

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Alle Chemikalien, Enzyme, Oligonukleotide oder Antikörper stammten, sofern nicht speziell vermerkt, von folgenden Unternehmen: Amersham-Pharmacia (Freiburg), Biotex (Berlin), Biozym (Hess. Oldendorf), Dianova (Hamburg), Gibco/BRL (Karlsruhe), Heraeus-Kulzer (Wehrheim), Invitex (Berlin), MBI-Fermentas (St.Leon-Rot), Merck (Darmstadt), MWG-Biotech (Ebersberg), New England Biolabs (Frankfurt), Pan-Biotech (Aidenbach), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Shandon (Frankfurt) und Sigma (Deisenhofen).

2.1.2 Bakterienstämme

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

2.1.3 Vektoren

pBluescript-SK II (+/-)	(Sorge, 1988)
pGEM-T bzw. pGEM-T Easy	Promega, Mannheim
pCR2.1-TOPO, pCR-II-TOPO	Invitrogen
pUC18-Kontroll-Vektor, pZERO TM -2	Invitrogen
pET14b	Novagen

2.1.4 Genomische Bibliotheken

PAC-Klone, deren Inserts genomische DNA der Maus enthielten, wurden vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD) bezogen. Die in dieser Arbeit verwendeten

Klone gehörten zur RPCI-21-Bibliothek (DNA-Quelle: *Mus musculus*, Stamm: 129/SvevTACfBr, Wirt: *E.coli* DH10B; Vektor: pPAC4; Anzahl Klone: 258048).

2.1.5 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden entweder von MWG-Biotech (Ebersberg) oder von BIOTEZ (Berlin) bezogen. Alle Primer sind in der 5'-3'-Richtung angegeben.

2.1.5.1 Primer für die Genotypisierungen

Olig3-WT_1	CCTCCAGGGAGCTGGTGAGCATG
Olig3-WT_2	ATTCCTGCCTAAAGGCTCCTCAAC
Olig3-GFP	GTGCAGATGAACTTCAGGGTCAGCT
Wnt1 Cre	TAAGAGGCCTATAAGAGGCGG
Brn4 Cre	AGCCCGGACCGACGATGAA
LacZa	TCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATG
LacZb	ATATCCTGATCTCCAGATAACTGCCG

2.1.5.2 Sequenzierprimer

M13FW IRD-markiert	TGTAAAACGACGGCCAGT
M13RV IRD-markiert	CAGGAAACAGCTATGACC

2.1.5.3 Primer zur Herstellung des konditionalen *c-Maf*-Allels

grc_cmaf_DTA	TTCCTTACAGAGTCAGAGGAATGAATGTACCCTAAATGACCCTAT GGAACCCGCCACCAACGCGGTGCGCCGTTTA
grc_cmaf_pBS	CTGAAAAGCGCTTTCAGACACGAGAGACTTCAGAAGATAAATACT AAACAGAACTAAACGCGCGGCCGCTATCDATAACCGTCGACCTC
PAC_BsiW-Linker-Fw	P-CTAGATTAATTAACGTACG
PAC_BsiW-Linker-Rv	P-CTAGCGTACGTTAATTAAT
grc_cmaf_pBS_PAC1	CTGAAAAGCGCTTTCAGACACGAGAGACTTCAGAAGATAAATACT AAACAGAACTAAACGCTTAATTAATATCGATACCGTCGACCTC
grc_cmaf_sense	TTCCTTACAGAGTCAGAGGAATGAATGTACCCTAAATGACCCTAT GGAACCCGCCACCAACCTACAGATGCTTCGGCTCT
grc_cmaf_antisense	CTGAAAAGCGCTTTCAGACACGAGAGACTTCAGAAGATAAATACT AAACAGAACTAAACGCTTAATTAATTCGCCCTATAGTGAGTCGT

cMAF_5_upper	GTGCAGGCGCACTGCTCACTGATCCCCGCGCGCATTCTGGGTCCC CGCACCCCTTGGCGCCGCCAATTTCTCCATCGGTTCC
cMAF_5_lower	CCAGGGGCCCCAACTTGACTGAACTCTTTGTCCCTCTCTGCAAGTG AGGTGATCAGATGGGGCAGTGGGTCACTCGGGTCTGA
frt-Neo-frt-loxP-3'upper	TTTTACACCCGCTGCCCCACACATACCCTGGACTTGCACAAGGGT CAAAGATCTGAGCAG
frt-Neo-frt-loxP-3'lower unique4	CATACTTCATGTAGGGCATAGCTCACCTTTGAACCGGGCCATCAA TTGCCTGTATATATA
5'grc_cmaf_neocloning_upper	GACGAATTCAGTGGCCCTGAACAGACACAC
3'grc_cmaf_neocloning_upper	ACTCTGCAGCTGCTCAGATCTTTGACCCTTGT
5'grc_cmaf_neocloning_lower	AGCGCGGCCGCCATACTTCATGTAGGGCATAGCTCA
3'grc_cmaf_neocloning_lower	TCGACTAGTTCAAGAACATGGTGCAGGGGTG

2.1.5.4 Primer zur Herstellung der *c-Maf*-Reporter-Allele

gap_Pst_NcoI	AGCCTGCAGCCACCATGGTGTGCTGTATGA
gap_BamHI	CGACGGGATCCCGGGGAATTCGAATCATGCCAATCTTTTGGTCTTCATC ATTT
cMaf_3_lacZ-up	ATTGCGGCCGCGGTGAGTGTGACACGCGATCC
cMaf_3_lacZ-lw	ATCCCGCGGTGGCCGAGCGAGCTT
cMaf_5_lacZ-up	ACTGGTACCACCGCCGCGCAAGC
cMaf_5_lacZ-lw	ACTCCATGGTGGCGCCTCCGCCGCCACCG

2.1.6 Antikörper

Die nachfolgend angegebenen Antikörper wurden von der ausgewiesenen Quelle bezogen und in der Immunhistologie verwendet.

Primäre Antikörper

Antikörper (Spezies)	Herkunft	Verdünnung
Anti-Digoxigenin-Antikörper (Kaninchen)	Roche	1:2000
BrdU (Ratte)	Oxford Biotechnology	1:400
Brn3a (Maus)	Chemicon	1:200
c-Maf (Kaninchen)	Labor Prof. C. Birchmeier	1:20000
Cre Recombinase (Kaninchen)	Novagen	1:5000

Cre Recombinase (Maus)	Covance	1:500
Foxd3 (Kaninchen)	Dietmar Zechner	1:4000
GFP (Ziege)	Abcam	1:5000
Lbx1 (Kaninchen und Meerschweinchen)	Labor Prof. C. Birchmeier	1:10000
Lhx1/5 (Maus)	Developmental Studies Hybridoma Bank	1:10
Lhx2/9 (Kaninchen)	Tom Jessell	1:3000
Mash1 (Maus)		1:5000
Math1 (Kaninchen)	Tom Jessell	1:5000
Ngn1 (Kaninchen)	Jane Johnson	1:5000
Olig3 (Meerschweinchen)	Labor Prof. C. Birchmeier	1:20000
Pax2 (Kaninchen)	Zymed	1:1000
Phox2b (Kaninchen)	Christo Goridis und Jean-Francois Brunet	1:1000
Ptf1a (Kaninchen)	Helena Edlund	1:1000
Tlx3 (Meerschweinchen)	Labor Prof. C. Birchmeier	1:10000

Alle sekundären Antikörper wurden von Dianova (Hamburg) bezogen und 1:200 verdünnt eingesetzt: Anti-MausIgG, Anti-KaninchenIgG, Anti-ZiegeIgG, Anti-RatteIgG, Anti-MeerschweinchenIgG jeweils gekoppelt an Cy2, Cy3 oder Cy5.

2.1.7 Zelllinie

In der Zellkultur wurde die embryonale Stammzelllinie E14.1 eingesetzt, die aus einer männlichen 129/Ola Maus-Blastozyste stammt (Kühn *et al.*, 1991).

