

## 4 Materialien und Methoden

### 4.1 Chemikalien und Enzyme

Falls nicht anders angegeben, wurden sämtliche verwendeten Chemikalien von den Firmen Fluka, Life Technologies (ehemals Gibco BRL), Merck, Serva und Sigma in p.A. oder in reinst Qualität bezogen. Enzyme, Nukleinsäuren (Plasmide, Größenstandards) und Nukleosidtriphosphate wurden von den Firmen Roche, Life Technologies, Invitrogen, New England Biolabs, MBI Fermentas, Pharmacia, Stratagene und Amersham bezogen. Oligonukleotide wurden bei MWG-Biotech oder Metabion synthetisiert.

Radioaktive Nukleotide wurden von den Firmen Amersham Bucheler oder DuPont bezogen.

### 4.2 Filmmaterial

Zur Abbildung von Agarosegelen wurden ein Digital-Videosystem der Firma Intas (Göttingen) verwendet. Zur Autoradiographie wurden Kodak X-OMAT AR-Röntgenfilme verwendet.

Farbdias wurden mit einem Nikon Scanner digitalisiert. Die Nachbearbeitung der digitalisierten Bilder geschah mit Photoshop 5.0 (Adobe) und Freehand 8.0 (Macromedia) oder Illustrator 8.0 (Adobe).

### 4.3 Zellen und Zellkulturmaterialien

Alle erwähnten Medien, Medienzusätze (Antibiotika, Aminosäuren, LIF) und Seren stammten von der Firma Life Technologies. Die Zellkulturschalen waren von der Firma Nunc und aus Nunclon-Kunststoff hergestellt, der eine positive Ladung besitzt, damit kultivierte Zellen besser adherieren können.

### 4.4 Antikörper

Die in dieser Arbeit angewendeten Antikörper sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

Antikörper (Spezies)	Verdünnung	Herkunft
Anti-C1C-7 7N4 (K)	1:300	eigene Herstellung
Anti-31kDa-Untereinheit der H <sup>+</sup> -ATPase(M)	1:50	Dr. Steve Gluck
Anti-β <sub>3</sub> -Integrin (H)	1:500	Pharmingen
Anti-Aktin (K)	1:2000	Sigma
Anti-Lamp-1 (R)	1:20	Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa)
Anti-Villin (K)	1:50	Chemicon
Anti-Maus IgG/Alexa Fluor 546 (Z)	1:2000	Molecular Probes
Anti-Kaninchen IgG/Alexa Fluor 488 (Z)	1:2000	Molecular Probes
Anti-Ratte IgG/Alexa Fluor 546 (Z)	1:2000	Molecular Probes
Anti-Hamster IgG/Cy3 (Z)	1:5000	Jackson Immunoresearch
Anti-Kaninchen/Peroxidase (Z)		DAKO
Anti-Kaninchen/ Alkalische Phosphatase (Z)	1:2000	DAKO

**Tabelle 4.1:** Verdünnungen und Herkunft der verwendeten Antikörper. In Klammern ist die Spezies aufgeführt, aus der der Antikörper isoliert wurde. H= Hamster, K= Kaninchen, M= Maus, R= Ratte, Z= Ziege. Hinter dem Schrägstrich ist das Enzym oder der Fluoreszenzfarbstoff genannt, mit dem der Antikörper markiert ist.

## 4.5 Mikroskopie

Die konfokale Laserscanning-Mikroskopie wurde mit dem Leica TCS NT durchgeführt. Zur Elektronenmikroskopie dienten das Zeiss EM 902 und das Zeiss Leo-435 VP. Durchlicht-Aufnahmen wurden an einem Zeiss Axiophot Mikroskop mit einem digitalen Kamerasystem von Optronics Engineering, sowie der Bildverarbeitungssoftware Metamorph angefertigt.

## 4.6 Puffer, Lösungen und Medien

Hier nicht aufgeführte Puffer, Lösungen und Medien werden bei der entsprechenden Methode beschrieben.

**DNA-Ladepuffer** 50% (v/v) Glycerol; 1mM EDTA; 0,1% (w/v) Xylencyanol in H<sub>2</sub>O/DEPC

H<sub>2</sub>O/DEPC 0,5ml Diethylpyrocarbonat in entionisiertem Wasser über Nacht bei 37°C inkubieren, anschließend autoklavieren

<b>Lysis-Puffer</b>	50mM KCl; 50mM Tris/HCl pH 8,0; 25mM EDTA; pH 8,0; 0,45% NP40; 0,45% Tween 20
<b>Ohrclip-Puffer</b>	0,5% NP-40; 0,5% Tween20; 20mM Tris-HCl; 50mM KCl; 300µg/ml Proteinase K; pH 8,4
<b>Low TE</b>	10mM Tris-HCl; pH 8,0; 0,1mM Na <sub>2</sub> EDTA
<b>PBS</b>	137 mM NaCl; 2,7mM KCl; 7,4mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,5mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>4%PFA</b>	4% (w/v) Paraformaldehyd wurden unter Rühren bei 70–80°C in PBS gelöst und nach dem Abkühlen filtriert.
<b>TAE</b>	10mM Natriumacetat; 1mM Na <sub>2</sub> EDTA; 40mM Tris/HCl; pH 8,0
<b>20xSSC</b>	3M NaCl; 0,3M Na <sub>3</sub> Citrat; pH 7.0
<b>10xSSPE</b>	3M NaCl; 0,2M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,02M EDTA; pH 7,4
<b>Speed Hybrid II</b>	7% SDS; 10%PEG6000; 1,5x SSPE; vor Benutzung 100µg/ml denaturierte Heringssperma-DNA zugeben
<b>LB-Medium</b>	10g/l Bacto-Trypton; 5g/l Hefeextrakt; 10g/l NaCl; pH 7,2
<b>LB/Amp-Medium</b>	LB-Medium mit 150µg/l Ampicillin
<b>LB-Agar</b>	LB-Medium mit 15g/l Agar
<b>LB/Amp-Agar</b>	LB-Agar mit 150µg/l Ampicillin
<b>SOC-Medium</b>	20mM Glucose in LB-Medium
<b>MEF-Medium</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit Glutamaxx; 10% (v/v) fetales Kälberserum; 1% (v/v) 100xMix nicht-essentieller Aminosäuren; 100U/ml Penicillin; 100µg/ml Streptomycin
<b>ES-Medium</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)mit 20mM HEPES; 15% (v/v) fetales Kälberserum; 2mM L-Glutamin; 1% (v/v) 100xMix nicht-essentieller Aminosäuren; 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin; 1µl/100ml 2-Mercaptoethanol; 1000U/ml Leukemia Inhibitory Factor (LIF)
<b>Einfriedermedium</b>	MEF-Medium/ DMSO/ fetales Kälberserum (4:1:5)
<b>Elektroporationspuffer</b>	20mM HEPES; 137mM NaCl; 5mM KCl; 0,7mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 6mM Dextrose

## 4.7 Bakterienstämme

Es wurden folgende Escheria coli K-12 Abkömmlinge verwendet:

**XL1-Blue** supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46thi, relA1, lac<sup>-</sup>

**DH5 $\alpha$**  F<sup>-</sup>,  $\phi$ 80 dlacZ $\Delta$ M15,  $\Delta$ (lacZYA-argF) U169, recA1, endA1, hsdR17 r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>), supE44,  $\lambda$ <sup>-</sup>, thi<sup>-</sup>1gyrA, relA1

## 4.8 Vektoren

**pBluescript** Klonierungsvektor der Firma Stratagene mit Replikationsursprung zu Replikation in E. Coli, Ampicillinresistenz, T7- und T3-Promotoren für die cRNA-Synthese, lacZ-Gen zum Durchmustern von Transformanten nach dem Blau / Weiß-Kriterium

## 4.9 Mikrobiologische Methoden

### 4.9.1 Erzeugung elektrokompenter Bakterien

Zur Herstellung elektrokompenter Bakterienzellen wurden ausschließlich autoklavierte Gegenstände und Lösungen verwendet. Eine stationäre Übernachtskultur des gewünschten Bakterienstammes in LB-Medium wurde 1:60 in frisches LB-Medium überimpft und zu einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> von 0,5-0,5 (log-Phase) inkubiert. Die Suspension wurde dann bei 4°C und 4200Upm für 20min. in einem Beckmann JA-10-Rotor sedimentiert und der Überstand vorsichtig abgeschüttet. Die Zellen wurden zweimal mit sterilem, entionisiertem Wasser und einmal mit 10% wässriger Glycerinlösung gewaschen. Das Pellet wurde in einem letzten Schritt in seinem vierfachen Volumen 10% Glycerin resuspendiert in Aliquots bei -70°C eingefroren.

### 4.9.2 Transformation von Bakterien

Die Transformation der Bakterien erfolgte mittels Elektroporation. 50 $\mu$ l auf Eis aufgetaute transformationskompetente Bakterien wurden mit 1 $\mu$ l Ligationsansatz gemischt und in einem Genepulser (Bio-Rad) bei 2,5kV, 400W, 25 $\mu$ F elektroporiert. Anschließend wurden die Bakterien in SOC-Medium aufgenommen und nach 20min. bei 37°C auf LB/Amp-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden anschließend ü.N. bei 37°C inkubiert.

### 4.9.3 Kultivierung und Lagerung von transformierten Bakterien

Nach der Transformation und dem Ausplattieren der Bakterien auf LB/Amp-Platten wurden resistente Kolonien mittels steriler Zahnstocher von der Platte in 2-5ml (Minipröp) oder 100ml

(Midipröp) LB/Ampicillin-Medium überführt. Die Kulturlösung wurde in Erlenmeyerkolben mit luftdurchlässigem Deckel ü.N. bei 37°C geschüttelt.

