

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien zum Ansetzen von Puffern, Medien und Reaktionslösungen wurden von Merck, Darmstadt; Sigma Gmbh, Deisenhofen oder Roth Gmbh, Karlsruhe in der *pro analysi* Qualitätsstufe bezogen.

2.1.2 Radiochemikalien

$\alpha^{32}\text{P}$ dCTP (3000 Ci/mmol) Amersham Pharmacia, Freiburg

$\alpha^{33}\text{P}$ -UTP (3000 Ci/ mmol) Amersham Pharmacia, Freiburg

2.1.3 Pufferlösungen

Alle nicht gesondert aufgeführten Pufferlösungen wurden nach (Sambrook et al. 2001) hergestellt.

2.1.4 Enzyme

Alle Restriktionsendonukleasen für Klonierung, Sequenzierung und Southern Blotting wurden von MBI Fermentas oder New England Biolabs bezogen.

2.1.5 Kits

Kit	Hersteller
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Quiagen
Qiagen Plasmid Midi und Maxi Kits	Quiagen
Qiaquick Gel extraction Kit	Quiagen
Qiaquick PCR Purification Kit	Quiagen
BigDye Terminator Sequencing Kit	Perkin Elmer
PhasePrep BAC DNA Kit	Sigma
GenoPrep DNA from Tissue Kit	GenoVision, Dänemark
Expand Long Template PCR System	Roche Diagnostics Corp.
Rediprime II random prime labelling Kit	Amersham biosciences
Taqman Reverse Transcription Reagents	Applied Biosystems
Topo TA cloning Kit	Invitrogen
Genome Walker Kit	Clontech

2.1.6 Vektoren

pGem-T easy, Promega
 pCR Topo 4, Invitrogen
 pCR Topo XL, Invitrogen
 p1230 (LacZ Reportervektor) , Dr. Rob Krummlauf

2.1.7 Bakterien

E. coli DH5 α , Invitrogen
 E. coli TOP10, Invitrogen
 E. coli XI-1 Blue, Stratagene

2.1.8 DNA Banken

Murine BAC Klone wurden vom *Resourcen Zentrum Primäre Datenbanken (RZPD)* in Berlin bezogen.

2.1.9 Tiere

Heterozygote Dsh- Mutanten sind ein Geschenk von Dr. P.B. Selby, Oak Ridge, TN, USA. Dsh ist eine autosomal semidominante Mutation, welche in der Nachkommenschaft von (101x C3H) F1-Hybridböcken auftrat, die zuvor mit 600 Röntgen (R) + 600 R (96R/min) bestrahlt wurden [Selby et al. 1993]. Die Mutation wurde zunächst auf dem C3H/101 Mausstamm gehalten, später dann in den C57B110 Inzuchtstamm eingekreuzt.

Die heterozygoten Shh k.o-Mäuse wurden von C. Chiang (John Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA) zur Verfügung gestellt.

Diverse andere Wildtypstämme (101, C3H, C57B16, C57B110) sind im institutseigenen Tierhaus vorhanden und stehen zur Verfügung.

Die Züchtung der verschiedenen aufgeführten Mausstämme wurde im institutseigenen Tierhaus (MPI für molekulare Genetik, Leiter Dr. Ludger Hartmann) durchgeführt. Hier wurden ebenfalls die Mikroinjektionen (Ingo Vogt) zur Generierung von transgenen Reportermausen (CNE Konstrukte) durchgeführt.

2.1.10 Datenbanken und Tools für in silico Analysen

In silico Analysen wurden mit Hilfe folgender Datenbanken und Tools durchgeführt.

Institut oder Datenbank/ Tool	URL
Biobase (Transfac Pro)	http://www.biobase.de
Blast Analyse (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/
Celera Discovery System	http://www.celeradiscoverysystem.com
ENSEMBL	http://www.ensembl.org
Mouse Genome Database (MGD)	http://www.informatics.jax.org/mgd.html
Matinspector	http://www.genomatix.de
Online Mendelian Inheritance in Man	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim
PIPMaker / MultiPIPMaker	http://pipmaker.bx.psu.edu
RZPD (Ressourcen Zentrum Primäre Datenbanken)	http://www.rzpd.de
mVISTA	http://www-gsd.lbl.gov/vista/
Whitehead Institute (MIT)	http://www-genome.wi.mit.edu

2.2 Methoden

Molekularbiologische Standardtechniken wie zum Beispiel Bakterienaufzucht, Medienherstellung, Agarosegelelektrophorese, Restriktionsenzymverdau oder Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren wurden nach den in Sambrook et al. (2001) beschriebenen Protokollen durchgeführt.

2.2.1 Plasmid DNA Präparation

Die Präparation kleiner Plasmidmengen wurde mit dem Plasmid-DNA-Mini-Kit von Quiagen durchgeführt. Die Aufreinigung wurde in der Regel mit 3 ml einer ÜNK nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde mit 50µl sterilem H₂O eluiert. Bei diesem Elutionsvolumen ist erfahrungsgemäß mit einer Konzentration von 300-400ng/µl zu rechnen. Zur Gewinnung größerer Plasmidmengen wurde das Midi bzw. Maxi Plasmid DNA Kit (Quiagen) verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.2.2 BAC DNA Präparation

Zur Aufreinigung von DNA aus BAC (bacterial artificial chromosome) wurde das PhasePrep BAC DNA Kit (SIGMA) verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die hochmolekulare BAC DNA wurde in TE Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.2.3 Genomische DNA Extraktion aus Mausgewebe

Mausschwanzbiopsien, Amnion von Embryonen bzw. Gewebestücke (z.B. Leber) wurden mit 500 µl Lysispuffer und 20µl Proteinase K (20mg/ml) in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß versetzt und bei 55°C über Nacht inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur (RT) wurden dem Ansatz 200 µl 6 M NaCl zugefügt. Der Ansatz wurde für 1 Minute geschwenkt und anschließend für 10 Minuten auf Eis inkubiert.