2.1.8 Mausstämme und transgene Mauslinien

- Zucht-Mäuse: Die verwendeten C57Bl/6J-Inzucht und CD1-Zucht Mäuse stammten aus eigener Zucht oder von Charles River (Sulzfeld).

- $Olig3^{GFP-LacZ}$ -Mäuse wurden in der Arbeitsgruppe von Mathias Treier, Heidelberg, hergestellt. Durch homologe Rekombination wurde in ES-Zellen eine essentielle Domäne der kodierenden Sequenz des *Olig3*-Gens durch eine *EGFP-nlsLacZ*-Gen-Kassette ersetzt

(Müller *et al.*, 2005). In dieser Arbeit wurde für diese Mauslinie die Bezeichnung *Olig3^{GFP}* verwendet.

- Wnt1^{Cre}-Mäuse (Danielian *et al.*, 1998)
- Tau^{LacZ}-Reportermäuse (Hippenmeyer *et al.*, 2005)

2.1.9 Nährmedien

Medien und Platten für die Kultivierung der *E.coli*-Bakterienstämme oder der PAC-Klone wurden gemäß Standard-Protokollen eingesetzt (Sambrook und Russell, 2001). In Agar und Medien betragen die Konzentration von Ampicillin 50 µg/ml, die von Carbenicillin 100µg/ml und die von Kanamycin 50µg/ml.

2.1.10 Zellkulturmedien

Fibroblasten-Medium

- 500 ml Dulbecco's MEM mit Glutamax-I, 4500 mg/l Glucose, mit Pyridoxin, Natriumpyruvat (Gibco/BRL)
- 60 ml FCS (zuvor 30 min bei 55 °C inaktiviert, Sigma)
- 5,7 ml 100x nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco/BRL)
- 5,7 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 µg/ml Penicillin, 10000µg/ml Streptomycin; Gibco/BRL)
- 1,2 ml 50 mM β-Mercaptoethanol (Gibco/BRL)

ES-Zell-Medium

- 500 ml DMEM/Glutamax (siehe oben, Gibco/BRL)
- 90 ml FCS (zuvor 30 min bei 55 °C inaktiviert, Sigma)
- 6 ml nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco/BRL)
- 6 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung (Gibco/BRL)
- 1,2 ml β-Mercaptoethanol (Gibco/BRL)
- 60 µl LIF („Leukemia Inhibitory Factor“)

2.1.11 Verwendete Software

Sequenzanalysen des *c-Maf*-Gens wurden mithilfe von Daten des Maus-Sequenzierungsprojekts durchgeführt (www.ensembl.org). Zum Vergleich verschiedener DNA- oder Proteinsequenzen wurde Multalin verwendet (Corpet, 1988). Homologe Sequenzen wurden mithilfe des Blast Algorithmus am NCBI durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Für die Suche nach homologen Bereichen in zwei verschiedenen DNA- oder Proteinsequenzen wurde das Programm Dotter genutzt (Sonnhammer und Durbin, 1995). Die Vorhersage von Proteindomänen wurde mithilfe von SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) durchgeführt.

2.1.12 Konfokale Mikroskopie

Für die Analyse der Immunhistochemie wurde ein spektrales konfokales Mikroskop (Typ: LSM 5 Pascal, Zeiss) verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation von DNA und RNA

2.2.1.1 Aufzucht von PAC-Klonen und Präparation der PAC-DNA

Ein Kolben gefüllt mit 20 ml LB-Medium wurde mit einem PAC-Klon angeimpft und über Nacht bei 37 °C kräftig geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden 150 µl IPTG-Lösung und 30 ml LB-Medium zugegeben und erneut für 2 h bei 37°C geschüttelt. Wenn nötig, wurden danach 300 µl der Zellsuspension abgenommen, in Röhrchen mit 600 µl Dauerkultur-Lösung gegeben und bei minus 80 °C eingefroren, um den Klon für spätere Arbeiten aufzuheben. Anschließend wurden die Zellen bei 3000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde abgegossen und sterilisiert. Das Pellet wurde mit 4 ml Resuspensions-Puffer (6,06 g TRIS; 3,72 g EDTA-Na-Salz; 100 mg RNase in 1 l H₂O; pH 7,5 mit HCl) versetzt und unter heftigem Schütteln resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 4 ml Lysispuffer (8 g NaOH; 100 ml 10 % SDS-Lösung (v/v) in 1 l) versetzt und bis zur Homogenität geschwenkt, dann mit 4 ml

Neutralisations-Puffer (294,5 g Kaliumacetat in 1 l H₂O; pH 5,5 mit konzentrierter Essigsäure) versetzt und erneut geschwenkt. Das flockige Gemisch wurde für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Lösung bei 20000 x g für 30 min zentrifugiert. Der PAC-DNA enthaltende Überstand wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol versetzt und bei 15000 x g zentrifugiert. Das DNA- Pellet wurde in 100 µl RNase-Lösung (10µg/ml) gelöst und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der folgenden Ethanolfällung wurde das DNA-Pellet über Nacht in 100 µl TE (Tris-EDTA-Puffer 10x: 100 mM Tris/HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA) gelöst und in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß gefüllt.

2.2.1.2 Präparation von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten

Die Mini-Präparationen von Plasmid-DNA erfolgten durch alkalische Lyse (Birnboim und Doly, 1979). In größerem Maßstab wurde die Isolierung mit dem Plasmid-Maxi-Präparations-Kit der Firma Qiagen durchgeführt (Qiagen, Hilden). Die präparative Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Elektroelution (nach McDonnell *et al.*, 1977) bzw. mithilfe des "QIAEX II / QUIAQUICK Gel Extraction Kit" (Qiagen, Hilden; Vogelstein und Gillespie, 1979).

2.2.1.3 Isolierung genomischer DNA aus ES-Zellen

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

Hälfte dieses Ansatzes wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und das Gel zur Southern-Blot-Hybridisierung eingesetzt.

2.2.1.4 Isolierung genomischer DNA aus embryonalem Gewebe, Ohröchern bzw. Schwanzstücken

Dottersäcke oder andere embryonale Gewebe bis zum Tag 14,5 der Embryogenese (E14,5) wurden in Lysis-Puffer I (10 mM Tris, pH 8,9; 50 mM KCl; 3 mM MgCl₂; 0,01 % Gelatine; 0,45 % Nonidet P40; 0,45 % Tween 20; 100 µg/ml Proteinase K) aufgenommen. Ohrlöcher und Schwanzstücke wurden in Lysis-Puffer II (100 mM Tris, pH 8,5; 200 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,2 % SDS; 100 µg/ml Proteinase K) über Nacht bei 55 °C inkubiert. Darauf folgte die Inaktivierung der Proteinase K für 10 min bei 95 °C. Nach Zugabe von 500 µl Aqua bidest. wurde je 1 µl der verdünnten Lösung für die Genotypisierung in einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) eingesetzt. Die DNA aus Schwanzstücken wurde für die genomische Southern-Blot-Hybridisierung präpariert und durch Phenol/Chloroform extrahiert. Nach Fällung und Waschen der DNA wurde das Präzipitat in 100 µl Aqua bidest. mit 50 µg/ml RNase A aufgenommen.

2.2.1.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus embryonalem Gewebe

Vollständige Embryonen oder Gewebe wurden in DEPC behandeltem PBS präpariert, in Trizol gegeben und bis zur Weiterverarbeitung bei minus 80 °C verwahrt. Gewebe eines Genotyps wurde vereinigt und in 1 ml Trizol pro 50 bis 100 mg Gewebe homogenisiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 12000 x g und 2 bis 8 °C sedimentiert. Zum Überstand wurden 0,2 ml Chloroform/1 ml Trizol gegeben und durch Schütteln vermischt. Erneute Zentrifugation bei 12000 x g und 2 bis 8 °C für 15 min führte zur Phasentrennung. Die wässrige Phase wurde abgenommen und die gelöste RNA durch 0,5 ml Isopropanol/1 ml Trizol gefällt. Das Sediment wurde zweimal mit 75 % Ethanol gewaschen und in Rnase-freiem Aqua bidest. gelöst. In einigen Fällen wurde die RNA mithilfe des “Rneasy cleanup” Kits (Quiagen) weiter aufgereinigt.

