

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: Ambion (Austin, USA), GE Healthcare (Freiburg), Biotex (Berlin), Biozym (Hess. Oldendorf), Dianova (Hamburg), Invitek (Berlin), Invitrogen (Karlsruhe), Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), MWG-Biotech (Ebersberg), New England Biolabs (Frankfurt), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (München), Thermo Scientific (Waltham, USA).

2.1.2 Bakterienstämme

Escherichia coli XLI-Blue MRF' Jerpseth et al., 1992

2.1.3 Vektoren

pBluescript-SK II (+/-) Sorge, 1988
pGEM-T Easy Promega, Mannheim

2.1.4 Antikörper

Die nachfolgenden Antikörper wurden von der ausgewiesenen Quelle bezogen und in der Immunhistologie angewandt:

Kaninchen anti-Gsx1/2 (Martyn Goulding); Kaninchen und Meerschweinchen anti-Tlx3, sowie Kaninchen und Meerschweinchen anti-Lbx1 wurden im Labor von Carmen Birchmeier generiert; Maus anti-Lhx1/5 (Developmental Studies Hybridoma Bank); Kaninchen anti-Pax2 (Zymed); Maus anti-Mash1 (BD Pharmingen); Meerschweinchen anti-Prodynorphin (Abcam); Ziege anti-Neurod1 (Santa Cruz); Maus anti-BrdU und Kaninchen anti-Neurod2 (Sigma); Kaninchen anti-Cre (Novagen).

2.1.5 Mausstämme und transgene Mauslinien

Wildtyp-Mäuse:

Die verwendeten C57Bl/6J-Inzucht und CD1-Auszucht-Mäuse stammten aus eigener Zucht bzw. wurden von Charles River (Sulzfeld) bezogen.

Gsx1^{-/-}-Mäuse:

Bei *Gsx1*^{-/-}-Mäusen wurde durch homologe Rekombination in ES-Zellen ein Großteil des *Gsx1*-Gens, der unter anderem für die Homöobox-Domäne des Gsx1-Proteins kodiert, durch eine PGK-HPRT Selektionskassette ersetzt (Li et al., 1996).

Gsx2^{-/-}-Mäuse:

Bei *Gsx2*^{-/-}-Mäusen wurde durch homologe Rekombination in ES-Zellen ein Großteil des *Gsx2*-Gens, der für die letzten 40 Aminosäuren der Homöobox-Domäne und das C-terminale Ende des Gsx2-Proteins kodiert, durch eine Neomycin Selektionskassette ersetzt (Szucsik et al., 1997).

Ptf1a^{Cre/Cre}-Mäuse:

Bei *Ptf1a*^{Cre/Cre}-Mäusen wurde durch homologe Rekombination in ES-Zellen die kodierende Sequenz von *Ptf1a* durch eine *Cre* cDNA ersetzt (Kawaguchi et al., 2002).

Pax2^{-/-}-Mäuse:

Bei *Pax2*^{-/-}-Mäusen wurde durch homologe Rekombination in ES-Zellen ein Teil des *Pax2*-Gens, der sowohl die Stelle des Translationsstarts als auch einen Teil der *paired box*-Region enthält, durch eine Neomycin Selektionskassette ersetzt (Torres et al., 1995).

Neurod1^{-/-}-Mäuse:

Bei *Neurod1*^{-/-}-Mäusen wurde durch homologe Rekombination in ES-Zellen ein Großteil des *Neurod1*-Gens, der für die basische Helix-Loop-Helix- (bHLH) und die Transaktivierungsdomäne kodiert, durch eine Neomycin Selektionskassette ersetzt (Naya et al., 1997).

Neurod2^{-/-}-Mäuse:

Bei *Neurod2*^{-/-}-Mäusen wurde durch homologe Rekombination in ES-Zellen die kodierende Sequenz von *Neurod2* durch eine Neomycin Selektionskassette ersetzt (Arbeitsgruppe von Klaus-Armin Nave, unpubliziert).

Neurod6^{Cre/Cre}-Mäuse:

Bei *Neurod6*^{Cre/Cre}-Mäusen wurde durch homologe Rekombination in ES-Zellen die kodierende Sequenz von *Neurod6* durch eine *Cre* cDNA und eine Neomycin Selektionskassette ersetzt (Goebbels et al., 2006).

Lhx1^{lox/lox}-Mäuse:

Bei *Lhx1*^{lox/lox}-Mäusen wurde durch homologe Rekombination in ES-Zellen die kodierende Sequenz von *Lhx1* von Erkennungssequenzen der Cre-Rekombinase (loxP-Stellen) flankiert (Kwan and Behringer, 2002).

Lhx5^{-/-}-Mäuse:

Bei *Lhx5*^{-/-}-Mäusen wurden durch homologe Rekombination in ES-Zellen die Exone 2, 3 und 4 des *Lhx5*-Gens, die für die zweite Lim-Domäne kodieren, durch eine Neomycin Selektionskassette ersetzt (Zhao et al., 1999).

Lbx1^{Cre/Cre}-Mäuse:

Bei *Lbx1*^{Cre/Cre}-Mäusen wurde durch homologe Rekombination in ES-Zellen die kodierende Sequenz von *Lbx1* durch eine *Cre* cDNA ersetzt (Sieber et al., 2007).