Danach wurde der Ansatz für 8min bei 13000rpm zentrifugiert, der Überstand in ein frisches Gefäß überführt und mit 1 ml 100% EtOH (RT) versetzt. Die DNA wurde durch Zentrifugation für 10min bei 13000rpm bei 4°C gefällt, mit 75% EtOH gewaschen und in 100 µl TE Puffer aufgenommen. DNA für Southern Blot Analysen wurde zusätzlich Phenol/Chloroform extrahiert. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.2.4 Automatisierte DNA Isolierung (GenoM-48 Robotic Workstation)

Genomische DNA der F2 Mäuse der Feinkartierung wurde mit Hilfe der GenoM-48 Robotic Workstation präpariert: Ungefähr 5mm große Schwanzbiopsien wurden in ein 2ml Eppendorfgefäß überführt, mit 95 µl Inkubationspuffer und 5µl Proteinase K-Lösung (20mg/ml) versetzt, leicht gevortext und bei 55°C über Nacht inkubiert. Nach einer kurzen Zentrifugation (300rpm/1min) wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß ohne Deckel überführt. Die DNA aus den somit vorbehandelten Proben wurde unter Verwendung des „Tissue standard“ Protokoll (der Software) und des „GenoPrep DNA from Tissue“ Kit auf der GenoM-48 Robotic Workstation isoliert und aufgereingt: Das Prinzip der Aufreinigung beruht auf der Bindung der DNA an die Silicatoberfläche von magnetischen Beads in Gegenwart einer chaotropen Lösung.

2.2.5 Wiedergewinnung von DNA Fragmenten

Um einzelne DNA-Fragmente (nach Restriktionsverdau, linearisierte Plasmide) nach gelelektrophoretischer Auftrennung zurückzugewinnen wurde der Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.2.6 Aufreinigung von PCR Produkten

PCR Produkte wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Die Aufreinigung wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.2.7 Isolierung von RNA

Für die Isolation von Gesamt-RNA aus Embryonen bzw. Limbs (engl: Extremitätenknospe) wurde peqGold TriFast™ verwendet: Hierbei handelt es sich um ein gebrauchsfertiges Reagenz, welches Phenol und Guanidinisothiocyanat in einphasiger Lösung enthält. Die Methode basiert auf einer Einschnitt-Flüssigphasen-Separation. Embryonen bzw. Limbs wurden in ein Eppendorfcap überführt und mit 1ml peqGold TriFast™ versetzt. Anschließend wurden sie mit einem Ultraturrax homogenisiert, um eine effiziente Lyse zu erreichen. Um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten wurden die Ansätze für 5 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Je Ansatz wurde 0,2 ml Chloroform zugegeben, die Proben wurden für 15 sec kräftig geschüttelt, und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Eine anschließende Zentrifugation (5 min bei 13000rpm) führte zur Trennung der Probe in 3 Phasen: eine untere rote Phenol-Chloroform-Phase, eine obere farblose wäßrige Phase und eine dazwischenliegende Interphase. RNA befindet sich in der wäßrigen Phase, die in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5 ml Isopropanol pro eingesetztem Milliliter peqGold TriFast™ gefällt (15 min / RT) wurde. Die RNA wurde durch Zentrifugation (13000rpm; 4°C; 10 min;) pelletiert. Der Isopropanolüberstand wurde vorsichtig abgezogen und das Pellet zweimal mit 1 ml 75% Ethanol durch Vortexen und anschließende Zentrifugation (13000rpm; 4°C; 10 min;) gewaschen. Das gelartige RNA-Pellet wurde kurz (5 min) an Luft getrocknet. Die RNA wurde je nach Embryonalstadium in 50-100 µl DEPC-H₂O gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

PCR Standardexperiment

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die meisten Sequenzen mit Hilfe dieser Standard PCR Methode amplifiziert. Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz: 5µl 10x PCR-Puffer (MBI Fermentas/15mM MgCl₂), 1µl dNTP Mix (10mM), 0,5 µl forward Primer (50pmol/µl), 0,5 µl reverse Primer (50pmol/µl), x µl DNA Template (50ng), 1µl *Taq* Polymerase (MBI Fermentas 10 U/µl), x µl dd H₂O (steril). Nach einer initialen Denaturierung bei 94°C für 5 min im Thermocycler erfolgte die PCR Reaktion mit 30 Zyklen des folgenden Standardprogrammes: Denaturierung bei 94°C für 1 min, Primer-

Annealing $x^{\circ}\text{C}$ (in Abhängigkeit der Primer T_m) für 1 min, Primer-Extension (in Abhängigkeit der Produktlänge) 72°C 1-2 min. Zum Abschluß erfolgte ein finaler Syntheseschritt für 10 min bei 72°C , danach Kühlung bei 4°C .