2.2.2 Reinigung von Nukleinsäuren

2.2.2.1 Gelfiltration

Zur Beseitigung von niedermolekularen Stoffen (Salze, Phenol, Ethanol, freie Nukleotide usw.) wurde die Gelfiltration eingesetzt. Hierzu wurde eine 1 ml Spritze mit einer 0,45 µm Fritte verschlossen und mit einer Sephadex G50 Suspension (in TE-Puffer) gefüllt. Die Spritze wurde dann in ein Röhrchen (Falcon 2059) gegeben und 10 min bei 1000 x g zentrifugiert. Der abzentrifugierte Puffer wurde abgossen und an das untere Ende der Spritze in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt, um im folgenden Elutionsschritt die DNA aufzufangen. Auf die Säule wurde bis zu 100 µl zu reinigende DNA-Lösung aufgetragen, die Säule wieder in das Zentrifugenröhrchen gesteckt und 10 min bei 1000 x g zentrifugiert. In dem 0,5 ml Reaktionsgefäß befand sich die gereinigte DNA in TE-Puffer.

2.2.2.2 Ethanol- und Isopropanolfällung von DNA

Die zu fällende Lösung wurde mit 1/5 Volumen 3 M Natriumacetat und 2 Volumen Ethanol versetzt, gemischt und für 15 min bei minus 80 °C inkubiert. Die Zentrifugation bei 15000 x g und 4 °C schloss sich an. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das DNA-Pellet getrocknet. Die DNA wurde in einem passenden Volumen TE oder Aqua bidest. aufgenommen. Bei besonders großen Volumina eignet sich eher die Isopropanolfällung, bei der das Ethanol durch 0,7 Volumen Isopropanol ersetzt wird. Nach guter Durchmischung der Probe wurde sie bei 15000 x g für 15 bis 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann verworfen und das DNA Pellet mit kaltem 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und die DNA in einem geeigneten Volumen TE oder Aqua bidest. aufgenommen.

2.2.2.3 Mikrodialyse

Zur Entsalzung verschiedener Reaktionsansätze wurde die Dialyse durchgeführt. Dazu wurde eine spezielle Membran mit 25 mm Durchmesser und 0,025 µm Porengröße verwendet. In einem Gefäß, gefüllt mit Aqua bidest., wurde die Membran auf die Flüssigkeitsoberfläche gelegt, wobei sie aufgrund der Oberflächenspannung schwamm. Anschließend wurde die

Probe auf die Membran pipettiert. Die Dialyse wurde für 1 bis 2 Stunden durchgeführt. Danach wurden die Proben von der Membran herunter pipettiert und in weiteren Reaktionen eingesetzt. Besonders geeignet ist diese Methode für die Entsalzung von Ligationsansätzen vor der Elektroporation.

2.2.3 Isolierung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Zur Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden die Banden auf dem Transilluminator aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit dem Qiaquick-Gel-Extraktions-Kits (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben isoliert.

2.2.4 Gelelektrophorese

2.2.4.1 Agarosegele

Die Agarosegelelektrophorese wurde eingesetzt, um DNA-Fragmente aufzutrennen. Die Gele enthielten 0,7 % bis 2 % Agarose in TAE Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer 10x: 48 g Tris; 11 ml Eisessig; 20 ml 0,5 M EDTA; pH 7,5), der auch als Laufpuffer verwendet wurde. Die Elektrophorese wurde je nach Länge des Gels bei 80 - 180 V durchgeführt.

2.2.4.2 Sequenziergele

Zur Auftrennung von Sequenzierreaktionen wurde ein 4 % denaturierendes Acrylamidgel mit einer Dicke von 0,25 mm verwendet. Als Laufpuffer wurde 1x TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer 10x: 108 g Tris; 55 g Borsäure; 40 ml 0,5 M EDTA; pH 9) verwendet. Das Gel wurde während der Elektrophorese konstant auf 50 °C temperiert, die Proben (1 µl der Sequenzierreaktion) wurden 10 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt (1500 V, 50 W, 50 °C). Gleichzeitig wurde die Absorption der markierten Proben bei 700 nm und 800 nm aufgezeichnet.

2.2.4.3 SDS-Polyacrylamidgele

Zur Auftrennung von Proteinen wurde ein SDS-Polyacrylamidgel bestehend aus einem 12 % Trenn- und einem Sammelgel hergestellt (12 % Trenngel für 15 ml: 5 ml Aqua bidest.; 6 ml 30 % Acrylamid-Mix; 1,5 M Tris, pH 8,8; 10 % SDS; 10 % APS; TEMED ; Sammelgel für

5 ml: 3,4 ml Aqua bidest.; 0,83 ml 30 % Acrylamid-Mix; 1 M Tris, pH 6,8; 10 % SDS; 10 % APS; TEMED). Das Gel wurde bei ca. 30 mA elektrophoretisch in Laufpuffer (10x: 60,6 g Tris; 288 g Glycin; 0,1 % SDS (w/v) in 2 l Aqua bidest.; pH 8,3) aufgetrennt. Nach dem Färbeprozess in Coomassie-Blau (2,5 g Coomassie Blau R-250; 100 ml 100 % Essigsäure; 500 ml 100 % Methanol in 1 l Aqua bidest.) wurde das Gel entfärbt (Entfärbelösung: 40 % Methanol (v/v); 10 % Essigsäure (v/v) in Aqua bidest.) und danach für 5 min bei RT in Celophan (25 % Ethanol; 4 % Glycerol) geschwenkt. Zum Trocknen wurde es zwischen zwei GT2F-Folien (Bioplex) aufgespannt.

2.2.5 Nachweis elektrophoretisch aufgetrennter Nukleinsäuren

Um DNA in Gelen sichtbar zu machen, wurde sie mithilfe von Ethidiumbromid (1 mg/ml Aqua bidest.) markiert. Die Gele wurden auf dem Transilluminator bei 312 nm analysiert, die Ergebnisse mit einer CCD-Kamera aufgenommen und mit dem Video Graphic Printer ausgedruckt.

2.2.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um Konzentrationen von DNA-Lösungen zu bestimmen, wurden Verdünnungen der zu messenden Lösung in TE-Puffer hergestellt und deren Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen TE vermessen. Die DNA-Menge ergibt sich nach: $1 \text{ OD} = 50 \mu\text{g/ml}$. Der Quotient $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ wurde als Maß für die Reinheit herangezogen. In gleicher Weise verfährt man bei der Messung von RNA, wobei sich die Menge aus $1 \text{ OD} = 40 \mu\text{g/ml}$ ergibt. Der Reinheitswert sollte bei $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} > 1,7$ liegen.

2.2.7 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.2.7.1 Herstellung von kompetenten DH10B Zellen und XL1-Blue MRF

LB-Medium (5 ml) wurde mit einer Einzelkolonie des *E.coli*-Stammes DH10B bei 37 °C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1 ml der Vorkultur in 1 l SOB-Medium (20 g Bacto-Trypton; 5 g Bacto-Hefe; 0,584 g NaCl; 0,186 g KCl in 1 l Aqua bidest.) überführt und solange bei 37 °C inkubiert bis eine OD_{600} von 0,6 erreicht war. Die

Bakteriensuspension wurde in Zentrifugenbecher überführt und bei 1500 x g für 10 min in einer Kühlzentrifuge (4 °C) zentrifugiert. Das Pellet wurde in ca. 150 bis 200 ml 10 % Glycerin resuspendiert und bei 4 °C 10 min zentrifugiert (4000 x g). Dieser Waschschrift wurde ein zweites Mal durchgeführt. Der Überstand wurde dekantiert, wobei ca. 30 bis 50 ml in jedem Becher zurückbehalten wurden. Die Zentrifugation bei 5000 x g und 4 °C für 10 min folgte. Anschließend wurde der Überstand entfernt. Die Pellets wurden in ca. 15 ml 10 % Glycerin resuspendiert, vereinigt und in einem kleineren Gefäß bei 8000 x g zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 400 bis 600 µl 50 % Glycerin aufgenommen, in Reaktionsgefäße aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff gefroren (Lagerung bei minus 80 °C).