2.1.6 Nährmedien

Medien und Platten für Anzucht und Kultivierung der *Escherichia coli*-Stämme wurden gemäß Standard-Protokollen verwendet (Sambrook und Russel, 2001). Die Konzentration von Ampicillin in Agar und Medien betrug 100 µg/ml.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von Desoxyribonukleinsäuren und Ribonukleinsäuren

2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten

Die Mini-Präparation von Plasmid-DNA erfolgte durch Alkalische Lyse (Birnboim und Doly, 1979). In größerem Maßstab wurde die Isolierung mit dem Plasmid-Maxi-Präparations-Kit der Firma Invitrogen durchgeführt.

Die präparative Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Elektroelution (nach McDonnell et al., 1977) bzw. mit Hilfe des „NucleoSpin Extract II“-Kit (Macherey-Nagel; Vogelstein und Gillespie, 1979).

2.2.1.2 Isolierung genomischer DNA aus embryonalem Gewebe und Biopsien

Die Isolierung genomischer DNA aus embryonalem Gewebe und Biopsien für PCR-Analysen erfolgte aus Gewebestücken frisch präparierter Embryonen und Ohrloch- oder Schwanzbiopsien von Mäusen. Die Gewebestücke wurden über Nacht in 50 µl Ohr-/Schwanz-Lyse-Puffer (100 mM Tris pH 8,5, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,2 % SDS, 100 µg/ml Proteinase K) bei 55°C verdaut. Darauf erfolgte die Inaktivierung der Proteinase K für 10 min bei 95°C. Nach Zugabe von 300 µl H₂O wurde je 1 µl dieser verdünnten Lösung für die Genotypisierung in einer PCR-Reaktion eingesetzt.

2.2.1.3 Isolierung von total RNA aus embryonalem Gewebe

Embryonen wurden in kaltem, DEPC-behandeltem PBS präpariert, Neuralrohrgewebe oder ganze Embryonen wurden in kaltes Trizol gegeben und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C verwahrt. Das Gewebe wurde anschließend in 1 ml Trizol pro 50-100 mg Gewebe homogenisiert. Unlösliche Bestandteile des Homogenisats wurden durch 10 min Zentrifugation bei 12000 g und 4°C pelletiert. Zum Überstand wurden 0,2 ml Chloroform/1 ml Trizol gegeben und durch Schütteln vermischt. Erneutes Zentrifugieren bei 12000 g und 4°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 Pellet wurde dann noch zweimal mit 75 % Ethanol gewaschen und

abschließend in H₂O gelöst. In einigen Fällen wurde die RNA mit Hilfe des “RNeasy Cleanup”-Kits (Qiagen) gemäß Herstellerangaben weiter aufgereinigt.

2.2.2 Restriktionshydrolyse von Desoxyribonukleinsäuren, Ligation von DNA-Fragmenten und Transformation kompetenter Bakterien

Restriktionshydrolysen von Plasmid-DNA wurden mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen gemäß Standardmethoden durchgeführt (Berger und Kimmel, 1987; Sambrook und Russel, 2001). Bei der Ligation von DNA-Fragmenten wurden in der Regel 50 ng Vektor-DNA und ein etwa dreifacher molarer Überschuss an Fragment-DNA eingesetzt. Die Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien erfolgte nach Inoue et al., 1990.

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al., 1985) wurde zur Genotypisierung von präparierten Maus-Embryonen bzw. Jungtieren aus der Nachzucht eingesetzt, sowie zur Klonierung verschiedener plasmidbasierter Konstrukte. Die Etablierung der verwendeten PCR-Programme erfolgte dabei in Anlehnung an Standard-PCR-Methoden (Innis et al., 1989). Nachfolgend sind die verwendeten Genotypisierungs-PCR-Programme inklusive der eingesetzten Primer und MgCl₂-Konzentrationen angegeben:

1. Gsx1 wt

a) MgCl₂-Konzentration: 2,5 mM

b) Primer:

Gsx1 wt fwd: 5'-GCACCGCAAGGCTGCAAGTGCTCTT-3'

Gsx1 wt rev: 5'-ATACCATGTGAGACAGTTCTCTCTGCTAGG-3'

c) Programm:

95°C 2 min	
95°C 1 min	}
65°C 1 min	
72°C 1 min	
4°C ∞	

d) Produktlänge: 720 bp

2. Gsx1 mutant

a) MgCl₂-Konzentration: 2,5 mM

b) Primer:

PGKout-2: 5'-TAAGATAAATGGACCGATCGCCAG-3'

Gsx1-5'-2: 5'-AGGCCACTTGTGTAGCGCCAAGTG-3'

c) Programm:

95°C	2 min	
95°C	45 s	} 40x
66°C	30 s	
72°C	30 s	
4°C	∞	

d) Produktlänge: 425 bp

3. Gsx2 wt

a) MgCl₂-Konzentration: 2,5 mM

b) Primer:

Gsx2 wt fwd: 5'-CAAGGGTTGTCAAGTAGAGTGG-3'

Gsx2 wt rev: 5'-CTTCACGCGACGGTTCTGAAAC-3'

c) Programm:

95°C	2 min	
95°C	1 min	} 30x
65°C	1 min	
72°C	1 min	
4°C	∞	

d) Produktlänge: 270 bp

4. Gsx2 mutant

a) MgCl₂-Konzentration: 2,5 mM

b) Primer:

Gsx2-5': 5'-ATGGATGTGTTGGGTTAGACTGGGTTCTGG-3'

Gsx2neo-1: 5'-CAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATT-3'

c) Programm:

95°C	2 min	
95°C	45 s	} 40x
66°C	45 s	
72°C	1 min	
4°C	∞	

d) Produktlänge: 750 bp

5. Pax2 wt

a) MgCl₂-Konzentration: 1,5 mM

b) Primer:

Pax2-f: 5'-CGGGGCTGCGTTGCTGACTG-3'

Pax2-r: 5'-GCTTTGCAGTGCATATCCATCG-3'

c) Programm:

94°C	2 min	
94°C	30 s	} 30x
62°C	30 s	
72°C	30 s	
4°C	∞	

d) Produktlänge: 300 bp

6. Pax2 mutant

a) MgCl₂-Konzentration: 1,5 mM

b) Primer:

Neo-f4: 5'-CCTCTATCGCCTTCTTGACG-3'

Pax2-r3: 5'-TCCCAGCCATTACTTGAACG-3'

c) Programm:

94°C	2 min	
94°C	45 s	} 35x
58°C	30 s	
72°C	1 min	
4°C	∞	

d) Produktlänge: 600 bp

7. Neurod1 LacZ/Neurod6 Cre

a) MgCl₂-Konzentration: 2,5 mM

b) Primer:

Neurod1-sense: 5'-CTTGAAGCCATGAATGCA-3'

Neurod1-antisense: 5'-TGACAGAGCCCAGATGTA-3'

LacZ-antisense: 5'-ATCGATCTCGCCATACAG-3'

Neurod6-sense: 5'-GAGTCCTGGAATCAGTCTTTTTC-3'

Neurod6-antisense: 5'-AGAATGTGGAGTAGGGTGAC-3'

Cre-antisense: 5'-CCGCATAACCAGTGAAACAG-3'

c) Programm:

94°C 2 min

94°C 30 s	} 40x
54°C 30 s	
72°C 75 s	

4°C ∞

d) Produktlängen:	Neurod1 wt	350 bp
	Neurod1 mutant (LacZ)	200 bp
	Neurod6 wt	1000 bp
	Neurod6 mutant (Cre)	600 bp

8. Neurod2 wt/mutant

a) MgCl₂-Konzentration: 2,5 mM

b) Primer:

Neurod2-sense: 5'-TGGGCTCTCTCGGAGATCT-3'

revNeo-sense: 5'-ATTGTCTGTTGTGCCAGTC-3'

Neurod2-antisense: 5'-CTGTTGGGAGGTGGGGAGAG-3'

c) Programm:

95°C 2 min

95°C 30 s	} 40x
60°C 30 s	
72°C 2 min	

4°C ∞

d) Produktlängen:	Neurod2 wt	1000 bp
	Neurod2 mutant (Neo)	680 bp

9. Lhx1 wt/flox

a) MgCl₂-Konzentration: 2,5 mM

b) Primer:

Lhx1 B: 5'-ATCCAAATCCGCCTCACAGTAG-3'

Lhx1 C: 5'-CAAAAACAAATCAAAAACCCAGAG-3'

c) Programm:

95°C	2 min	
95°C	45 s	} 30x
62°C	45 s	
72°C	45 s	
4°C	∞	

d) Produktlängen: Lhx1 wt 450 bp

Lhx1 flox 550 bp

10. Lhx5 wt

a) MgCl₂-Konzentration: 2,5 mM

b) Primer:

Lhx5 YZ5: 5'-GTCGTCCTGTACGGACCGCAGTTT-3'

Lhx5 YZ7: 5'-TCTCCTGTGCCAGCTGTTTCGCGAAT-3'

c) Programm:

95°C	2 min	
95°C	45 s	} 40x
70°C	45 s	
72°C	45 s	
4°C	∞	

d) Produktlänge: 250 bp

11. Lhx5 mutant

a) MgCl₂-Konzentration: 2,5 mM

b) Primer:

Lhx5 Neo3: 5'-GATCCCCTCAGAAGAACTCGT-3'

Lhx5 Neo5: 5'-CTGTGCTCGACGTTGTCAGT-3'

c) Programm:

95°C	2 min	
95°C	45 s	} 40x
60°C	45 s	
72°C	45 s	
4°C	∞	

d) Produktlänge: 550 bp

12. Lbx1 wt

a) MgCl₂-Konzentration: 1,5 mM

b) Primer:

Lbx1 HB24: 5'-CCGTACGCCGTTTCAGCATCGAGGACATC-3'

Lbx1 HB25: 5'-TCCAATGGCCGGACTCCACCCTACCC-3'

c) Programm:

95°C	2 min	
95°C	30 s	} 40x
65°C	30 s	
72°C	40 s	
4°C	∞	

d) Produktlänge: 560 bp

13. Cre

a) MgCl₂-Konzentration: 2 mM

b) Primer:

crenew1: 5'-GAACGCACTGATTTTCGACCA-3'

crenew2: 5'-AACCAGCGTTTTTCGTTCTGC-3'

c) Programm:

95°C	2 min	
95°C	30 s	} 35x
58°C	30 s	
72°C	30 s	
4°C	∞	

d) Produktlänge: 200 bp

14. Ptf1a wt

a) MgCl₂-Konzentration: 1,5 mM

b) Primer:

P48 locus 5': 5'-AAC CAG GCC CAG AAG GTT AT -3'

P48 locus 3': 5'-TCA AAG GGT GGT TCG TTC TC -3'

c) Programm:

94°C 2 min

94°C 45 s

57°C 30 s

72°C 1 min

4°C ∞

} 40x

d) Produktlänge: 500 bp

2.2.4 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 Oligo-dT Sequenzen, um die gesamte polyA⁺ RNA zu amplifizieren. Aus der cDNA wurden durch PCR dann die gewünschten DNA Sequenzen amplifiziert.

2.2.5 Quantitative RT-PCR

Mit Hilfe der quantitative RT-PCR wurde der mRNA-Expressionslevel von *Galanin* in Geweben des dorsalen Rückenmarks bestimmt. Dafür wurde ein Abschnitt des *Galanin*-Gens mit Hilfe des „Absolute SYBR Green Fluorescein“-Kits (Thermo Scientific) und Gen-spezifischen Primern in einem *Light-Cycler* (IQ5, Biorad) amplifiziert. Während der Amplifikation wurde die Fluoreszenz gemessen und daraus die Expressionsstärke bestimmt. Die Expressionsstärke von *beta-Aktin* diene zur Normalisierung der verschiedenen Ansätze und für jeden Ansatz wurden drei Messungen durchgeführt. Die Amplifikation der Gene erfolgte auf cDNA, die für die Microarray-Expressionsanalyse aus total RNA des dorsalen Rückenmarks von Wildtyp- und *Gsx1/2*-mutanten Embryonen hergestellt wurde (siehe 2.2.10.1 und 2.2.10.2). Für die Amplifikation wurden folgende Primer eingesetzt:

Galanin:

Gal fwd: 5'-CTCACAGGCAAGAGGGAGTTACAA -3'

Gal rev: 5'-GGATGCCAGGCAGGCTGTC -3'

beta-Aktin:

b-Akt fwd: 5'-AGCAGTTGGTTGGAGCAAACATCC -3'

b-Akt rev: 5'-ACAGAAGCAATGCTGTACCTTCC -3'

2.2.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde vor allem zur Verifizierung von klonierten und PCR-amplifizierten Sequenzen angewandt.

Sequenzierungen erfolgten nach dem Kettenabbruchverfahren (Sanger et al., 1977; modifiziert von Tabor und Richardson, 1987) mit dem „Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing“-Kit der Firma Amersham. Neben fluoreszenzmarkierten sequenzspezifischen Primern kamen Standard-Sequenzier-Oligonukleotide (MWG-Biotech) bei der PCR in folgendem Sequenzier-Programm zum Einsatz:

95°C 3 min	
95°C 35 s	} 30x
53°C 35 s	
70°C 1 min	
95°C 3 min	

Die Reaktionen wurden auf 6 % Sequagel XR-Sequenziergelen (Biozym) in 1x TBE-Laufpuffer mit Hilfe des Li-Cor-Sequenzierautomaten (Model 4200, MWG-Biotech) bei 1500 V, 37 mA, 50 W, 50°C analysiert.

2.2.7 *In vitro*-Transkription

Synthese von Digoxigenin-markierten *in vitro*-Transkripten. Zunächst wurde die Plasmid-Matrize zur Transkriptbegrenzung mittels Restriktionshydrolyse linearisiert und danach Phenol/Chloroform-extrahiert, gefällt, gewaschen, getrocknet und in H₂O aufgenommen. Die Synthese des *in vitro*-Transkripts fand in folgendem Ansatz für 1,5 h bei 37°C statt:

- 1 µl linearisierte Plasmid-DNA (1 µg/µl)
- 2 µl 10x Transkriptionspuffer (Roche)
- 2 µl DIG-Labeling-Mix (Roche)
- 0,5 µl RNase-Inhibitor (40U/µl, Invitrogen)
- 13,5 µl DEPC-H₂O
- 1 µl RNA-Polymerase (20U/µl, Roche)

Das Transkript wurde entweder durch Lithiumchlorid-Fällung, oder durch Verwendung des „RNeasy Cleanup“-Kits (Qiagen) aufgereinigt und in 100 µl 50 % Formamid/50 % H₂O aufgenommen.