Zur dauerhaften Lagerung transformierter Bakterien wurden 800µl Übernachtskultur mit 200µl Glycerol vermischt, auf Trockeneis schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

## 4.10 Zellbiologische Methoden

### 4.10.1 Auftauen von kryokonservierten Zellen

Aus dem Stickstoff-Behälter wurden die in Kryoröhrchen befindlichen Zellen jeglichen Typs in Stickstoff gekühlt ins Zellkultur-Labor verbracht und dort im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Nach dem Auftauen wurden sie in 5ml erwärmtes, zum Zelltyp passendes Medium in 15ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 1000Upm für 5min pelletiert. Nach Resuspendierung des Pellets in frischem Medium wurde die Zellsuspension auf entsprechend vorbereiteten (z.B. mit Feeder-Zellen) Zellkulturschalen der benötigten Größe verteilt.

### 4.10.2 Trypsinieren von Fibroblasten

Das Medium wurde abgesaugt, die humanen oder murinen Fibroblasten zweimal mit PBS gewaschen, anschließend so viel 0,05% (w/v) Trypsin/0,02% (w/v) EDTA-Lösung (Life Technologies) zugegeben, dass der Zellrasen gerade bedeckt war und für 3-5min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit mindestens der gleichen Menge MEF-Medium gestoppt und die Fibroblasten durch eine Pasteurpipette vereinzelt. Anschließend wurden die trypsinierten Zellen in gewünschter Dichte ausgesät und das Medium nach 6-8h zum ersten Mal gewechselt.

### 4.10.3 Gewinnung und Kultivierung von embryonalen Maus-Fibroblasten (MEF)

Murine embryonale Fibroblasten dienen als Versorgungszellen (Feeder-Zellen) für embryonale Stammzellen. Durch gezielte Verpaarung und tägliche Plaque-Kontrolle von Tieren des Genotyps FVB Neo<sup>-/-</sup> konnten 14,5 Tage alte Embryonen gewonnen werden. Nach Entfernen des Kopfes und der Leber wurde das Gewebe mit Skalpellen unter 10ml DMEM- Medium zerkleinert und anschließend in mit 5ml 0,05% (w/v) Trypsin/0,02% (w/v) EDTA-Lösung (Life Technologies) und ca. 0,1mg DNase versetzt und bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach 10min wurden 5ml der entstehenden Zellsuspension in ein 50ml-Röhrchen mit 20ml MEF-Medium bei RT überführt. Das Gewebe-Homogenat wurde mit 5ml 0,05% (w/v) Trypsin/0,02% (w/v) EDTA-Lösung wieder auf 15ml aufgefüllt und 10min bei 37°C inkubiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt viermal ausgeführt und danach die Zellen der Suspension auf 15cm-Schalen in einer Dichte von  $5 \times 10^6$  ausplattiert. Pro 10 Embryonen erhielt man auf diese Weise 5 15cm-Schalen und 2 Schalen mit größtenteils unverdauten, größeren Gewebeteilen. Nach drei Tagen unter 7,5% CO<sub>2</sub> bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre

(Heraeus-Inkubatoren) waren die Zellen nahezu konfluent und es wurden pro 15cm-Schale 2 1,8ml-Kryoröhrchen abgefüllt und eingefroren.

### 4.10.4 Gewinnung und Kultivierung von humanen Fibroblasten

Die verwendeten humanen Fibroblasten (HF) wurden in der Universitätskinderklinik der Universität Ulm aus Hautbiopsien von unter infantiler maligner Osteopetrose leidenden Patienten gewonnen. Sie wurden unter den gleichen Bedingungen wie Maus-Fibroblasten kultiviert.

### 4.10.5 Inaktivierung von embryonalen Maus-Fibroblasten (MEF)

Die Inaktivierung der MEF vor der Aussaat der embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) verhindert die weitere Teilung der Fibroblasten, so dass sie die ES-Zellen nicht überwuchern und in Nahrungskonkurrenz treten können. Ein bis drei Tage vor ihrer Weiterverarbeitung als Feeder-Zellen wurden die MEF aufgetaut und der Inhalt je eines Kryoröhrchens auf 2 15cm-Schalen mit 25ml MEF-Medium verteilt. Einen Tag vor der Aussaat der embryonalen Stammzellen wurden die konfluenten 15cm Schalen mit 15 ml frischem Medium versorgt und Mitomycin ( $10\mu\text{g}/\text{ml}$  Endkonzentration (Sigma)) dazugegeben. Mitomycin alkyliert die DNA und behindert so die DNA-Synthese. Nach maximal drei Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  wurde das Medium abgesaugt, die Zellen 2x mit PBS gewaschen und mit 0,05% (w/v) Trypsin/0,02% (w/v) EDTA-Lösung abgelöst. Die Zellzahl wurde bestimmt und die inaktivierten Fibroblasten auf gelatinisierten Zellkulturschalen in einer Dichte von  $5 \times 10^4$  Zellen/ $\text{cm}^2$  ausgesät.

### 4.10.6 Gewinnung transgener embryonaler Stammzellen (ES-Zellen)

#### 4.10.6.1 Kultivierung embryonaler Stammzellen

Murine embryonale Stammzellen wurden unter 7,5%  $\text{CO}_2$  bei  $37^\circ\text{C}$  in wasserdampfgesättigter Atmosphäre auf gelatinisierten und mit inaktivierten MEF (Feeder-Zellen) beschichteten Zellkulturschalen in HEPES-haltigem ES-Medium gezogen. Für die Identifizierung rekombinater Klone wurden Kopien dieser Zellklone für die DNA-Gewinnung auf gelatinisierten Platten ohne MEF-Rasen kultiviert. Medien und Lösungen wurden vor der Benutzung auf  $37^\circ\text{C}$  erwärmt.

#### 4.10.6.2 Trypsinieren embryonaler Stammzellen

Die Prozedur entspricht im Prinzip dem Trypsinieren der MEF (s.o.), jedoch wurde für das Waschen der Zellen PBS/EDTA verwendet und die Trypsinlösung bestand aus 0,25% Trypsin in PBS mit 1% Hühnerserum (beides Life Technologies), das im Gegensatz zum Rinderserum keinen Trypsin-Inhibitor enthält.

#### 4.10.6.3 Elektroporation embryonaler Stammzellen

800  $\mu$ l Elektroporationspuffer mit  $1 \times 10^7$  embryonalen Stammzellen (Linie C7A: E14; Linie C7B: R1) der Mauslinie 129SV wurden in einer 1,0ml Küvette mit 50-100  $\mu$ g linearisierter Targeting-Vektor-DNA elektroporiert (Biorad Elektroporator). Die Zellen wurden mit zwei Pulsen von 800V und 3  $\mu$ F elektroporiert. Die Zeitkonstante lag ideal bei  $t = 0,2$ sek. Nach der Elektroporation wurden die Stammzellen auf Zellkulturschalen (Durchmesser 10cm) in unterschiedlicher Dichte (500-2000 Klone pro Schale) ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Die Schalen waren zuvor gelatiniert und mit inaktivierten embryonalen Fibroblasten beschichtet worden.

#### 4.10.6.4 Isolation von embryonalen Stammzellklonen, in denen homologe Rekombination erfolgt ist

Zur Positivselektion der rekombinanten Zellen wurde das ES-Medium nach 2 Tagen bis zur Isolierung von Einzelkolonien mit Geneticinsulfat (200  $\mu$ g/ml; G418, Life Technologies) versetzt. Das Medium wurde alle 12 Stunden ausgetauscht. Die Negativselektion gegen bloß zufällig in das Genom der embryonalen Stammzellen integrierte Targeting-Vektoren erforderte nur im Falle von Vektor C7A die Zugabe von Ganciclovir (Life Technologies). Diese Substanz wird von der Herpes simplex Thymidylat Kinase in ein toxisches Produkt umgewandelt.

Nach 6-8 Tagen wurden Kolonien, die im idealen Fall aus einem einzelnen Zellklon bestehen, mit abgeschnittenen gelben Pipettenspitzen abgehoben und in 50  $\mu$ l Puffer (100U/ml Penicillin; 10mg/ml Streptomycin, PBS) in einer 96-Well Rundbodenplatte aufgenommen. Zu jeder Kolonie wurde 20  $\mu$ l Trypsinlösung (0,25% Trypsin, PBS) gegeben und 3min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien durch 3-6 maliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Die Reaktion wurde mit 100  $\mu$ l Medium abgestoppt. Je 70  $\mu$ l dieser Suspensionen wurden in 2 gelatinierte 96-Well Flachbodenplatten pipettiert, von denen eine mit inaktivierten MEF-Zellen beschichtet war, und auf 200  $\mu$ l mit Selektionsmedium aufgefüllt. Die ES-Zellen im 96-Well wurden nach 2-3 Tagen erneut trypsinisiert, um mehrere Kopien einzelner Klone zu gewinnen. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Kolonien mit 100  $\mu$ l PBS/EDTA gewaschen und anschließend für 3 min. mit 0,25% Trypsin in PBS/ 1% Hühnerserum (Life Technologies) bei 37°C trypsinisiert. Nach der Resuspension in einzelne Zellen wurde die Reaktion mit 50  $\mu$ l Medium abgestoppt und die Zellen im Verhältnis 1:4 auf zwei 96-Well Platten mit MEF-Zellrasen und auf zwei gelatinierte 96-Well Platten gesplittet. ES-Zellen, die auf Feeder-Zellen wuchsen, wurden eingefroren und dienen zur Expansion des Zellklones. Aus den auf gelatinierten Schalen gezogenen Zellen wurde genomische DNA für die Genotypisierung mittels Southern Blot isoliert.

#### 4.10.7 Einfrieren von Zellen

a) Einfrieren von Zellen in Kryogefäßen

Die Zellen wurden trypsiniert und in 4°C kaltem Einfriermedium in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml in Kryoröhrchen (Nunc) bei -80°C in einer Styroporkiste langsam eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

### b) Einfrieren von Zellen im 96-Well

Zur vorübergehenden Lagerung von vereinzelt ES-Zellklonen wurden diese in 96-Well Platten eingefroren. Dazu wurden die Zellen auf den 96-Well Platten mit PBS/EDTA gewaschen, mit 50  $\mu$ l 0,25% Trypsinlösung trypsiniert, resuspendiert und mit 200  $\mu$ l 4°C kaltem Einfriermedium vermischt. Die Lagerung erfolgte anschließend maximal 8 Wochen bei -80°C.