2.2.7.2 Herstellung von Plasmid-Konstrukten

Um Vektor und Fragment zu verbinden, müssen beide kompatible Enden besitzen. Um dies zu erreichen, wurde der Vektor so in der multiplen Schnittstelle („multiple cloning site“) geschnitten, dass er die gleichen überhängenden Enden erhielt, wie das zu klonierende DNA-Fragment. Dazu wurde für die Linearisierung des DNA-Fragments und des Vektors das gleiche Restriktionsenzym verwendet. Um zu verhindern, dass der Vektor mit sich selbst legiert, wurde dem Restriktionsansatz 1 µl alkalische Phosphatase („shrimp alkaline phosphatase“, SAP) zugesetzt. Anschließend wurde das Restriktionsenzym entsprechend der Herstellerangaben hitzeinaktiviert. War das aufgrund der Eigenschaften des Enzyms nicht möglich, wurde der Ansatz mit Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol (PCI) ausgeschüttelt. Um die Ansätze zu entsalzen, wurden sie anschließend mikrodialysiert, mit TE verdünnt und bei minus 20 °C gelagert.

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

2.2.7.3 Einsatz von Restriktionsendonukleasen

Die zu spaltende DNA wurde mit dem vom Hersteller gelieferten Puffer und mit Wasser versetzt. Wenn empfohlen, wurde außerdem BSA zugegeben. Zum Reaktionsansatz wurden etwa 2 U des Restriktionsenzym je µg zu spaltender DNA gegeben, mindestens jedoch 1 µl

und höchstens ein Zehntel des Gesamtvolumens des Restriktionsansatzes. Der Ansatz wurde durchmischt und bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur (in der Regel 37 °C) für 30 min bis zwei Stunden inkubiert. Die Spaltung von Plasmid- und genomischer DNA wurde gemäß Standardmethoden durchgeführt (Berger und Kimmel, 1987; Sambrook und Russell, 2001).

2.2.7.4 Ligation

In einen Ligationsansatz, der im Allgemeinen aus 10 µl bestand, wurden die zu verknüpfenden DNA Fragmente mit 1/10 Volumen Ligationspuffer (10x konzentriert, mit ATP; 1 µl (5 U) T4-DNA-Ligase und einer entsprechenden Menge Aqua bidest.) gemischt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 10 °C. In vielen Fällen wurde bei der Ligation von DNA-Fragmenten 50 ng Vektor-DNA eingesetzt.

2.2.7.5 Transformation

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

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

2.2.7.6 Homologe Rekombination in Bakterien

Homologe Rekombination in Bakterien ermöglicht die Sequenz-spezifische Integration oder Exzision von DNA-Fragmenten in bzw. aus Plasmiden (Yu *et al.*, 2000). Um eine hohe Rekombinationsfrequenz zu erzielen, müssen die homologen Sequenzen am 5'- und 3'-Ende eines Fragments mindestens 40 bp umfassen. In dieser Arbeit wurden homologe Sequenzen

mit einer Länge von 60 bp bis 300 bp verwendet. Zuerst wurde der zu manipulierende Vektor in DY380-Bakterien transformiert. Dieser Bakterien-Stamm trägt einen Prophagen, der die für die Rekombination notwendigen Gene *exo*, *bet* und *gam* unter der Kontrolle eines temperatursensitiven Repressors enthält. Zur Manipulation des Vektors wurden DNA-Fragmente genutzt, die entweder mittels PCR amplifiziert oder aus einem zuvor hergestellten Plasmid isoliert wurden. Die Fragmente enthielten zusätzlich eine Antibiotikaresistenz-Kassette, welche die Selektion von rekombinierten Klonen erlaubte. Um das Fragment in den Vektor zu rekombinieren, wurde der den Vektor enthaltende DY380-Bakterienklon in Kultur genommen und bis zu einer OD₅₅₀ von 0,6 - 0,8 kultiviert. Danach wurden die Bakterien durch einen Temperaturwechsel auf 42 °C für 15 min für die Rekombination kompetent gemacht. Anschließend wurden die Zellen auf Eis gekühlt und wie in Abschnitt 2.2.7.1 beschrieben für die Elektrotransformation vorbereitet. Das zu rekombinierende DNA-Fragment wurde mithilfe der Elektrotransformation (Abschnitt 2.2.7.5) in die Bakterien transferiert und auf Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die korrekte Rekombination in den Klonen wurde mittels Restriktionsverdau geprüft. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die homologe Rekombination in Bakterien zur Generierung des *c-Maf*-Reporter-Allels und des konditionalen *c-Maf*-Allels eingesetzt.

2.2.8 Sequenzierung

Die Sequenzanalyse wurde nach dem Kettenabbruchverfahren (Sanger *et al.*, 1977; modifiziert von Tabor und Richardson, 1987) mithilfe des „Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit“ (Amersham) nach den Herstellerangaben durchgeführt. Neben Fluoreszenz-markierten Sequenz-spezifischen Primern kamen Standard-Sequenzier-Oligonukleotide (MWG-Biotech) bei der PCR zum Einsatz. Es wurden 150 ng/kb Plasmid-DNA und je 4 pmol jedes Primers eingesetzt. Die Reaktion wurde in einer PCR-Maschine bei folgenden Parametern inkubiert: 3 min Denaturierung bei 95 °C; gefolgt von 25 Zyklen: 95 °C für 35 s, Anlagerung der Primer (Annealing) bei 53 °C für 35 s, Verlängerungsphase (Elongation) bei 70 °C für 1 min; gefolgt von 95 °C für 3 min. Die PCR-Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µl Seq-Stop-Puffer beendet. Anschließend wurde 1 µl des Ansatzes auf ein 6 % Sequagel XR-Sequenziergel (Biozym) aufgetragen. Die Gelelektrophorese sowie die Messung der Absorption der markierten DNA-Fragmente

erfolgten mithilfe des Sequenzierautomaten „Model 4000L bzw. 4200, MWG-Biotech) bei 1500 V, 37 mA, 50 W, 50 °C. Die automatische Auswertung des Bildes, das Lesen der einzelnen Gelbanden, sowie die Korrektur von Fehlern der automatischen Sequenzanalyse erfolgte mithilfe des Programms Base ImagIR (Licor).

2.2.9 Polymerase-Ketten-Reaktion

2.2.9.1 Genotypisierung

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1985) wurde zur Genotypisierung von präparierten Maus-Embryonen bzw. Jungtieren aus der Nachzucht und zur Klonierung verschiedener Plasmid-Konstrukte eingesetzt. Die Etablierung der verwendeten PCR-Programme erfolgte dabei in Anlehnung an standardisierte PCR-Methoden (Innis *et al.*, 1989). Alle Komponenten wurden auf Eis pipettiert und die DNA-Polymerase unmittelbar vor dem Start des PCR-Programms zum Ansatz gegeben. Ein typischer Reaktionsansatz hatte ein Volumen von 20 µl und enthielt bis zu 100 ng DNA; 2 µl Enzym-spezifischen Reaktionspuffer; 200 µM dNTPs; 10 pmol je Primer; 1,5 mM MgCl₂ (wenn nicht schon im Reaktionspuffer enthalten) und 0,5 U DNA-Polymerase (z. B. Taq-DNA-Polymerase oder Hot Start Taq). Je nach Fragestellung konnten diese Komponenten jedoch auch variieren.

Die PCR wurde mit den bei den einzelnen Experimenten angegebenen *Annealing*-Temperaturen und, so nicht anders angegeben, mit folgenden Parametern durchgeführt: 4 min Denaturierung bei 95 °C; gefolgt von 30 bis 40 Zyklen: 95 °C für 30 s, Annealing für 20 s und Elongation bei 68 °C bis 72 °C für 40 s bis 10 min; gefolgt von einer Elongation für 7 min bei 72 °C. In einigen Fällen wurde 5 % DMSO eingesetzt.