2.2.8 Histologische Methoden

2.2.8.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Auf Gefrierschnitten wurden immunhistologische Färbungen oder *in situ*-Hybridisierungen durchgeführt. Präparierte Embryonen wurden in PBS gespült und anschließend in 4 % PFA (in 100 mM NaPO₄) für eine bis maximal drei Stunden fixiert. Das Einfrieren erfolgte in „Tissue-Tek“ (= „OCT-Compound“, Sakura) in einer Einbettform („Peel-A-Way“, Thermo Scientific) auf einer Alkohol/Trockeneis-Mischung. Für die *in situ*-Hybridisierung auf Gefrierschnitten (2.2.9.1) wurden präparierte Embryonen auch unfixiert direkt nach Spülen in PBS in „Tissue-Tek“ eingefroren. In Abhängigkeit von Gewebeart bzw. dem Embryonalstadium wurden Schnitte im Kryostaten (Microm HM560, Walldorf) bei einer Blocktemperatur zwischen -10°C und -20°C angefertigt, wobei die Schnittdicke bei 10-20 µm lag. Die Schnitte wurden auf Adhäsions-Objektträger (Histobond, Marienfeld) aufgezogen, bei 37°C getrocknet und dann feuchtigkeitsgeschützt eingefroren. Wie auch die gefrorenen Präparate konnten die Schnitte über mehrere Wochen bei -80°C aufbewahrt werden.

2.2.8.2 Herstellung von Vibratomschnitten

Zur histologischen Analyse von Embryonen, die zuvor in einer whole mount *in situ*-Hybridisierung gefärbt wurden, wurden Schnitte mit Hilfe eines Vibratoms (Leica VT1000S) angefertigt. Die Schnittdicke lag dabei bei 20-50 µm. Das Einbetten der fixierten Embryonen erfolgte in flüssiger 20 % Gelatine in PBS bei ca. 55°C in „Peel-A-

Way“-Einbettformen (Thermo Scientific). Nach dem Aushärten der Gelatine auf Eis wurden die Blöcke getrimmt und über Nacht in 4 % PFA fixiert, worauf eine Lagerung bis zum Schneiden bei 4°C in PBS möglich war. Nach dem Schneiden in PBS wurden die Schnitte auf Objektträger (Roth) aufgezogen, bei RT getrocknet und anschließend mit „Immu-Mount“ (Thermo Scientific) eingedeckelt.

2.2.8.3 Immunhistologie auf Gefrierschnitten

Die Gefrierschnitte wurden für 1 h bei RT in 1 % Pferdeserum/PBX (PBS mit 1 % TritonX-100) blockiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in Blockierungslösung über Nacht bei 4°C. Hierauf wurden die Schnitte dreimal für je 10 min mit 1 % Pferdeserum /PBX gewaschen und dann für 1 h mit dem sekundären Antikörper in Blockierungslösung bei RT inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in 1 % Pferdeserum/PBX, zur Reduktion des unspezifischen Hintergrunds, wurden die Schnitte mit „Immu-Mount“ (Thermo Scientific) eingedeckelt.

2.2.8.4 Detektion von Zellproliferation

Die Quantifizierung mitotisch aktiver Zellkerne erfolgte auf Gewebeschnitten durch mikroskopische Inspektion (siehe 2.2.11.1).

Um die Anzahl von bestimmten postmitotischen Neuronentypen zu bestimmen, die innerhalb von 24 Stunden die Neurogenese durchliefen, wurde BrdU (= 5-Brom-2'-desoxy-Uridin) intraperitoneal in schwangere Maus-Weibchen injiziert (75µg/g Körpergewicht in 0,9% NaCl) und die Embryonen 24 Stunden später präpariert. Das BrdU, welches als Thymidin-Analogon nur in die DNA von Zellen inkorporiert wird, die sich in der S-Phase befinden, wurde immunhistologisch auf Embryonalschnitten mit einem anti-BrdU-Antikörper aus der Maus (Sigma) nachgewiesen und der Nachweis von BrdU wurde mit immunhistologischen Färbungen mit Antikörpern gegen Neuronentypen-spezifische Proteine kombiniert.

2.2.9 *In situ*-Hybridisierung

2.2.9.1 *In situ*-Hybridisierung auf Gefrierschnitten

Die Gefrierschnitte wurden, je nach Art des Gewebes, für 10 bis 30 min mit 4 % PFA bei RT fixiert, dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für 10 min in Acetylierungs-Lösung (4 ml Triethanolamin, 500 µl konz. HCl, 750 µl Essigsäureanhydrid in 250 µl H₂O) acetyliert. Nach erneutem dreimaligen Waschen in PBS erfolgte die Prähybridisierung in Hybridisierungspuffer (50 % entionisiertes Formamid, 5x Denhardts, 5x SSC, 150 µg/ml denaturierte Lachsspermien-DNA, 150 µg/ml Hefe-tRNA) für 2 h bei RT. In der Zwischenzeit wurden die im Folgenden einzusetzenden Deckgläser silanisiert. Dazu wurden diese einmal in „Sigmacote“ (Antihafsilan, Sigma) getaucht und anschließend zweimal kurz in 100 % Ethanol gespült. Nach kurzer Trocknung konnten die Deckgläser zur Hybridisierung eingesetzt werden.