### 4.10.8 Kultivierung primärer Maus-Osteoklasten

Die Kultivierung primärer Maus-Osteoklasten erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Kasper im Wesentlichen entsprechend der von Saftig et al. beschriebenen Methode (Saftig et al., 1998). Zwei Tage alte Tiere wurden durch Dekapitation getötet, die Röhrenknochen entnommen und in kaltem PBS zwischengelagert. Mit Skalpell wurde am Knochen befindliches Gewebe entfernt und die knorpeligen Enden wurden abgetrennt. Unter 100  $\mu$ l Medium (Eagle's Modified Essential Medium/ 10% Fetales Kälberserum/ 2mM L-Glutamin) wurden die gesammelten Knochen eines Tieres soweit wie möglich zerkleinert, dann ein Tropfen Kälberserum zugegeben und durch starkes Pipettieren die Zellen von den Knochenfragmenten abgewaschen und in Suspension gebracht. Die Zellsuspension wurde als Tropfen anschließend auf eine Elfenbeinscheibe mit etwa 1cm Kantenlänge in einer 4-Well Zellkulturschale aufgebracht. Nach 1h bei 37°C hatten sich die Osteoklasten abgesetzt. Das 24-Well wurde mit 2ml Medium aufgefüllt und für weitere 3 Tage bei 37°C/ 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Für die lichtmikroskopische Untersuchung wurde die Zellsuspension auf runde Deckgläser aufgetragen.

### 4.10.9 Kultivierung von aus Milzzellen differenzierten Osteoklasten

Osteoklasten gehen aus den gleichen Vorläuferzellen hervor wie die großen Fresszellen des Immunsystems, die Monozyten und Makrophagen. In der Milz reifen letztgenannte Zellen in großer Zahl heran und es ist möglich, durch entsprechende hormonelle Stimulation und in Kokultur mit Stromazellen aus den Vorläuferzellen Osteoklasten entstehen zu lassen (Udagawa et al., 1989). Die Experimente wurden wiederum in enger Zusammenarbeit mit Frau Dr. Kasper durchgeführt.

24h vor Präparation der Milzzellen wurden in 24-Well-Zellkulturschalen  $4 \times 10^4$  ST-2-Zellen, fibroblastenähnliche Stromazellen, pro Well auf Deckgläsern oder Elfenbeinscheiben ausplatziert und in  $\alpha$ -MEM/ 10% Fetales Kälberserum bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

4 bis 6 Wochen alte Mäuse wurden durch Äther narkotisiert, durch Dekapitation getötet und die Milz entnommen. Nach Zerkleinerung des Gewebes wurde es durch ein Nylonnetz mit 40  $\mu$ m Maschengröße (Falcon) passiert und anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 5min bei 1000g pelletiert. Zur Lyse der Erythrozyten erfolgte eine Inkubation für 5min in 10mM Tris-HCl (pH 7,4)/ 0,83% Ammoniumchlorid, worauf die Zellen in  $\alpha$ -MEM



gewaschen und zuletzt in einem kleinen Volumen  $\alpha$ -MEM/ 10% Fetales Kälberserum/ 100nM Dexamethason/ 10nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2$ Vitamin  $\text{D}_3$  (beides von Sigma) aufgenommen wurden.

Die Zellsuspension wurde in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und  $4 \times 10^5$  Zellen pro 24-Well auf den ST-2-Zellrasen ausgesät. Die Zellen wurden in  $\alpha$ -MEM/ 10% Fetales Kälberserum/ 100nM Dexamethason/ 10nM  $1\alpha,25(\text{OH})_2$ Vitamin  $\text{D}_3$  bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert.

#### 4.10.10 Pit-Assay

Nach einer Verweildauer von 3 Tagen für primäre Osteoklasten und 2 Wochen für in Kokultur differenzierte Osteoklasten auf ca.  $100\mu\text{m}$  dicken Elfenbeinscheiben wurden das Elfenbein unter fließendem Wasser von Zellen befreit und gereinigt. In der Abteilung für Osteopathologie wurden die Elfenbeinscheiben getrocknet, mit Gold bedampft und unter einem Leo-435 VP Rasterelektronenmikroskop (Zeiss) nach Löchern abgesucht.

#### 4.10.11 Messung der Ansäuerung durch Acridin Orange

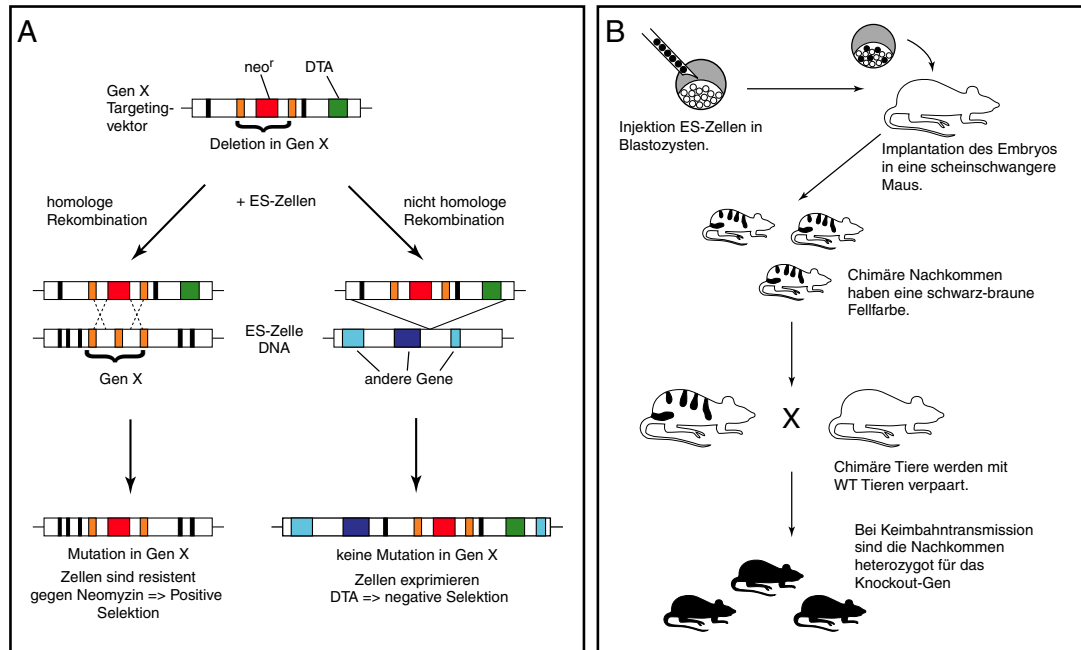
Bei Acridin Orange handelt es sich um einen Farbstoff, dessen Fluoreszenzeigenschaften sich bei niedrigem pH ändern und der durch die Ladungsänderung nach Protonierung in sauren Kompartimenten akkumuliert. Dieses Experiment, das an die Methode von Baron et al. angelehnt ist (Baron et al., 1985), wurde von Frau Dr. Kasper ausschließlich an für einen Tag wie oben beschrieben auf Elfenbeinscheiben kultivierten primären Osteoklasten durchgeführt. Diese Zellen wurden mit  $5\mu\text{g}/\text{ml}$  Acridin Orange-haltigem (Molecular Probes), HEPES-gepufferten MEM für 15min bei den üblichen Zellkulturbedingungen inkubiert, in PBS gewaschen und in vivo unter dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Leica TCS NT) bei einer Anregungswellenlänge von 490nm und einem 525nm-Filter untersucht.

### 4.11 Erzeugung chimärer Founder-Tiere

Der Weg der positiven ES-Zelle zum Knockout-Tier ist in der folgenden Abbildung (siehe 4.1) schematisch wiedergegeben.

#### 4.11.1 Injektion von embryonalen Stammzellen in Blastozysten

Im Southern Blot positive ES-Klone, die bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren waren, wurden bei  $37^\circ\text{C}$  aufgetaut und mit  $200\mu\text{l}$  ES-Medium versetzt. Die Klone wurden anschließend auf gelatinierten Zellkulturschalen mit Feeder-Zellen expandiert. Dazu wurden sie zunächst von 96-Well- auf 24-Well- und anschließend auf 6-Well-Schalen passagiert. Dabei darf es nie zu einer zu hohen Dichte der Einzelkolonien kommen, da die Gefahr vorzeitiger Differenzierung besteht. 30-33 Stunden vor der Injektion wurden die ES-Zellen ein letztes Mal passagiert und mit frischem Medium versetzt. Ein letzter Mediumwechsel fand 3-4 Stunden vor der Injektion statt.



**Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung der Erzeugung von Knockout-Tieren durch homologe Rekombination. (A) Erzeugung transgener embryonaler Stammzellen. (B) Entstehung von Knockout-Tieren durch Injektion von embryonalen Stammzellen in Blastozysten und Verpaarung der entstehenden chimären Founder-Tiere.

Für die Injektion wurden die Kolonien trypsiniert, zweimal mit 5 ml PBS gewaschen und in 500  $\mu$ l ES-Medium aufgenommen. Die Injektion erfolgte in Blastozysten (Linie C57Bl/6J) welche 2,5 Tage nach Befruchtung entnommen wurden. In jede Blastozyste wurden mittels Mikromanipulator (Eppendorf) 10-16 ES-Zellen injiziert.