Die einzelnen verwendeten Programme für die Genotypisierungen sind im Folgenden aufgelistet:

1. **Olig3-WT-Programm** mit 40 Zyklen: 95 °C für 15 min; 95 °C für 45 s, 58 °C für 35 s, 72 °C für 45 s
2. **Olig3-GFP-Programm** mit 38 Zyklen: 95 °C für 15 min; 95 °C für 45 s, 58 °C für 35 s, 72 °C für 45 s

3. **Cre-Programm** mit 40 Zyklen: 95 °C für 4 min; 95 °C für 30 s, 55 °C für 30 s, 72 °C für 1 min

4. **LacZ-Programm** mit 38 Zyklen (Verwendung von DMSO): 95 °C für 4 min; 95 °C für 30 s, 55 °C für 30 s, 72 °C für 1 min

2.2.9.2 RT-PCR

Zur Generierung und Klonierung von cDNA-Fragmenten wurde die RT-PCR angewandt. Dabei wird aufgereinigte mRNA mittels des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Als Primer für die reverse Transkriptase dienten entweder Gen-spezifische Sequenzen oder Oligo-dT-Sequenzen, um die gesamte polyadenylierte RNA zu amplifizieren. Aus der cDNA wurden durch PCR die gewünschten DNA-Sequenzen amplifiziert.

2.2.10 Southern-Blots von Agarosegelen

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

2.2.11 Markierung von Sonden

Die für die radioaktive Markierung verwendeten DNA-Sonden wurden auf unterschiedliche Weise gewonnen. Zum einen wurden sie aus Plasmiden isoliert, indem das Insert mit

Restriktionsenzymen ausgeschnitten und gelelektrophoretisch aufgetrennt wurde. Das gewünschte Fragment wurde dann aus dem Gel isoliert. Zum anderen wurden Sonden durch PCR generiert und nach der Gelelektrophorese aus dem Gel isoliert.

2.2.11.1 Radioaktive Markierung von Sonden

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

2.2.11.2 *In vitro*-Transkription und Digoxigenin-Markierung

Zur Synthese von Digoxigenin-markierten (Dig) *in vitro*-Transkripten wurde die Plasmid-Matrize mittels Restriktionshydrolyse linearisiert, um das Transkript zu begrenzen. Danach wurde das Produkt mit Phenol/Chloroform extrahiert, gefällt, gewaschen, getrocknet und in Aqua bidest. aufgenommen. Die Synthese fand in folgendem Ansatz für 1 h bei 37 °C statt: 1 μ l linearisierte Plasmid-DNA (1 μ g/ μ l); 2 μ l 10x Transkriptionspuffer (Roche); 2 μ l Dig-Labeling-Mix (Sigma); 0,5 μ l RNase-Inhibitor (5 U/ μ l, Amersham-Pharmacia); 13 μ l DEPC-H₂O; 5 μ l RNA-Polymerase (20 U/ μ l, Roche). Das Transkript wurde entweder durch eine Lithiumchlorid-Fällung oder durch Verwendung des RNAeasy Cleanup Kits (Quiagen) aufgereinigt und in 100 μ l 50 % Formamid/50 % Aqua bidest. aufgenommen.

2.2.12 *In situ*-Hybridisierungstechniken

2.2.12.1 *In situ*-Hybridisierung auf Gefriergewebeschnitten

Die Gefrierschnitte wurden für 10 min mit 4 % PFA fixiert, dreimal mit PBS (1,47 mM KH₂PO₄; 8,1 mM Na₂HPO₄; 137 mM NaCl; 2,68 mM KCl; 0,9 mM CaCl₂; 0,5 mM MgCl₂; pH 7,2) gewaschen und dann für 10 min in Triethanolamin-Lösung (4 ml Triethanolamin; 500 μ l konz. HCl; 750 μ l Essigsäureanhydrid in 250 ml H₂O) acetyliert. Nach kurzem Waschen in PBS folgte die Prähybridisierung. In der Zwischenzeit wurden die Deckgläser silanisiert. Dazu wurden sie in „Sigmacote“ (Antihafsilan, Sigma) getaucht und nach dem

Trocknen in 100 % Ethanol gespült. Nach dem Trocknen bei RT konnten die Deckgläser verwendet werden. Vor Beginn der Hybridisierung wurde die markierte Sonde für 5 min bei 80 °C denaturiert, auf Eis gekühlt und etwa 100 bis 200 ng/150µl davon in Hybridisierungspuffer verdünnt (50 % entionisiertes Formamid; 5x Denhardts; 5x SSC; 150 µg/ml denaturierte Lachsspermien-DNA; 150 µg/ml Hefe-tRNA). Die Hybridisierung fand über Nacht bei 70 °C in einer feuchten Kammer mit Puffer aus 50% Formamid und 5x SSC statt. Die Deckgläser wurden durch Waschen für 5 min in 5x SSC, bei RT abgeschwemmt und die Präparate in 0,2x SSC bei 70 °C für 60 min gewaschen. Daran schloss sich ein Waschschrift in 0,2x SSC bei RT an. Danach wurden die Objektträger in B1-Puffer überführt (0,1 M Tris, pH 7,5; 0,15 M NaCl) und 5 min inkubiert. Es folgte die Blockierung mit 10 % Ziegen Serum in B1-Puffer für 60 min. Die Inkubation mit dem Anti-Dig-Antikörper (in 10 % Ziegen Serum/B1-Puffer) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am Folgetag wurden die Objektträger drei- bis viermal für je 10 min in B1-Puffer gewaschen und in NTMT (0,1 M Tris, pH 9,5; 0,1 M NaCl; 50 mM Mg₂Cl; 0,1 % Tween) inkubiert, bevor sie in die Färbelösung transferiert wurden (1µl NBT; 1µl BCIP in 1 ml NTMT). Um die Färbereaktion zu stoppen wurden die Objektträger mit H₂O gewaschen und für die Analyse mit Immunomount (Shandon, Frankfurt) eingedeckelt.

2.2.12.2 *In situ*-Hybridisierung auf Paraffinschnitten

Zu Beginn der *in situ*-Hybridisierung wurden die Paraffinschnitte durch Waschen (dreimal) in Xylol für je 5 min entwacht, in einer absteigenden Ethanolreihe (zweimal 100 % für 5 min, dann je einmal 95 %, 85 %, 70 %, 50 %, 30 % für je 3 min) rehydriert. Die Objektträger wurden in PBS überführt (5 min bei RT) und 15 min in 4 % PFA fixiert. Nach dem Waschen in PBS (zweimal) erfolgte ein Bleichschritt für 15 min in 6 % H₂O₂ in PBS und das Waschen (dreimal) mit PBS. Um den Zugang in das Gewebe zu verbessern, wurden die Schnitte für 10 min mit Proteinase K (10 µg/ml) inkubiert. Die Proteinase wurde dann durch Inkubation in 0,2 % Glycin (in PBS) für 2 min inaktiviert, die Schnitte zweimal in PBS gewaschen und 15 min in 4 % PFA fixiert. Nach dem Auswaschen des PFA durch PBS, wurden die Schnitte für 2 min in 100 mM Tris (pH 7,5) inkubiert, dann in 0,25 % Essigsäureanhydrid in 0,1 M Tris, pH 7,5 acetyliert und zweimal für 5 min in 2x SSC (pH 7,5) geschwenkt. Eine aufsteigende Ethanolreihe schloss sich an: je 2 min in 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % Ethanol.