Die Optimierung von schwierigen PCR Reaktionen (z.B bei genomischen und/ oder GC reichen DNA Templates) erfolgte standardmäßig mit einer Veränderung der MgCl_2 Konzentration und der Zugabe von 5- 10% DMSO (Finalkonzentration PCR Standardansatz)

Für DNA Fragmente $> 1,5$ kb wurde der PCR Long Range Kit von Roche benutzt. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

2.2.9 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

Die radioaktive Markierung von DNA, die als Sonden für Hybridisierungen eingesetzt wurden, erfolgte mit dem Rediprime II random prime labelling Kit (Amersham biosciences). 25ng aufgereinigte DNA wurde in 45 μl dH_2O verdünnt, für 5 min bei 95°C denaturiert und für 10 min auf Eis abgekühlt. Die denaturierte DNA wurde zum Amersham labelling reaction mix^R (Klenow Fragment/ dNTP/ Random Primer) hinzugefügt, 5 μl Redivue $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP zupipettiert und der Ansatz für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Im Anschluß wurde die Reaktion mit 2 μl 0,5M EDTA gestoppt. Nichteingegebene dNTPs und überschüssige Primer wurden mittels micro-spin S-200 HR Säulen entfernt. Dazu wurden die präequilibrierten Säulen für 1 min bei 3000rpm kurz anzentrifugiert, der markierte Sondenansatz geladen und für 2 min bei 3000rpm zentrifugiert. Die spezifische Aktivität der markierten Sonde wurde im Szintillationszähler gemessen. Vor einer Hybridisierung wurde die markierte Sonde für 5 min bei 95°C denaturiert.

2.2.10 Radioaktive Sondengenerierung durch in vitro Transkription

Die Markierung der Sonde durch in vitro Transkription wurde in einem 20µl Reaktionsansatz mit folgenden Komponenten durchgeführt: 500ng linearisiertes DNA Template, Transkriptionspuffer, 0,5 mM NTP Mix, 5 U RNase Inhibitor, RNase freies H₂O, 40 U RNA Polymerase (Sp6 bzw. T7) und 80µCi α³³P-UTP. Die Transkriptionsreaktion wurde für 1 Stunde bei 37°C durchgeführt. Danach erfolgte ein DNase Verdau (10 U DNase) für 30 min bei 37°C. Der Transkriptionsansatz wurde anschließend mit 4 Volumen RNase freies H₂O, welches 20ng/ml Glycogen und 0,5 M LiCl enthält, verdünnt. Zum Präzipitieren der RNA wurden dem Ansatz 2,5 Volumen 100% EtOH zugefügt. Nach einer Inkubation bei -20°C für 30 min wurde der Ansatz bei 13000 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Das RNA Pellet wurde anschließend zweimal mit kaltem 80% EtOH gewaschen, in 50 µl RNase freiem H₂O gelöst und 1:20 mit Hybridisierungspuffer verdünnt. Die RNA Sonde wurde vor der Verwendung für 5 min bei 95°C denaturiert und danach kurz auf Eis abgekühlt.

2.2.11 Southern Blot Hybridisierung

Genomische DNA wurde mit geeigneten Restriktionsendonukleasen über Nacht verdaut und in einem 0,8% Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt; als Größenreferenz diente ein λ/EcoRIHindIII Marker (Marker III, MBI Fermentas). Nach der Elektrophorese wurde das Agarosegel für 10 min in Denaturierungspuffer und anschließend für 45 min in Neutralisierungspuffer inkubiert. Der Transfer der DNA auf eine positiv geladene Nylon Membran (3M-N⁺, Amersham) erfolgte in 20x SSC Puffer über Nacht. Die Membranen wurden vorsichtig mit 2x SSC gespült und auf Whatmanpapier getrocknet. Die DNA wurde anschließend durch UV Crosslinking (UV-Stratalink 1800, Stratagene) fixiert. Die Membranen wurden für 4 Stunden in Church Puffer (0,1mg/ml denaturierte Hering Sperm DNA/ 0,5µg/ml COT DNA) prähybridisiert; vor Zugabe der Sonde wurde der Church Hybridisierungspuffer erneuert. Die radioaktiv markierte DNA Sonde wurde für 5 min bei 95°C denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt, mit 1 ml Church Puffer versetzt und zum Hybridisierungspuffer pipettiert. Die Hybridisierung der Membranen erfolgte bei 65°C über Nacht im Hybridisierungsofen. Danach wurden die Membranen mit 2x SSC/0,1%SDS Puffer bei

60°C - 65°C so oft wie erforderlich gewaschen, mit 2x SSC gespült und noch feucht in Frischhaltefolie verpackt. Die Detektion der Signale erfolgte über Nacht mittels PhoshoImager (Molecular Dynamics).

