

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Sofern nicht anders beschrieben wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Enzyme und Oligonukleotide von den folgenden Firmen bezogen: Amersham-Pharmacia (Freiburg), Biotex (Berlin), Biozym (Hess. Oldendorf), Dianova (Hamburg), Gibco/BRL (Karlsruhe), Heraeus-Kulzer (Wehrheim), Invitex (Berlin), MBI-Fermentas (St.Leon-Rot), Merck (Darmstadt), MWG-Biotech (Ebersberg), New England Biolabs (Frankfurt), Pan-Biotech (Aidenbach), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Shandon (Frankfurt) und Sigma (Deisenhofen).

2.1.2 Lösungen und Reagenzien

Alle Lösungen und Reagenzien wurden mit Wasser angesetzt, das zuvor über eine Aufbereitungsanlage (Milli-Q Plus Water System, Millipore) bis zum Qualitätsgrad „aqua bidest“ aufgereinigt wurde. Die Lösungen wurden zum Teil autoklaviert oder steril-filtriert.

Name	Zusammensetzung
TE	10 mM Tris base 1 mM EDTA, pH 8.0
Schwanzpuffer	200 mM NaCl 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 5 mM EDTA, pH 8.0 0.2% SDS
Tris-HCl	1 M Tris base pH 7.4, 7.5, 8.0, 9.5 mit HCl
EDTA	0.5 M EDTA pH 8.0 mit NaOH
DNA-Extraktionspuffer	10 mM Tris base 100 mM EDTA 0.5 % (w/v) SDS pH 8.0 mit NaOH

Name	Zusammensetzung
ES-Zellysepuffer	10 mM Tris-HCl, pH 7.5 10 mM EDTA, pH 8.0 10 mM NaCl 0.5 % (w/v) N-lauroylsarcosine 0.2 mg/ml Proteinase K
Ethanol-Na-Ac-Mix	0.15 M Na-Ac, pH 5.2 in Ethanol
Na-Ac	3 M Natriumacetat pH 5.2
LB-Medium	1 % (w/v) Bacto-Trypton 0.5 % (w/v) Hefe-Extrakt 1 % (w/v) NaCl
Southern-Hybridisierungslösung	0,5 M NaH ₂ PO ₄ 1 mM EDTA pH 7.2 mit NaOH dann bei 68 °C 1 % (w/v) BSA 7 % (w/v) SDS
Fibroblasten-Medium	500 ml Dulbecco's MEM mit Glutamax-I mit 60 ml hitzeinaktiviertes FCS 5.7 ml 100x nicht-essentielle Aminosäuren 5.7 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung 1.2 ml 50 mM β-Mercaptoethanol
Mitomycin C-Lösung	0.2 % (w/v) Mitomycin C in PBS
Einfriermedium	20 % (v/v) DMSO 30 % (v/v) FCS 50 % (v/v) ES-Zellmedium
ES-Zell-Medium	500 ml Dulbecco's MEM mit Glutamax-I mit 90 ml hitzeinaktiviertes FCS 6 ml 100x nicht-essentielle Aminosäuren 6 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung 1.2 ml β-Mercaptoethanol 60 µl LIF
Vorbereitungslösung	100 ml Technovit 7100 mit 1 g Härter I
Phosphatpuffer	0.2 M NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ , pH 7.4
PBT	PBS _{DEPC} 0.15% Tween 20
PBTx	0.1 % (v/v) Triton-X 100 in PBT
PBS _{DEPC}	PBS DEPC-behandelt
H ₂ O _{DEPC}	MilliQ-H ₂ O DEPC-behandelt
SSC _{DEPC}	SSC DEPC-behandelt

Name	Zusammensetzung
Hybridisierungslösung (Whole mount <i>in situ</i> -Hybridisierung)	50 ml ultrareines, deionisiertes Formamid 25 ml 20x SSC 6 ml 1 M Zitronensäure _{DEPC} 1 ml 10 mg/ml Lachsspermien-DNA (10 min bei 95 °C denaturiert) 100 µl 50 mg/ml tRNA (10 min bei 95 °C denaturiert) 150 µl Tween 20 40 µl 100 mg/ml Heparin auf 100 ml mit H ₂ O _{DEPC}
Zitronensäure _{DEPC}	1 M Zitronensäure DEPC-behandelt
Lösung I (Whole mount <i>in situ</i> -Hybridisierung)	125 ml Formamid 62.5 ml 20x SSC 375 µl Tween 20 auf 250 ml mit H ₂ O _{DEPC}
Lösung II (Whole mount <i>in situ</i> -Hybridisierung)	25 ml 5 M NaCl 2.5 ml 1 M Tris-HCl, pH 7.5 375 µl Tween20 auf 250 ml mit H ₂ O _{DEPC}
Lösung III (Whole mount <i>in situ</i> -Hybridisierung)	125 ml Formamid 25 ml 20x SSC 375 µl Tween20 auf 250 ml mit H ₂ O _{DEPC}
TBST	8.0 g NaCl 0.2 g KCl 2.5 ml 1 M Tris-HCl, pH 7.4 1.5 ml Tween 20 auf 1 l mit H ₂ O _{DEPC}
AP-Puffer	25 ml 1 M Tris-HCl, pH 9.5 12.5 ml 1 M MgCl ₂ 5 ml 5 M NaCl 375 µl Tween 20 auf 250 ml mit H ₂ O _{DEPC}
TBS	150 mM NaCl 100 mM Tris-HCl, pH7.4 2 mM KCl
NTMT	100 mM NaCl 100 mM Tris-HCl pH 9.5 50 mM MgCl ₂ 0.1 % (v/v) Tween20
TBSX	0.1 % (v/v) Triton-X 100 in TBS
Hybridisierungspuffer (<i>In situ</i> -Hybridisierung auf Gefrierschnitten)	50 ml ultrareines, deionisiertes Formamid 25 ml 20x SSC 5ml 100X Denhardts Lösung 1.5 ml 10 mg/ml tRNA (10 min bei 95 °C denaturiert) 5 ml 10 mg/ml Lachsspermien-DNA (10 min bei 95 °C denaturiert) 13.75ml H ₂ O _{DEPC}

Name	Zusammensetzung
Acetylierungspuffer	295 ml MilliQ-H ₂ O 4 ml Triethanolamin 0.5ml HCl 0.75ml Essigsäureanhydrid
B1-Puffer	0.1 M Tris-HCl, pH 7.5 0.15 M NaCl
Blockierungslösung (Immunhistochemie)	1-5 % (v/v) Pferdeserum 0.1 % (v/v) Triton-X 100 in PBS
Depurinierungspuffer	250 mM HCl
Denaturierungspuffer	1 M NaCl 0.5 M NaOH
20x SSC	3 M NaCl 300 mM Na-Citrat, pH 7,0
Toluidine-Blau	0,1% Toluidine-Blau-O in 0,2M Walpole Puffer, pH 4,45

Tab. 2.1 Lösungen und Reagenzien

2.1.3 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Biotex (Berlin) bezogen.

