

Stammzellen

Gewinnung haploider Stammzellkulturen der Maus für genetische Screens

REMO FREIMANN¹, STEFAN KRAMER¹, ANDREAS BÖHMLER², ANTON WUTZ¹

¹ INSTITUT FÜR MOLEKULARE GESUNDHEITSWISSENSCHAFTEN, ETH ZÜRICH, SCHWEIZ

² BECKMAN COULTER GMBH, KREFELD

Haploid mouse embryonic stem cells are a handy tool to investigate loss of function mutations. Furthermore, these cells can contribute to chimeric embryos and can be used to introduce genetic modifications into mouse germ lines. Nevertheless, haploid cell cultures have to be maintained by flow sorting on a regular basis due to spontaneous diploidization. Here we present physical differences between haploid and diploid cells, which can be used in applied cell sorting of haploid cell cultures.

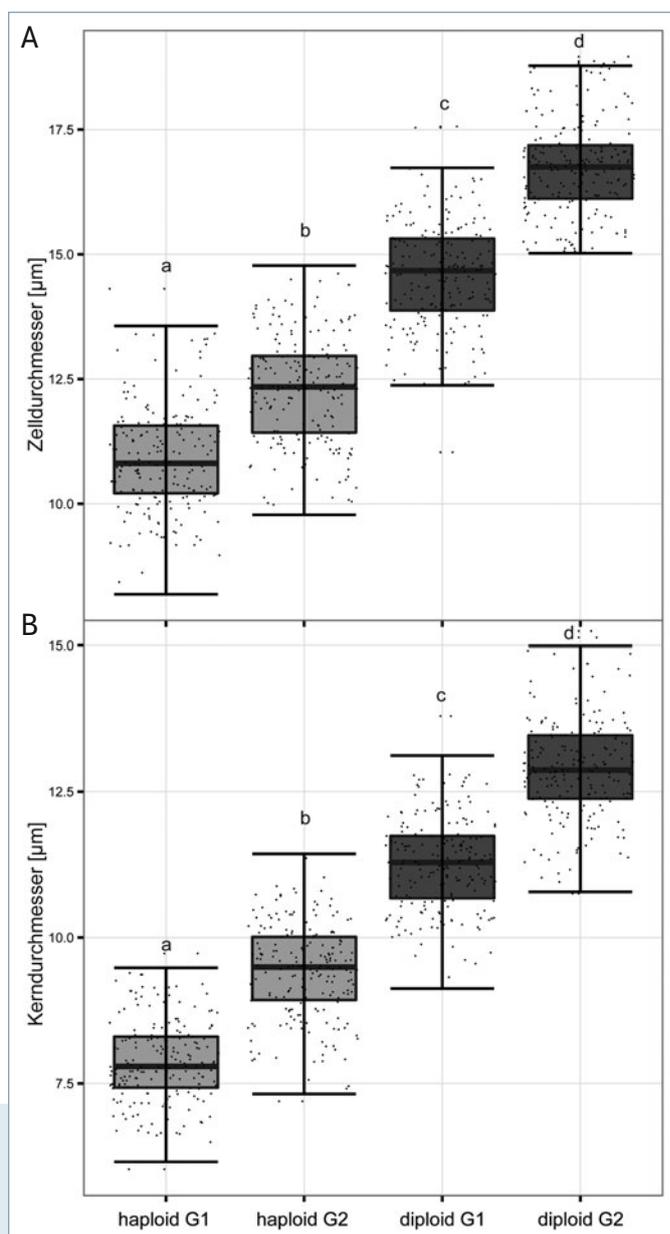
DOI: 10.1007/s12268-014-0458-6
© Springer-Verlag 2014

■ Genetische Screens in mikrobiellen Systemen haben zur Aufklärung einer Vielzahl zellulärer Signalwege und metabolischer Prozesse beigetragen. Diese effektiven Screens haben dazu geführt, dass Wissenschaftler ein immer größeres Interesse an der Etablierung von haploiden Tierzellensystemen bekundeten. Erste haploide Tierzellen wurden z. B. von Insekten und Fröschen in Kultur genommen [1]. Experimentell können haploide Embryonen höherer Tiere durch diverse Manipulationen an Gameten oder Zygoten produziert werden (z. B. durch Bestrahlung, Bisektion oder Oozytenaktivierung). Sie bilden die Grundlage zur Gewinnung embryonaler Stammzellen (ESCs), welche in Zellkulturen gehalten und manipuliert werden können [2].