#### 4.11.2 Transfer von Blastozysten in scheinchwangere Mäuse

Die mit transgenen ES-Zellen injizierten Blastozysten konnten für einige Stunden im Inkubator gehalten werden. Danach jedoch mussten sie in den Uterus scheinchwangerer Ammen-Mäuse transferiert werden. Um diese Ammen zu erhalten, macht man sich den Umstand zunutze, dass bei Mäusen die Bereitschaft der Gebärmutterschleimhaut zur Einnistung eines Embryos durch den Koitus induziert wird. Durch Verpaarung von weiblichen mit durch Vasektomie sterilen männlichen Tieren entstehen daher scheinchwangere Ammen-Tiere. Diesen wurden unter Narkose 12 bis 15 Blastozysten in einigen  $\mu$ l Flüssigkeit über eine Kapillare in den Uterus injiziert. Es resultierten chimäre Tiere, die das manipulierte Gen über die Keimbahn vererben können und als Gründer der transgenen Linie dienen.

Die Injektion und der Transfer der Blastozysten wurde von der Firma BRL (Füllinsdorf,

Schweiz) durchgeführt.

## **4.12 Molekularbiologische Methoden**

### **4.12.1 Restriktion von DNA**

Die Restriktion von DNA erfolgte nach Standardvorschriften (Sambrook et al., 1989). Enzymmenge, Puffer und Reaktionsbedingungen wurden entsprechend der Herstellerangaben eingestellt.

Um die Selbstligation eines verdauten Vektors nach der Restriktion zu verhindern, erfolgte nach dem Restriktionsverdau eine Inkubation mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) für 30min bei 37°C. Die verdaut DNA wurde über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, die Banden ausgeschnitten und aufgereinigt.

### **4.12.2 Ligation von DNA-Fragmenten**

DNA-Fragmente wurden mit T4-DNA-Ligase gemäß Herstellerangaben ligiert. Die Fragmente wurden in der Regel im molaren Verhältnis von 1:3 (Vektor/Fragment) eingesetzt. Die Reaktion erfolgte mit einer Inkubationsdauer von einer bis 24 Stunden bei 14°C bis 25°C.

#### **4.12.2.1 Agarose-Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung von DNA wurde 0,7 - 2,0% (w/v) Agarosegele verwendet. Als Laufpuffer wurde TAE eingesetzt. Bei der Herstellung der Gele wurde der Farbstoff Ethidiumbromid zugesetzt. Als Größenstandard diente die 1kB-Leiter von LifeTechnologies. Die Elektrophorese erfolgte in Flachbettkammern. Die Proben wurden mit 1/10 Volume DNA-Auftragspuffer versetzt und bei 5 bis 15V/cm aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele auf einem UV-Transilluminator bei 312nm mit einem Video-Dokumentationssystem (Intas) fotografiert.

### **4.12.3 Isolierung von DNA**

#### **4.12.3.1 Isolierung von DNA aus Bakterienkulturen**

Mengen zwischen 100-200µg Plasmid-DNA wurden aus Bakterienkulturen mittels QIAgen Midi Prep Kits (QIAGEN) oder des JET Star Plasmid Purification Systems (Genomed) nach den Angaben der Hersteller gewonnen. Das Bakterienpellet wird dabei mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen, die Proteine gefällt und anschließend die DNA über eine Säule gereinigt und konzentriert (Birnboim und Doly, 1979).

#### **4.12.3.2 Isolierung von DNA aus kultivierten eukaryotischen Zellen oder Gewebe**

Gewebe (ca. 0,5g) oder Zellpellets konfluenter 6cm- oder 10cm-Zellkulturschalen wurden jeweils mit 400µl Lysis-Puffer in 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit je 10µl Proteinase K-Lösung

(14mg/ml, Roche) ü.N. bei 55°C inkubiert. Pro Ansatz wurde anschließend 10µl RNase A (10mg/ml) zugefügt und die Ansätze für 1h bei 37°C inkubiert. Zur Extraktion von Proteinen wurden die Ansätze mit 400µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt und für 20min kopfüber rotiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10min mit 14.000Upm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge. Die wässrigen Überstände wurden zur Fällung der DNA mit 40µl 8M LiCl sowie 350µl Isopropanol versetzt, leicht geschüttelt und 10 bei RT inkubiert. Die Sedimentation genomischer DNA für 20min bei 14000Upm. Die DNA-Pellets wurden mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend kurz getrocknet (5min mit offenem Deckel bei 50°C). Das getrocknete Pellet wurde in 100-200µl Low TE gelöst.

Für die Genotypisierung von ES-Klonen wurde die DNA-Isolierung in der 96-Well-Schale durchgeführt. Nach Absaugen des Mediums wurden 100µl des o.g. Lysis-Puffers in die Wells gegeben und in einer feuchten Kammer ü.N. bei 55°C inkubiert. Die Fällung der DNA erfolgte ohne vorige Phenol-Chloroform-Extraktion durch Zugabe von 10µl 8M LiCl und 100µl Isopropanol je Well. Die Zentrifugationsschritte wurde in einem ausschwingenden Zellkulturschalen-Halter in einer Untertisch-Zentrifuge (Heraeus) bei 3000Upm durchgeführt.

#### **4.12.3.3 Isolierung von DNA aus Schwanzbiopsien oder Ohrclips für die PCR-Genotypisierung**

Ca. 0,5cm lange Schwanzenden oder bei der Ohrmarkierung anfallende Ohrclips drei bis vier Wochen alter Tiere wurden in 1,5ml Eppendorf-Gefäßen in 100 bis 300µl Ohrclip-Puffer 8h bis ü.N. bei 55°C inkubiert. Die Proteinase K wurde durch Inkubation bei 93°C für 10min inaktiviert. Die erhaltene Lösung konnte ohne weitere Aufreinigung für die PCR-Reaktion eingesetzt werden.

#### **4.12.3.4 Isolierung von DNA aus Blutproben**

Es wurde das Genomic Prep Blood DNA Isolation Kit (Amersham Pharmacia Biotech) entsprechend den Hersteller-Anweisungen benutzt. Der erste Schritt bestand in einer Lyse der Erythrozyten durch einen hypotonen Lyse-Puffer. Die verbleibenden Leukozyten wurden pelletiert und entweder zur späteren Aufarbeitung bei -20°C eingefroren oder für die Gewinnung von genomischer DNA oder RNA (siehe unten) eingesetzt. Für die Isolierung von DNA wurden durch einen SDS-haltigen Puffer die Leukozyten lysiert und anschließend die Proteine gefällt. Nach Zentrifugation konnte aus dem proteinfreien Überstand mit Isopropanol die DNA gefällt werden. Nach Waschen mit 70% Ethanol wurde das DNA-Pellet in Low TE aufgenommen und vor Verwendung mindestens über Nacht gelöst.

#### **4.12.3.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

DNA-Fragmente, die aus der PCR oder aus Restriktionsverdau, die entsprechend den vom Hersteller für die jeweilige Restriktionsendonuklease angegebenen Bedingungen durchgeführt

wurden, wurden einer Elektrophorese in je nach Größe 0,8 bis 1,6% Agarosegelen in TAE-Puffer unterworfen, die Ethidiumbromid enthielten. Auf dem UV-Transilluminator wurden die Banden sichtbar gemacht und die gewünschten Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA aus den Agarosegel-Stückchen erfolgte mit Hilfe des High-Pure PCR Product Purification Kit (Roche).

#### 4.12.4 Southern-Blot Analyse genomischer DNA

Ein Ethidiumbromid-haltiges Agarosegel von 0,8 bis 1% Dichte wurde für die Auftrennung der zuvor für mindestens 6h mit 40U der entsprechenden Restriktionsendonuklease behandelten genomischen DNA (10µg pro Spur) in der Elektrophorese benutzt. Zur Depurinierung und anschließender Spaltung der DNA-Fragmente wurde das Gel bis zur Gelb- bzw. Grünfärbung der Bromphenolblau- bzw. Xylenylanolbande, jedoch mindestens 15min im 4fachen Volumen 0,25M HCl inkubiert. Der Transfer langer (> 5kb) DNA-Fragmente wird dadurch verbessert. Anschließend wurde das Gel kurz in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und für 30min im 10fachen Volumen 0,4M NaOH inkubiert. Die DNA wird so zu Einzelsträngen denaturiert. Der Transfer fand ebenfalls mit 0,4M NaOH statt. Als Transfermembran wurde eine positiv geladene Nylonmembran (Nytran N, Schleicher und Schuell) verwendet. Der Transfer der DNA auf die Membran erfolgte für mindestens 12h mittels Kapillarkraft. Hierfür wurde die Membran vor der Verwendung zunächst mit Wasser angefeuchtet und anschließend 15min in 0,4M NaOH equilibriert. Für den Transfer wurde das Gel auf 4 mit 0,4M NaOH equilibrierte Whatman 3MM Papiere gelegt, nacheinander mit der Nylon-Membran, mit 2 in 0,4M NaOH equilibrierten Whatman 3MM Papieren und einem Stapel Papierhandtücher bedeckt und mit einem Gewicht von ca. 1-3kg beschwert. Die unter dem Gel gelegenen Whatman 3MM Papiere endeten in einem Reservoir mit 0,4 M NaOH. Der Transfer findet durch den Fluss des Puffers in die oben gelegene Membran statt.

#### 4.12.5 Isolierung von RNA

##### 4.12.5.1 RNA aus Gewebe

Das Gewebe oder ganze Organe wurden in Trizol (Gibco BRL) homogenisiert (1ml Trizol/70mg Gewebe). Die Suspension wurde 5min bei RT stengelassen. Anschließend wurden 0,2ml Chloroform per 1ml Trizol zugegeben und stark geschüttelt. Nach 3min bei RT wurde das Gemisch 15min bei 4°C und 12000g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit 0,5ml Isopropanol pro 1ml Trizol vermischt. Nach 10min bei RT wurde 10min bei 4°C und 12000g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1ml 70% Ethanol pro 1ml Trizol gewaschen und bei RT getrocknet. Anschließend wurde die RNA in DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen. Alle wässrigen Lösungen sollten bei der Präparation von RNA mit DEPC behandelt sein, da eine Kontamination durch RNAsen sehr häufig ist.