2.2.12 Northern Blot Hybridisierung

Für Northern Blot Hybridisierungen wurden 20µg Total RNA, die aus Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien isoliert wurden, in Formamid Ladepuffer (50% deionisiertes Formamid und 6% Formaldehyd in 1x MOPS) bei 70°C denaturiert. Die denaturierten RNA Proben wurden in einem 1% Agarosegel (enthält 3,7% Formaldehyd) in 1x MOPS Laufpuffer bei 100V für 4 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt, dokumentiert, entfärbt und mit 2x SSC äquilibriert. Der Transfer der RNA auf eine positiv geladene Nylon Membran (3M-N⁺, Amersham) erfolgte in 20x SSC Puffer über Nacht. Die Membranen wurden vorsichtig mit 2x SSC gespült und auf Whatmanpapier getrocknet. Die RNA wurde anschließend durch UV Crosslinking (UV-Stratalink 1800, Stratagene) fixiert und die Membran bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt. Die Membranen wurden zunächst bei 68°C für 1 Stunde in Expresshyb^R- Lösung (Clontech) prähybridisiert. Danach erfolgte die Hybridisierung (Expresshyb^R- Lösung, 0,1mg/ml denaturierte Hering Sperm DNA und 45 µl radioaktiv markierte DNA Sonde) bei 68°C im Hybridisierungssofen über Nacht.

Nach der Hybridisierung wurden die Membranen kurz gespült und 3x für 10 min mit Waschlösung I (2x SSC /0,05%SDS) bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend erfolgten zwei weitere Waschschrte bei 50- 55°C für je 20 min mit Waschlösung II (0,1x SSC/ 0,1% SDS). Die Membran wurde mit 2x SSC kurz abgespült, auf Whatmanpapier abgetropft und in Frischhaltefolie verpackt. Die Detektion der Signale erfolgte über Nacht mittels PhoshoImager, anschließend mit einem Röntgenfilm. Nach der Dokumentation wurden die Membranen in 0,5% SDS Lösung bei 95°C für 10 min gestrippt, 10 min in Lösung bei Raumtemperatur abgekühlt, auf Whatmanpapier abgetropft und die Effizienz der Prozedur mittels PhosphoImager überprüft. Abschließend wurde zur Kontrolle der geladenen RNA-Menge eine Hybridisierung mit einer *Gapdh* Sonde durchgeführt.

2.2.13 Real-time PCR

Die Real-time PCR wurde unter Verwendung von SYBR Green PCR Master Mix auf einem ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System durchgeführt. Bei SYBR Green handelt es sich um einen interkalierenden Farbstoff, der doppelsträngige DNA unspezifisch bindet. Deshalb wurden Intron überspannende Primer verwendet, um Amplifikation von genomischer DNA auszuschließen. Die Primer wurden mit Hilfe der Primer Express Software (Applied Biosystems) nach den empfohlenen Spezifikationen des Herstellers generiert.

Präparation der cDNA: Je 1 µg Total RNA der Embryonen/ Limbs wurde nach den Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. (Taqman Reverse Transcription Reagents, Applied Biosystems).

Die Real-time PCR wurde in einem 30 µl Reaktionsansatz durchgeführt: 10 µl 1:10 verdünnte cDNA oder Standard, 5 µl Primer Mix (7,5 pmol je Primer) und 15 µl SYBR green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Die PCR wurde in Triplikaten in 96-well Platten auf einem ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System wie folgt durchgeführt: 2 min +50°C, 10 min +95°C (Enzym Aktivierung / Inaktivierung, Template Denaturierung); 40 Zyklen mit 15 sec +95°C und 1 min +60°C. Im Anschluß erfolgte eine Dissoziationskurvenanalyse, die für 15 sec bei +60°C bis 15 sec +95°C mit einer ramp Rate von 2% aufgezeichnet wurde. Hiermit sollten unspezifische Amplifikationen und Primerdimere bestimmt werden. Ct (threshold cycle) Werte des Amplifikationsplot wurden mit der SDS 2.0 Software bestimmt.

Die relative Quantifizierung der Genexpression wurde mit Hilfe der Standardkurvenmethode [User Bulletin#2, 10/2001; Applied Biosystems] durchgeführt: Hierzu wurde für jede unterschiedliche cDNA Probe oder Standard für das Zielgen als auch für Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (*Gapdh*), als ubiquitäres Haushaltsgen nicht differentiell exprimiert und endogene Referenz, eine Standardkurve mit den entsprechenden cDNA Verdünnungen erstellt. Für jede cDNA Probe wurde die Menge des Zielgens und der endogenen Referenz *Gapdh* mit Hilfe der entsprechenden Standardkurve ermittelt. Anschließend wird der ermittelte Wert des Zielgens durch den Wert der endogenen Referenz geteilt, hierdurch erhält man die normalisierte Menge des Zielgens in der jeweiligen cDNA. Den relativen Expressionsgrad erhält man, indem man den Wert für das normalisierte Zielgen durch den ebenfalls normalisierten Wert des Kalibrators (eine bestimmte cDNA Probe, z.B. WT E 10.5) dividiert. Die ermittelten Werte werden als n-fache Differenz relativ zum Kalibrator angegeben.

2.2.14 Klonierung/ Rekombinante DNA

Die Arbeitstechnik des Klonierens basiert auf der Fähigkeit, DNA in vitro zu schneiden, zu modifizieren und neu zusammenzufügen, sowie auf der Grundlage von Wirt-Vektor-Systemen, in denen man neu kombinierte DNA vermehren kann.