70 %, 85 %, 95 % und 100 %. Die Schnitte wurden danach für ca. 30 min getrocknet. Die Hybridisierungslösung (250 µl 20x SSC; 500 µl Formamid; 500 µl Boehringer Block Reagenz; 200 µl 50 % Dextransulfat; 10 µl 0,5 M EDTA; 10 µl 10 % Tween 20; 1 µl 1 M Heparin; 10 µl tRNA, 10µg/ml; 10 µl Lachsspermien-DNA, 10 µg/ml) wurde mit 100-150 ng Dig-markierter Sonde auf die getrockneten Schnitte gegeben und jeweils mit einem silanisierten Deckgläschen bedeckt. Die Objektträger wurden in einer feuchten Kammer bei 60 °C über Nacht hybridisiert. Am Folgetag wurden die Deckgläser bei 60 °C in 5x SSC abgeschwemmt. Die Schnitte wurden zweimal bei 60 °C in 2x SSC, 50 % Formamid gewaschen. Um unspezifischen Hintergrund zu reduzieren, wurde eine RNase-Behandlung durchgeführt. Die Schnitte wurden dazu in TES (0,5 M NaCl; 10 mM Tris, pH 8; 1 mM EDTA) inkubiert und für 15 min in RNase (20 µg/ml in TES) bei 37 °C geschwenkt. Die RNase wurde mit TES ausgewaschen (5 min bei RT). Es folgten zwei Waschungen bei 60 °C für je 15 min in 1x SSC/50 % Formamid, danach einmal in 0,2x SSC/50 % Formamid und anschließend zweimal bei RT in TBS (150 mM NaCl; 100 mM Tris, HCl pH 7,4; 2 mM KCl). Die Schnitte wurden für 2 h bei 4 °C in einer feuchten Kammer blockiert (1 % Boehringer Block Reagenz; 10 % Ziegen-Serum; 0,1 % TritonX-100 in TBS). Der Anti-Dig-Antikörper wurde in der Blockierungslösung verdünnt und über Nacht bei 4 °C auf den Objektträgern belassen. Ungebundener Antikörper wurde durch Waschen in TBSX (sechsmal je 30 min bei RT) entfernt. Die Färbereaktion und das Eindeckeln wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt (2.2.12.1).

2.2.12.3 „Whole mount“ *in situ*-Hybridisierung

Das Gewebe wurde über Nacht in 4 % PFA/DEPC-PBS fixiert und am Folgetag dreimal in 0,15 % DEPC-PBT (PBS mit 0,15 % Tween 20) gewaschen. Die Dehydrierung des Gewebes durch eine aufsteigende Methanol-Reihe (25 %, 50 %, 75 %, und zweimal 100 %) für 5 bis 15 min schloss sich an. Um den Hintergrund bei der späteren Färbung zu reduzieren, wurden die Gewebe in Methanol:H₂O₂ (4:1) für 1 h bei minus 20 °C gebleicht. Danach wurde das Gewebe dreimal in 100 % Methanol gewaschen. Für die Hybridisierung wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Methanol-Reihe (75 %, 50 %, 25 %) für 10 bis 15 min rehydriert, dreimal in 0,15 % DEPC-PBT gewaschen und abhängig vom embryonalen Stadium sowie der zu erwartenden Expression für 10 bis 30 min mit 20 µg/ml Proteinase K in 0,15 %

DEPC-PBT bei RT inkubiert. Die weiteren Inkubationen erfolgten unter leichtem Schütteln. Das Gewebe wurde in 4 % PFA/DEPC-PBS für 20 min bei RT fixiert, dreimal für je 10 min in 0,15 % DEPC-PBT gewaschen und in Hybridisierungspuffer präinkubiert (50 % entionisiertes Formamid; 5x SSC, 40 µg Heparin; 100 µg denaturierte Lachsspermien-DNA; 50 µg tRNA; 0,1 % Tween 20, pH 4,5 bis 5 mit 1 M Zitronensäure). Das Gewebe wurde für 1 bis 3 h bei 65 bis 70 °C in einem Wasserbad prähybridisiert. Die Hybridisierung wurde mit denaturierten Dig-markierten Sonden (5 bis 10 min bei 80 °C) über Nacht bei 65 bis 70 °C durchgeführt. Am Folgetag wurde das Gewebe zweimal für je 30 min bei 65 bis 70 °C in Lösung I gewaschen (50 % Formamid; 5x SSC; 0,1 % Tween 20). Nach einem Waschschrift von 10 min bei 65 bis 70 °C in Lösung I/II (1:1) (Lösung II: 10 mM Tris, pH 7,5; 0,5 M NaCl; 0,1 % Tween 20), wurde das Gewebe dreimal für je 10 min bei RT in Lösung II gewaschen (10 mM Tris, pH 7,5; 0,5 M NaCl; 0,1 % Tween 20). Anschließend wurde das Gewebe für 30 min bei 37 °C mit 50 µg/ml RNase A in Lösung II inkubiert, um ungebundene Sonde abzubauen. Daran schlossen sich drei weitere Waschschriffe für je 1 h in Lösung III an (50 % Formamid; 2x SSC; 0,1 % Tween 20). Die Waschttemperatur lag 3 bis 5 °C unter der Temperatur, die für die Hybridisierung verwendet worden ist. Das Gewebe wurde bei RT dreimal für je 10 min in TBST (2,5 mM Tris, pH 7,4; 13,7 mM NaCl; 0,27 mM KCl; 0,15 % Tween 20) gewaschen und danach für 1 h mit 10 % Ziegen serum in TBST inkubiert. Parallel wurde eine Spatelspitze Embryo-Pulver in 4 ml TBST für 30 min bei 65 bis 70 °C inaktiviert, 10 min bei 5000 rpm und 4 °C sedimentiert, und das Pellet pro Ansatz in 0,5 ml TBST/1 % Ziegen serum und 1 µl Anti-Dig-Antikörper resuspendiert. Diese Lösung wurde für 1 h bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Antikörper-Lösung für 10 min bei 5000 rpm abzentrifugiert und der Überstand vierfach mit TBST/1 % Ziegen serum verdünnt. Mit 2 ml dieses Ansatzes wurde das Gewebe über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurde das Gewebe weiter mit TBST bei RT gewaschen. Die Lösungen wurde alle 45 min gewechselt und die Waschung über Nacht bei 4 °C fortgesetzt. Am Folgetag wurde das Gewebe zweimal für je 30 min in alkalischem Phosphatase-Puffer (100 mM Tris, pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂; 0,15 % Tween 20) bei RT inkubiert und danach gefärbt. Für die Färbelösung wurden pro Ansatz zum alkalischen Phosphatase-Puffer BCIP und NBT gegeben (1 µl/ml). Die Färbelösung wurde filtriert. Das Gewebe wurde entweder bei RT oder bei 4 °C unter Lichtabschluss über mehrere Stunden oder Tage in Anhängigkeit von der Sonde gefärbt. Die

Lösung wurde nach 2 h erstmals und dann alle 2 Tage gewechselt. Um die Färbung zu beenden, wurde das Gewebe dreimal für je 10 min in 0,15 bis 0,3 % PBT gewaschen und anschließend in 4 % PFA bei 4 °C fixiert. Bei 4 °C konnte das Gewebe in sterilem PBS gelagert werden.

2.2.12.4 Radioaktive Hybridisierung

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

2.2.13 Autoradiographie

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

2.2.14 Präparation von Embryo-Pulver

Das Embryo-Pulver diente zur Prä-Adsorption des Anti-Dig-Antikörpers, der während der *in situ*-Hybridisierungen eingesetzt wurde. Präparierte Embryonen wurden in PBS homogenisiert, 4 Volumen Aceton hinzugegeben und diese Mischung für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 10000 x g für 10 min und 4 °C folgte das Waschen des Präzipitats mit Aceton und eine erneute Zentrifugation. Hierauf wurde das Präzipitat zermörsert, getrocknet und das Pulver bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.15 Zellkultur