#### 4.12.5.2 RNA aus Fibroblasten und Blutproben

Aus Fibroblasten oder Leukozyten wurde RNA mit Hilfe des RNeasy-Systems (Quiagen) gewonnen. Die Zellpellets wurden in 450  $\mu$ l RLT-Puffer mit 15  $\mu$ l Mercaptoethanol resuspendiert und über eine Shredder-Säule zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation über eine RNeasy-Säule, bei der die RNA an die Matrix gebunden wurde und nach zweimaligem Waschen in DEPC-behandeltem Wasser eluiert werden konnte.

#### 4.12.6 Gewinnung von PolyA(+)-RNA

Zur Isolierung von PolyA(+)-RNA aus Gesamt-RNA bediente man sich der Oligo(dT)<sub>25</sub>-Dynabeads (Dyna) entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Es handelt sich hierbei um magnetische Partikel, an die aus 25 deoxy-Thymidin bestehende Oligonukleotide gekoppelt sind. Der PolyA-Teil der mRNA hybridisiert mit diesen Oligonukleotiden, so dass die an die Partikel gebundene mRNA durch einen Magneten aus der Lösung entfernt werden kann. Nach einigen Waschschritten wird die mRNA dann durch Änderung der Lösungsbedingungen eluiert. Die Dynabeads können mehrfach wiederverwendet werden.

#### 4.12.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration wässriger DNA-Lösungen wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260nm ermittelt (Genequant II, Pharmacia Biotech). Bei dieser Wellenlänge liegt sowohl für einzel- als auch für doppelsträngige DNA das Absorptionsmaximum. Eine  $A_{260}$  von 1 entspricht einer Nukleinsäure-Konzentration von 50  $\mu$ g/ml für doppelsträngige DNA sowie 20  $\mu$ g/ml für einzelsträngige DNA und 40  $\mu$ g/ml für RNA. Die Güte der Nukleinsäure-Präparation konnte anhand des Verhältnisses (Ratio) der  $A_{260}$  zur  $A_{280}$  beurteilt werden. Bei 280nm liegt das Absorptionsmaximum von gelösten Proteinen. Ab einer Ratio von 1,7 wurde die Reinheit als ausreichend bewertet.

#### 4.12.8 Northern-Blot Analyse von PolyA(+)-RNA

Die Analysen wurden nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook et al., 1989): Alle wässrigen Lösungen (mit Ausnahme der TRIS-Puffer) wurden mit DEPC behandeltem Aqua bidest angesetzt sowie alle Gefäße einer geeigneten RNase-Dekontamination unterzogen. Pro Probe wurden 2-5  $\mu$ g polyA(+)-RNA aufgetragen und in einer 1%igen Agarosematrix aufgetrennt. Der Festphasentransfer erfolgte anschließend auf Nylonmembran (Hybond N, Amersham Pharmacia) mittels Kapillarblot.

#### 4.12.9 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden und Hybridisierung von Northern- und Southern-Blots

DNA-Sonden wurden entweder aus genomischer DNA oder aus cDNA durch PCR oder durch den Restriktionsverdau von Plasmid-DNA hergestellt und mittels Random-Primingradioaktiv

markiert. Die Reaktion wurde mit dem „redi-prime II-Kit (Amersham Pharmacia Biotech) durchgeführt. Etwa 10ng DNA-Fragment wurden in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und durch 5-10minütige Inkubation bei 95°C denaturiert. Durch schnelles Abkühlen auf 0°C wurde das Rehybridisieren der Einzelstränge verhindert. Die wässrige DNA-Lösung wurde daraufhin in ein Reaktionsgefäß des Kits zusammen mit 50µCi 32P-markiertem dCTP gegeben und 30min bei 37°C inkubiert. Die Trennung der markierten DNA-Fragmente von nicht eingebauten Nucleotiden erfolgte durch eine Probe Quant G-50 Sepharose-Säule (Amersham Pharmacia Biotech).

Die Blot-Membran wurde in einer Glasröhre in 15-30ml Hybridisierungslösung (Speed-Hybrid II, 100µg/ml denaturierte Lachsspermien-DNA) für 1h bei 60 (Northern-Blot), bzw. 65°C (Southern-Blot) in einem Rotationsofen prähybridisiert. Danach erfolgte die Zugabe der zuvor bei 95°C denaturierten [ $\alpha$ -32P]dCTP markierten DNA-Sonde. Die Hybridisierung erfolgte mindestens 6h bei den genannten Temperaturen. Danach wurde durch folgende Waschschrirte unspezifisch gebundene Radioaktivität entfernt:

0,5x SSC/0,1% SDS 5min bei RT

0,5x SSC/0,1% SDS 30min bei 55°C (Northern), bzw. 65°C (Southern)

0,1x SSC/0,1% SDS 30min bei 57°C (Northern), bzw. 65°C (Southern).

Die Membran wurde kurz getrocknet, in Saran-Folie eingeschlagen und auf Imaging-Platten (FUJI Imaging Plate) für 2h bis 12h exponiert. Die Hybridisierungslösung mit der radioaktiv markierten Sonde wurde ggfs. bei -20°C gelagert und nach 30 minütigem Erhitzen auf 90°C erneut verwendet.

#### 4.12.10 Erzeugung von cDNA

Gesamt-RNA wurde durch eine Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben um diese als Matrize für PCR-Analysen benutzen zu können. Als Enzym diente SuperScriptII (Gibco/BRL), das nach Angaben des Herstellers eingesetzt wurde und keine RNase H-Aktivität besitzt. Die Primer waren Hexanucleotide mit zufälliger Sequenz, so dass die gesamte kodierende RNA-Sequenz mit etwa der gleichen Wahrscheinlichkeit von der Reversen Transkriptase abgelesen werden sollte.

#### 4.12.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das Prinzip der PCR besteht darin, dass eine als Vorlage dienende DNA zunächst für Sekunden bis Minuten bei hoher Temperatur denaturiert wird und beim Abkühlen auf die Annealingtemperatur im Ansatz vorhandene, einen bestimmten Abschnitt flankierende, zur Vorlage komplementäre Oligonucleotide an die denaturierte DNA binden können. Im nächsten Schritt wird jedes der gebundenen Oligonucleotide von einer temperaturstabilen DNA-Polymerase als Ausgangspunkt für die Synthese eines komplementären DNA-Einzelstranges benutzt. Dieser Prozess wird 30 bis 40mal wiederholt, wodurch es zur exponentiellen Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnitts kommt. Als Vorlage kann jede Art von DNA, auch genomische

DNA, dienen.

#### 4.12.11.1 Genotypisierung

Um alle drei möglichen Genotypen der Linien C7A und C7B jeweils in einer einzigen Amplifikation bestimmen zu können, beinhaltete der Reaktionsansatz drei Oligonukleotide: Ein Hin-Primer, der vor dem durch die homologe Rekombination entfernten DNA-Abschnitt lag, ein Rück-Primer, der in der Deletion lag und ein weiterer, der in der durch den Targeting-Vektor neu eingefügten Sequenz (Neo-Kassette, bzw. *lacZ*-Gen) binden konnte.

Die von den Mäusen abgenommenen Schwanzbiopsien wurden in Ohrclip-Puffer verdaut und 1  $\mu$ l dieser Lösung als Vorlage in den 50  $\mu$ l PCR-Ansatz gegeben, der außerdem 1U rekombinante Taq-Polymerase (Life Technologies) nebst mitgeliefertem Reaktionspuffer (20mM Tris-HCl, pH 8,4; 50mM KCl), 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM dNTP und je 0,2  $\mu$ M der drei Primer (siehe Tabelle 4.16) enthielt. Das Temperatur-Protokoll war für beide Genotypisierungs-PCRs identisch:

Schritt	Temperatur	Zeit	
1 Denaturierung	94°C	4min	
2 Denaturierung	94°C	1min	
3 Primerbindung	55°C	1min	} 3 mal
4 Extension	72°C	2min	
5 Denaturierung	94°C	30sec	
6 Primerbindung	55°C	30sec	} 39 mal
7 Extension	72°C	1min	
8 Extension	72°C	5min	
9 Aufbewahrung	10°C	$\infty$	

Das für das Wildtyp-Allel kennzeichnende Produkt hatte eine Länge von ca. 550bp, das vom Knockout-Allel stammende ca. 400bp. Beide Fragmente konnten in der Gelelektrophorese getrennt und sichtbar gemacht werden.

#### 4.12.11.2 Amplifikation von humaner genomischer DNA für die genetische Testung

Das Gen CLCN7 besteht aus 25 Exonen und die gesamte humane Sequenz ist in der Datenbank abgelegt (Nr. AL031600 (GenBank)). Anhand dieser Sequenz wurden 12 Primerpaare ausgesucht, die etwa 300 bis 800bp Abstand voneinander hatten und jeweils ca. 50bp vor, bzw. hinter der Exon/Intron-Grenze in der intronischen Sequenz lagen. Für die Amplifikation wurde das Enzym Elongase (Life Technologies) nach den Herstellerangaben benutzt. Die verwendeten PCR-Protokolle unterschieden sich nur in den Primerbindungs-Temperaturen und dem Gehalt an DMSO im Reaktionsansatz. Beides ist für die jeweiligen Oligonukleotide in der Tabelle 4.16 aufgeführt. Das Temperatur-Protokoll lautet:



Schritt	Temperatur	Zeit	
1 Denaturierung	94°C	2min	
2 Denaturierung	94°C	1min	
3 Primerbindung	TA <sub>1</sub>	1min	} 3 mal
4 Extension	68°C	3min	
5 Denaturierung	94°C	30sec	
6 Primerbindung	TA <sub>2</sub>	30sec	} 37 mal
7 Extension	68°C	2min	
8 Extension	68°C	5min	
9 Aufbewahrung	10°C	∞	

#### 4.12.11.3 Amplifikation von cDNA

Die Reaktionsbedingungen für die Amplifikation von *ClC-7* von cDNA als Vorlage entsprechen bis auf eine geringere Zyklenanzahl (insgesamt 36 oder 37) dem Protokoll der genomischen Amplifikation (siehe 4.12.11.2). Bei der Amplifikation von humaner cDNA kamen zwei exonisch gelegene Primerpaare zur Verwendung: 1. e1fe/7CD5; 2. H7A9/e25r (siehe Tabelle 4.16).

