionen zur spezifischen Amplifizierung von DNA-Fragmenten setzten sich i.d.R. wie folgt zusammen:

```

ad 25    µl Wasser
    2,5 µl 10X-Puffer (s.u.)
    0-2,5 µl 25mM MgCl2 1
    0,2 µl dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 25mM)
je 0,25µl 100µM Primer
    1,25µl DMSO 2
    0,5 µl 10U/µl Taq/Pfu-Polymerase-Gemisch 3
0,5-5    µl DNA-Templat 4

```

<sup>1</sup> 0µl nur dann, wenn der gewählte PCR-Puffer bereits MgCl<sub>2</sub> enthielt

<sup>2</sup> optional

<sup>3</sup> Pfu-Anteil variabel zwischen 0 und 100%

<sup>4</sup> genomische DNA (≈50ng), cDNA (≈50ng-RNA-Äquivalent) oder verdünntes PCR-Produkt (5·10<sup>-2</sup> bis 5·10<sup>-4</sup>ng)

Die Auswahl geeigneter Primersequenzen erfolgte in einer Weise, dass die mit dem Programm NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>) berechnete Hybridisierungstemperatur bei einer Oligonukleotidlänge von 20-24bp zwischen 60 und 64°C lag und die Primer weder mit sich selbst noch miteinander theoretisch stabile Dimere bilden konnten. Bei der Verwendung von genomischer DNA als PCR-Templat wurden repetitive Abschnitte in dem zur Primerauswahl in Frage kommenden Sequenzbereich durch Verwendung des Programms RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org/>) ausgeschlossen. Die hauptsächlich verwendeten 10X-Puffer hatten folgende Zusammensetzung:

```

PCR-Puffer "B1":  500mM Tris-Cl pH 8,8
                  200mM (NH4)2SO4
                  15mM MgCl2
                  1mM Kresolrot (optional)
                  0,1% (v/v) Tween 20

```

```

PCR-Puffer "B3":  650mM Tris-Cl pH 8,8
                  166mM (NH4)2SO4
                  1mM Kresolrot (optional)
                  0,1% Tween 20

```

Die Zugabe von Kresolrot diente lediglich der Anfärbung der PCR-Gemische, um ein späteres Auftragen der Proben auf Agarose-Gele zu erleichtern. "B1" diente als eine Art Universalpuffer, während "B3" bei anspruchsvolleren PCRs verwendet wurde, für die z.B. die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration optimiert werden musste.

PCR-Reaktionen wurden i.d.R. als sog. *touchdown*-PCRs durchgeführt, bei denen die *annealing*-Temperatur im Laufe der ersten Zyklen schrittweise bis auf einen Endwert reduziert wird. Zudem wurden die Reaktionen heiß gestartet, d.h. erst in die PCR-Maschine gesetzt, als diese bereits die Anfangstemperatur von 94°C erreicht hatten. Ein typisches PCR-Programm, hier für eine *annealing*-Temperatur von 56°C, war das folgende:

94°C	2'30''		
94°C	30''		
68°C	45''		
72°C	1'/kb	Produktgröße	
94°C	30''		← 12 Wiederholungen, $T_{ann}^* - 1^\circ\text{C}/\text{Zyklus}$
56°C	45''		
72°C	1'/kb		← 15-19 Wiederholungen
72°C	5'		
7°C	∞		

\* *annealing*-Temperatur

## 2.2.6 Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden in Einzelfällen kloniert unter Ausnutzung des 3'-A-Überhangs nach Amplifizierung mit *Taq*-Polymerase (TA-Klonierung).

Die Sequenzierung von PCR-Produkten erforderte deren Aufreinigung mit Hilfe eines PCR-Reinigungskits. Die Durchführung der Sequenzierungsreaktionen und deren Analyse erfolgte durch Daniela Krüger (Service-Gruppe am MPI für Molekulare Genetik). Die gereinigten PCR-Produkte wurden in einer Konzentration von 0,25 ng/µl je 100bp Fragmentlänge eingesetzt.