Vor Beginn der Hybridisierung wurde die DIG-markierte Sonde (siehe 2.2.7) für 5 min bei 80°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und auf etwa 100-200 ng/150 µl in Hybridisierungspuffer verdünnt. Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 70°C in einer Feuchtkammer mit einem Kammerpuffer aus 50 % Formamid und 5x SSC durchgeführt. Darauf wurden die Deckgläser durch 5 min Waschen in 5x SSC, bei RT abgeschwemmt und die Präparate in 0,2x SSC bei 70°C für 60 min gewaschen. Nach erneutem kurzem Waschen in 0,2x SSC bei RT wurden die Objektträger in B1-Puffer (0,1 M Tris pH 7,5, 0,15 M NaCl) überführt und 5 min inkubiert. Es folgte ein Blockierungsschritt mit 10 % Ziegen Serum in B1-Puffer für 60 min. Die Inkubation mit dem anti-DIG-Antikörper (in 10 % Ziegen Serum/B1) erfolgte über Nacht bei 4°C. Danach wurden die Objektträger dreifach für je 10 min mit B1-Puffer gewaschen und kurz in NTMT (0,1 M Tris pH 9,5, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, 0,1 % Tween-20) inkubiert, bevor sie in die Färbelösung (3,5 µl NBT und BCIP/1 ml NTMT) transferiert wurden.

Die Farbreaktion erfolgte bei 4-37°C und wurde durch Waschen in H₂O gestoppt. Anschließend wurden die Präparate mit „Immu-Mount“ eingedeckelt.

2.2.9.2 Whole mount *in situ*-Hybridisierung

Embryonen wurden für die whole mount *in situ*-Hybridisierung in eiskaltem DEPC-PBS präpariert und über Nacht in 4 % PFA/PBS fixiert. Am nächsten Tag erfolgte zweimal ein Waschschrift in PBT (PBS mit 0,15 % Tween-20) auf Eis, bevor sich die Dehydration mittels einer Methanolreihe (25 %, 50 %, 75 % und zweimal 100 %) ebenso auf Eis für 5-15 min pro Schritt anschloss. Zur Reduktion des Hintergrunds bei der späteren Farbreaktion wurde das Gewebe daraufhin in Methanol:H₂O₂ (4:1) für 1 h bei RT gebleicht und im Anschluss daran dreimal mit 100 % Methanol auf Eis gewaschen, wonach eine Lagerung des Gewebes bei -20°C für mehrere Wochen möglich war.

Zu Beginn der whole mount *in situ*-Hybridisierung wurden die Präparate in kleine Glasfläschchen (3 ml Volumen) überführt und anschließend in einer Methanolreihe (je 15 min in 75 %, 50 %, 25 % Methanol in PBT) bei 4°C rehydriert. Daraufhin wurde das Gewebe dreimal 15 min mit PBT bei 4°C gewaschen und 20 min in 20 µg/ml Proteinase K in PBT bei RT verdaut. Sodann wurden die Präparate 20 min in 0,2 % Glutaraldehyd/4 % PFA in PBS refixiert und dreimal 15 min mit PBT gewaschen. Dann wurde das Gewebe 15 min in Hybridisierungslösung (50 % entionisiertes Formamid, 5x SSC, 40 µg/ml Heparin, 100 µg/ml denaturierte Lachsspermien-DNA, 50 µg/ml HefetRNA, pH4,5-5 mit 1 M Zitronensäure) equilibriert und 1-3 h in Hybridisierungslösung bei 65°C prähybridisiert. Vor der Hybridisierung wurden 12 µl DIG-markierte RNA-Sonde pro 3 ml Hybridisierungslösung 10 min bei 80°C denaturiert. Darauf wurde die Sonde auf die Präparate in Hybridisierungslösung gegeben und über Nacht bei 65°C hybridisiert.

Am nächsten Tag wurden die Präparate zweimal mit Lösung I (50 % Formamid, 5x SSC, 0,1 % Tween-20) bei 65°C gewaschen, dann 15 min in 1:1 Lösung I:Lösung II bei 65°C und dreimal 15 min in Lösung II (10 mM Tris pH 7,5, 0,5 M NaCl, 0,1 % Tween-20) bei RT inkubiert. Optional erfolgte darauf die Reduktion unspezifischer Bindung der Sonde durch einen Verdau in 50 µg/ml RNase A in Lösung II für zweimal 30 min bei 37°C. Als nächster Schritt wurde dreimal 1 h mit Lösung III (50 % Formamid, 2x SSC, 0,1 % Tween-20) bei 62°C stringent gewaschen und das Gewebe anschließend dreimal 15 min in TBST (2,5 mM Tris pH 7,4, 13,7 mM NaCl, 0,27 mM KCl, 0,15 % Tween-20) bei RT equilibriert. Vor der Inkubation mit einem anti-DIG-Antikörper (Roche), an den AP gekoppelt war, wurden die Präparate 1 h in TBST mit 20 %

Ziegenerum (Blockierungslösung) vorinkubiert. Währenddessen wurde ein kleiner Laborlöffel Embryo-Pulver 30 min in 4 ml TBST bei 65°C hitzeinaktiviert. Das Embryo-Pulver wurde 5 min bei 5000 rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurden 0,75 ml TBST mit 5 % Ziegenerum und der Antikörper (1:500) zugegeben, mit dem Embryo-Pulver vermischt und 1 h bei 4°C präadsorbiert. Das Embryo-Pulver wurde erneut 5 min mit 5000 rpm bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand 1:4 mit TBST und 5 % Ziegenerum verdünnt. Die Blockierungslösung wurde abgenommen und das Gewebe über Nacht mit anti-DIG-Antikörper 1:2000 in 3 ml TBST mit 5 % Ziegenerum bei 4°C inkubiert.