Name	Sequenz
5' Tsh3 Ab	CAT ATG CCC AAC ATG ATG AAG TTG T
3' Tsh3 Ab	GGA TCC GAA GCT GCC GTC GCT GGA G
Tsh3_grc_3'	GATATTTCTATATTAGCCCAAATTAACCTTGAACATAATATGCAC TGCAGGTTGGCCAGGA
Tsh3_grc_5'	AATGGATGCCCCAAAACAGGCATGTCACTCATCTAAGGATGTC ATGTGCTCTTGATCACT
DualNeosense	GGGCTGGCACTCTGTCGATA
DTA_antisense	TGTTCTGAATTCGCCAATGAC
lox2_down	GACCCGAGTGACCCACTG
FRT2_down	GTAACCGTTCGTACGAGAATGGA
genot.NLS_lacZ_as	CGATTAAGTTGGGTAACGC
genot_lacZ_anti	ACACCTGCTGCAGGGTCTTC
Tsh3_5`probe_sense	GAGTTGCCTGCTATGGGTACC
Tsh3_5`probe_anti	ATCTCAGAGCTCATGAGCTGG

Name	Sequenz
Tsh3_3`probe_sense	CTCGAAGGTGCCGGGATAAC
Tsh3_3`probe_anti	TCGAAGGTCTATCCTCCTCC
genot_flox_sense	GTGACACACTCTGTGCCCTGTTTTG
genot_flox_anti	CCAACCTGGTTGTCTCTGCTTGCTT
genotyp_flp_sense	ATACAGCAGGAGTGAGCTCCGCATA
genotyp_flp_anti	CTCATTACATTTTCGAGGCTCCATC
LiMA_lacZ_sense	GCTCGAGCGTCTCATTTGCCACCTTC
LiMA_lacZ_anti	GCCATGGTCATGGCTGGAGAACTCAG
ReMA_lacZ_sense	GTCTAGACTGGTGACATCCTCCCCGGA
ReMA_lacZ_anti	ATGCGGCCGCGACCGAACAGTCCAGCCCAG

Tab. 2.2 Verwendete Primer

2.1.4 Plasmidvektoren

Name	Bezugsquelle
pBluescript-SK II (+/-)	(Sorge, 1988)
pGEM-T bzw. pGEM-T Easy	Promega, Mannheim
pET14b	Novagen
pFLAG-CMV TM 1	Sigma
pTracer TM -SV40	Invitrogen

Tab. 2.3 Verwendete Plasmidvektoren

2.1.5 Bakterienstämme

Name	Referenz
Escherichia coli XL1-Blue MRF	(Jerpseth <i>et al.</i> , 1992)
Escherichia coli NS3529 und NS3516	(Cohen und Sternberg, 1989)
Escherichia coli DY380	(Yu <i>et al.</i> 2000)
Escherichia coli DH10B	
BL21 (DE3)pLysS	(Stratagene)

Tab. 2.4 Verwendete Bakterienstämme

2.1.6 Antikörper

In Tabelle 2.5 sind die verwendeten polyklonalen Primär-Antikörper aufgelistet, die die genannten Antigene der Maus binden. Die benutzten Sekundär-Antikörper für Fluoreszenzimmunhistochemie (Dianova, Hamburg) waren Anti-Maus-IgG-, Anti-Kaninchen-IgG-, Anti-Ziege-IgG- oder Anti-Meerschweinchen-IgG -Antikörper, jeweils gekoppelt an Cy2, Cy3 oder Cy5; sie wurden in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt.

Antigen	Spezies	Verd.	Bezugsquelle
ACK2	Ratte	1:100	Bioscience, San Diego, CA, USA
CGRP	Kaninchen	1:20000	Sigma, ST. Louis, MO, USA
c-Ret	Ziege	1:2000	R&D Systems, MN, USA
IB4 lectin FITC-conjugated	Griffonia simplicifolia	1:200	Sigma, ST. Louis, MO, USA
Lbx1	Kaninchen	1:10000	Labor C. Birchmeier, Berlin
Lmx1b	Meerschweinchen	1:1000	Labor C. Birchmeier, Berlin
Map2ab	Maus	1:1000	Sigma, ST. Louis, MO, USA
NF	Maus	1:1000	Sigma, ST. Louis, MO, USA
Neuropeptide-Y	Kaninchen	1:10000	Sigma, ST. Louis, MO, USA
P2X3	Kaninchen	1:5000	Abcam, Cambridge, MA, USA
Peripherin	Kaninchen	1:5000	Chemicon, Temecula; CA, USA
Substance P	Kaninchen	1:1000	Zymed, San Francisco, CA, USA
Tshz1,2,3	Kaninchen/Meerschweinchen	1:500	C. Frahm, MDC, Berlin
TrkA	Kaninchen	1:2000	L. Reichardt, San Francisco, USA
VR1	Ziege	1:200	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA

Tab. 2.5 Verwendete Primär-Antikörper

Aufgeführt ist das vom Antikörper erkannte Maus-Antigen und die Spezies in der der Antikörper erzeugt wurde. Desweiteren ist die in dieser Arbeit verwendete Verdünnung für die Immunhistochemie und die Bezugsquelle für den Antikörper angegeben.

2.1.7 Zelllinien

Für die Kultur und Transfektion von ES-Zellen zur Herstellung transgener Mäuse wurde die embryonale Stammzelllinie E14.1 aus dem Mausstamm 129P2/Ola

(Kühn *et al.* 1991) verwendet. In dieser Arbeit wurde ein Aliquot wenig passagierter ES-Zellen aus dem Labor von C.B. benutzt.

2.1.8 Mausstämme

c-Kit Mäuse: Es wurde ein Mausstamm verwendet, der ein loss-of-function Allel (bezeichnet als *W*, für dominant white spotting) besitzt, das aus einer Punktmutation entstanden ist. Dafür wurde ein spezifischer Inzucht-Substamm, der das *W* Allel trägt (WB-pedigree, Jackson Labs), verwendet, der während der Inzucht-Prozedur durch Selektion von Elterntieren mit erhöhter Überlebensrate ihrer homozygoten Nachkommen etabliert wurde. Die in dieser Arbeit verwendeten Tiere wurden über Hans-Reimer Rodewald (Department of Immunology, Ulm, Deutschland) von der Shizuoka Laboratory Company (SLC, Shizuoka, Japan) bezogen.

CD1-Auszucht Mäuse: Die verwendeten CD1-Auszucht Mäuse stammen aus eigener Zucht bzw. wurden von Charles River (Sulzfeld) bezogen.

Teashirt3 Mäuse: bei *Teashirt3*^{-/-} Tieren wurde durch homologe Rekombination in ES Zellen die kodierende Sequenz von *Teashirt3* durch eine *LacZ*-Reportergen Selektionskassette (Guillemot *et al.* 1993) ersetzt. Außerdem wurde das *Teashirt3*-Gen in Mäusen konditionell mutiert.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Im Folgenden werden die experimentellen Methoden beschrieben, die bei der Anfertigung dieser Arbeit zur Anwendung kamen. Standardmethoden waren von Sambrook (2001) abgeleitet und sind hier nicht näher behandelt. DNA-Konstrukte wurden von K. Gottschling im C.B. Labor sequenziert.

2.2.1.1 DNA-Isolierung und -Aufreinigung

2.2.1.1.a Präparation von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten

Die Mini-Präparation von Plasmid-DNA erfolgte durch alkalische Lyse; die Plasmid-DNA wurde in 35 µl TE-Puffer mit 0.2 µg/µl RNase A eluiert und bei 4 °C gelagert. Die Präparation von Plasmid-DNA im größeren Maßstab erfolgte mit dem Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) oder dem NucleoBond PC-500 Kit (Machery-Nagel, Düren) gemäß Herstellerangaben. Die DNA wurde in 50-100 µl TE-Puffer eluiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.1.1.b Isolierung genomischer DNA aus ES-Zellen

Für den Nachweis von homologer Rekombination in embryonalen Stammzellklonen (ES-Zellklonen), wurde die genomische DNA nach Ramirez-Solis präpariert (Ramirez-Solis *et al.*, 1992) und mittels Southern-Blot untersucht. Die konfluenten ES-Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 50 µl ES-Zell-Lyse-Puffer (10 mM Tris pH 7,5; 10 mM EDTA; 10 mM NaCl; 0,5 % N-Lauroylsarcosin, entspricht „Sarcosyl“; 200 µg/ml Proteinase K) bei 60 °C in einer mit Parafilm abgedichteten Feuchtkammer über Nacht inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl 100 % Ethanol mit 1/20 Volumen 3 M Natriumacetat wurde die DNA für 30 min bei Raumtemperatur gefällt. Anschließend wurden die Überstände abgegossen, die DNA dreimal mit 70 % Ethanol gewaschen und für etwa 20 min leicht getrocknet. Die Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen in 50 µl „Restriktionsmix“ (1x Restriktionspuffer; 100 µg/ml BSA; 50 µg/ml RNase; etwa 2 Units Restriktionsenzym je µg zu spaltender DNA) schloss sich bei 37 °C über Nacht unter leichtem Schütteln an. Die Hälfte dieses Ansatzes wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und das Gel zur Southern-Blot-Hybridisierung eingesetzt.

