

Stellungnahme zur Genotypisierung von transgenen Mäusen

I. Einführung

Bei der Herstellung oder Vermehrung von transgenen Mäusen ist der genaue genetische Status der Tiere zunächst nicht bekannt. Die phänotypischen Merkmalsausprägungen der induzierten Mutationen können rezessiv oder nicht direkt zu beobachten sein, sodass im Regelfall alle Nachkommen auf ihren Genotyp hin untersucht werden müssen („Genotypisierung“). Die Genotypisierung sollte frühzeitig erfolgen, rasch zuverlässige Ergebnisse liefern und tierschutzkonform durchgeführt werden. Dadurch kann sichergestellt werden, dass Versuche nur mit den dafür geeigneten Tieren bzw. Kontrolltieren durchgeführt werden (Wahl des geeigneten Tiermodells), die Zucht nicht benötigter Tiere so weit wie möglich vermieden wird (Zuchtplanung) und belastete Tiere frühzeitig besonders genau beobachtet und ihrem Zustand entsprechend behandelt werden können (Belastungsminimierung). Die Wahl der geeigneten Methode und die fachgerechte Durchführung der Genotypisierung dienen somit der Umsetzung der Anforderungen der „3R“ (Replacement, Reduction und Refinement).

Auf molekularer Ebene stehen zur Feststellung des Genotyps verschiedene Methoden zur Verfügung. Die jeweils benötigte DNA-Menge hängt dabei von der Fragestellung und der vorgesehenen Untersuchungsmethode ab.

Als DNA-Quelle kommen Zellen verschiedener Gewebe in Betracht. Für die Auswahl des geeigneten Gewebes sind die benötigte DNA-Menge in Abhängigkeit von der geplanten Analyse und der mit der Probennahme verbundenen Belastung für die Tiere zu berücksichtigen. Außerdem ist auf das Risiko einer Kontamination der Proben Bedacht zu nehmen. Die fehlerfreie Zuordnung zwischen Gewebeprobe und Herkunft (Proband) muss durch die eindeutige Kennzeichnung jedes Tieres sichergestellt sein.

Bei der Wahl der Best Practice nach den Grundsätzen der „3R“ sind jeweils die Umstände des konkreten Einzelfalls (z.B. die benötigte Aussage der Analyse, das Alter der Tiere bei der Probennahme und die Methode zur Kennzeichnung der Tiere) zu berücksichtigen, um eine sichere Genotypisierung zu gewährleisten und die Belastung der Versuchstiere auf das notwendige Minimum zu reduzieren.

II. Methoden zur Durchführung der Genotypisierung

1. Methoden zur DNA-Untersuchung

Genotypisierungen werden gegenwärtig fast ausschließlich mittels PCR und Southern Blot durchgeführt. Die bei allen DNA-Untersuchungen verwendeten Enzyme (Polymerasen bzw. Restriktionsenzyme) können durch Verunreinigungen

in den Proben gehemmt werden, sodass die DNA in jedem Fall aus dem Gewebe isoliert und von störenden Substanzen gereinigt werden muss.

1.1. PCR

Die PCR bzw. qPCR-Analyse ist ein sehr empfindliches Nachweisverfahren, mit dem durch die schrittweise Amplifikation selbst geringste Mengen an DNA (wenige Moleküle) nachgewiesen werden können. Das Verfahren kommt daher mit kleinsten DNA-Mengen aus, weshalb nur sehr wenig Gewebe des Probanden bereitzustellen ist. Infolge der hohen Sensitivität ist diese Methode aber auch sehr anfällig für Kontaminationen. Entsprechende Vorkehrungen sind deshalb bereits zum Zeitpunkt der Probennahme zu treffen.

1.2. Southern Blot

Für Southern Blots wird im Vergleich zur PCR eine größere DNA-Menge (ca. 10 µg) benötigt. Diese Methode ist zeit- und arbeitsaufwändiger und wird meist mit radioaktivem Material durchgeführt. Southern Blots sind jedoch zur Charakterisierung bestimmter genetischer Modifikationen unbedingt erforderlich, da sie mehr und spezifischere Informationen zur induzierten Mutation liefern als PCR-Assays.