Am dritten Tag wurde dreimal 15 min in TBST bei RT, dann 8-10 Mal 40-60 min in TBST bei RT und schließlich über Nacht mit TBST bei 4°C gewaschen.

Am vierten Tag wurden die Präparate zweimal 45 min in AP-Puffer (100 mM Tris pH 9,5, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, 0,15 % Tween-20) bei RT equilibriert und anschließend wurde die filtrierte Färbelösung (0,35 µl/ml NBT und BCIP in AP-Puffer) zugegeben. Die Färbung erfolgte bei RT oder 4°C lichtgeschützt und die Färbelösung wurde alle zwei Tage ersetzt. Nach Abschluss der Farbreaktion wurde zweimal mit AP-Puffer und dreimal mit PBS gewaschen. Die Präparate wurden anschließend über Nacht in 4 % PFA in PBS bei 4°C postfixiert, erneut zweimal mit PBS gewaschen und darin bei 4°C gelagert.

2.2.9.3 Präparation von Embryo-Pulver

Das Embryo-Pulver diente zur Präadsorption des anti-DIG-Antikörpers, der für *in situ*-Hybridisierungen eingesetzt wurde. Präparierte Maus-Embryonen wurden in einem möglichst kleinen Volumen eiskaltem PBS homogenisiert, 4 Vol. eiskaltes Aceton hinzugegeben und diese Mischung für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 10000 g für 10 min bei 4°C erfolgte ein Waschen des Präzipitats mit eiskaltem Aceton und eine erneute Zentrifugation. Hierauf wurde das Präzipitat fein zermörsert, luftgetrocknet und dieses Pulver bei 4°C aufbewahrt.

2.2.10 Microarray-Expressionsanalyse

2.2.10.1 RNA-Isolierung und –Aufreinigung

Die Microarray-Expressionsanalyse zur Identifizierung differenziell exprimierter Gene wurde an RNA durchgeführt, die aus dem Rückenmark von E12.5, E14.5 und E18.5 Mausembryonen isoliert worden war. Zur Gewinnung des Rückenmarkgewebes wurde das gesamte Rückenmark von Wildtyp- und *Gsx1/2*-doppelt mutanten Embryonen in kaltem DEPC-PBS herauspräpariert und der dorsale Teil des Rückenmarks vom ventralen Teil abgetrennt. Das Gewebe wurde sofort in RNAlater (Ambion) gegeben und darin bei -80°C gelagert. Danach wurde das Gewebe von je mindestens fünf Embryonen zu einem Ansatz vereinigt. Für jeden Genotyp (Wildtyp bzw. *Gsx1/2*^{-/-}) und jedes Entwicklungsstadium (E12.5, E14.5 bzw. E18.5) wurden je drei unabhängige Ansätze verwendet. Das Gewebe jedes Ansatzes wurde in 500 µl Trizol überführt, homogenisiert und anschließend auf 1600 µl mit Trizol aufgefüllt. Es wurden 320 µl Chloroform zugegeben und 15 s vermischt. Anschließend wurde 15 min mit 10000x g in einer Kühlzentrifuge bei 4°C zentrifugiert, die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 2 µl Polyacrylträger (MRC) zugegeben. Nun wurden 0,83 Volumen Isopropanol zugefügt, die Lösung 10 min bei RT inkubiert und die RNA 10 min mit 12000x g in einer Kühlzentrifuge bei 4°C präzipitiert. Die präzipitierte RNA wurde mit 1,5 ml 75 % Ethanol gewaschen, 2 min mit 14000 rpm in einer Tischzentrifuge bei RT abzentrifugiert, luftgetrocknet und in 100 µl H₂O aufgenommen. Die so gewonnene total RNA wurde anschließend mit dem „RNeasy MinElute Cleanup“-Kit (Qiagen) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Die RNA wurde dabei zweimal mit 11 µl H₂O eluiert und die Konzentration der eluierten RNA wurde photometrisch mittels einer 1:80 mit H₂O verdünnten RNA-Lösung bestimmt. Die Qualität der RNA wurde außerdem durch Auftrennung in einem 1 %igen Agarosegel kontrolliert.

2.2.10.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese für die *in vitro*-Transkription und anschließende Biotin-Markierung von cRNA wurde mit dem „SuperScript Double-Stranded cDNA Synthesis“-Kit (Invitrogen) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Für den

Reaktionsansatz der Erststrangsynthese wurden 1 µl 100 µM Oligo-(dT)₂₄-T7 Primer (MWG-Biotech) und 8 µg der zuvor gereinigten total RNA mit 12 µl H₂O gemischt und 10 min bei 70°C erhitzt. Anschließend wurden 4 µl 5x Erststrang-Puffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl 10 mM dNTPs zugegeben und 2 min bei 42°C inkubiert. Dann wurde 1 µl SuperScript III (Invitrogen) zugefügt und die Synthese des Erststrangs erfolgte für 1 h bei 42°C.