2.2.1.1.c Isolierung genomischer DNA aus embryonalem Gewebe, Ohrlöchern bzw. Schwanzstücken

Dottersäcke oder andere embryonale Gewebe (E14,5) wurden in Lysis-Puffer I (10 mM Tris, pH 8,9; 50 mM KCl; 3 mM MgCl₂; 0,01 % Gelatine; 0,45 % Nonidet P40; 0,45 % Tween 20; 100 µg/ml Proteinase K) aufgenommen. Ohrlöcher und Schwanzstücke wurden in Lysis-Puffer II (100 mM Tris, pH 8,5; 200 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,2 % SDS; 100 µg/ml Proteinase K) über Nacht bei 55 °C inkubiert. Darauf folgte die Inaktivierung der Proteinase K für 10 min bei 95 °C. Nach Zugabe von 200 µl Aqua bidest. wurde je 1 µl der verdünnten Lösung für die Genotypisierung in einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) eingesetzt. Die DNA aus Schwanzstücken wurde für die genomische Southern-Blot-Hybridisierung präpariert und durch Phenol/Chloroform extrahiert. Nach Fällung und Waschen der DNA wurde das Präzipitat in 100 µl Aqua bidest. mit 50 µg/ml RNase A aufgenommen.

2.2.1.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die PCR wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Klonierung und die Genotypisierung eingesetzt. Die PCR wurde nach Standardmethoden (Sambrook 2001) in PCR-Maschinen von Bio-Rad (München) und Biometra (Göttingen) durchgeführt. Es wurden die folgenden Polymerasen mit den entsprechenden Puffern gemäß Herstellerangaben verwendet: Taq (Invitrogen, Karlsruhe), Pyrobest, LA-Taq (beide von Takara, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich; bezogen von Cambrex, Potsdam), PfuUltra (Stratagene, Amsterdam, Niederlande). Für die präparative PCR wurde das Amplifikationsprodukt entweder PCI-extrahiert oder elektrophoretisch aufgetrennt und dann isoliert.

Für die Routine-Genotypisierung wurde DNA verwendet, die aus embryonalem Gewebe und Biopsien extrahiert wurde. Ein Reaktionsansatz enthielt: 1-2 µl des hitzeinaktivierten Lysats, 2 µl dNTPs (2,5 mM jedes Nukleotids; Invitrogen, Berlin), 2 µl 10x-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe), 1 µl Primer1 (5 µM), 1 µl Primer2 (5 µM), 1,2 µl MgCl₂ (Invitrogen, Karlsruhe), 0,15 µl Taq (Invitrogen, Karlsruhe) und MilliQ-

H₂O auf 20 µl. Das PCR Programm umfasste: 5 min 94 °C, dann 35x der Zyklus 30 s 95 °C, 20 s 57 °C und 1 min 72 °C, schließlich folgte 4 °C.

2.2.1.3 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.2.1.3.a Herstellung von kompetenten DH10B Zellen und XL1-Blue MRF

LB-Medium (5 ml) wurde mit einer Einzelkolonie des *E.coli*-Stammes DH10B bei 37 °C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1 ml der Vorkultur in 1 l SOB-Medium (20 g Bacto-Trypton; 5 g Bacto-Hefe; 0,584 g NaCl; 0,186 g KCl in 1 l Aqua bidest.) überführt und solange bei 37 °C inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht war. Die Bakteriensuspension wurde in Zentrifugenbecher überführt und bei 1500 x g für 10 min in einer Kühlzentrifuge (4 °C) zentrifugiert. Das Pellet wurde in ca. 150 bis 200 ml 10 % Glycerin resuspendiert und bei 4 °C 10 min zentrifugiert (4000 x g). Dieser Waschschrift wurde ein zweites Mal durchgeführt. Der Überstand wurde dekantiert, wobei ca. 30 bis 50 ml in jedem Becher zurückbehalten wurden. Die Zentrifugation bei 5000 x g und 4 °C für 10 min folgte. Anschließend wurde der Überstand entfernt. Die Pellets wurden in ca. 15 ml 10 % Glycerin resuspendiert, vereinigt und in einem kleineren Gefäß bei 8000 x g zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 400 bis 600 µl 50 % Glycerin aufgenommen, in Reaktionsgefäße aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff gefroren (Lagerung bei -80 °C).

2.2.1.3.b Herstellung von Plasmid-Konstrukten

Um Vektor und Fragment zu verbinden, müssen beide kompatible Enden besitzen. Um dies zu erreichen, wurde der Vektor so in der multiplen Schnittstelle („multiple cloning site“) geschnitten, dass er die gleichen überhängenden Enden erhielt, wie das zu klonierende DNA-Fragment. Dazu wurde für die Linearisierung des DNA-Fragments und des Vektors das gleiche Restriktionsenzym verwendet. Um zu verhindern, dass der Vektor mit sich selbst legiert, wurde dem Restriktionsansatz 1 µl alkalische Phosphatase („shrimp alkaline phosphatase“, SAP) zugesetzt.

Anschließend wurde das Restriktionsenzym entsprechend der Herstellerangaben hitzeinaktiviert.

Der vorbereitete Vektor konnte zur Ligation mit dem DNA-Fragment verwendet werden, wobei das molare Verhältnis zwischen Vektor und dem zu integrierenden Fragment (Insert) bei überhängenden Enden 1:4 und bei glatten Enden 1:10 betrug. Der Ansatz wurde nach der Ligation mikrodialysiert und konnte in kompetente Zellen transformiert werden.

2.2.1.3.c Ligation

In einen Ligationsansatz, der im Allgemeinen aus 10 µl bestand, wurden die zu verknüpfenden DNA-Fragmente mit 1/10 Volumen Ligationspuffer (10x konzentriert, mit ATP; 1 µl (5 U) T4-DNA-Ligase und einer entsprechenden Menge Aqua bidest.) gemischt. Die Ligation erfolgte 2 h bei RT.

2.2.1.3.d Transformation

Die Transformation kompetenter Bakterien wurde nach zwei Protokollen durchgeführt. Entweder wurden die Zellen durch die Hitzeschock-Methode (Inoue *et al.*, 1990) kompetent gemacht oder wie im folgenden Abschnitt beschrieben behandelt.

Die elektrokompenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 25 µl der elektrokompenten Zellen mit dem Ligationsansatz gemischt. Dieser Ansatz wurde in eine Küvette für die Elektrotransformation gegeben. Die Küvette wurde im GenePulser einem Hochspannungsimpuls (BioRad, 1,85 kV bei 200 Ω und 25 µF) ausgesetzt, wodurch ein Teil der kompetenten Zellen mit dem Plasmid transformiert wurde. Unmittelbar danach wurde 1 ml LB-Medium auf die Zellen gegeben. Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach konnten die transformierten Zellen auf Agarplatten, die das entsprechende Selektionsantibiotikum enthielten, ausplattiert werden.