Erste haploide Maus-ESCs wurden im Jahr 2011 produziert und kultiviert [3, 4]. Dabei wurden unbefruchtete Eizellen mit Strontiumchlorid aktiviert, *in vitro* bis zum Blastozystenstadium kultiviert und daraus die ESCs gewonnen. Diese ESCs haben ein großes Potenzial und ein weites Anwendungsfeld in der Säugetiergenetik. Dazu gehören z. B. die

vorwärtsgerichtete Genetik, die Analyse der Genregulation wie auch von Signal- und Stoffwechselwegen, die Zellidentitätskontrolle und die Untersuchung des Einflusses der genomischen Prägung. Haploide ESCs können ebenfalls zur Erzeugung chimärer Mäuse benutzt werden und bieten somit die Möglichkeit, verändertes Erbgut auf einfache Weise in einen Organismus und dessen Nachkommen zu integrieren.

Es hat sich gezeigt, dass haploide Stammzellkulturen



► **Abb. 1:** Boxplots der Größenverteilung von haploiden und diploiden embryonalen Stammzellen (ESC; **A**) und deren Nuklei (**B**) während der G1- und G2-Phase des Zellzyklus ($n = 200$). Die Buchstaben annotieren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ($p < 0,05$).

für weiterführende Untersuchungen etabliert und erhalten werden können. Haploide ESCs neigen jedoch zur Diploidisierung. Diese geschieht nicht durch Zellfusion, sondern durch Endoreduplikation oder unvollständige Zellteilung [5]. Um reine haploide Stammzellkulturen zu etablieren und zu erhalten, müssen die Zellen deshalb regelmäßig von diploiden Kontaminanten befreit werden. Mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (FACS) können die haploiden Zellen aufgrund ihres geringeren DNA-Gehalts in der G1-Phase des Zellzyklus aussortiert, angereichert und rekultiviert werden [3]. Die dabei verwendeten Farbstoffe interkalieren stöchiometrisch in die DNA und stellen einen möglichen Störfaktor dar, da sie zytotoxisch wirken können. Hoechst 33342 ist einer dieser in der Durchflusszytometrie gebräuchlichen Farbstoffe. Dieser wird aktiv von den Zellen über membrangebundene ABC-Transporter aus der Zelle transportiert, was eine Toxizität vermuten lässt [6]. Da Hoechst mit der DNA interkaliert, könnten Interferenzen bei der DNA-Replikation auftreten. Diese potenzielle Mutagenität könnte zur Folge haben, dass unerwünschte Veränderungen des Erbmaterials auftreten, welche in nachfolgenden Experimenten Ergebnisse beeinflussen können.