Zur Analyse der Transkription von *ClC-7* von den Knockout-Loci dienten die Primerpaare 7A14/7M1, 7A14/7CD4, 7A10/7R16. Die Primer aTuf/aTur waren spezifisch für das konstitutiv exprimierte  $\alpha$ -Tubulin und dienten zur Kontrolle der erfolgreichen cDNA-Synthese (siehe Tabelle 4.16).

#### 4.12.12 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode von Sanger (Sanger et al., 1977). Die Sequenzierungen wurden zum Teil von der Servicegruppe des ZMNH (Dr. W. Kullmann) durchgeführt. Es wurde das Thermozyklusverfahren unter Verwendung thermostabiler DNA-Polymerase (Amplitaq, Perkin Elmer) und Fluoreszenzfarbstoff-markierter Didesoxynukleotide angewandt. Die Analyse der Sequenzreaktionen erfolgte auf Geräten der Firma Perkin-Elmer (ABI Prism 377, ABI Prism 310). Als Primer dienten Oligonukleotide mit einer Länge von mindesten 18 Nukleotiden.

### 4.13 Proteinbiochemische Methoden

#### 4.13.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Proteinkonzentrationen in Lösungen wurden mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce) bestimmt. Als Standardreihe wurden BSA-Verdünnungen in den jeweils verwendeten Pufferlösungen verwendet.

### 4.13.2 SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-Page)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte gemäß ihrer Molmasse nach einer Methode nach Laemmli (Laemmli, 1970). Hierzu wurde die Proteinlösung in SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5min auf 50 bis 60°C erhitzt. Die anschließende Elektrophorese erfolgte abhängig von der Molmasse des zu detektierenden Proteins über 5-15%ige vertikale Trenngele bei 20-100V in Minigelkammern (Hoefer Scientific).

### 4.13.3 Western-Blot

Das SDS-Gel wurde nach der Elektrophorese in Methanoltransferpuffer equilibriert und anschließend blasenfrei zwischen eine PVDF-Membran (Polyscreen, NEN) und ein mit Puffer befeuchtetes Whatman 3MM Filterpapier gelegt. Auf der anderen Seite der PVDF-Membran wurde ein weiteres Filterpapier hinzugefügt. Der Transfer erfolgte in einer Tankblotkammer (Hoefer Scientific) mit Transferpuffer bei 70V für 3h oder ü.N. bei 20V, jeweils bei 4°C unter leichtem Rühren. Zur Kontrolle des Transfers wurde die Membran anschließend mit Ponceau S gefärbt.

Für die Immundetektion wurde die Membran für 30min in Blockierungslösung inkubiert. Die Inkubation mit dem spezifischen Antikörper erfolgte in Blockierungslösung für 2 h bei RT oder ÜN bei 4°C. Vor der Inkubation mit dem Zweitantikörper wurde die Membran dreimal mit Waschpuffer gewaschen und erneut für 30min blockiert. Der Zweitantikörper oder Protein A, jeweils mit Peroxidase markiert, wurden in Blockierungslösung aufgenommen und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Membranen 3-4 mal gewaschen und mit Wasser gespült. Die Detektion erfolgte mittels Chemoluminiszenzreaktion (Renaissance Kit, Du Pont) nach den Angaben des Herstellers. Röntgenfilme wurden mit Hilfe eines Curix 60 (AGFA) entwickelt.

## 4.14 Histologische Techniken

### 4.14.1 Gewebeschnitte

#### 4.14.1.1 Gefrierschnitte von Embryonen und Knochen

16,5 Tage alte Embryonen wurden direkt nach Entnahme unfixiert in Tissue Freezing Medium (Leica) auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert.

Perfusionsfixierten Mäusen wurde der Schienbeinknochen (Tibia) entnommen und auf Trockeneis in Tissue Freezing Medium eingefroren.

Die Embryonen oder Knochen enthaltenden Freezing Medium-Blöcke wurden zugeschnitten, auf die Schneidetemperatur (-20 bis -24°C) äquilibriert und mit dem Kryotom (Leica) 20µm dicke Schnitte hergestellt, die auf gekühlte, punktuell erwärmte Objektträger (Histo-bond) gezogen und sofort wieder auf die Schneidetemperatur gekühlt wurden. Die Lagerung

der Objektträger erfolgte bei -80°C. Vor der Weiterverwendung wurden die Objektträger zum Nachfixieren für 5min in 4% PFA bei RT inkubiert und darauf zweimal mit PBS gespült.

#### **4.14.1.2 Paraffinschnitte von Gehirn, Niere oder Knochen**

Perfusionsfixierten Mäusen wurden Tibiae, Gehirn und Nieren entnommen und halbiert. Die Tibiae wurden vor der Weiterverarbeitung ü.N. in 4% PFA in PBS bei 4°C immersionsfixiert und dann für 5 Tage in 250mM EDTA bei 4°C entkalkt.

Die Gewebe wurden durch eine Reihe ansteigender Konzentrationen von Isopropanol entwässert (60%, 75%, 90% für je 3h, 100% ü.N.) und anschließend 12h in einem 1:1 Gemisch aus Isopropanol und Paraffin bei 62°C inkubiert. Darauf folgte die Inkubation bei 62°C für mindestens 12h in reinem Paraffin. Die Präparate wurden anschließend in Paraffin eingebettet, wobei eine halbautomatische Einbettungshilfe (Leica EG 1160) verwendet wurde.

An einem Mikrotom wurden 5µm dicke Schnitte angefertigt und auf Histobond-Objektträger aufgezogen. Nach Inkubation ü.N. bei 37°C zum besseren Haften wurden die Schnitte durch Inkubation für je 10min in Xylolersatz (Vogel), 100%, 90%, 70% und 50% Ethanol entfettet und in PBS gewässert.

#### **4.14.1.3 Schnitte von unentkalkten Knochen**

Schnitte von unentkalkten Knochen für histologische Färbungen wurden in der Abteilung für Osteopathologie angefertigt. Die Knochen wurden 12-36h in 4% PFA in PBS bei 4°C immersionsfixiert und in Methacrylat eingebettet. Die Dicke der am Mikrotom hergestellten Schnitte betrug 2µm.

#### **4.14.1.4 Semi-/ Ultradünnschnitte und Elektronenmikroskopie**

Für die Elektronenmikroskopie wurden 1mm große Fragmente der Epiphysenfuge der Tibia und des Auges nach der Perfusions- und Immersionsfixierung in 1% Glutaraldehyd/ 2% PFA in PBS in der Abteilung für Morphologie des ZMNH in 1% OsO<sub>4</sub> nachfixiert und in Epon eingebettet. Semidünnschnitte von 0,5µm wurden angefertigt und mit Methylenblau gefärbt. Von interessierenden Bereichen wurden 60nm dicke Ultradünnschnitte gefertigt, auf Grids aufgezogen und mit Uranylacetat und Bleicitrat gefärbt. Die Schnitte wurden anschließend mit dem Zeiss EM 902 untersucht.

### **4.14.2 Histologische Färbemethoden**

#### **4.14.2.1 HE-Färbung**

Die HE-Färbung ist eine klassische Methode für histologische Übersichtspräparate. Hämatoxilin färbt die Kerne und Eosin vor allem die Interzellulärsubstanz. Hämatoxilin wurde in Form der Mayer'schen Lösung (Merck) eingesetzt. Die Eosinlösung bestand aus 0,1% Eosin und ca. 0,05% Erythrosin G in Wasser. Die Gewebeschnitte wurden 5min in der Hämatoxilinlösung

bei RT inkubiert und dann zweimal 2min in Wasser gewaschen. Es folgte das sogenannte Bläuen unter laufendem Leitungswasser für 5min. Danach wurden die Objektträger für 10min in der Eosinlösung inkubiert, kurz in Wasser gewaschen und dann durch die aufsteigende Ethanolreihe entwässert und eingedeckelt.

##### **4.14.2.2 Färbung mit Toluidinblau**

Die Schnitte wurden in einer wässrigen Lösung von 1% Toluidinblau O und 1% Natriumtraborat für 5-10min bei RT inkubiert, in 70% und 100% Ethanol für einige Minuten differenziert, entwässert und eingedeckelt.

##### **4.14.2.3 Nissl-Färbung von Neuronen**

Diese Färbung färbt spezifisch die Nissl-Schollen der Neuronen. Eine 1% Lösung von Kresylviolett in 90% Ethanol wurde zum Färben der zuvor gewässerten Schnitte für 5min benutzt. Das Differenzieren erfolgte in 96% Ethanol mit 5% Eisessig für 10sec (bei Paraffinschnitten) bis 5min (bei dickeren Gefrierschnitten), gefolgt von je 4min in 90% und 100% Ethanol. Nach 5min in Xyloversatz wurden die Schnitte eingedeckelt.

##### **4.14.2.4 PAS-Reaktion**

Durch die PAS-Reaktion werden 1,2-glykolische Gruppen nachgewiesen, wie sie beispielsweise in Glykogen, Mucopolysacchariden oder auch abnormen zellulären Ablagerungen auftreten. Die Schnitte wurden 10min in einer 1% Perjodsäurelösung bei RT inkubiert und darauf dreimal in Wasser gewaschen. Es folgten 15min Inkubation in Schiffschem Reagenz und Waschen in Sulfitwasser (18ml 10% Natriumdisulfit + 300ml Wasser + 15ml 1N HCl) dreimal je 2min. Entwässern und Eindeckeln wie üblich.

##### **4.14.2.5 Färbung mit Kernechtrot**

Kernechtrot wurde zur Gegenfärbung von X-Gal- oder von Kossa-gefärbten Knochenschnitten benutzt. Die Kernechtrot-Färbelösung besteht aus 0,1% Kernechtrot, das in 5% wässriger, kochender Aluminiumsulfatlösung gelöst wird. Darin werden die betreffenden Schnitte 10min gefärbt, mit Wasser gewaschen, entwässert und eingedeckelt.