2.2.1.3.e Homologe Rekombination in Bakterien

Homologe Rekombination in Bakterien ermöglicht die Sequenz-spezifische Integration oder Exzision von DNA-Fragmenten in bzw. aus Plasmiden (Yu *et al.*, 2000). Um eine hohe Rekombinationsfrequenz zu erzielen, müssen die homologen Sequenzen am 5'- und 3'-Ende eines Fragments mindestens 40 bp umfassen. In dieser Arbeit wurden homologe Sequenzen mit einer Länge von 100 bp bis 300 bp verwendet. Zuerst wurde der zu manipulierende Vektor in DY380-Bakterien transformiert. Dieser Bakterien-Stamm trägt einen Prophagen, der die für die Rekombination notwendigen Gene *exo*, *bet* und *gam* unter der Kontrolle eines temperatursensitiven Repressors enthält. Zur Manipulation des Vektors wurden DNA-Fragmente genutzt, die entweder mittels PCR amplifiziert oder aus einem zuvor hergestellten Plasmid isoliert wurden. Die Fragmente enthielten zusätzlich eine Antibiotikaresistenz-Kassette, welche die Selektion von rekombinierten Klonen erlaubte. Um das Fragment in den Vektor zu rekombinieren, wurde der den Vektor enthaltende DY380-Bakterienklon in Kultur genommen und bis zu einer OD_{550} von 0,6-0,8 kultiviert. Danach wurden die Bakterien durch einen Temperaturwechsel auf 42 °C für 15 min für die Rekombination kompetent gemacht. Anschließend wurden die Zellen auf Eis gekühlt und für die Elektrotransformation vorbereitet. Das zu rekombinierende DNA-Fragment wurde in die Bakterien transferiert und auf Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die korrekte Rekombination in den Klonen wurde mittels Restriktionsverdau geprüft.

2.2.1.4 Herstellung von Antikörpern

Mithilfe der RT-PCR wurden die kodierenden Sequenzen von Tshz1, Tshz2 und Tshz3 amplifiziert und in den bakteriellen Expressionsvektor pET14b (Novagen) kloniert. Der Vektor kodiert unter anderem die Sequenz für den His6-tag. Der His6-tag-Bereich wurde für die Aufreinigung genutzt. His6-Tshz1, His6-Tshz2 und His6-Tshz3 wurden mithilfe des Bakterienstammes BL21 (DE3)pLysS produziert. Die Proteine wurden mit einem TALON-Metall-Granulat (Clontech) entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt und die Konzentrationen nach der Bradford-

Methode (BioRad) nach den Herstellerhinweisen bestimmt. Die Antikörperproduktion erfolgte in verschiedenen Spezies. Durch die Zentrale Einrichtung des Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin wurden Antikörper aus Kaninchen hergestellt. Antikörper aus dem Meerschweinchen wurden von Charles River generiert.

2.2.1.5 *In vitro*-Transkription und DIG-Markierung von RNA Sonden

Die Linearisierung von Plasmid-DNA für die *in vitro*-Transkription und DIG-Markierung einer RNA-Sonde erfolgte mit 50 µg Plasmid-DNA in einem 100 µl Reaktionsansatz mit 50 U des benötigten Enzyms üN bei 37 °C. Die Aufreinigung der DNA wurde mit Lösungen aus dem Jetquick Plasmid Miniprep Spin Kit und dem Jetquick PCR Product Purification Spin Kit (beide Genomed, Löhne) durchgeführt. Dabei wurde der Reaktionsansatz von 100 µl mit 400 µl Puffer H1 vermischt und auf eine Säule aus den genannten Kits gegeben. Dann wurde 1 min bei 14000 rpm in einer Tischzentrifuge (Centrifuge 5417; Eppendorf, Hamburg) bei RT zentrifugiert, 500 µl Puffer GX auf die Säule gegeben, 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert, 700 µl Puffer G4 zugegeben, 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert und die Säule schließlich 2 min bei 14000 rpm trocken zentrifugiert. Dann wurden 25 µl 70 °C warmes 10 mM Tris, pH 8,0 (und RNase-frei), auf die Säule gegeben, darin 2 min bei 70 °C inkubiert und die DNA durch 1 min Zentrifugation bei 14000 rpm und RT eluiert. Die Elution wurde mit weiteren 25 µl 70 °C warmem 10 mM Tris, pH 8,0, wiederholt, danach wurde die linearisierte Plasmid-DNA bei -20 °C gelagert.

Für die *in vitro*-Transkription und DIG-Markierung von RNA-Sonden wurden, wenn nicht anders angegeben, Reagenzien und Enzyme von Roche (Mannheim) verwendet. Die Linearisierung der DNA-Matrize erfolgte mit 50 µg Plasmid-DNA in einem 100 µl Reaktionsansatz mit 50 U des passenden Enzyms üN bei 37 °C. Ein Reaktionsansatz enthielt 1-2 µl linearisiertes und aufgereinigtes Plasmid als Matrize, 2 µl 10x Transkriptionspuffer, 2 µl DIG-Labeling-Mix, 1 µl RNase-Inhibitor (RNaseOUT; Invitrogen, Karlsruhe), 1 µl der passenden Polymerase (T7, T3, SP6); wurde auf 20 µl mit H₂O_{DEPC} aufgefüllt, für 2 h bei 37 °C inkubiert und auf

Eis abgestoppt. Die Säulenaufreinigung der DIG-markierten RNA-Sonde erfolgte mit dem RNeasy MinElute Cleanup-Kit (Qiagen, Hilden) oder dem NucleoSpin RNA II Kit (Macherey-Nagel, Düren) gemäß Herstellerangaben. Die RNA wurde zweimal mit je 25 µl H₂O_{DEPC} eluiert mit 50 µl Formamid vermischt und die DIG-markierten RNA-Sonde für die in situ-Hybridisierung (2.2.3) eingesetzt oder bei -70 °C gelagert.

2.2.1.6 Radioaktive Markierung von Sonden

Zur Southern-Blot-Hybridisierung wurden die DNA-Proben mithilfe des „Prime-It RmT Random Primer Labeling Kits“ (Stratagene) durch Einbau von α-³²P-dCTP radioaktiv markiert (Feinberg und Vogelstein, 1983). Die Proben wurden mit Sephadex G50-Mikrosäulen (Probe Quant G50, Amersham-Pharmacia) aufgereinigt und vor Beginn der Hybridisierung denaturiert.

2.2.1.7 Southern-Blot Analyse von Agarosegelen

Das Agarosegel wurde 8 min in Depurinierungspuffer (250 mM HCl) geschwenkt. Danach wurde das Gel zweimal in destilliertem Wasser gespült und zweimal für 20 min in Denaturierungspuffer (4x: 2 M NaOH; 4 M NaCl) inkubiert. Das Gel wurde 5 min in 20x SSC (20x: 3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat; mit 0,1 M HCl auf pH 7,0 einstellen, durch 0,45 µm Membran filtrieren) geschwenkt. Mit den Taschen wurde es nach unten auf eine Glasplatte gelegt und von oben mit 20x SSC befeuchtet. Eine Nylonmembran der Größe des Gels wurde luftblasenfrei auf das Gel gelegt und angedrückt. Darauf wurden luftblasenfrei drei Whatman-Papiere, die kurz in 20x SSC eingeweicht worden waren, gelegt und mit einer 5 cm dicken Lage aus Papierhandtüchern überdeckt. Auf die Papierhandtücher wurde eine zweite Glasplatte gelegt und der gesamte Aufbau umgedreht, um den Transfer der DNA durch die Schwerkraft zu unterstützen. Am nächsten Tag wurde der Aufbau zerlegt und die Membran zweimal in 2x SSC geschwenkt, um sie zu neutralisieren. Das Filterpapier wurde getrocknet und konnte dann für Hybridisierungen eingesetzt werden.