Der Reaktionsansatz wurde danach abgekühlt und auf Eis wurden 91,6 µl H₂O, 30 µl 4x Zweitstrang-Puffer, 2,4 µl 12,5 mM dNTPs, 1 µl *E. coli* DNA Ligase, 4 µl *E. coli* DNA Polymerase und 1 µl *E. coli* RNase H zugegeben und der Zweitstrang 2 h bei 16°C synthetisiert. Nun wurden 2 µl T4 DNA Polymerase zugegeben, für 5 min bei 16°C inkubiert und die Reaktion mit 10 µl EDTA gestoppt.

Für die Aufreinigung der cDNA wurde der Reaktionsansatz mit 162 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, kurz gemischt und auf ein zuvor zentrifugiertes „Phase Lock“-Reaktionsgefäß (Eppendorf) gegeben. Nach einer Zentrifugation mit 14000 rpm in einer Tischzentrifuge bei RT wurde die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die gelöste cDNA wurde durch Zugabe von 0,5 Volumen 7,5 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumen -20°C kaltem 100 % Ethanol mit 14000 rpm 2 min bei RT gefällt, anschließend luftgetrocknet und in 12 µl H₂O aufgenommen.

2.2.10.3 *In vitro*-Transkription und Biotin-Markierung von cRNA

Ausgehend von der gereinigten cDNA wurde mit Hilfe des „IVT-Labeling“-Kits (Affymetrix) Biotin-markierte cRNA hergestellt. Die *in vitro*-Transkription fand in folgendem Ansatz für ca. 16 h bei 37°C statt:

- 6 µl cDNA-Lösung
- 2 µl IVT Labeling 10x Puffer
- 6 µl IVT Labeling NTP-Mix
- 2 µl IVT Labeling Enzym-Mix
- 4 µl H₂O

Die Biotin-markierte cRNA wurde anschließend mit dem „GeneChip Sample Cleanup Module“ (Affymetrix) aufgereinigt und zweimal mit 15 µl H₂O eluiert. Die Konzentration der gereinigten cRNA wurde photometrisch mittels einer 1:80 mit H₂O verdünnten RNA-Lösung bestimmt. Die Fragmentgrößen der cRNA wurden außerdem

elektrophoretisch bestimmt und 15 µg der cRNA für die Hybridisierung von Microarrays eingesetzt.

2.2.10.4 Microarray-Hybridisierung

Die Biotin-markierte cRNA wurde gemäß Herstellerangaben auf Affymetrix „GeneChip Mouse Genome 430 2.0“-Microarrays hybridisiert. Pro Genotyp und embryonalem Entwicklungsstadium wurden je drei Microarrays mit unabhängigen Ansätzen hybridisiert. Die Hybridisierung der cRNA und die Aufzeichnung der Hybridisierungsergebnisse wurden als Dienstleistung von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Norbert Hübner (MDC) durchgeführt. Die Expressionsrohdaten, bestehend aus den Hybridisierungsintensitäten, wurden im Rahmen dieser Arbeit weiter bearbeitet und analysiert.

2.2.11 Datenanalyse

2.2.11.1 Dokumentation histologischer Daten

Die Dokumentation histologischer Daten erfolgte mittels Licht- oder Fluoreszenzmikroskopie. Die Lichtmikroskopie von Schnitten erfolgte an einem aufrechten Mikroskop (Axiophot, Zeiss) ausgestattet mit Kamera (AxioCam HRc, Zeiss) und der Axiovision AC Software Version 4.5 (Zeiss). Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte an einem *Laser-Scanning*-Mikroskop (LSM 5 Pascal, Zeiss) mit der LSM 5 Pascal Software Version 3.2 (Zeiss). Die generierten Bilder wurden mit Photoshop Version 8 (Adobe, München) bearbeitet. Bei der Kombination von *in situ*-Hybridisierung und Immunhistologie wurden beide Signale gleichzeitig mit dem *Laser-Scanning*-Mikroskop aufgenommen. Die blaue Färbung der *in situ*-Hybridisierung wurde dabei als Schwarzweißbild aufgenommen und anschließend in Adobe Photoshop invertiert und in ein grünes Pseudo-Fluoreszenzsignal umgewandelt.

2.2.11.2 Expressionsanalyse

Die Expressionsanalyse wurde zur Identifizierung von, im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen, im Rückenmark *Gsx1/2*-mutanter Embryonen differenziell exprimierter Gene genutzt. Die Rohdaten der Microarray-Hybridisierung wurden mit der

Basisinstallation der Software Bioconductor (Gentleman et al., 2004) ausgewertet, welche die R-Umgebung für statistische Berechnungen (R Development Core Team, 2005) nutzt. Die Qualität der Microarray-Hybridisierung wurde mit dem Bioconductor-Modul affyPLM untersucht und die Daten wurden mit dem gcma-Modul (Zhijin et al., 2004) normalisiert. Sonden mit geringer Varianz der Expression über alle Microarrays wurden herausgefiltert und differenziell exprimierte Gene wurden mit dem limma-Modul (Smyth, 2005) identifiziert. Dieses Modul implementiert die empirische Bayes-Methode und dient der Fehlerkorrektur, vor allem dem Ausschluss Falschpositiver. Gene wurden als differenziell exprimiert angenommen, wenn $p < 0,05$ für den Unterschied des Expressionsniveaus war.