## 2.3 Methoden zur Mutationsdetektion

### 2.3.1 Denaturierende HPLC

Diese Methode zur heteroduplexbasierten Mutationsdetektion kam ausschließlich für die Analyse von Läsionen im heterosomalen *Hprt*-Gen zum Einsatz. Dazu mussten mutierte Klone stets mit Wildtyp vermischt werden, was i.d.R. auf cDNA-Ebene geschah. Die PCR-Produktgemische wurden ungereinigt eingesetzt und in einem Thermocycler bei 95°C (5min) denaturiert, um zur Bildung von Heteroduplices anschließend langsam - Reduktion der Temperatur um 0,5°C pro min - wieder auf Raumtemperatur abgekühlt zu werden. Die Bedienung der dHPLC-Anlage erfolgte durch Bettina Moser (Service-Gruppe am MPI für Molekulare Genetik) und schloss die Bestimmung von Lauftemperaturen gemäß der Schmelzdomänen im zu analysierenden Fragment mit Hilfe der Hersteller-Software sowie die Auswahl der Elutionsparameter mit ein.

### 2.3.2 MALDI-vermittelte Resequenzierung

Testläufe zur Mutationsdetektion mit diesem Verfahren wurden vollständig bei Methexis Genomics NV (Zwijnaarde, Belgien) gemäß Stanssens et al. (2004) durchgeführt. Die Amplifizierung von *Hprt* unter Inkorporation viraler Promotorsequenzen erfolgte als *nested* PCR auf dem durch das Primerpaar *Hprt UTR* (siehe Oligonukleotidliste im Anhang) definierten Amplikon.

### 2.3.3 Heteroduplex-Spaltung mit CEL1

Die Heteroduplexbildung zu analysierender Fragmentgemische erfolgte ebenso wie unter 2.3.1 beschrieben. Der 20-minütige Verdau wurde bei 42°C durchgeführt und enthielt in einem Volumen von 15µl 10mM Hepes pH 7.0, 10mM MgSO<sub>4</sub>, 10mM KCl, 0.002% (v/v) Triton X-100, 0.2 µg/ml BSA, 200ng ungereinigtes PCR-Produkt und CEL1-Endonuklease. Die optimale Enzymkonzentration wurde durch Vorversuche bestimmt. Die Reaktion wurde initiiert durch Zugabe des DNA-Substrats und terminiert durch Zugabe von 5µl 75mM EDTA. Die Hälfte des Reaktionsansatzes wurde zur Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen.

### 2.3.4 Fragmentanalyse durch Kapillarelektrophorese

Die Probenläufe wurden am Berliner Max-Delbrück-Centrum (Dr. Hans C. Hennies, Gruppe Prof. Nürnberg) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden durch Einsatz von fluoresceinmodifizierten Primern für die Fluoreszenz-Detektion markiert. Die Aufreinigung der Fragmente vor der Analyse erfolgte durch Ethanolfällung nach Standardmethoden.

## 2.4 Mausembryologische Methoden

Die in diesem Teil zusammengefassten Methoden dienen der Generierung von Mäusen aus ES-Zellen und beruhen zum großen Teil auf Arbeitsvorschriften in Nagy et al. (2003) sowie Papaioannou und Johnson (2000), sind aber in mehreren Details abgewandelt und werden deshalb ausführlicher beschrieben.

### 2.4.1 Vasektomie

Um eine männliche Maus zur Auslösung von Scheinschwangerschaften einsetzen zu können, muss diese sterilisiert werden. Dazu wurde ein Bock, wegen erhöhter Libido vorzugsweise eines Auszuchtstammes wie NMRI, durch intraperitoneale Injektion von ca. 600µl Avertin betäubt (Stocklösung aus 1 g/ml 2,2,2-Tribromethanol in 2-Methyl-2-butanol, Arbeitskonzentration durch 40-fache Verdünnung in warmem PBS, Dunkellagerung bei 4°C für nicht länger als zwei Wochen). Etwa zwei Zentimeter oberhalb des Penis wurde ein

knapp 1cm langer Schnitt durch Haut und Bauchfell gesetzt und der Hoden an dem daran befindlichen Fettpolster soweit herausgezogen, dass auch der Samenleiter zugänglich wurde. Mit einer Mikroschere wurde ein möglichst langes Stück davon herausgeschnitten, bevor der Hoden vorsichtig zurück in die Bauchhöhle gedrückt wurde. Die Prozedur wurde für den zweiten Samenleiter wiederholt, das Bauchfell mit einem Stich vernäht und die Außenhaut mit einem Metallclip verschlossen.