2. Methoden zur Gewebegewinnung

2.1. Nicht-invasive Methoden

Zur Genotypisierung mittels PCR werden in der Literatur verschiedene nicht-invasive Verfahren beschrieben (z.B. Gewinnung von Zellen aus Haarbülsen, Mund- oder Darmschleimhaut). Diese Methoden sind allerdings wegen der geringen DNA-Ausbeute und der Kontaminationsgefahr in der tierexperimentellen Praxis derzeit wenig verbreitet.

- *Haarbülsen*

Zur Probengewinnung werden den Tieren mit einer gereinigten Pinzette Haare ausgezupft. Diese Methode hat zwar den Vorteil, dass Haare weitgehend schmerzlos und wiederholt gewonnen werden können, doch ist sie bei Neugeborenen oder wenig behaarten Jungtieren nicht anwendbar. Zudem besteht ein geringes Risiko der Probenkontamination (z.B. durch Kreuzkontamination zwischen Wurfgeschwistern).

- *Mundschleimhaut*

Proben aus der Mundschleimhaut können durch Spülung mit Hilfe einer Pipette oder durch einen Mundhöhlenabstrich mittels Wattestäbchens gewonnen werden. Mundhöhlenabstriche sind bereits bei 10 Tage alten Tieren möglich. Abstriche und Spülungen können relativ schonend und erforderlichenfalls wiederholt durchgeführt werden. Bei säugenden Jungtieren besteht bis zum Absetzen ein geringes Risiko einer Kontamination durch maternale Zellen in der Mundhöhle.

- *Darmschleimhaut*

Die Probengewinnung durch Abstrich der Darmschleimhaut mittels Einweg-Plastiköse ist bei Tieren ab dem Absetzalter beschrieben. Auch Kotpellets, die bei der Manipulation abgesetzt oder in Einzelhaltung gewonnen werden, können zur DNA-Isolation für PCRs verwendet werden. Diese Art der Probennahme ist relativ schonend und kann erforderlichenfalls problemlos wiederholt werden. Zu bedenken ist, dass diese Proben massiv mit Darmbakterien kontaminiert sind, was die Qualität der Analysen beeinträchtigen kann.

2.2. Invasive Methoden

- *Ohrblatt*

Ohrlochung oder Ohrkerbung werden zur dauerhaften und individuellen Kennzeichnung von Mäusen eingesetzt. Das dabei anfallende Gewebe (ca. 2 mm Durchmesser) eignet sich sehr gut für eine Genotypisierung mittels PCR, sodass die Tiere in einem Arbeitsschritt und durch einen Eingriff gekennzeichnet *und* beprobt werden können.

Bei der Ohrlochung besteht ein geringes Risiko der Kontaminierung der Proben durch die verwendete Zange, das jedoch durch eine adäquate Zwischenreinigung des Instruments nahezu ausgeschlossen werden kann.

Bei Mäusen, die jünger als 2 Wochen sind, sind Ohrkerbung und Ohrlochung als problematisch einzustufen, da die Entfernung eines auch nur kleinen Gewebestücks einen signifikanten Teil des Ohrblattes bedeuten kann. Optimaler Weise sollte der Eingriff im Alter zwischen 18 – 21 Tagen durchgeführt werden.

- *Schwanzspitze*

Die Schwanzspitzenbiopsie war die bisher am häufigsten verwendete Methode zur Genotypisierung. Sie liefert im Vergleich zu anderen Methoden eine größere Menge genomischer DNA, die auch für Southern Blots ausreicht. Die Schwanzspitzenbiopsie sollte nur mehr angewandt werden, wenn das bei der Kennzeichnung der Tiere durch Ohrlochung bzw. -kerbung oder Zehenendgliedbiopsie gewonnene Gewebe für eine Analyse nicht ausreicht oder eine Kennzeichnungsmethode verwendet wird, bei der keine Gewebeprobe anfällt.

Zur Probengewinnung wird die Schwanzspitze mit einem Skalpell oder einer scharfen Schere abgesetzt. Der Schwanz ist u.a. für die Thermoregulation und die Balance des Tieres wichtig. Daher ist die Größe des Biopats der gewählten Untersuchungsmethode anzupassen und muss sich auf jene Menge an Gewebe beschränken, die zur Durchführung der Analyse unbedingt erforderlich ist. Für die PCR genügen 1 – 2 mm. Generell sollten nicht mehr als 5 mm der Schwanzspitze abgesetzt werden.