2.2.1.8 Radioaktive Hybridisierung

Alle Hybridisierungen wurden in Glasröhren durchgeführt. Die Membran (Southern-Blot) wurde in eine Röhre gebracht. Dazu wurden 6 bis 8 ml der auf 50 °C vorgewärmten Hybridisierungslösung (nach Church und Gilbert (1984): 0,5 M NaH₂PO₄; 1 mM EDTA; auf 190 ml H₂O auffüllen; 1 % BSA (w/v); 7 % SDS (w/v); mit 0,1 M NaOH, pH 7,2 einstellen; durch 0,8 µm Membran filtrieren) in eine Röhre gegeben. Die Membran wurde auf eine 20 ml Plastikpipette gewickelt, so dass sich die Seite mit der DNA innen befand. Die Membran wurde in die Hybridisierungsröhre gesteckt und unter Verdrängung der Flüssigkeit blasenfrei an der Innenwand der Röhre abgewickelt. Die Röhre wurde in den Hybridisierungssofen gegeben und bei 37 °C rotiert. Nach 30 min wurden 25-50 µg markierte Sonde in die Röhre gegeben und bei 65 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung entsorgt, durch 10 ml Waschlösung (1x SSC; 1 % SDS) ersetzt und bei 65 °C für 5 min rotiert. Die Lösung wurde erneut entsorgt und die Membran für 30 min mit der Waschlösung (1x SSC; 0,1 % SDS) gewaschen. Die Membran wurde aus der Röhre genommen und nochmals 15 min mit gleicher Waschlösung bei 65 °C im Wasserbad geschüttelt. Die Radioaktivität der Membran wurde mit dem Handmonitor gemessen. Lag sie nur unwesentlich über dem Hintergrund, wurde die Waschung beendet, andernfalls wurde mit stringenteren Lösungen erneut gewaschen. Nach jedem Schritt wurde die Radioaktivität der Membran geprüft. Es wurde in folgender Reihenfolge bei 65 °C weiter gewaschen: 0,5x SSC, 0,1 % SDS; 0,2x SSC, 0,1 % SDS; 0,1x SSC, 0,1 % SDS.

2.2.1.9 Autoradiographie

Die gewaschene Membran wurde in Folie eingepackt, in der Dunkelkammer auf einen Röntgenfilm (Kodak Biomax MR) aufgelegt und in einer Röntgenkassette bei -80 °C für einen Tag bis zu zwei Wochen exponiert. Der Film wurde dann entwickelt.

2.2.2 Histologische Methoden

2.2.2.1 Methacrylatschnitte

Zur Herstellung von Methacrylatschnitten wurden die präparierten Gewebestücke mit 4 % PFA in PBS 1-2 Tage fixiert und in einer Ethanolreihe (je 1 Tag in 30 %, 50 %, 70 %, 85 %, 96 %, 98 %, 99 % Ethanol) bei 4 °C dehydriert. Dann wurde das Gewebe in 1:1 100 % Ethanol: Technovit 7100 bei 4 °C präinfiltriert. Danach wurde das Gewebe üN in Vorbereitungslösung bei RT infiltriert, schließlich in 15:1 Vorbereitungslösung:Härter II eingebettet und üN bei RT auspolymerisiert. Die Präparate wurden dann mit Technovit 3040 auf Histoblöcke (Heraeus-Kulzer, Hanau) fixiert und bei RT gelagert. Es wurden 5 µm Semidünnschnitte mit einem Rotationsmikrotom (Microm HM360; Microm, Walldorf) angefertigt, im warmen Wasserbad gestreckt, auf Objektträger (Roth, Karlsruhe) aufgezogen und auf einem Heizblock getrocknet.

2.2.2.2 Gefrierschnitte

Zur Herstellung von Gefriergewebeschnitten wurden die Gewebeproben frisch präpariert und in eiskaltem PBS_{DEPC} gespült.

Wenn die Schnitte für die *in situ*-Hybridisierung auf Gefrierschnitten (2.2.3.2) verwendet werden sollten, wurden die Präparate entweder frisch in Tissue-Tek O.C.T Compound (Sakura Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet (s.u.), oder erst wie nachstehend fixiert.

Für die Immunhistochemie (2.2.4) wurden die Präparate 2 h in 4 % PFA in Phosphatpuffer bei 4 °C fixiert, kurz in PBS bei RT und üN in PBS bei 4 °C gewaschen. Danach erfolgte die Kryoprotektion der Präparate üN in 30 % D(+)-Saccharose in Phosphatpuffer bei 4 °C .

Die Präparate wurden dann kurz in Tissue-Tek geschwenkt, in eine Peel-A-Way Einbettform (Thermo, Dreieich) mit Tissue-Tek überführt und ausgerichtet. Die Präparate wurden anschließend in einer Mischung aus Ethanol und Trockeneis eingefroren und bei -70 °C gelagert.

Die Gefrierschnitte wurden mit einem Kryostaten (Microm HM560 Cryo-Star; Microm Walldorf) angefertigt. Die Schnittdicke betrug 12 oder 16 µm (12 µm für

die Immunhistochemie, 12 oder 16 µm für die *in situ*-Hybridisierung). Die Schnitte wurden auf Adhäsions-Objektträger (Histobond, Marienfeld, Lauda-Königshofen) aufgezogen, bei 37 °C getrocknet (mind. 30 min, für die *in situ*-Hybridisierung mind. 1 h) und luftdicht verpackt bei -70 °C gelagert.

2.2.2.3 Vibratomschnitte

Nach *in situ*-Hybridisierungen an ganzen Embryonen oder Geweben wurden sie in einigen Fällen in 20 % Gelatine/PBS eingebettet, um dickere Schnitte von diesen Geweben im Bereich von 20 bis 50 µm anfertigen zu können. Vor dem Schneiden wurden die Gelatine-Blöcke über Nacht in 4 % PFA fixiert und dann in PBS bei 4 °C gewaschen und gelagert. Die Schnitte wurden mithilfe des Vibratoms (Leica VT1000S, Bensheim) angefertigt, auf Objektträger aufgezogen, getrocknet und in 85 % Glycerol oder in Immunomount (Shandon, Frankfurt) eingedeckelt.

2.2.2.4 Toluidine-Blau-Färbung von Methacrylatschnitten

Zur Toluidine-Blau-Färbung von Methacrylatschnitten wurden die Semidünnschnitte je nach Alter des Präparats 7-15 min in Toluidine-Blau-O-Lösung (0,1 % Toluidine-Blau-O in 0,2M Walpole Puffer, pH 4,45) bei RT gefärbt. Die Schnitte wurden kurz in fließendem Wasser gespült und danach für maximal 20 s in 70 % EtOH gewaschen um Hintergrund-Färbung zu reduzieren. Danach wurden die Schnitte sofort 2x 2,5 min in VE-Wasser gespült. Der letzte Waschschrift erfolgt in milliQ H₂O. Die Schnitte wurden nun getrocknet und die Objektträger mit Entellan und Deckgläschen eingedeckelt.