Nach etwa zwei Wochen war die Wunde verheilt. Vasektomierte Männchen wurden durch Testverpaarungen auf Unfruchtbarkeit überprüft und bei Erfolg der Sterilisierung verwendet zur Induktion von Scheinschwangerschaften.

#### 2.4.2 Isolation von Präimplantationsembryonen

Die Standardmethode, um lebende Mäuse aus ES-Zellen zu generieren, ist deren Injektion in Embryonen des Blastozystenstadiums. Im Normalfall benutzt man natürliche diploide Blastozysten, deren Zellen der Inneren Zellmasse sich mit den injizierten ES-Zellen vermischen. Folglich erhält man nach Wiedereinführen der injizierten Embryonen in scheinchwangere Mäuse chimäre Jungtiere.

Es ist naheliegend, die Embryonen im Blastozystenstadium, d.h. am vierten Tag *p.c.* aus dem Uterus befruchteter Weibchen zu isolieren, um sie sogleich zur ES-Zellinjektion zu verwenden. Die Ausbeute war jedoch in mehreren Vorversuchen unbefriedigend, teils wegen der geringen Anzahl isolierbarer Embryonen und teils, weil diese zudem oft nicht gut expandiert waren und sich damit nicht zur sofortigen Injektion eigneten. Das Problem der geringen Embryoausbeute dürfte hauptsächlich auf Seite der mit den Spenderweibchen verpaarten Böcke gelegen haben, die aufgrund von Kapazitätsengpässen in der Tierhaltung zu oft für Verpaarungen eingesetzt wurden und daher oft nur einen Teil der Weibchen begatteten - die Ausbeute an Vaginal-Plugs am Morgen des ersten Tages *p.c.* lag durchschnittlich bei unter 50%. Eine Lösung des Problems gelang durch die Vorgehensweise, die Embryonen bereits am dritten Tag *p.c.* im 8-Zell- bzw. Morula-Stadium aus den Eileitern zu isolieren, diese *in vitro* bis zum Blastozystenstadium zu kultivieren und dann für ES-Zellinjektionen einzusetzen.

Dazu wurden die Spenderweibchen am Morgen von Tag 3 *p.c.* durch Genickbruch getötet und deren Ovidukte zusammen mit einem Stück Uterus isoliert und in M2-Medium überführt. (Die Embryonen befinden sich am dritten Tag der Schwangerschaft ungefähr am Übergang Ovidukt-Uterus, vgl. Abb. 1.1.) Die Eileiter wurden weitgehend von Fett und Resten der Ovarien befreit und einzeln in  $\approx 50\mu\text{l}$ -Tröpfchen M2-Medium auf einer Petrischale überführt. Mit Hilfe einer mit M2-Medium gefüllten Spritze mit feiner, abgeschliffener Kanüle wurden die Ovidukte von der Infundibulum-Seite her ausgespült (Spülvolumen ca.  $50\mu\text{l}$ ). Die so isolierten Embryonen wurden mit einer Mundpipette durch mehrere Tropfen M2-Medium gewaschen

und schließlich in M16 zwei Tage lang kultiviert, bis sie das Blastozysten-Stadium erreicht hatten und sich damit zur Injektion eigneten. Die Embryoausbeute insgesamt ließ sich auf diese Weise in annehmbare Dimensionen (um zehn Blastozysten pro Vaginalpfropf) steigern, weil einerseits das Ausspülen von Ovidukten gegenüber dem von Uteri gründlicher ist und andererseits die Embryonen durch die Kultur *in vitro* in ihrer Entwicklung synchronisiert werden: diese wird im Blastozysten-Stadium arretiert. Die einzelnen Arbeitsschritte sind in Abb. 2.6 illustriert.