Aufgereinigte PCR Produkte, verdaute und aufgereinigte Plasmidfragmente wurden mit T4 DNA Ligase (Promega) in geeignete Vektoren kloniert und in chemisch kompetente *E.coli* (DH5a, XL-1 Blue) Zellen mittels Hitzschock nach Standardprotokoll transformiert. Die LacZ Reporter Konstrukte wurden durch PCR wie folgt generiert: die konservierten Elemente (CNE 1-3) wurden mit den CNE Primern (siehe Anhang) amplifiziert, mit *Xho I* und *Hind III* verdaut, und in Vektor p1230, der mit denselben Enzymen verdaut worden war, ligiert. Die Verifizierung der Konstrukte erfolgte durch Sequenzierung.

2.2.15 Bruchpunktklonierung

Zur Klonierung der Dsh Bruchpunkte wurde das Genome WalkerTM Kit (Clontech) verwendet: Genomische Dsh/Dsh DNA wurde mit EcoRV, DraI, Pvu II und Ssp I Restriktionsendonukleasen über Nacht bei 37°C verdaut und EtOH gefällt. Zu je 1 µg der unterschiedlich verdauten DNA wurden in einem 50µl Reaktionsansatz Genome Walking Adapter Oligonukleotide mit T4 DNA Ligase (Promega) über Nacht bei 16°C ligiert. 1µl dieses Ansatzes wurde als Template für eine 50µl PCR Reaktion mit API und sequenz-spezifischem Primer 1 eingesetzt. Die PCR wurde in einem DNA Thermal Cycler 2700 (Perkin Elmer) mit folgenden Parametern durchgeführt: initiale Denaturierung bei 94°C für 2 min; [94°C für 25 sec, 72°C für 4 min] 7 Zyklen; [94°C, 25 sec, 67°C für 4 min] 32 Zyklen, gefolgt von einem finalen Syntheschritt bei 67°C für 4 min. Die PCR Reaktion wurde 1:50 verdünnt und als Template für eine Nested PCR

mit AP2 und Primer 2 eingesetzt, welche mit folgenden Parametern durchgeführt wurde: [94°C für 25 sec, 72°C für 4 min] 5 Zyklen; [94°C für 25 sec, 67°C für 4 min] 22 Zyklen, gefolgt von einem finalen Syntheseschritt bei 67°C für 4 min. 15µl des sekundären PCR Produktes wurden auf einem 1,2% Agarosegel analysiert, das Fragment (aus Pvu II Genome Walker Library) aus dem Gel aufgereingt (2.2.5) und anschließend in PCR Topo II Vector (Invitrogen) kloniert. Das Plasmid mit dem inserierten Bruchpunktfragment wurde sequenziert und auf einem ABI 3100 Sequenzer (Applied Biosystems) analysiert.

Primer/Oligo	Funktion	Sequenz 5' - 3'
GenomeWAdapter	Adapter	GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTTCGACGGCCCGGGCTGGT-
Primer 1	PCR1	AGGAAAGGCCCTGCTTATGT
AP 1	PCR1	GTAATACGACTCACTATAGGGC
Primer2	PCR2	GTGAGTGGCCATTTCTTCCT
AP 2	PCR2	ACTATAGGGCACGCGTGGT

2.2.16 Genotypisierung

Die Bestimmung von *Dsh* und *Shh* Genotypen erfolgte mit Hilfe einer Standard PCR (2.2.8) von genomischer DNA (2.2.3) mit folgenden Oligonukleotiden und PCR Bedingungen:

Dsh: D5Mit72-f; D5Mit72-r (Sequenzen siehe Anhang Oligonukleotide)
Standard PCR Ansatz
94°C/5min [94°C/1 min; 56°C/1 min; 72°C/1 min] 35 Zyklen; 72°C/10min; 4°C

Shh: Shh-GenoP3; Shh-GenoP4 (Sequenzen siehe Anhang Oligonukleotide)
Standard PCR Ansatz (+5% DMSO final)
94°C/5min [94°C/1 min; 60°C/1 min; 72°C/1 min] 35 Zyklen; 72°C/10min; 4°C

Die PCR Fragmente wurden auf einem 4% Agarosegel aufgetrennt und analysiert.

2.2.17 Nichtradioaktive In situ Hybridisierung auf Gefrierschnitten

Nach der Präparation von Maus Embryonen und Extremitätenknospen unterschiedlicher Entwicklungsstadien wurden diese direkt in OCT Medium (Tissue Tek) eingebettet, eingefroren und danach mittels Kryotom (Leica), Schnittdicke 15µm, geschnitten. In situ Hybridisierung wurde auf einem Tecan In situ Hybridisierung Roboter (Genesis RSP 150) mit den empfohlenen kommerziellen Reagenzen durchgeführt.