2.2.3 *In situ*-Hybridisierungsmethoden

2.2.3.1 Herstellung von Embryopulver

Die Herstellung von Embryopulver erfolgte mit Mausembryonen der Stadien E10.5-E13.5, die nach der Präparation bei -20 °C eingefroren waren. Je nach

Größe wurden 10-20 Embryonen in einem möglichst kleinen Volumen von eiskaltem PBS homogenisiert. Sodann wurden 4 Volumen eiskaltes Aceton zugegeben und die Suspension 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Präzipitat 10 min mit 10000 g in einer Bodenkühlzentrifuge (Heraeus Varifuge 3.0 OR; Thermo, Langenselbold) bei 4 °C pelletiert, mit eiskaltem Aceton gewaschen und erneut pelletiert. Das Präzipitat wurde nun ausgebreitet, luftgetrocknet, fein gemörsert und bei -20 °C gelagert.

2.2.3.2 *In situ*-Hybridisierung auf Gefrierschnitten

Am ersten Tag der *in situ*-Hybridisierung auf Gefrierschnitten wurden die Schnitte 0,5-1 h bei RT aufgetaut und danach mit einem Fettstift umrandet. Die Schnitte wurden dann in eine Küvette überführt, 10 min in 4 % PFA in PBS_{DEPC} bei RT postfixiert und dreimal 5 min in in PBS_{DEPC} gewaschen. Danach wurde 10 min in Acetylierungspuffer acetyliert und dreimal 5 min in PBS_{DEPC} gewaschen. Die Schnitte wurden schließlich 1,5-3 h in Hybridisierungslösung in einer Feuchtkammer bei RT prähybridisiert. Währenddessen wurden Deckgläschen silanisiert. Vor der Hybridisierung wurden 1,5-3 µl der DIG-markierten RNA-Sonde (2.2.1.6) 5 min in 150 µl Hybridisierungslösung bei 80 °C denaturiert und die Lösung danach schnell abgekühlt. Die Prähybridisierungslösung wurde schließlich von den Schnitten entfernt und die Hybridisierungslösung mit Sonde aufgetragen. Die Objektträger wurden nun mit einem silanisierten Deckgläschen bedeckt und über Nacht in einer Feuchtkammer (mit 5x SSC, 50 % Formamid) bei 70 °C hybridisiert.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger in eine Küvette überführt und die Deckgläschen 5 min in 5x SSC bei RT abgelöst. Es wurde danach zweimal 30 min in 0,2x SSC bei 70 °C stringent gewaschen. Anschließend wurde 5 min in 0,2x SSC bei RT gewaschen und 5 min in B1-Puffer umgepuffert. Vor der Inkubation mit dem Anti-DIG-Antikörper, der gekoppelt an alkalische Phosphatase war, wurden die Schnitte 1 h in 1 ml B1-Puffer mit 10 % Ziegenserum (Blockierungslösung) in einer Feuchtkammer bei 4 °C vorinkubiert. Danach wurde

die Blockierungslösung entfernt und die Schnitte über Nacht in 400 µl 1:2500 Anti-DIG-Antikörper in B1-Puffer mit 10 % Ziegenserum bei 4 °C inkubiert.

Am dritten Tag wurden die Objektträger wieder in Küvetten überführt, dreimal 10 min in B1-Puffer bei RT gewaschen und 5 min in NTMT-Puffer bei RT umgepuffert. Anschließend wurden die Schnitte in die Färbelösung mit je 1 µl/ml NBT und BCIP in NTMT-Puffer gegeben und mehrere Tage lichtgeschützt bei 4 °C inkubiert bis die gewünschte Färbungsintensität erreicht war. Die Lösung wurde dabei alle zwei Tage gewechselt. Zum Schluss wurde dreimal in PBS gewaschen und die Objektträger mit Immunomount und Deckgläschen eingedeckt.

2.2.4 Immunhistochemie

Am ersten Tag der Immunhistochemie auf Gefrierschnitten wurden die Schnitte 0,5-1 h bei RT aufgetaut und danach mit einem Fettstift umrandet. Danach wurde 1 h in Blockierungslösung in einer Feuchtkammer bei RT blockiert. Anschließend wurden die Schnitte kurz in PBS getaucht und über Nacht mit den Primär-Antikörpern (2.1.6) in Blockierungslösung bei 4 °C inkubiert. Am zweiten Tag wurden die Schnitte 3x 10 min in Blockierungslösung bei RT gewaschen. Dann wurde 1 h mit den Sekundär-Antikörper (2.1.6) in Blockierungslösung bei RT inkubiert und danach 3x mindestens 10 min in PBTx in einer Glasküvette gewaschen. Der letzte Waschschrift erfolgte in PBS.

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Objektträger mit den gefärbten histologischen Schnitten zum Schluß mit Immunomount und Deckgläschen eingedeckt.

2.2.5 Zellbiologische Methoden

2.2.5.1 Präparation und Kultur primärer embryonaler Fibroblasten

Primäre embryonale Fibroblasten ("Feeder-Zellen") wurden aus Embryonen präpariert, die aus Kreuzungen von Wildtyp-Tieren mit transgenen homozygoten Neomycin-Mäusen stammten (Joyner, 1999). Diese Neomycin-resistenten Fibroblasten bilden die Matrix für das Wachstum von ES-Zellen. Embryonen der

Stadien E13,5 - E16,5 wurden steril entnommen. Kopf, Leber und innere Organe wurden entfernt und die übrigen Gewebe mehrfach in PBS gewaschen. Die Gewebe wurden zerkleinert und durch ein Sieb in einen mit Glasperlen gefüllten Erlenmeyerkolben gepresst. Gleichzeitig wurde 50 ml 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA sowie einige Tropfen DNase-Lösung zugegeben und die Zellsuspension für 30 min bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde 50 ml Trypsin/EDTA-Lösung hinzugegeben und die Inkubation fortgesetzt. Nach dem Dekantieren der Glasperlen wurde die Zellsuspension bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Die Präzipitate wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 5 ml PBS resuspendiert. Die Zellen wurden in Fibroblasten-Medium mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen/150 mm Schale ausplattiert. Nach zwei bis drei Tagen konnten die konfluent gewachsenen Fibroblasten eingefroren werden. Die Zellen wurden dazu abzentrifugiert, in Einfriermedium A (ES-Zell-Medium/50 % FCS) und Einfriermedium B (ES-Zell-Medium/20 % DMSO) resuspendiert und die Suspension auf Kryoröhrchen (Nalgene) aufgeteilt. Der Einfrierprozess wurde langsam bei -20 °C für mehrere Stunden begonnen und die Röhrchen dann bei -70 °C oder für längere Zeit in flüssigem Stickstoff gelagert. Das Auftauen der Zellen erfolgte durch schnelles Erwärmen bei 37 °C. Zu den Zellen wurde Fibroblasten-Medium gegeben und die Suspension bei 1100 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Zellpräzipitate wurden in Fibroblasten-Medium aufgenommen und ausplattiert. Das Wachstum der Fibroblasten musste vor der Kultur mit ES-Zellen inaktiviert werden. Dazu wurde zu 10 ml Medium/150 mm Schale 100 µl MitomycinC-Lösung pipettiert (1 mg/ml MitomycinC in PBS; 5 % DMSO, Sigma). Nach 2 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und auf neue Zellkulturschalen transferiert. Die wachstums-inaktivierten Fibroblasten konnten zwei bis drei Wochen in Kultur gehalten werden.

2.2.5.2 Kultur, Transfektion und Selektion embryonaler Stammzellen

Nach dem Auftauen wurden die ES-Zellen in ES-Zell-Medium aufgenommen und ihrer Anzahl entsprechend auf Fibroblasten in 35 oder 60 mm Schalen kultiviert. Das Medium wurde jeden Tag gewechselt und die Zellen beim Erreichen der

geeigneten Dichte (viele einzelne Zellklone, jedoch keine Konfluenz) auf 100 mm Schalen kultiviert. Für die Transfektion wurden 1×10^7 ES-Zellen/800 μ l in PBS eingesetzt. Sie wurden in einer Elektroporationskuvette (Gene-Pulser Kuvette; 0,4 cm; Bio-Rad, München) mit 20 bis 25 μ g linearisiertem Targeting-Vektor gemischt und bei 300 V, 1200 μ F mit einem Impuls von 2 ms elektroporiert (L. Fischer, Heidelberg). Im Anschluss wurden die ES-Zellen in der Kuvette resuspendiert und direkt auf vier dicht mit Fibroblasten bewachsenen 100 mm Schalen ausplattiert.