Darüber hinaus ist das Alter der Tiere bei der Probennahme zu berücksichtigen. Zur Schonung des Tieres sollte die Schwanzspitzenbiopsie frühestens 14 Tage nach der Geburt durchgeführt werden. Bei jungen Tieren liefert eine Biopsie der Schwanzspitze außerdem vergleichsweise viel DNA, da die Haut noch wenig verhornt ist und die kaudalen Wirbel noch nicht kalzifiziert sind. Falls gleichzeitig auch Blutzellen untersucht werden sollen, können in Verbindung mit der Schwanzspitzenbiopsie auch 2 – 3 Tropfen Blut gewonnen werden.

- *Blutprobe*

Aus Mausblut können je ml ca. 20 – 30 µg genomische DNA extrahiert werden. Eine zur Durchführung einer PCR-Untersuchung ausreichende Blutmenge (ca. 20-50 µl) kann mittels Schwanzvenenpunktion mit einer 30G Kanüle gewonnen werden. Alternativen dazu sind die Punktion der *Vena facialis* mit einer Lanzette, der *Vena saphena* oder des retrobulbären Venenplexus. Zu beachten ist, dass bei einmaliger Blutentnahme höchstens 10 % des Blutvolumens entnommen werden dürfen.

- **Zehenendglied**

Die Zehenendgliedbiopsie (Toe Tip Clipping oder Distal Phalanx Biopsy) sollte ausschließlich angewandt werden, wenn die Tiere besonders früh, d.h. noch während der Säugephase, genotypisiert *und* individuell gekennzeichnet werden müssen. Die Anwendung dieser Methode ist auf den Zeitraum zwischen dem 4. und 8. Lebenstag zu beschränken, da der Eingriff zu einem früheren Zeitpunkt nicht mit der erforderlichen Präzision durchgeführt werden kann und zu einem späteren Zeitpunkt mit ausgeprägten Schmerzen zu rechnen ist. Als optimaler Zeitpunkt zur Vornahme einer Zehenendgliedbiopsie wird in der Literatur der 7. Lebenstag empfohlen.

Pro Pfote darf nur ein Zehenendglied entfernt werden. Dabei ist zu beachten, dass das distale Glied vollständig abgetrennt wird, da es sonst zu einer Regeneration kommen kann, die eine spätere Identifizierung des Tieres erschwert. Zur Differenzierung der Zehen bzw. Zehenglieder kann die Verwendung einer Lupe erforderlich sein. Der Eingriff sollte sich pro Tier auf zwei Pfoten beschränken.

III. Empfehlungen

1. Generelle Empfehlungen

- Kann die Genotypisierung durch mehrere Analysemethoden erfolgen, so ist jene Methode zu wählen, die mit der geringsten Menge an DNA auskommt.
- Zur Entnahme von Gewebeproben ist die am wenigsten belastende Methode zu verwenden, mit der die benötigte DNA Menge sicher zu gewinnen ist.
- Bei Anwendung invasiver Methoden darf nur so viel Gewebe entnommen werden, wie tatsächlich benötigt wird.
- Die Methoden zur Genotypisierung sollten regelmäßig überprüft werden, um neuere Entwicklungen zu nutzen, die weniger invasiv sind oder weniger Gewebe benötigen.
- Kontaminationen der Gewebeproben sind während der Probennahme sorgfältig zu vermeiden, um eine wiederholte Biopsie zu vermeiden.
- Methoden zur Gewebegewinnung, die gleichzeitig zur individuellen Kennzeichnung der Tiere dienen, sind zu bevorzugen, wenn sowohl für die Kennzeichnung als auch für die Probenentnahme eine invasive Methode erforderlich ist (Vermeidung der Doppelbelastung).
- Die Genotypisierung ist von fachkundigem Personal durchzuführen.

2. Spezifische Empfehlungen

2.1. Anwendung nicht-invasiver Methoden

Die Anwendbarkeit nicht-invasiver Methoden zur Gewebegewinnung (DNA-Gewinnung aus Haarbulben, Mund- oder Darmschleimhaut) sollte in jedem einzelnen Fall in Erwägung gezogen werden. Einer nicht-invasiven Methode ist jedenfalls dann der Vorzug zu geben, wenn nach Anwendung einer invasiven Probennahme, eine Wiederholung der Genotypisierung erforderlich ist.