Tag 1				
Zyklen	Volumen µl	Zeit	Reagenz	Temperatur °C
5	250	6 min	0.6% H ₂ O ₂ in MeOH	24 °C
8	300		PBS	↓
2	300	4 min	0.2M HCl	↓
4	300		PBS	↓
2	300	8 min	Proteinase K	↓
8	250		PBS	↓
2	300	10 min	4% PFA	↓
8	300		PBS	↓
2	200		Hybridisierungsmix	65 °C
1		6 h	Hybridisierungsmix + Sonde	66 °C
Tag 2				
4	300	5 min	5x SSC	63 °C
6	350	8 min	Formamid I	64 °C
4	350	15 min	Formamid II	↓
5	300	6 min	0.1x SSC	↓
3	300	2 min	NTE	22 °C
3	300	5 min	20 mM Iodoacetamid	↓
4	300	2 min	NTE	↓
4	250	20 min	4% Schaf Serum	↓
9	200	9 min	TNT	↓
3	250	20 min	TNB Blocking Puffer	↓
2	200	45 min	AntiDIG-POD (1:600)	↓
8	200		TNT	↓
1	250	30 min	Tyramid-Biotin	↓
8	300		Maleat Waschpuffer	↓
2	200	30 min	NeutrAvidine (1:750)	↓
8	300		Maleat Waschpuffer	↓
8	200		TNT	↓
2	200	2 min	TMN	↓
3	200	20 min	NBT/BCIP	↓
4	250		H ₂ O	↓
2	200	1 min	TNT	↓
2	200	7.5 min	4% PFA + 1% Gluteraldehyd	↓
2	300		PBS	↓
4	200		H ₂ O	↓

Tabelle 1: In situ Hybridisierung auf Gefrierschnitten mit Tecan in situ Roboter System

2.2.18 Radioaktive In situ Hybridisierung auf Paraffinschnitten

Embryonen und Extremitätenknospen wurden nach der Präparation in 4% PFA bei 4°C über Nacht fixiert. Am nächsten Tag wurden die Präparate in 70% und 100% EtOH für je 2 Stunden dehydriert, in Paraffin (56°C) eingebettet und anschließend am Mikrotom geschnitten (8µm Schnittstärke).

Die Schnitte wurden zwei mal für 5 min in Xylol inkubiert, um das Paraffin zu entfernen. Danach wurden die Schnitte in folgender Ethanolreihe: 100%, 100%, 90%, 70%, 50%, 30%, für je 2 min rehydriert. Anschließend wurden die sie mit H₂O (Millipore) gespült und zwei mal für je 2 min mit PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte in einer Proteinase K Lösung (10µg/ml in PBS) für 3 min inkubiert, und mit PBS für 5 min gespült. Die Schnitte wurden in 4% PFA für 10 min fixiert und anschließend für 5 min mit PBS gespült. Anschließend wurden die Schnitte in folgender Ethanolreihe: 30%, 50%, 70%, 90%, 100%, 100% für je 2 min dehydriert und danach bei Raumtemperatur für 15 min getrocknet. 50µl der markierten RNA Sonde wurden auf die Schnitte pipettiert, diese wurden mit Deckgläschen versiegelt. Die In situ Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 70 °C in einer Feuchtkammer.

	Finales Volumen 10 ml	Finale Konzentration
100% Formamid	5 ml	50%
5 M NaCl	1.8 ml	3M
1 M Tris-HCL pH 7.4	0.2 ml	20 mM
0.5M EDTA pH8.0	0.1 ml	5 mM
1 M NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O pH 8.0	0.1 ml	10 mM
40% Dextranulphat	2.5 ml	10%
50 % Denhardts	0.2 ml	1x
10 mg/ml Yeast RNA	0.5 ml	0.5 mg/ml

Tabelle 2: in situ Hybridisierungspuffer

Am zweiten Tag wurden die Schnitte zuerst für 30 min mit 5xSSC bei 55°C gewaschen, danach für 30 min mit 2x SSC bei 55°C und die Deckgläschen wurden entfernt. Danach erfolgte ein RNase Verdau mit 0,02 mg RNase A für 30 min bei 37°C. Die Schnitte wurden danach mit 2x SSC/50% Formamid und zweimal 30 min mit 2x SSC bei 55°C gewaschen. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert und für 10 min getrocknet. Die Detektion der Signale erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur mit einem Röntgenfilm (Kodak Scientific Imaging Film) Die Schnitte wurden in Photoemulsion NTB2 bei 40°C in der Dunkelkammer gedippt. Die getrockneten Schnitte wurden bei 4°C im Dunkeln so lange gelagert, wie vom entwickelten

Röntgenfilm abgeschätzt werden konnte. Die gedippten Schnitte wurden mit Kodak Entwickler für 5 min bei 15°C entwickelt, mit Wasser gespült und mit Kodak Fixierer für 15 min bei RT fixiert. Die Schnitte wurden mit 0,2% Toluidin Blau für 5 min gegengefärbt und in einer aufsteigenden Ethanolreihe: 30%, 50%, 70, 90%, 100%, 100% für je 2min dehydriert. Die Schnitte wurden danach in 100% Xylol für 30 min inkubiert und in Einbettmedium (DPX Mountant) mit Deckgläschen eingedeckelt.

2.2.19 Fluoreszenz In situ Hybridisierung (FISH) auf Chromosomen

DNA aus BACs (bacterial artificial chromosome) wurden wie in 2.2.2 präpariert. Zur Herstellung der Sonden wurden die BACs mittels Nick Translation mit Biotin-16-dUTP, Digoxigenin-11-dUTP (Roche Diagnostics Corp) oder Tamra-dUTP (Applied Biosystems) (rot) markiert. Drei-Farben FISH wurde auf Metaphasen Chromosomen und Kernen aus DSH+/- Milz Lymphozyten nach Standardprotokoll durchgeführt. Bilder wurden mit einem Epifluoreszenzmikroskop (Leica DMRXA) aufgenommen, das mit einer gekühlten charge-coupled device (CCD) Kamera (Photometrics) und Bandpass Filtern (Chroma Technology Corporation) ausgestattet ist. Für die Analyse der FISH Ergebnisse wurde die QFISH-Software (Leica Microsystems) verwendet.