2.2.15.1 Präparation und Kultur primärer embryonaler Fibroblasten

Primäre embryonale Fibroblasten ("Feeder-Zellen") wurden aus Embryonen präpariert, die aus Kreuzungen von Wildtyp-Tieren mit transgenen homozygoten Neomycin-Mäusen stammten (Joyner, 1999). Diese Neomycin-resistenten Fibroblasten bilden die Matrix für das Wachstum von ES-Zellen. Embryonen der Stadien E13,5 - E16,5 wurden steril entnommen. Kopf, Leber und innere Organe wurden entfernt und die übrigen Gewebe mehrfach in PBS gewaschen. Die Gewebe wurden zerkleinert und durch ein Sieb in einen mit Glasperlen gefüllten Erlenmeyerkolben gepresst. Gleichzeitig wurde 50 ml 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA sowie einige Tropfen DNase-Lösung zugegeben und die Zellsuspension für 30 min bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde 50 ml Trypsin/EDTA-Lösung hinzugegeben und die Inkubation fortgesetzt. Nach dem Dekantieren der Glasperlen wurde die Zellsuspension bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Die Präzipitate wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 5 ml PBS resuspendiert. Die Zellen wurden in Fibroblasten-Medium mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen/150 mm Schale ausplattiert. Nach zwei bis drei Tagen konnten die konfluent gewachsenen Fibroblasten eingefroren werden. Die Zellen wurden dazu abzentrifugiert, in Einfriermedium A (ES-Zell-Medium/50 % FCS) und Einfriermedium B (ES-Zell-Medium/20 % DMSO) resuspendiert und die Suspension auf Kryoröhrchen (Nalgene) aufgeteilt. Der Einfrierprozess wurde langsam bei minus 20 °C für mehrere Stunden begonnen und die Röhrchen dann bei minus 70 °C oder für längere Zeit in flüssigem Stickstoff gelagert. Das Auftauen der Zellen erfolgte durch schnelles Erwärmen bei 37 °C. Zu den Zellen wurde Fibroblasten-Medium gegeben und die Suspension bei 1100 rpm und 4 °C

zentrifugiert. Die Zellpräzipitate wurden in Fibroblasten-Medium aufgenommen und ausplattiert. Das Wachstum der Fibroblasten musste vor der Kultur mit ES-Zellen inaktiviert werden. Dazu wurde zu 10 ml Medium/150 mm Schale 100 µl Mitomycin C-Lösung pipettiert (1 mg/ml Mitomycin C in PBS; 5 % DMSO, Sigma). Nach 2 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und auf neue Zellkulturschalen transferiert. Die wachstums-inaktivierten Fibroblasten konnten zwei bis drei Wochen in Kultur gehalten werden.

2.2.15.2 Kultur, Transfektion und Selektion embryonaler Stammzellen

Nach dem Auftauen wurden die ES-Zellen in ES-Zell-Medium aufgenommen und ihrer Anzahl entsprechend auf Fibroblasten in 35 oder 60 mm Schalen kultiviert. Das Medium wurde jeden Tag gewechselt und die Zellen beim Erreichen der geeigneten Dichte (viele einzelne Zellklone, jedoch keine Konfluenz) auf 100 mm Schalen kultiviert. Für die Transfektion wurden 1×10^7 ES-Zellen/800 µl in PBS eingesetzt. Sie wurden in einer Elektroporationsküvette (Gene-Pulser Küvette; 0,4 cm; Bio-Rad, München) mit 20 bis 25 µg linearisiertem Targeting-Vektor gemischt und bei 300 V, 1200 µF mit einem Impuls von 2 ms elektroporiert (L. Fischer, Heidelberg). Im Anschluss wurden die ES-Zellen in der Küvette resuspendiert und direkt auf vier dicht mit Fibroblasten bewachsenen 100 mm Schalen ausplattiert.

Am zweiten Tag nach der Elektroporation wurde die Selektion auf homolog rekombinante ES-Zellklone begonnen. Dafür wurde 400 µg/ml Geneticin (G418) im ES-Zell-Medium eingesetzt. Die resistenten Zellklone konnten sieben bis acht Tage nach der Transfektion isoliert werden. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und die Klone mit einer Pipettenspitze in etwa 25 µl PBS auf eine unbehandelte 96-Loch-Platte überführt. Danach wurden die ES-Zellen durch Zugabe von 25 µl 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA bei 37 °C vereinzelt, 50 µl ES-Zell-Medium hinzu pipettiert und die Zellen auf eine mit Fibroblasten dicht bewachsene 96-Loch-Platte transferiert. Etwa zwei Tage später wurden die Zellen gewaschen, trypsinisiert und ES-Zell-Medium hinzugegeben. Die eine Hälfte der Zellsuspension wurde auf eine mit 0,5 % Gelatine/H₂O vorbehandelte 96-Loch-Platte, die andere Hälfte auf eine mit Feeder-Zellen bewachsene 96-Loch-Platte überführt. Auf der Platte mit den Feeder-Zellen wurden die Stammzellklone bis zur Ausbildung von ausreichend

großen Einzelkolonien kultiviert und anschließend eingefroren. Die Klone wurden dazu mit PBS/5 mM EDTA gewaschen, trypsinisiert und in 75 µl Einfriermedium (ES-Zell-Medium/30 % FCS/13,3 % DMSO) aufgenommen. Die 96-Loch-Platten wurden bei minus 70 °C eingefroren. Auf der gelatinisierten 96-Loch-Platte ohne Fibroblasten wurden die ES-Zellen bis zur Konfluenz kultiviert, da eine ausreichende Zellzahl zur Isolierung genomischer DNA aus den Klonen notwendig war. ES-Zellklone, die das Targeting-Konstrukt homolog integriert hatten, wurden mittels Southern-Blot-Hybridisierung identifiziert, dann aufgetaut und der Zellzahl entsprechend auf Fibroblasten in einer 96-Loch-Platte oder auf einer 35 mm Schale kultiviert.

2.2.15.3 Überprüfung der LacZ-Expression in COS-Zellen

Zur Überprüfung des LacZ-Konstrukts wurde ein Expressionsvektor mit der *Gap43-LacZ*-Sequenz hergestellt und in COS-Zellen eingebracht. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion fixiert, kurz mit PBS gewaschen und anschließend mit Färbelösung (20 mM MgCl₂, 0,5 mg/ml X-Gal, 5 mM Kaliumferrozyanid, 5 mM Kaliumferrizyanid in PBS) inkubiert.

2.2.16 Etablierung von genetisch veränderten Mäusen

Superovulation und Isolierung von Blastozysten sowie die Injektion embryonaler Stammzellen in Blastozysten (Bradley und Robertson, 1986) und der anschließende Uterustransfer der Blastozysten wurde durch die Zentrale Einrichtung des Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin durchgeführt. Die Keimbahntransmission des mutierten Allels wurde mittels Southern-Blot-Hybridisierung und PCR überprüft.

2.2.17 Immunhistologische Methoden

2.2.17.1 Detektion neuronaler Zellpopulationen

Die Gefrierschnitte wurden für 1 h bei RT in 1 % Pferdeserum/PBX (PBS mit 1% Triton X-100) blockiert. Dann erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C. In einigen Fällen wurde für 48 h bei 4 °C mit 10 % Pferdeserum und 1 % BSA sowohl

blockiert als auch der Antikörper inkubiert. Hierauf wurden die Schnitte dreimal für je 10 min mit 1% Pferdeserum/PBX gewaschen und für 1 h mit dem sekundären Antikörper in Blockierungslösung inkubiert. Nach drei Waschschritten für je 15 min mit 1% Pferdeserum/PBX wurde in einigen Fällen die DNA mit 1 mg/ml DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) gefärbt und die Schnitte mit Immunomount (Shandon, Frankfurt) eingedeckelt.

2.2.17.2 Detektion von Zellproliferation und Zelltod

Die Quantifizierung mitotisch aktiver und pyknotischer Zellkerne erfolgte auf Gewebeschnitten nach Färbung der DNA mit DAPI durch mikroskopische Inspektion. Um den Zeitpunkt der Bildung von verschiedenen Nervenzelltypen im embryonalen Neuralrohr zu bestimmen wurde BrdU (Bromdeoxyuridin) intraperitoneal in schwangere Maus-Weibchen injiziert (75 µg/g Körpergewicht in 0,9 % NaCl) und die Embryonen anschließend zu unterschiedlichen Zeiten präpariert. BrdU wird als Thymidin-Analogon in die DNA von Zellen inkorporiert, die sich in der S-Phase befinden (Nowakowski *et al.*, 1989; Cooper-Kuhn *et al.*, 2002). Das inkorporierte BrdU wurde immunhistologisch auf Embryonalschnitten mit einem Anti-BrdU-Antikörper nachgewiesen.