Am zweiten Tag nach der Elektroporation wurde die Selektion auf homolog rekombinante ES-Zellklone begonnen. Dafür wurde 400 μ g/ml Geneticin (G418) im ES-Zell-Medium eingesetzt. Die resistenten Zellklone konnten sieben bis acht Tage nach der Transfektion isoliert werden. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und die Klone mit einer Pipettenspitze in etwa 25 μ l PBS auf eine unbehandelte 96-Loch-Platte überführt. Danach wurden die ES-Zellen durch Zugabe von 25 μ l 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA bei 37 °C vereinzelt, 50 μ l ES-Zell-Medium hinzu pipettiert und die Zellen auf eine mit Fibroblasten dicht bewachsene 96-Loch-Platte transferiert. Etwa zwei Tage später wurden die Zellen gewaschen, trypsinisiert und ES-Zell-Medium hinzugegeben. Die eine Hälfte der Zellsuspension wurde auf eine mit 0,5 % Gelatine/H₂O vorbehandelte 96-Loch-Platte, die andere Hälfte auf eine mit Feeder-Zellen bewachsene 96-Loch-Platte überführt. Auf der Platte mit den Feeder-Zellen wurden die Stammzellklone bis zur Ausbildung von ausreichend großen Einzelkolonien kultiviert und anschließend eingefroren. Die Klone wurden dazu mit PBS/5 mM EDTA gewaschen, trypsinisiert und in 75 μ l Einfriermedium (ES-Zell-Medium/30 % FCS/13,3 % DMSO) aufgenommen. Die 96-Loch-Platten wurden bei -70 °C eingefroren. Auf der gelatinisierten 96-Loch-Platte ohne Fibroblasten wurden die ES-Zellen bis zur Konfluenz kultiviert, da eine ausreichende Zellzahl zur Isolierung genomischer DNA aus den Klonen notwendig war. ES-Zellklone, die das Targeting-Konstrukt homolog integriert hatten, wurden mittels Southern-Blot-Hybridisierung identifiziert, dann aufgetaut und der Zellzahl entsprechend auf Fibroblasten in einer 96-Loch-Platte oder auf einer 35 mm Schale kultiviert.

2.2.5.3 Präparation und Kultur von DRG-Neuronen

Adulte Mäuse wurden durch CO₂-Gas getötet. Die Rückenpartie des Tieres wurde mit Ethanol (70 %) gesäubert, anschließend wurde das Fell über der Wirbelsäule entfernt. Mit sterilem Präparationsbesteck wurde die gesamte Wirbelsäule freipräpariert und herausgenommen. Anschließend wurde diese in einer sterilen Petrischale mit einer feinen Schere rostro-kaudal in zwei Hälften geteilt. Mit sterilen Pinzetten wurden, nach der Entfernung des Rückenmarkes, die Spinalganglien entlang der gesamten Wirbelsäule einzeln freipräpariert und entnommen. Die Spinalganglien wurden während der Präparation in D-MEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium, Gibco, Deutschland) gesammelt. Anschließend wurden die Spinalganglien in 10 µl Collagenase Type IV (110 U final concentration, Sigma) bei 37 °C 30 min inkubiert. Nach kurzem Abzentrifugieren (400 g, 1 min) wurde der Überstand abgenommen und die Spinalganglien für weitere 30 min bei 37 °C in 100 µl einer 0,5 %igen Trypsinlösung inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Spinalganglien erneut abzentrifugiert und in 1 ml Zellmedium (D-MEM-F12 Medium (Gibco) mit 2,0 mM L-Glutamine (Gibco), 40 mM Glucose (Sigma), 100 U/ml Penicillin (Gibco), 100 µg/ml Streptomycin (Gibco)) und 10 % Pferdeserum (Life Technologies)) resuspendiert. Das Serum stoppt die Aktivität des Trypsins und verhindert somit eine weitere enzymatische Verdauung. Mittels steriler Pasteur-Pipetten wurden die Zellverbände dissoziiert. Die Pasteur-Pipetten wurden dazu in einer Gasflamme poliert, so dass die Öffnungsgröße der Pipetten beliebig variiert werden konnte. Mit drei Pipetten mit abnehmender Öffnungsgröße wurde die Zellsuspension dann vorsichtig durchgemischt („trituriert“) bis diese gleichmäßig trüb wurde. Anschließend wurde die Zellsuspension auf vorpräparierte Deckgläschen pipettiert (60 µl/ Deckgläschen). Die Deckgläschen (Hartenstein Laborbedarf, Deutschland) wurden mit 120 µl Poly-LLysin (500 µg/ml) (Sigma) beschichtet und mindestens 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Deckgläschen 3x mit milliQ H₂O gewaschen und anschließend mit 120 µl Laminin (Santa Cruz) 1 h bei 37 °C inkubiert. Der darauf folgende Waschschrift mit PBS wurde 3x wiederholt und die Deckgläschen im letzten Schritt mit Zellmedium gewaschen. Danach wurde die Zellsuspension auf die Deckgläschen gegeben und für mindestens 4 h inkubiert

(37 °C, 5 % CO₂). In diesem Zeitraum konnten die Zellen sinken und an der Oberfläche der mit Poly-L-Lysin behandelten Deckgläschen haften. Anschließend wurde ca. 1 ml Zellmedium pro Deckgläschen dazugegeben. Die Zellkultur wurde dann bei 37 °C und 5 % CO₂ weiter inkubiert und innerhalb von 48 h für Experimente verwendet.

2.2.6 Verhaltensexperimente

2.2.6.1 Thermische Hyperalgesie

Zur Ermittlung thermischer Hyperalgesie wurde der Hargreaves-Test angewandt (Hargreaves *et al.* 1988). Als Maß für die Hyperalgesie wird hierbei die Latenzzeit der nozifensiven Reaktion auf eine thermische Reizung hin herangezogen. Die Messungen wurden mittels eines Basile Plantar Test (Ugo Basile, Varese, Italien) durchgeführt. Die zu untersuchenden Tiere wurden in einen Plexiglaswürfel (15 cm Durchmesser; 22,5 cm hoch) gesetzt, der sich auf einer Glasplatte befand (Abb. 2.4). Das Gerät zur Hitze-Applikation konnte nun abwechselnd unter die linke und rechte Hinterpfote des Tieres gebracht werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich die Leuchtdiode unmittelbar im Plantarbereich der Pfote befand und das Tier nicht durch Putzen oder Kratzen abgelenkt war. Beim Starten des Gerätes wurde zur gleichen Zeit eine Stoppuhr gestartet, die automatisch stoppte, wenn das Tier aufgrund des Schmerzreizes die Pfote wegzog. Somit erhielt man die Latenzzeit bis zur Wegzugsschwelle der getesteten Pfote, die am Gerät in Sekunden und Zehntelsekunden angezeigt wurde.