2.2.20 Skelettpräparation

Die Skelettpräparation der Embryonen wurden nach Mundlos (Methods Mol. Biol. 2000) durchgeführt: Dafür wurden die Embryonen gehäutet und die inneren Organe entnommen, um einen besseren Zugang der Färbelösung zu gewährleisten. Die Embryonen wurden anschließend in 100% technischem EtOH über Nacht bei 4°C entwässert und anschließend für 2,5 Tage in die Färbelösung überführt. Zum Aufklaren des Präparats wurde das restliche Gewebe in 1,8%-2% KOH für 4 Stunden, in 1% KOH für 2 Stunden und in 0,3% KOH über Nacht zersetzt. Die Skelette wurden danach in 90% Glycerin gelagert. Die Dokumentation erfolgte in Glycerin unter einem Binokular mit einer AxioCam (Zeiss).

2.2.21 Hämatoxylin/ Eosin Färbung

Die Hämatoxylin/ Eosin (HE) Färbung, welche Zellkerne und das Bindegewebe der Objekte anfärbt, erfolgte nach einem Protokoll von SIGMA (Accustain/ HE-Färbung): Die Paraffinschnitte wurden in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe hydriert (100%, 95%, 90%, 70% Ethanol, je 5 min). Die Blaufärbung der Kerne erfolgte für 3 min in Hämatoxylin, wobei dieses durch Oxidation in den eigentlichen Farbstoff Hämatein überführt wird. Das Bindegewebe wurde für 3-5 min mit Eosin orangerot angefärbt. Anschließend wurden die Präparate wieder in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und nach dem Xylolschritt mit Entellan (Merck) eingedeckelt.

2.2.22 LacZ Färbung

Die Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien werden in 1x PBS präpariert und in eine 24-Loch Zellkulturplatte überführt. Nachdem alle Embryonen gesammelt sind wird das 1x PBS durch 2 ml Fixierlösung ersetzt. Die Inkubationsdauer erfolgt entsprechend dem Entwicklungsstadium bei 4°C auf einer Schwenkappartur: E7.5/5 min; E8.5/10 min; E9.5/20 min; E10.5/30 min; E11.5/40 min; E12.5/50 min; E13.5/60 min. Anschließend wird die Fixierlösung entfernt und die Embryonen 2 mal mit 1x PBS für je 20 min bei RT gewaschen. Danach wird das 1x PBS entfernt und durch 2 ml X-gal Färbungslösung ersetzt. Die Färbung erfolgt für 1-2 Tage bei 37°C. Danach werden die Embryonen kurz mit 1xPBS gespült und für 30 min mit 4% PFA fixiert.

2.2.23 Feinkartierung

Auswahl und Generierung von Markern

Zur Feinkartierung für das zu untersuchende 14 cm Intervall auf Chromosom 5 wurden zum einen Mikrosatelliten Marker aus Datenbanken (<http://www-genome.wi.mit.edu>) verwendet. Diese klassischen Mikrosatelliten Marker sind meist $(CA)_n$ - Repeat Marker. Hierbei handelt es sich um repetitive Abfolgen zweier Nukleotide, meist mit 20 bis 30 Wiederholungseinheiten. Diese Bereiche können im Genom der verschiedenen Mausstämme polymorph sein, das heißt sich in der Anzahl der repetitiven Einheiten unterscheiden. Diese polymorphen Marker wurden zur Kartierung der *Dsh* Mutante verwendet, sie waren jedoch nur begrenzt verfügbar. Somit mussten für den zu untersuchenden Bereich weitere Repeat Marker entwickelt werden:

Mit Hilfe des Tandem Repeat Masker Programmes (<http://tandem.bu.edu/>) und des vollständig sequenzierten Mausgenoms war es möglich, an vielen Positionen im Genom innerhalb des Intervalls auf Chromosom 5 repetitive Bereiche zu identifizieren. Das Tandem Repeat Masker Programm ist in der Lage, in einer gegebenen Sequenz Di, Tri, Tetra etc. Wiederholungen von Nukleotidsequenzen zu erkennen. Die flankierenden Sequenzen, die einen Repeat Bereich umgeben, wurden benutzt, um Primer für den jeweiligen Bereich zu generieren. Die Primer wurden anschließend einer genomweiten Blast Analyse unterzogen (<http://www.ensembl.org/BLAST>). Dies ist von entscheidender Bedeutung zur Vorauswahl der Marker. Die Marker wurden anschließend mittels PCR mit genomischer Maus DNA der Stämme C57, 101 und Balb/c getestet. Hierfür wurde standardmäßig folgendes PCR Programm verwendet: Initiale Denaturierung bei 94°C für 5 min, [96°C, 10 sec; 60°C→55°C, 15 sec; 72°C, 30 sec] 5 Zyklen; [96°C, 10 sec; 55°C, 15 sec; 72°C, 30 sec] 25 Zyklen, gefolgt von einem finalen Syntheseschritt bei 72°C für 10 min. Nach Analyse der PCR Produkte im 2% Agarosegel wurden Marker, die ein distinktes PCR Produkt amplifizieren, für die exakte Bestimmung der Allelgrößen fluoreszenzmarkiert und auf einem ABI 3100 PRISM Genetic Analyzer analysiert (siehe Durchführung der Kopplungsanalyse).