Zum Nachweis von Zelltod wurde die DNA-Fragmentierung untersucht (TUNEL Färbung; Gavrieli *et al.*, 1992). Dazu wurde der „Apop Taq Plus, Fluorescein *in situ* Apoptosis Detection Kits“ verwendet (Intergen, Gaithersburg, MD 20877, USA).

2.2.18 X-Gal-Färbung

Die X-Gal-Färbung von Gewebe, das aus transgenen Mäusen mit LacZ-Insertion stammte, wurde wie folgt durchgeführt: Die Mäuse wurden mit 20 ml 2 % PFA and 40 ml PBS perfundiert. Die Gehirne wurden isoliert, in 20 % Gelatine/PBS eingebettet und 80 µm Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4 °C in PBS with 20 mM MgCl₂, 0,01 % Natriumdeoxycholat, 0,02 % NP-40 (Igepal CA-630), 0,5 mg/ml X-Gal, 5 mM Kaliumferricyanid und 5 mM Kaliumferrocyanid gefärbt, anschließend in PBS gewaschen, in 4 % PFA fixiert und in Immunomount (Shandon, Frankfurt) eingedeckelt.

2.2.19 Hämatoxylin von Methacrylatschnitten

Für die Färbung mit Hämatoxylin (Roth) wurden die Plastikgewebeschnitte bis zur gewünschten Signalintensität für etwa 15 bis 20 min in der Lösung geschwenkt (dunkelblaue Färbung der Zellkerne). Nach dem Spülen der Schnitte für 15 min unter fließendem Leitungswasser wurde die Hintergrundfärbung durch Eintauchen der Schnitte in 70 % Ethanol für 15 bis 20 s reduziert (Differenzierung). Abschließend wurden die Schnitte sofort in Aqua bidest. gewaschen und getrocknet. Die Schnitte wurden in „Entellan“ (Merck, Darmstadt) eingedeckelt.

2.2.20 Herstellung von Gewebeschnitten

2.2.20.1 Herstellung von Methacrylatschnitten

Für die histologische Analyse wurden Gewebe bzw. Embryonen in Hydroxyethylmethacrylat (Technovit 7100, kaltpolymerisierender Kunststoff; Heraeus-Kulzer, Wehrheim) eingebettet. Die Präparate wurden mit 4 % PFA fixiert und in Abhängigkeit von der Größe schrittweise in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30 %, 50 %, 70 %, 85 %, 96 % und dreimal 100 %) für je 15 min bis zu zwei Tagen (pro Schritt) dehydriert. Daraufhin wurden die Gewebe für 1 h (in einigen Fällen über Nacht) in Technovit 7100/100 % Ethanol (1:1) inkubiert. Danach erfolgte die Infiltration in Vorbereitungslösung (100 ml Technovit 7100 mit 1g Härter I) für 1 h (bis zu zwei Tage). Das Einbetten der Präparate fand in Vorbereitungslösung/ Härter II (15:1) statt, wobei die Gewebe in dieser Lösung in der Vakuum-Zentrifuge entgast wurden. Nach der Polymerisation des Kunststoffs über Nacht wurden die Präparate mit Technovit 3040 auf Blöcken fixiert und bis zum Schneiden bei RT aufbewahrt. Mikrotomschnitte von 5 bis 10 µm Dicke wurden angefertigt (Microm HM360, Walldorf), im warmen Wasserbad gestreckt, auf Objektträger (Roth, Karlsruhe) aufgezogen und auf einer Heizplatte getrocknet.

2.2.20.2 Herstellung von Gefrierschnitten

Auf Gefrierschnitten wurden Immunhistologien oder *in situ*-Hybridisierungen durchgeführt. Nach dem Spülen in PBS wurden die präparierten Embryonen bzw. Gewebe in 4 % PFA für 1 h bis maximal 3 h in Abhängigkeit vom Alter fixiert. Für *in situ*-Hybridisierungen wurden die Gewebe unfixiert in Einbettformen (Shandon, Frankfurt) eingefroren. Zum Einfrieren

wurde Tissue Tec (OCT-Compound; Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) verwendet. Nach Ausrichtung der Gewebe im Tissue-Tek, wurden die Einbettformen auf Alkohol/Trockeneis gestellt und nach Abschluss des Frierprozesses bei minus 80 °C gelagert. In Abhängigkeit von der Gewebeart bzw. dem Embryonalstadium wurden die Gewebeschnitte im Kryostat (Leica, Bensheim bzw. Microm HM560, Walldorf) bei einer Temperatur von minus 20 °C bis minus 9 °C angefertigt. Die Schnittdicke betrug 10 bis 50 µm. Die Schnitte wurden auf Adhäsions-Objektträger (Histobond, Marienfeld) aufgenommen, bei 37 °C getrocknet und bei minus 80 °C eingefroren.

2.2.20.3 Herstellung von Paraffinschnitten

Zur Herstellung von Paraffinschnitten wurden Embryonen oder Gewebe in PBS präpariert und in 4 % PFA über Nacht bei 4°C fixiert. Anschließend wurde das Gewebe durch eine Methanolreihe (25 %, 50 %, 75 % und zweimal 100 %) dehydriert. Das Gewebe wurde dann entweder bei minus 20 °C gelagert oder für 1 h in Ethanol überführt und danach zweimal für 1 h in Toluol inkubiert. So behandelt, konnten sie in kleinen Plastiknetzen in flüssigem Paraffin bei 60 °C lagern. Dort wurden sie unter zweimaligem Wechseln der Paraffinlösung für drei Tage belassen. Die Gewebe wurden anschließend in Paraffin eingebettet. Paraffinschnitte von 5 bis 10 µm wurden angefertigt, im Wasserbad (48 °C) gestreckt und auf Adhäsions-Objektträger (Histobond, Marienfeld) aufgezogen (Lagerung bei 4 °C).

2.2.20.4 Herstellung von Vibratomschnitten

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

2.2.21 Herstellung von Antikörpern

Mithilfe der RT-PCR wurden die kodierenden Sequenzen von Maf-A, Maf-B und c-Maf amplifiziert und in den bakteriellen Expressionsvektor pET14b (Novagen) kloniert. Der Vektor kodiert unter anderem die Sequenz für den His₆-tag. Der His₆-tag-Bereich wurde für die Aufreinigung genutzt. His₆-MafA, His₆-MafB und His₆-c-Maf wurden mithilfe des Bakterienstammes BL21 (DE3)pLysS produziert. Die Proteine wurden mit einem TALON-Metall-Granulat (Clontech) entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt und die Konzentrationen nach der Bradford-Methode (BioRad) nach den Herstellerhinweisen bestimmt. Die Antikörperproduktion erfolgte in verschiedenen Spezies. Durch die Zentrale Einrichtung des Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin wurden Antikörper aus Kaninchen hergestellt. Antikörper aus der Ratte, dem Huhn und dem Meerschweinchen wurden von Sequence Laboratories generiert.

2.2.22 Elektrokardiogramm

Zur Durchführung des Elektrokardiogramms (EKG) an Embryonen (E18) wurden diese vor der Geburt isoliert. Das Elektrokardiogramm wurde nach dem standardisierten Protokoll der „Drei-Ableitungen-Methode“ nach Einthoven (Einthoven *et al.*, 1950; rechtes Vorderbein, linkes Vorderbein und linkes Hinterbein) durchgeführt. Dokumentiert wurde das Elektrokardiogramm auf SICARD 460 (Siemens-Elema) mit einer Papiergeschwindigkeit von 50 mm/sec. Die reguläre Länge von drei Sinuskurven (R-R) wurde bei jedem Versuchstier gemessen und die Herzschlagrate (HR) nach der Formel $HR = 1,2 \times R-R$ berechnet.

2.2.23 Statistische Auswertung der erhobenen Daten

Die Analyse der ausgezählten Daten wurde mithilfe des Programms Excel durchgeführt. Für den statistischen Vergleich von Daten verschiedener Versuchsgruppen wurde ein T-Test (Programm Excel) verwendet. Unterschiede wurden als statistisch signifikant betrachtet, wenn $p < 0,05$ betrug. Generell werden die Mittelwerte +/- Standardabweichungen angegeben.