

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Alle Chemikalien, Enzyme, Oligonukleotide oder Antikörper wurden, sofern nicht speziell vermerkt, von nachfolgenden Unternehmen bezogen: Amersham-Pharmacia (Freiburg), Biotex (Berlin), Biozym (Hess, Oldendorf), Dianova (Hamburg), Gibco/BRL (Karlsruhe), Heraeus-Kulzer (Wehrheim), Invitek (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), Sigma (Deisenhofen).

2.1.2 Lösungen und Reagenzien

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

Tab. 1 Lösungen und Reagenzien

Name	Zusammensetzung
Acetylierungspuffer	296 ml MilliQ-H ₂ O 4 ml Triethanolamin 0,5 ml HCl 0,75 ml Essigsäureanhydrid
AP-Puffer	25 ml 1 M Tris-HCl, pH 9.5 12,5 ml 1 M MgCl ₂ 5ml 5 M NaCl 375 µl Tween 20 auf 250 ml mit H ₂ O _{DEPC}
B1-Puffer	0,1 M Tris-HCl, pH 7.5 0,15 M NaCl
EDTA	0,5 M EDTA pH 8.0 mit NaOH
H ₂ O _{DEPC}	0,1% DEPC in MilliQ-H ₂ O
Hybridisierungslösung (<i>in-situ</i> Hybridisierung auf Gefrierschnitten)	50 ml ultrareines, deionisiertes Formamid 25 ml 20x SSC 5 ml 100x Denhardts Lösung 1,5 ml 10 mg/ml tRNA (10 min bei 95°C denaturiert) 1 ml 10 mg/ml Lachsspermien-DNA (10 min bei 95°C denaturiert) 13,75 ml H ₂ O _{DEPC}
Hybridisierungslösung (Whole-mount <i>in-situ</i> Hybridisierung)	50 ml ultrareines, deionisiertes Formamid 25 ml 20x SSC

	6 ml 1 M Zitronensäure 1 ml 10 mg/ml Lachsspermien-DNA (10 min bei 95°C denaturiert) 100 µl 50 mg/ml tRNA (10 min bei 95°C denaturiert) 150 µl Tween 20 40 µl 100 mg/ml Heparin auf 100 ml mit H ₂ O _{DEPC}
Lösung I (Whole-mount <i>in-situ</i> Hybridisierung)	125 ml Formamid 62,5 ml 20x SSC 375 µl Tween 20 auf 250 ml mit H ₂ O _{DEPC}
Lösung II (Whole-mount <i>in-situ</i> Hybridisierung)	25 ml 5 M NaCl 2,5 ml 1 M Tris-HCl, pH 7.5 375 µl Tween 20 auf 250 ml mit H ₂ O _{DEPC}
Lösung III (Whole-mount <i>in-situ</i> Hybridisierung)	125 ml Formamid 25 ml 20x SSC 375 µl Tween 20 auf 250 ml mit H ₂ O _{DEPC}
Lysis-Puffer (Embryonen)	10 mM Tris, pH 8.9 50 mM KCl 3 mM MgCl ₂ 0,01% Gelantine 0,45% Nonidet P40 0,45% Tween 20 100 µg/ml Proteinase K
Lysis-Puffer (Ohr/Schwanzgewebe)	100 mM Tris-HCl pH 8.5 200 mM NaCl 5 mM EDTA 0,2% SDS 100 µg/ml Proteinase K
Natriumacetat	3 M Natriumacetat pH 5.2 mit Essigsäure
NTMT	100 mM NaCl 100 mM Tris-HCl pH 9.5 50 mM MgCl ₂ 0,1% (v/v) Tween 20
PBS	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,15 g Na ₂ HPO ₄ 0,2 g KH ₂ PO ₄ auf 1l mit MilliQ-H ₂ O
PBS _{DEPC}	0,1% DEPC in PBS
PBT	PBS _{DEPC} 0,15% Tween 20
PBT-X	0,1% Triton-X100 in PBS
Phosphatpuffer	0,2 M NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄
TBS	150 mM NaCl 100 mM Tris-HCl pH 7.4 2 mM KCl
TBST	0,15% Tween 20 in TBS
TE	10 mM Tris base 1 mM EDTA pH 8.0
Tris-HCl	1 M Tris base pH 7.4, 7.5, 8.0, 9.5 mit HCl
20x SSC	3 M NaCl

	300 mM Na ₃ -Citrat-Dihydrat, pH 7.0
Walpole-Puffer	0,2 M Essigsäure 0,2 M Natriumacetat, pH 4.45
X-Gal Färbelösung	5 mM K ₃ Fe(CN) ₆ 5 mM K ₄ Fe(CN) ₆ 10 mM MgCl ₂ 0,01% Na-Deoxycholat 1 mg/ml X-Gal in PBS

2.1.3 Bakterienstämme

Tab. 2 Verwendete Bakterienstämme.