Theorie

Aufgrund der Chromosomentheorie der Vererbung ist zu erwarten, dass Gene, die auf dem gleichen Chromosom liegen, nicht unabhängig voneinander, sondern miteinander segregieren (Kopplung). Durch Rekombination kann die Kopplung jedoch durchbrochen werden. Benachbarte Gene und genetische Merkmale eines Chromosoms bilden demnach eine Kopplungsgruppe. Durch die Kopplungsanalyse soll ein mit der Krankheit gekoppeltes genetisches Merkmal (Marker) identifiziert werden, um sich der Position der Mutation annähern zu können. Während der Keimzellbildung in der F1 Generation kommt es in der Prophase der Meiose I zum reziproken Austausch (Cross-over) von Chromosomensegmenten. Je weiter zwei Gene bzw. genetische Merkmale voneinander entfernt sind, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Cross-over, das heißt eine Rekombination zwischen ihnen stattfindet. Dies bedeutet auch, dass je näher ein Marker am gesuchten Mutationsbereich liegt, desto seltener wird dieser durch Cross-over entkoppelt und somit getrennt vererbt. Die für die Feinkartierung generierten F2 Mäuse werden an den etablierten Marker Loci genotypisiert: Identifizierte Heterozygote Mäuse, die das 101 (defektes Allel) und Balb/c Allel für einen bestimmten Marker aufweisen, weisen an dieser Marker Position auf die potentielle Lage der Mutation hin. Homozygote Mäuse, die nur das Balb/c Allel für einen bestimmten Marker besitzen, schließen die Lage der Mutation an dieser Position im Genom aus. Diese rekombinanten F2 Mäuse werden benutzt, um den Bereich der Mutation einzugrenzen (Feinkartierung) und anschließend mittels positioneller Klonierung das krankheitsverursachende Gen zu identifizieren.

Durchführung der Feinkartierung

Zur Herstellung der Mutterplatten wurden je 50µl DNA der generierten F2 Mäuse in 96-Loch PCR Platten pipettiert. Die Genotypisierung der DNA mit den etablierten Markern erfolgte in 96-Loch Kopieplatten mittels einer single-nested PCR Methode, in der die PCR Produkte fluoreszenzmarkiert werden (nach Schuelke, 2000). Diese fluoreszenzmarkierten PCR Produkte werden anschließend in einem ABI 3100 PRISM Genetic Analyzer elektrophoretisch aufgetrennt und die Größe der PCR Produkte mittels Laser Detektion bestimmt.

Die PCR erfolgte in den 96-Loch Kopieplatten (enthalten je well 1µl DNA der generierten F2 Mäuse und der Parental bzw. Kontrollstämme) in einem 15µl Reaktionsansatz: 2µl 10x PCR-Puffer (MBI Fermentas/15mM MgCl₂), 0,4µl dNTP Mix

(10mM), 0,4 µl forward Primer (2pmol/µl), 0,4 µl reverse Primer (8pmol/µl), HEX-M13(-21) Primer (8pmol/µl), 1 µl DNA Template (50ng), 1µl *Taq* Polymerase (MBI Fermentas 5 U/µl), 10µl dd H₂O (steril). Die PCR Amplifikation erfolgte nach folgendem Programm: 94°C (5 min), danach 30 Zyklen bei 94°C (30s) / 56°C (45 s) / 72°C (45 s), gefolgt von 8 Zyklen 94°C (30s) / 53°C (45s) / 72°C (45s) und eine finale Extension bei 72°C für 10 min. Anschließend wurden je 1 µl PCR Produkt mit 22µl Formamid und 0,5 µl ROX Standar (Perkin Elmer) versetzt und auf einem ABI 310 PRISM Genetic Analyzer analysiert.

2.2.24 Magnetresonanztomographie (MRT)

Die MRT Analyse wurde auf einem 7 T Bruker Scanner (Pharmascan 70/16 AS, Bruker Biospin, Karlsruhe) mit einem 16 cm horizontalen bore Magnet und einem 9 cm (Innendurchmesser) abgeschirmten Gradient mit einer maximalen Stärke von 300 mT/m durchgeführt (Neuroimaging Zentrum Berlin, Charite).

Während des Experimentes wurde die Maus in das Zentrum einer 38mm RF Röhre auf einem Tierbett mit beheizter Wasserdecke plaziert; die Maus wurde während des gesamten Experiments mit 1,5 % Isofluran, das über eine Gesichtsmaske appliziert wird, anästhesiert. Die Respirationsrate wurde mittels einer Kontrolleinheit (Monitoring Unit Model 1025, SA Instruments, Inc.) am Bildschirm überwacht. Für die Bildgebung des Mausgehirnes wurde eine T1-gewichtete 2D turbo spin-echo Sequenz benutzt (TR 1338.5 ms, TE_{eff} 13.2 ms, 16 averages, Gesamtscanzeit 45 min). Coronal und Axial Schnitte mit einer Schnittdicke von 0.4 mm wurden positioniert, um den ganzen Bereich des Gehirns inklusive Cerebellum abzudecken. Das Betrachtungsfeld (FOV) war 2.84 x 2.84 cm und die Matrix 256 x 256, dies resultiert in einer Auflösung von 111 µm.