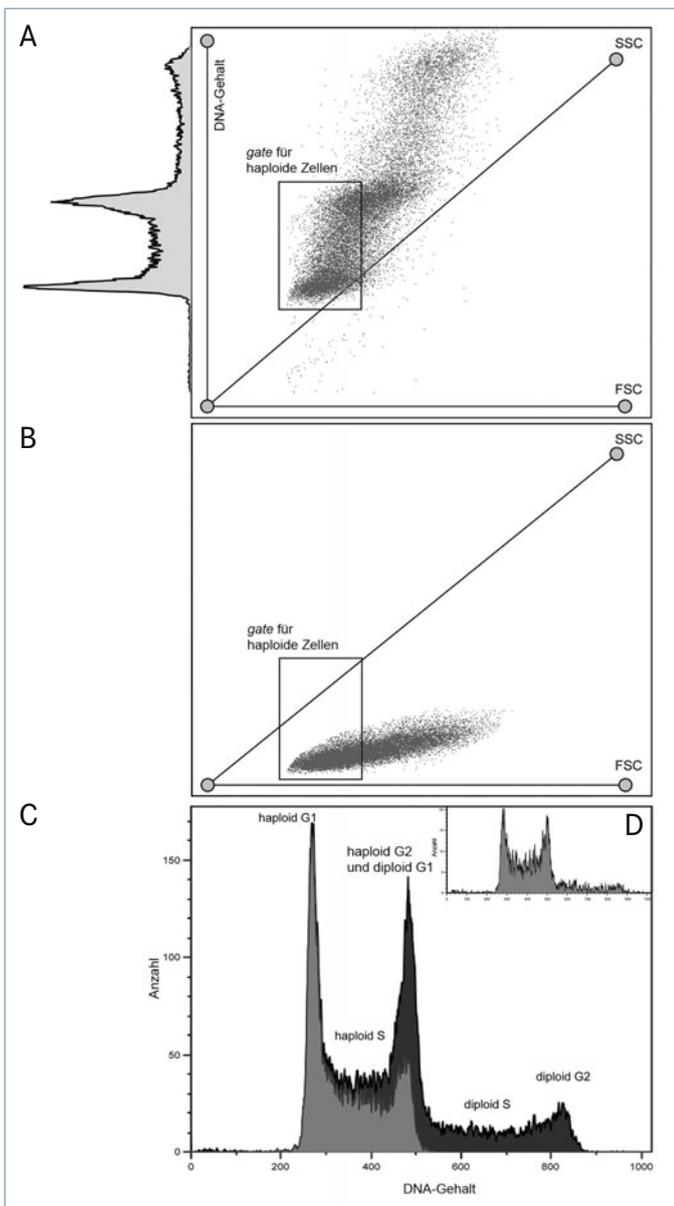
Ploidie-Hygiene haploider embryonaler Stammzellkulturen

Im Vergleich zu diploiden ESCs ist eine Vielzahl von Genen in haploiden ESCs differenziell reguliert. In der hier präsentierten Studie untersuchten wir die Zell- und Nukleus-Größenverteilung von verschiedenen Ploidiestadien haploider und diploider ESCs und entwickelten eine Strategie für eine alternative Zellsortierung haploider ESCs.

Die gemischt-ploide HATC3-Zelllinie wurde in chemisch defi-

niertem 2i(*two-inhibitor*)-Medium auf mitotisch inaktivierten embryonalen Fibroblasten der Maus (MEF) kultiviert. Um den haploiden Anteil zu erhalten, wurde sie jede dritte Passage mithilfe eines MoFlo[®]-AstriosTM-Durchflusszytometers (Beckman Coulter) sortiert. Dabei wurden die Zellen mit Hoechst 33342 (Invitrogen) angefärbt und der haploide G1- (1n) und der diploide G2-Peak (4n) sortiert und rekultiviert. Außerdem wurden aus den reinen diploiden und haploiden Kulturen die Zellmembrankompartimente mittels LavaCellTM (Active Motif) und der Nukleus mittels Hoechst 33342 angefärbt. Jeweils 5.000 Zellen der G1- und G2-Peaks dieser Kulturen wurden mittels des MoFlo[®]-AstriosTM auf diagnostische Objektträger sortiert und anschließend mit einem Epifluoreszenzmikroskop (Zeiss 200M) visualisiert. Die Größe der Zellen und der Zellkerne wurde mittels der Bildanalyse-Software ImageJ bestimmt.

Die Größenverteilung der ESCs korreliert gut mit dem Ploidiegrad (**Abb. 1A**). Dabei ist der Größenunterschied zwischen der G1- und G2-Phase der haploiden Zelle ähnlich wie der zwischen der haploiden G2- und der diploiden G1-Phase. Die Größenverteilung der Zellkerne scheint analog, ist jedoch weniger ausgeprägt (**Abb. 1B**). Diese physikalische Charakteristik spiegelt sich in der Beugung und Brechung des Lichts an der Zelle wider und wird im Durchflusszytometer als Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) gemessen. **Abbildung 2A** zeigt einen Radarplot des Streulichtparameters und des DNA-Gehalts der Zellen. Bei zunehmender Zellgröße verändert sich das Streulicht, und die größeren diploiden Zellen erfahren eine positive Verschiebung in den Streulichtsignalen, welche unabhängig vom DNA-Gehalt gemessen werden kann (**Abb. 2B**). Dieser Effekt ermöglicht es,