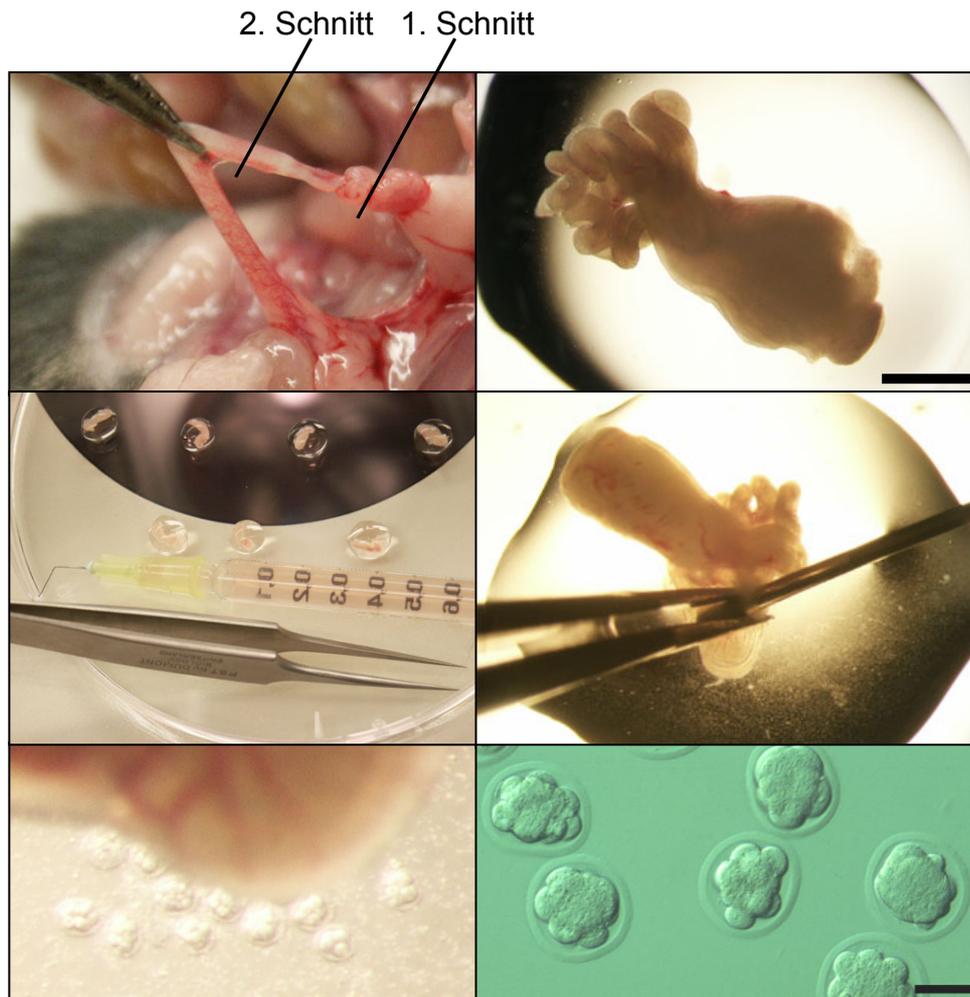


Abb. 2.6 Isolation von 8-Zell / Morula-Embryonen. Oben links: Eileiter-Präparation. Oben rechts: isolierter Eileiter mit einem Stück Uterus (Balken: ca. 0,5mm). Mitte links: Anordnung der Ovidukte in einzelnen Tropfen und Werkzeug zum Ausspülen. Mitte rechts: Ausspülen eines Eileiters unter Einführung der Kanüle in das Infundibulum. Unten: ausgespülte Embryonen im 8-Zell- bzw. Morula-Stadium (Balken im Bild rechts: 50µm).

### 2.4.3 Blastozysteninjektion

Die Standardmethode zur Generierung von ES-Zell-Chimären ist die Injektion von ES-Zellen in Blastozysten des Mausstammes C57Bl/6. Dazu wurden Embryonen des Morulastadiums wie oben beschrieben isoliert und für zwei Tage in M16-Medium bis zum Blastozystenstadium kultiviert. In etwa 2ml gekühltem M2-Medium auf einem Objektträger

wurden vereinzelte, weitgehend *feeder*-freie ES-Zellen vorgelegt, von denen ca. 60 Stück unter 200-facher Gesamtvergrößerung mit der ES-Zellinjektionskapillare aufgesaugt wurden. Dabei wurden nur kleine, d.h. undifferenzierte, und kreisrunde / vitale Zellen ausgewählt. 5 Blastozysten wurden aus dem Inkubator hinzugefügt und der Reihe nach injiziert. Der Vorgang wurde wiederholt, bis alle Embryonen verbraucht waren:

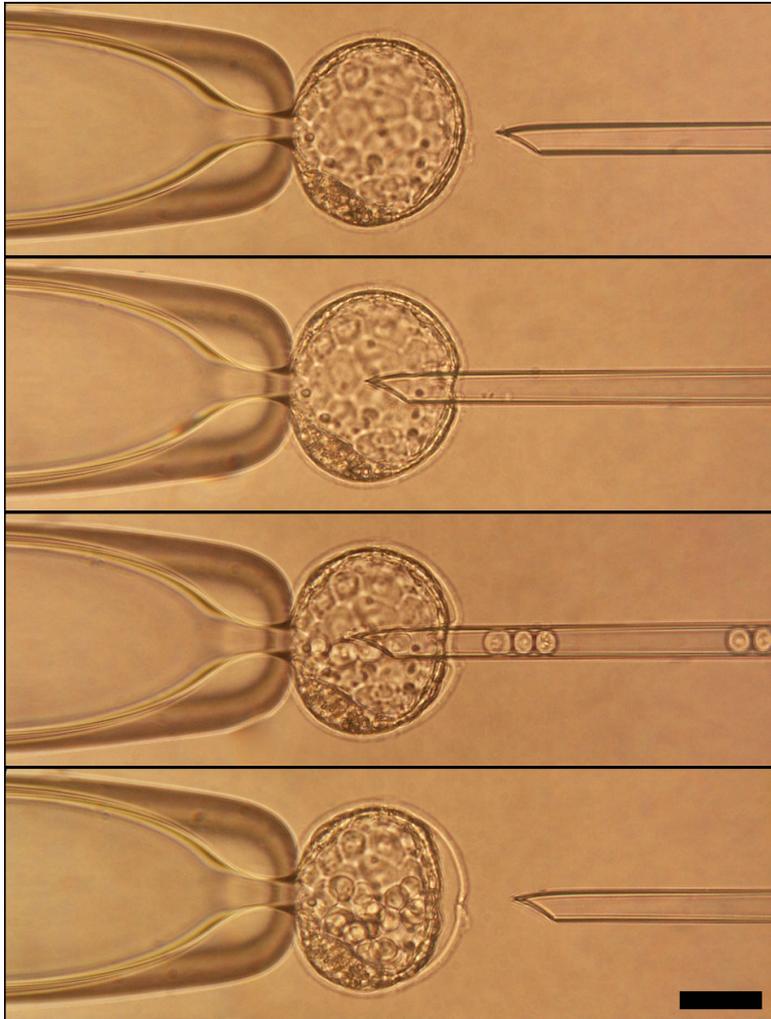


Abb. 2.6 Blastozysteninjektion. 1. Bild: Die Blastozysten wurden so mit der Haltekapillare orientiert, dass der Schwerpunkt der Inneren Zellmasse auf dem imaginären Ziffernblatt einer Uhr ungefähr auf "halb acht" zeigte. 2. Bild: Zona pellucida und Trophektoderm wurden möglichst ruckartig penetriert. 3. Bild: Injektion von ca. 12 ES-Zellen. 4. Bild: Entfernung der Injektionskapillare; die ES-Zellen sollten möglichst nah an der Inneren Zellmasse plziert bleiben.

In der Routine wurden 10 ca. vier Wochen alte C57Bl/6-Spenderweibchen pro Injektionsexperiment verwendet. Die Ausbeute an Embryonen lag in guten Fällen um 100 Stück, von denen sich meist etwa zwei Drittel zu injizierbaren Blastozysten weiterentwickelten. Die Erfolgsquote für die ES-Zellinjektion an sich lag bei annähernd 100%. Die Blastozysten kollabierten i.d.R. unmittelbar nach der Injektion und reexpandierten einige Stunden später nach Einbeziehung der ES-Zellen in die Innere Zellmasse. Der anschließende Transfer in scheinsschwangere Weibchen erfolgte wahlweise in den Uterus oder in den Ovidukt (siehe weiter unten).