##### **4.14.2.6 von Kossa-Färbung**

Durch diese Technik färben sich Kalzium-haltige Strukturen schwarz, weshalb sie besonders für die Untersuchung von Knochengewebe geeignet ist. Die Knochenschnitte wurden für 30min im Dunkeln in wässriger 5% Silbernitratlösung inkubiert. Nachdem die Färbelösung vollständig durch Waschen mit Wasser entfernt wurde, erfolgte die Reduzierung der Silbersalze mittels einer Natriumkarbonat-Formaldehydlösung (Von-Kossa Reduzierungslösung).

#### 4.14.2.7 TRAP-Färbung

„TRAP“ ist die Abkürzung für Tartrat-resistente saure Phosphatase, ein Enzym, das charakteristisch für reife Osteoklasten ist. Der Inkubationspuffer hat einen niedrigen pH-Wert und enthält Tartrat, um andere Phosphatasen weitmöglichst zu hemmen. 1mg Naphtol-AS-MX-Phosphat wurden in 100 $\mu$ l N-N-Dimethylformamid gelöst und mit einem Puffer aus 40mM Natriumacetat und 10mM Natriumtartrat (pH 5) auf 10ml aufgefüllt. 6mg Fast-Red-Violet LB wurde zugegeben und gemischt. Sowohl Paraffin- als auch Gefrierschnitte wurden in dieser Färbelösung für 10min inkubiert, in PBS gewaschen und wie üblich eingedeckelt.

#### 4.14.2.8 X-Gal Färbung

5-Br-4-Cl-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactose (X-Gal) wird durch die aus E.Coli stammende  $\beta$ -Galaktosidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Die X-Gal Färbung wurde an frischen, nachfixierten Gefrierschnitten von Embryonen oder an Fragmenten frisch präparierter und 1h immersionsfixierter Tibia durchgeführt. Die Objektträger wurden mit der Färbelösung (1mg/ml X-Gal, 5mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 5mM K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 2mM MgCl<sub>2</sub> in PBS) überschichtet und in einer feuchten Kammer 24h bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen folgte Entwässerung und Eindeckeln. Die Knochenstücke wurden nachfixiert und in Methacrylat eingebettet.

#### 4.14.3 *in situ* Hybridisierung

Die cRNA-Sonde wurde mittels des Maxiscript Kit (Ambion) von einem Plasmid (pBluescript) transkribiert, das ein 290bp großes, durch PCR generiertes Fragment der Clc-7 cDNA von Ratte enthielt, flankiert von einem T7- und einem SP6-Promoter. Das cDNA-Fragment entsprach dem Teil der kodierenden Sequenz, der durch die homologe Rekombination von Konstrukt C7B in den *Clcn7*-Lokus deletiert worden war. Je nach dem für die Transkription verwendeten Promoter erhielt man sense- oder antisense cRNA. Der Transkriptionsansatz enthielt [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]UTP zur radioaktiven Markierung der Sonde. Nicht eingebautes [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]UTP wurde durch Zentrifugation über eine Probe Quant G-50 Säule (Amersham Pharmacia) abgetrennt, die RNA mit Ethanol gefällt und im Hybridisierungspuffer aufgenommen.

Die *in situ* Hybridisierung dieser Sonde an Embryonenschnitten wurde von Frau Dr. Fehr aus der Abteilung für Morphologie des ZMNH durchgeführt. Die 20 $\mu$ m dicken Embryonenschnitte wurden für 10min bei 4°C mit 4%PFA nachfixiert, mit PBS gründlich gewaschen und getrocknet. Um Hintergrundsignale zu reduzieren, wurden freie Aminogruppen azetyliert, indem die Gewebeschnitte zunächst in 0,1M Triethanolamin pH 8 equilibriert und dann mit 0,25% Azetanhydrid in 0,1M Triethanolamin pH 8 10min inkubiert wurden. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und getrocknet.

Zur Hybridisierung wurden 50-70 $\mu$ l der markierten RNA-Sonde gleichmäßig als dünner Film durch das Auflegen eines Deckgläschens auf dem Präparat verteilt. In einer feuchten Kammer wurden die Objektträger über Nacht bei 50°C inkubiert. Danach wurden die Präparate in 4xSSC gewaschen. Nach 30min Inkubation in 37°C warmem RNase A-Puffer folgte eine

Waschreihe mit absteigenden SSC-Konzentrationen und eine Dehydrierung in Ethanol. Die getrockneten Präparate wurden anschließend auf Röntgenfilmen exponiert.

#### 4.14.4 Färbung der Zellkerne mit TOTO-3 Iodid

TOTO-3 Iodid (Molecular Probes) ist ein Farbstoff, der nach Interkalierung in DNA bei 660nm fluoresziert, wenn er durch Licht von 633nm angeregt wird. Nachdem die Inkubation mit den fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern abgeschlossen war, wurde im vorletzten PBS-Waschschritt eine Lösung von 0,1 $\mu$ M TOTO-3 Iodid in PBS für 5min bei RT auf die Präparate gegeben, noch einmal mit PBS gewaschen und die Präparate wie üblich eingedeckelt.

#### 4.14.5 Immunhistologische Methoden

Immunhistologische Färbungen wurden sowohl an Kryo- als auch an entsprechend vorbehandelten Paraffinschnitten unter annähernd gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Vorbehandlung der Paraffinschnitte bestand in einem 15minütigen Kochen der entfetteten Schnitte in einem Citratpuffer, was zur Freilegung von Antigenen führen soll. Der gegen CIC-7 gerichtete Antikörper 7N4 war ausschließlich nach dieser Behandlung erfolgreich zu verwenden. Die Verdünnungen der Antikörper waren sehr unterschiedlich und sind zu Beginn des Kapitels in einer Tabelle aufgeführt.

Die auf Objektträgern befindlichen Schnitte wurden mit einem Fettstift umrandet und mit 4% PFA/ 0,1% SDS in PBS für 5min bei RT nachfixiert und permeabilisiert und danach zweimal mit PBS gewaschen. Die anschließenden Schritte sind in den drei folgenden Unterkapiteln beschrieben.

##### 4.14.5.1 Immunhistochemie mit Diaminobenzidin (DAB)

Es folgte eine 10minütige Inkubation in 1% Natriumborhydrid in PBS. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte 30min bei RT in 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert, um endogene Peroxidasen zu zerstören. Nach nochmaligem Waschen in PBS wurden durch Inkubation für 1h in Blockerlösung (0,2% BSA/ 10% Ziegen Serum (NGS)/ 0,5% NP-40 in PBS) versucht, unspezifische Bindung des Antikörpers zu vermindern. Danach wurde die entsprechende Verdünnung des Antikörpers (1:50 bis 1:1000, aus Kaninchen) in Carrierlösung (0,2% BSA/ 1% Ziegen Serum (NGS)/ 0,5% NP-40 in PBS) aufgetragen und zunächst für 1h bei RT, dann ü.N. bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit PBS gewaschen und dann der biotinylierte Zweitantikörper (Anti-Kaninchen aus Ziege) 1:1000 in Carrierlösung verdünnt für 2h bei RT aufgetragen. Nach ausgiebigem Waschen mit PBS wurden die Schnitte 2h mit Streptavidin-Peroxidase inkubiert (Vector), gewaschen und mit einer Lösung aus 0,5mg/ml DAB/ 0,06% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ 50mM Tris/HCl (pH 7,6) entwickelt. Nach dem Waschen in PBS wurden die Schnitte entwässert und eingedeckelt.

#### 4.14.5.2 Immunhistochemie mit Alkalischer Phosphatase (AP)

Zuerst erfolgte eine Inkubation für 1h in Blockerlösung (0,2% BSA/ 10% Ziegen Serum (NGS)/ 0,5% NP-40 in PBS). Danach wurde die entsprechende Verdünnung des Antikörpers (1:50 bis 1:1000, aus Kaninchen) in Carrierlösung (0,2% BSA/ 1% Ziegen Serum (NGS)/ 0,5% NP-40 in PBS) aufgetragen und zunächst für 1h bei RT, dann ü.N. bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit PBS gewaschen und dann der mit Alkalischer Phosphatase gekoppelte Zweitantikörper (Anti-Kaninchen aus Ziege) 1:1000 in Carrierlösung verdünnt für 2h bei RT aufgetragen. Nach dem Waschen in PBS wurde mit einer aus fertigen Tabletten hergestellte AP-Substratlösung (Sigma) entwickelt.

#### 4.14.5.3 Immunfluoreszenz

Der Vorteil der Immunfluoreszenz gegenüber Detektion mit enzymgekoppelten Zweitantikörpern besteht darin, dass zwei oder drei Antikörper aus verschiedenen Spezies gleichzeitig angewandt werden können, so dass Kollokalisationsstudien betrieben werden können. Außerdem ermöglicht die Antigendetektion mit Fluoreszenz eine Untersuchung der Präparate mit konfokaler Laserscanning-Mikroskopie, was vor allem bei den sehr großen Osteoklasten ein Vorteil ist, da sie in verschiedenen Ebenen geschnitten werden können.

Wie bei den vorher genannten Methoden erfolgte eine Inkubation für 1h in Blockerlösung (0,2% BSA/ 10% Ziegen Serum (NGS)/ 0,5% NP-40 in PBS). Danach wurden die entsprechenden Verdünnungen der betreffenden Antikörper (1:50 bis 1:1000, aus Kaninchen/ Maus/ Hamster) in Carrierlösung (0,2% BSA/ 1% Ziegen Serum (NGS)/ 0,5% NP-40 in PBS) aufgetragen und zunächst für 1h bei RT, dann ü.N. bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit PBS gewaschen und dann die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (Cy2/ Cy3/ Cy5) gekoppelten passenden Zweitantikörper (Anti-Kaninchen/ Maus/ Hamster aus Ziege) 1:1000 bis 1:2000 in Carrierlösung verdünnt für 2h bei RT aufgetragen. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Schnitte entwässert und in Plastik eingedeckelt.