Nach einer Eingewöhnungsphase von 10 Minuten wurde jedes Tier 5x an jeder Hinterpfote getestet. Die einzelnen Tests auf Hitze-Hyperalgesie erfolgten abwechselnd an beiden Hinterpfoten der Maus, mit einer Pause von mindestens 30 s zwischen den einzelnen Messungen an einer Pfote, um eine Überstimulation und damit verzerrte Messergebnisse auszuschließen. Die Messungen an WT und c-Kit^{-/-} Mäusen fanden immer zur gleichen Tageszeit statt, um unterschiedliche Aktivitäten der Tiere zu unterschiedlichen Zeiten zu vermeiden.

Vor der Injektion von SCF wurde über drei Tage eine Grundlinie bestimmt, die als Ausgangswert (Mittelwert aus allen Messungen über drei Tage pro Tier) diente.

SCF wurde intraperitoneal in Wildtyp und TRPV1^{-/-} Mäuse (6-8 Wochen, 20-25 g



schwer) injiziert und die Latenzzeiten nach 10 min, 30 min, 60 min, 3 h, 7 h, 24 h und 48 h post Injektion bestimmt (Lewin *et al.*, 1994).

Abb. 2.4 Versuchsaufbau zur Bestimmung der thermischen Hyperalgesie

Die Mäuse wurden in einen Plexiglaswürfel gesetzt. Es wurde die Latenzzeit in Reaktion auf einen an der Hinterpfote applizierten Hitzereiz gemessen.

2.2.6.2 Taktile Allodynie

Zur Messung auf taktile Allodynie wurden die Mäuse in die gleichen Plexiglaswürfel gesetzt, die beim Hargreaves Test verwendet wurden. Darunter befand sich bei diesem Versuch ein grobmaschiges Gitternetz. Die Versuche wurden mittels des dynamic plantar aesthesiometer (Ugo Basile, Milan, Italy) durchgeführt. Von unten kommend konnten durch das Gitter taktile Reize mittels eines metallischen Filamentes an den Hinterpfoten der Tiere gesetzt werden. Nach 10 min Eingewöhnungszeit der Tiere wurde jede Hinterpfote 5x getestet, mit einem Abstand zwischen den Messungen von mindestens 30 s, um eine Überstimulation und damit verzerrte Messergebnisse auszuschließen. Die

Messungen wurden über mehrere Tage immer zur gleichen Tageszeit durchgeführt. Direkt im Plantarbereich der Hinterpfote wurde eine kontinuierlich ansteigende vertikale Kraft von 0-70 mN in 2 s angesetzt. Die Kraft und die Zeit,



nach der die Maus auf den mechanischen Reiz reagierte, wurden automatisch gemessen.

Abb. 2.5 Test auf taktile Allodynie mittels Aethisiometer

Die Maus sitzt im Plexiglaswürfel auf einem Gitterrost. Die plantare Fläche der Hinterpfote wird mit einem taktilen Stimulus mit ansteigender Krafteinwirkung stimuliert und die Latenzzeit gemessen.

Als positiv gewertet wurde, wenn die Maus mit schnellem Wegziehen der Pfote reagierte. Entfernen der Pfote mit gleichzeitig offensichtlich unruhigem Verhalten des Tieres (hin- und hergehen, putzen, auf die Hinterbeine stellen) wurde nicht gewertet und der Stimulus musste wiederholt werden. Als negativ galt ebenfalls, wenn auf einen ausreichenden Stimulus keine offensichtliche Reaktion seitens der Maus erfolgte.

2.2.7 Elektronenmikroskopie

Für die Untersuchungen am Elektronenmikroskop wurden die Mäuse zunächst mit 4 % PFA / 2,5 % Glutaraldehyd in Phosphatpuffer perfundiert. Danach wurde der

Saphenous Nerv freipräpariert, entnommen und für mindestens 24 h in 4 % PFA / 2,5 % Glutaraldehyd in Phosphatpuffer postfixiert. Danach wurden die Nerven 2x 30 min in 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen und dann für 2 h bei Raumtemperatur in 1 % Osmiumtetroxide in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,5) kontrastiert. Anschließend wurde noch zweimal für 30 min in 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen bevor die Entwässerungsreihe beginnt. Entwässert wurde in 1 h Schritten von 30-100 % Ethanol bei 4 °C. Danach folgte die Einbettung ebenfalls in 1 h Schritten mit Propylenoxid bei Raumtemperatur, Propylenoxid/Epon 1:1, Propylenoxid/Epon 1:2. Anschließend wurden die Proben in reines Epon überführt, mindestens einmal gewechselt und über Nacht weiter infiltriert. Am nächsten Tag wurde das Epon noch einmal gewechselt, dann die Nerven in flache Einbettschalen überführt und bei 60 °C 2-3 Tage polymerisiert.

Für die Lichtmikroskopie wurden die Nerven in Technovit 7100 resin (Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany) eingebettet und an einem Mikrothom semidünn (1 µm) geschnitten. Zur Sichtbarmachung der einzelnen Nervenfasern wurden die Schnitte mit Toluidine-Blau gefärbt. Mit einem 100x Phasenkontrastmikroskop konnten Bilder gemacht und die myelinisierten Nervenfasern ausgezählt werden. Die Zählung der nicht-myelinisierten Fasern erfolgte anhand von Ultradünnschnitten am Elektronenmikroskop unter Verwendung der Biosyp Software. Es wurden pro Nerv 4x4 Bilder mit einer Fläche von 18,2x18,2 µm ausgezählt und die Anzahl der nicht-myelinisierten Fasern auf die Gesamtfläche des Nervs hochgerechnet.

2.2.8 Datenanalyse

2.2.8.1 Dokumentation histologischer und histochemischer Daten

Die Dokumentation histologischer Daten erfolgte an Lichtmikroskopen oder an einem Laser Scanning Mikroskop. Fluoreszenzmikroskopie erfolgte an einem Laser Scanning Mikroskop (LSM 5 Pascal; Zeiss, Oberkochen) mit der LSM 5 Pascal Software Version 3.2 (Zeiss). Die Lichtmikroskopie von Schnitten erfolgte an einem aufrechten Mikroskop (Axiophot; Zeiss) ausgestattet mit Kamera (AxioCam HRc; Zeiss) und der Axiovision AC Software Vers. 4.5 (Zeiss). Die

generierten Bilder wurden mit Adobe Photoshop Vers. 7.0 (Adobe, Adobe Systems, USA) bearbeitet.

2.2.8.2 Auswertung der Expressionsanalyse

Zellzahlen wurden auf Bildern von immunhistologischen Färbungen bestimmt. Dafür wurde c-Kit auf Gefrierschnitten (2.2.2.2) mit Immunfluoreszenz oder enzymatisch nachgewiesen. Auf Bildern von diesen Färbungen wurden Zellen mit spezifischem Signal erkannt und ausgezählt.

Es wurden mindestens drei unabhängige Schnitte von mindestens drei verschiedenen Mäusen jedes Genotyps ausgezählt. Pro Tier wurden insgesamt mindestens 200 c-Kit⁺ Neurone gezählt. Doppelt-positive Zellen (c-Kit⁺ und ein anderer bestimmter neurochemischer Marker) wurden ebenfalls gezählt. Damit ließ sich die Proportion von c-Kit⁺ Zellen, die einen bestimmten neurochemischen Marker ko-exprimieren, bestimmen.

2.2.8.3 Statistik

Die Zellzahl und Zellproportionen wurden mit Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA, Version 11.2) statistisch ausgewertet. Graphen wurden in Excel generiert und z.T. mit CorelDraw 10 (Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Canada) nachbearbeitet und dargestellt. Alle Werte sind als Mittelwert \pm S.E.M angegeben. Die Berechnung der Signifikanz von beobachteten Differenzen erfolgte mit einem T-Test für eine zweiseitige Verteilung und eine ungleiche Varianz zweier Proben. Unterschiede wurden als signifikant betrachtet, wenn $p < 0,05$ (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$).