#### 2.4.4 Embryoaggregation und Morulainjektion

Technisch einfacher als die Injektion von ES-Zellen in Blastozysten sind Aggregationstechniken, bei denen ES-Zellen mit Embryonen des 8-Zell- bzw. Morula-Stadiums zusammengebracht - aggregiert - werden. Die Embryonen werden *in vitro* weiter zum Blastozystenstadium kultiviert, wobei die ES-Zellen in die Innere Zellmasse inkorporiert werden und so am späteren Aufbau des Mauskörpers beteiligt sind. Man unterscheidet zwei Aggregationstechniken: die Aggregation von ES-Zellklumpen mit von der Zona pellucida befreiten Morulae in kleinen Vertiefungen in einer Petrischale einerseits, sowie die Injektion von ES-Zellen unter die Zona pellucida von Morula-Embryonen andererseits. Beide Techniken blieben weitgehend erfolglos, sollen aber der Vollständigkeit halber hier erwähnt werden:

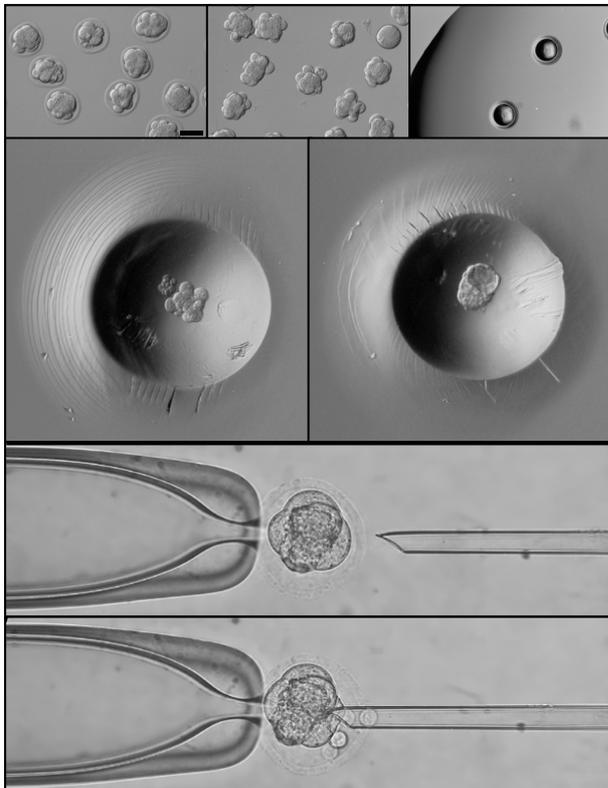


Abb. 2.7 Embryoaggregation und Morulainjektion. Für die Aggregation von ES-Zellklumpen mit Morulae wurden letztere gemäß Abb. 2.6 isoliert, um anschließend durch 5-minütige Behandlung mit 0,5% (w/v) Pronase in M2-Medium von der Zona pellucida befreit zu werden (erste beiden Bilder, Balken: 50µm). Als Embryo-Spender wurden Weibchen eines Auszucht- bzw. F1-Hybridstämmes bevorzugt. Mit einer stumpfen Nadel wurden Vertiefungen in einer Petrischale aus Plastik generiert, die, mit 50µl-Tropfen M16-Medium unter Öl überschichtet, als sog. *aggregation wells* - als Reaktionsräume für die Aggregation - dienten (siehe Bild oben rechts). Zweite Reihe: Aggregation von 6 bis 8 ES-Zellen mit einem 8-Zellembryo. ES-Zellklumpen dieser Größe konnten durch unvollständige Trypsinierung erhalten werden. Nach eintägiger Inkubation entwickelte sich ein hoher Anteil der Morulae unter Integration der ES-Zellen zu Blastozysten, die dann in Uteri scheinchwangerer Mäuse eingeführt wurden (siehe weiter unten).

Beide unteren Bilder: Morulainjektion. 3 bis 5 ES-Zellen wurden mit Hilfe von Halte- und Injektionskapillare zwischen Embryo und Zona pellucida plaziert. Dadurch ist im Gegensatz zur Aggregation ohne Zona pellucida ein enger Kontakt zwischen ES-Zellen und Embryo gewährleistet.