#### 4.14.6 Eindeckeln von Gewebeschnitten

Falls nicht anders erwähnt, wurden die Gewebeschnitte nach ihrer jeweiligen Behandlung durch eine aufsteigende Ethanolreihe (50%, 75%, 90%, 100%, je nach Schnittdicke 5-10min) entwässert, bevor sie für 10min in Xylolersatz inkubiert wurden. Ein mit DPX (Sigma) bestrichenes Deckgläschen wurde auf den noch mit Xylolersatz benetzten Objektträger aufgedrückt, bis alle Lufteinschlüsse entfernt waren.

## 4.15 An Tieren durchgeführte Experimente

### 4.15.1 Narkotisierung von Versuchstieren

Vor dem Töten durch Dekapitation für die Blut- und Organentnahme wurden die Tiere in eine Äthernarkose versetzt. Endozytoseversuche oder Perfusionsfixierung wurden nach Injektion eines Gemisches von Ketaminhydrochlorid und Xylazinhydrochlorid durchgeführt. Es wurden 100  $\mu$ l pro 10g Körpergewicht der folgenden Lösung peritoneal injiziert: 80  $\mu$ l 1% Xylazinhydrochlorid und 120  $\mu$ l 10% Ketaminhydrochlorid mit PBS auf 1 ml auffüllen.

### 4.15.2 Sammeln und Analyse von Blut und Urin

Blut wurde nach Dekapitation von in Äther narkotisierten Tieren aus der Halsschlagader gewonnen, bevor andere Organe entnommen wurden. Nach 15 bis 30min bei RT wurde bei 2500g für 10min zentrifugiert, das Serum abgenommen und bei -20°C aufbewahrt. Der Hämatokrit wurde durch Zentrifugation frischen Blutes in heparinisierten Kapillaren bei 2500g für 15min durch Teilen der Geamthöhe der Flüssigkeitssäule durch die Höhe der Erythrozytensäule bestimmt.

2 Tage vor der Urinsammlung wurden die heterozygoten oder Wildtyp-Mäuse ebenfalls auf das sonst den *Clcn7*<sup>-/-</sup>-Tieren vorbehaltenen Flüssigfutter umgestellt. Die Sammlung des Urins erfolgte in parallelen 8stündigen Aufenthalten in metabolischen Käfigen (Phymep, Paris) von 10:00 bis 18:00. Der Urin wurde zur Entfernung von Sediment 5min bei 20000g zentrifugiert und der Überstand bei -20°C eingefroren.

Die Analyse der Proben erfolgte in der Abteilung für Klinische Chemie des Universitätskrankenhauses Eppendorf. Lediglich pH-Wert, Osmolarität und Proteingehalt wurden eigenhändig mit Standardmethoden bestimmt.

### 4.15.3 Perfusionsfixierung

In die linke Herzkammer des durch Injektion tief narkotisierten Tieres wurde bei offenem Brustkorb eine Kanüle geschoben, der rechte Vorhof eröffnet und gleichzeitig mit einem Druck von 180mmHg 0,01% Heparin in PBS in die Herzkammer infundiert. Nach 2min wurde je nach Anwendung für 5min 4% PFA in PBS oder 1% Glutaraldehyd/ 2% PFA in PBS durch die Kanüle in die Herzkammer geleitet.

### 4.15.4 Endozytose von fluoreszenzmarkiertem *beta*-Lactoglobulin

Dieser Versuch wurde mit Unterstützung von Herrn Nils Piwon durchgeführt. 20mg *beta*-Lactoglobulin (Sigma) wurde mittels Fluoro-Link-Kit (Amersham) mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 gekoppelt. Ungebundener Farbstoff wurde über Sephadex G25-M-Säulen (PD10-Säulen, Pharmacia) abgetrennt. 75  $\mu$ g Cy5-markiertes *beta*-Lactoglobulin wurden in 200  $\mu$ l PBS pH 7,4 verdünnt und in die Vena cava narkotisierter Mäuse injiziert. Nach gewünschten Zeiträumen wurden die Tiere anschließend über die linke Herzkammer perfusionsfixiert.



#### 4.15.5 Röntgenaufnahmen

Die Mäuse (P35) wurden durch CO<sub>2</sub> getötet und Haut und Weichteile entfernt. Die Skelette wurden direkt auf der Röntgenfilmkassette befestigt und die Filme in der Abteilung für Osteopathologie in einem Faxitron-Röntgengerät belichtet und anschließend entwickelt. Nach dem gleichen Verfahren wurden einzelne Schienbeinknochen durchleuchtet.

#### 4.15.6 Micro-CT

Die Untersuchung wurde an immersionsfixierten Schädeln 39 Tage alter Tiere mit dem  $\mu$ CT 20 (Scanco Medical) in der Abteilung für Osteopathologie durchgeführt.

### 4.16 Oligonukleotide (Primer)

Primer für die Genotypisierung der Linie C7A		
Name	Sequenz	
LZ2f	gtgtagccattgttgccctagaac	
Neo2	ccttctatgccttcttgacg	
7C2	attcgtctttcctcctcc	
Primer für die Genotypisierung der Linie C7B		
Name	Sequenz	
C7bf	gcttggtacacgatgactg	
C7br1	gctcagcctctccagctctgac	
LZ4r	cgacagtatcggcctcaggaagatcgc	

Primer für die Amplifikation/Sequenzierung von Maus-cDNA		
Name	Sequenz	Gegenprimer: PCR-Bedingungen: WT-Fragment
7A10	gtgggccatggccaacgt	7R16: TA <sub>1/2</sub> 60(3x)/58°C(33x): 0,8kb
7R16	cacggatcctgagtggat	
7A14	agcctgcttcattgacat	7M1: TA <sub>1/2</sub> 60(3x)/58°C(33x): 1,1kb
7M1	cagggatgggatgaagac	
7CD4	crttgtgattgacgctgtg	7A14: TA <sub>1/2</sub> 60(3x)/57°C(34x): 1,6kb
aTuf	cactacaccattggcaaggag	aTur: TA <sub>1/2</sub> 60(3x)/57°C(34x): 0,5kb
aTur	ggtctggaattctgtcaggtc	

4 Materialien und Methoden

Primer für die Amplifikation/Sequenzierung humaner genomischer DNA		
Name	Sequenz	Rückprimer: Bedingungen: Fragment
e1fc	ttgcaggtcacatggtcggccgtcgctc	e1rc: 5% DMSO; TA <sub>1/2</sub> 58/55°C: 0,3kb
e1rc	gacacgcgccgcccagaaggctcac	
e2f	gagtgagaatccacggagcag	e2r: TA <sub>1/2</sub> 60/58°C: 0,2kb
e2r	gtcacctctgctaagatgc	
e34f	tggcctcgtgtgtgagctgag	e6r: TA <sub>1/2</sub> 58°C: 1,4kb
e34r	cagacgaaccacaggcctcag	
e5f	ctgccagagtgactgcgccag	e7r: TA <sub>1/2</sub> 63/60°C: 0,2kb
e5r	cacctgcactggaacacgctg	
e6f	catctgccaggctggtctgtg	e9rb: TA <sub>1/2</sub> 58°C: 0,8kb
e6r	tgagtctggaccacgtgattc	
e7f	ggctgcatctgtctcagcctg	e12r: TA <sub>1/2</sub> 58°C: 1,3kb
e7r	ccaagagagctgctcctg	
e8fb	tcccagccactctgctgatc	e14r: TA <sub>1/2</sub> 58°C: 0,9kb
e9rb	cgggaaacactgatgcacgtg	
e1011f	tcagagctgctgactcggtg	e15r: 5% DMSO; TA <sub>1/2</sub> 57/54°C: 0,9kb
e1011r	ggaatgagagcgcagcatgc	
e12f	gctctccactggcaagtccag	e16r: TA <sub>1/2</sub> 63/60°C: 0,2kb
e12r	gctctcagctccacagctatc	
e13f	tggacttccgcagcctgcgtg	e17r: TA <sub>1/2</sub> 58/56°C: 0,4kb
e13r	tatggccacgtcacagctgag	
e14f	gtggaggaagcatcttacca	e1920r: TA <sub>1/2</sub> 58°C: 0,8kb
e14r	gaaggacgctgcatacacagc	
e15f	caagatcgagcactgcactc	e25r: TA <sub>1/2</sub> 58°C: 2,1kb
e15r	tcctcccgtagcctaagcgag	
e16f	cacggcgacaccaggtttgtg	
e16r	gacactcagccagaaggcatc	
e17f	ggctcctggaaggtgactgg	
e17r	gtgaaccacgtgaggtgcgac	
e18f	gtgtatgatcgcggccacgag	
e18r	ggccactgccttctctgcagc	
e1920f	ggtgctgcagagaaggcagtg	
e1920r	aggtgtgaagccgctggacag	
e21f	tttctgtccagcggcttcac	
e21r	cctgcaaacctgcccgtgtgc	
e2223f	cgacacagcattccagcgcag	
e2223r	agacagagtcaccgagtctc	
e24f	agaggactcggtagctctgtc	
e24r	ccgggagctgagagtaagcac	
e25f	gcccgtgcttactctcagctc	
e25r	gggccgagaaaccagtgactc	

Exonische Primer für die Amplifikation/Sequenzierung humaner cDNA		
Name	Sequenz	Rückprimer: Bedingungen: Fragment
e1fe	gccatggccaacgtctctaag	7CD5: 2% DMSO; TA <sub>1/2</sub> 60/57°C: 1,3kb e25r: 2% DMSO; TA <sub>1/2</sub> 60/57°C: 1,4kb
7A9	tggtagcctcttccacgac	
7CD5	acccggcagacaccgtgag	
e25r	gggccgagaaccagtgactc	