2.2. Anwendung invasiver Methoden

- *Ohrblatt*

Werden Tiere durch Ohrkerbung oder Ohrlochung gekennzeichnet, so ist das dabei anfallende Gewebe gleichzeitig zur Genotypisierung zu verwenden, wenn die Analyse mittels PCR vorgesehen ist. Bei Mäusen, die jünger als 2 Wochen sind, sollte die Ohrkerbung bzw. Ohrlochung *nicht* vorgenommen werden.

- *Schwanzspitze*

Die Schwanzspitzenbiopsie sollte nicht mehr die erste Wahl zur Genotypisierung sein. Unter dem Aspekt der Belastungsminimierung ist nicht-invasiven bzw. weniger belastenden Methoden der Vorzug zu geben. Müssen die Tiere genotypisiert *und* mittels invasiver Technik gekennzeichnet werden, so ist grundsätzlich eine Methode zu wählen, mit der beide Zwecke durch einen Eingriff erreicht werden können.

Ist die Schwanzspitzenbiopsie dennoch erforderlich, dürfen für Southern Blots höchstens 5 mm der Schwanzspitze abgesetzt werden. Eine Wiederholung der Schwanzspitzenbiopsie ist in jedem Fall zu vermeiden.

Das Entfernen der Schwanzspitze darf nicht vor dem 14. Lebenstag erfolgen. Das bevorzugte Alter zur Vornahme einer Schwanzspitzenbiopsie liegt zwischen dem 18. und 28. Lebenstag.

Das Erfordernis einer Schmerzausschaltung bzw. Schmerzbehandlung ist im Einzelfall zu prüfen. Eine lokale Betäubung der Schwanzspitze, z.B. durch Eintauchen in eiskaltes Ethanol für 10 Sek. oder Anwendung eines Kältesprays, wird empfohlen. Bei über 4 Wochen alten Mäusen sind die Wirbel der Schwanzspitze bereits verknöchert, sodass zudem eine lokale Schmerzstillung erforderlich ist.

- *Blutproben*

50 µl Blut liefern ausreichend DNA für eine Genotypisierung mittels PCR. Die Blutprobe sollte durch eine einmalige Blutabnahme gewonnen werden, wobei höchstens 10 % des gesamten Blutvolumens entnommen werden dürfen. Daher sollten Blutabnahmen zur Genotypisierung an Mäusen, die jünger als 2 Wochen sind, *nicht* vorgenommen werden.

Für die Blutentnahme ist jene Technik zu wählen, die für das Tier am schonendsten ist und keine Narkose erfordert (Punktion der Schwanz- oder Facialvene).

- *Zehenendglied*

Die Zehenendgliedbiopsie sollte als Biopsiemethode nur dann angewandt werden, wenn damit gleichzeitig eine individuelle Kennzeichnung vorgenommen wird. Der Eingriff darf nur zwischen dem 4. und 8. Lebenstag vorgenommen werden. Er ist auf ein Zehenendglied pro Pfote zu beschränken, wobei maximal 2 Pfoten pro Tier betroffen sein dürfen.

IV. Weiterführende Literatur:

1. FELASA guidelines for the refinement of methods for genotyping genetically modified rodents: A report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group.

D Bonaparte, P Cinelli, E Douni, Y Héroult, A Maas, P Pakarinen, M Poutanen, M S Lafuente and F Scavizzi. *Laboratory Animals* (2013) 47: 134–145

2. Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations Working Group on animal identification.

K Dahlborn, P Bugnon, T Nevalainen, M Raspa, P Verbost and E Spangenberg. *Laboratory Animals* (2013) 47: 2–11

3. R Binder, P Kronen, V Marashi, Y Moens, U Pohl, T Rülcke (2013): Refinement II: Grundsätze des Versuchsrefinements. In: R Binder, N Alzmann, H Grimm (Hrsg): *Wissenschaftliche Verantwortung im Tierversuch. Ein Handbuch für die Praxis*, Baden-Baden, Nomos, 230–264

T Rülcke (2013): Das adäquate Tiermodell. In: R Binder, N Alzmann, H Grimm (Hrsg): *Wissenschaftliche Verantwortung im Tierversuch. Ein Handbuch für die Praxis*, Baden-Baden, Nomos, 165-183