◀ **Abb. 2:** Sortierstrategie einer gemischt-ploiden Zellkultur. **A,** Radarplot der Beugungssignale und des DNA-Gehalts mit Letzterem zusätzlich als Dichtekurve. Das für die Sortierung verwendete *gate* ist eingezeichnet. **B,** Radarplot ohne DNA-Gehalt, mit entsprechendem *gate*. **C,** Histogramm des DNA-Gehalts der Zellen. Hellgrau sind dabei die mit dem *gate* in **A** und **B** definierten Zellen. **D,** DNA-Gehalt gereinigter Zellen drei Tage nach der Sortierung. FSC: Vorwärtsstreuung; SSC: Seitwärtsstreuung.

interkalierende Farbstoffe zu unterhalten. Dadurch kann bei gleichzeitiger Vereinfachung des Verfahrens eine höhere Zellviabilität erreicht werden. Zusätzliche Streuungsparameter, welche z. B. durch unterschiedliche Abschirmbalken erzeugt werden, könnten in Zukunft multivariate Streulichtinformationen erzeugen und somit eine noch klarere Abgrenzung verschiedener Zellcharakteristika ermöglichen.

Danksagung

Die Arbeit an haploiden Stammzellen in unserer Gruppe wird durch das R'Equip-Programm des Schweizer Nationalfonds unterstützt (Projektnummer: 316030_145026).

Literatur

- [1] Freed JJ, Mezger-Freed L (1970) Stable haploid cultured cell lines from frog embryos. Proc Natl Acad Sci USA 65:337–344
- [2] Yuan Y, Huang X, Zhang L et al. (2013) Medaka haploid embryonic stem cells are susceptible to Singapore grouper iridovirus as well as to other viruses of aquaculture fish species. J Gen Virol 94(Pt 10):2352–2359
- [3] Leeb M, Wutz A (2011) Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos. Nature 479:131–134
- [4] Elling U, Taubenschmid J, Wirnsberger G et al. (2011) Forward and reverse genetics through derivation of haploid mouse embryonic stem cells. Cell Stem Cell 9:563–574
- [5] Leeb M, Walker R, Mansfield B et al. (2012) Germline potential of parthenogenetic haploid mouse embryonic stem cells. Development 139:3301–3305
- [6] Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD et al. (2001) The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. Nat Med 7:1028–1034

haploide Zellen mittels *flow sorting* für die Kulturpassage anzureichern, ohne dass interkalierende DNA-Farbstoffe benutzt werden müssen. Dabei kann ein Intervall (*gate*) im FSC/SSC-Streudiagramm (*scatterplot*) so gewählt werden (**Abb. 2B**), dass praktisch alle haploiden Zellen in der G1- und der S-Phase sortiert werden (**Abb. 2C**). Obwohl ein Teil der diploiden G1-Phase nicht von der haploiden G2-Phase unterschieden werden kann, wird die dadurch entstehende Verunreinigung bei wiederholter Sortierung stark verdünnt (**Abb. 2D**).

Fazit

Streuungsparameter moderner Durchflusszytometer ermöglichen es, Stammzellen verschiedener Ploidität voneinander zu unterscheiden und Zellkulturen somit ohne DNA-



Remo Freimann, Stefan Kramer, Andreas Böhmler und Anton Wutz (v. l. n. r.)

Korrespondenzadressen:

Dr. Remo Freimann
Institut für Molekulare Gesundheitswissenschaften
ETH Zürich
Otto-Stern-Weg 7
CH-8093 Zürich
Tel.: +41-(0)44-633-4648
remo.freimann@biol.ethz.ch

Dr. Andreas Böhmler
Beckman Coulter GmbH
Europark Fichtenhain B13
D-47807 Krefeld
Tel.: 02151-333-712
Fax: 02151-333-707
aboehmler@beckman.com