#### 2.4.5 Embryotransfer und Chimärenverpaarung

Injizierte (oder aggregierte) Embryonen wurden zur Weiterentwicklung in scheinchwangere - d.h. mit vasktomierten Böcken verpaarte und am Folgetag vaginalplugpositive - Weibchen des Auszuchtstammes NMRI übertragen, und zwar entweder am dritten Tag *p.c.* direkt in den Uterus oder in den Eileiter am ersten Tag *p.c.*. Dazu wurden die Tiere wie oben betäubt und durch einen knapp 1cm langen Schnitt durch Haut und Peritoneum ca. 2cm oberhalb der

Oberschenkel und beidseitig etwa 1cm von der Wirbelsäule entfernt dorsal geöffnet. Uterus und Ovidukt wurden an dem mit dem Ovarium assoziierten Fettpolster so weit wie nötig herausgezogen und freigelegt. Der i.d.R. beidseitige Transfer der Embryonen erfolgte unter dem Stereomikroskop mit Hilfe einer Mundpipette in möglichst geringem Volumen M2-Medium:

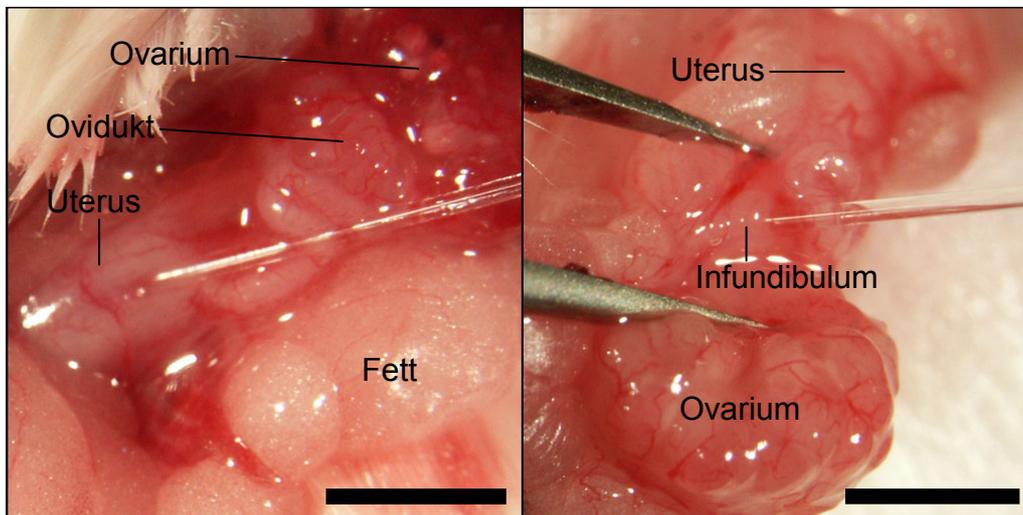


Abb. 2.8 Uterus- und Ovidukttransfer. Für den Transfer in den Uterus (Bild links, Balken: ca. 2mm) wurde dieser mit einer Metallkanüle punktuell geöffnet, bevor die Glaskapillare mit den Embryonen (i.d.R. 8 bis 16 Stück) eingeführt werden konnte. Für den Transfer in den Eileiter (Bild rechts) wurde die Bursa, die das Ovarium und den Ovidukt umgebende Membran, mit Hilfe von Pinzetten soweit aufgerissen, dass das Infundibulum zugänglich wurde. Die Embryonen (i.d.R. 8 bis 16 Stück) wurden in der Glaskapillare vor einer kleinen Luftblase aufgereiht, die ebenfalls in den Eileiter entlassen wurde und damit als Kontrolle für den Erfolg des Transfers sowie als Blockade gegen ein sonst mögliches Wiederaustreten der Embryonen aus dem Ovidukt diente.

Nach dem Transfer der Embryonen wurden Uteri, Ovidukte und Ovarien wieder vorsichtig in die Bauchhöhle zurückgedrückt und die Wunden mit Metallclips verschlossen. Die Tiere wurden auf eine auf 37°C temperierte Wärmplatte gelegt bis sie begannen, aus der Narkose aufzuwachen, und dann zurück in den Käfig gesetzt. Die folgenden Arbeiten wurden vom Tierhauspersonal ausgeführt: trächtige Weibchen wurden in der zweiten Schwangerschaftshälfte vereinzelt. Ihr Nachwuchs wurde nach drei Wochen abgesetzt. Chimäre männliche Nachkommen mit hohem Anteil braunen Fells wurden ab einem Alter von ca. 10 Wochen mit etwa gleichaltrigen Weibchen der Stämme B6 oder B10 natürlich verpaart. Mit trächtigen Weibchen wurde wie zuvor verfahren.