Name	Bezugsquelle (Referenz)
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRF'	Stratagene (Jerpseth <i>et al.</i> , 1992)
BL21 (DE3)pLysS	Stratagene

2.1.4 Plasmidvektoren

Tab. 3 Verwendete Plasmidvektoren.

Name	Bezugsquelle (Referenz)
pBluescript-SK II (+/-)	Stratagene (Sorge, 1988)
pGem-T bzw. pGem-T Easy	Promega, Mannheim
pET14b	Novagen

2.1.5 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Biotex (Berlin) oder MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.

Tab. 4 Verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz (5' - 3')
Bcl11b-flox UP	TGAGTCAATAAACCTGGGCGAC
Bcl11b-flox LP	GGAATCCTTGGAGTCACTTGTGC
EmxCre1	GTATTTGGTTTAGAGTTTGGC
EmxCre2	GGGGACATGAGAGGATGC
Thy1-wt FOR	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT
Thy1-wt RV	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCA
Thy1-YFP FOR	AAGTTCATCTGCACCACC
Thy1-YFP RV	TCCTTGAAGAAGATGGTGCG
Bcl11b-AK UP	CATATGGACGAGGAGGAGGAAGAAGAGGAG
Bcl11b-AK LP	GGATCCTCGTAGCCCACGAGCCACTGC
Bcl11b-Probe UP	GCTGCGGCTCTGGCGGATGA
Bcl11b-Probe LP	GACGATGTGGCGAAAGGCGACTGG
Dsp UP	GCGAAATCCTCTCAGACCCAAGTG
Dsp LP	GGTGGAAATCTTACTCACGGAGTCG
LacZ UP	TCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATG
LacZ LP	ATATCCTGATCTTCCAGATAACTGCCG

2.1.6 Antikörper

In Tabelle 5 sind die verwendeten Primär-Antikörper aufgelistet, die die genannten Antigene der Maus binden. Des Weiteren ist die Spezies, in der der Antikörper erzeugt wurde sowie die für die Immunhistologie verwendete Verdünnung und die Bezugsquelle angegeben. Die benutzten Sekundär-Antikörper für die Fluoreszenzimmunhistochemie (Dianova, Hamburg) waren anti-Maus-, anti-Kanninchen-, anti-Ziege-, anti-Meerschweinchen-, oder anti-Ratte-IgG Antikörper, jeweils gekoppelt an Cy2, Cy3 oder Cy5. Sie wurden in einer Verdünnung von 1:500 bei Gefriergewebschnitten bzw. 1:250 bei „free-floating“ Gewebeschnitten eingesetzt.

Tab. 5 Verwendete Antikörper. Die Verdünnung ist jeweils für Gefriergewebschnitte und „free-floating“ Schnitte angegeben.

Antigen	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
Bcl11b	Kanninchen	1:10000 / 1:1000	H.Brylka, MDC Berlin
Bcl11b	Meerschweinchen	1:10000 / 1:1000	H.Brylka, MDC Berlin
Bcl11a	Kanninchen	1:10000 / 1:1000	H.Brylka, MDC Berlin
Bcl11a	Meerschweinchen	1:10000 / 1:1000	H.Brylka, MDC Berlin
BrdU	Ratte	1:200	Abcam, Cambridge (UK)
Calbindin	Kanninchen	1:10000 / 1:4000	Swant, Bellinzona (Schweiz)
Doublecortin	Ziege	1:500 / 1:200	Santa Cruz, Heidelberg
GFAP	Kanninchen	1:1000	Sigma, Deisenhofen
NeuN	Maus	1:1000 / 1:200	Chemicon, Hampshire (UK)
NeuroD	Ziege	1:1000 / 1:500	Santa Cruz, Heidelberg
Parvalbumin	Kanninchen	1:1000 / 1:500	Swant, Bellinzona (Schweiz)
Prox1	Kanninchen	1:10000 / 1:5000	Abcam, Cambridge (UK)

2.1.7 Mausstämme und transgene Mauslinien

CD1-Auszucht Mäuse: Die verwendeten CD1-Auszucht Mäuse sowie C57Bl/6J-Inzucht Mäuse stammten aus eigener Zucht der Tierhaltung des MDC Berlin bzw. wurden von Charles River (Sulzfeld) bezogen.

Bcl11b flox Mäuse (Pentao Liu, Neal Copeland, Frederick, USA): Bei diesen Bcl11b flox Mäusen sind im Bcl11b Gen-Locus Exon 4-6 von zwei loxP Sequenzen flankiert sowie eine Neomycin-Resistenz Kasette im 3' UTR inseriert. Die Generierung dieser Mäuse erfolgte durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (Liu *et al.*, 2003a).

Emx-1Cre Mäuse (Jessica Gorski, Kevin R. Jones, Colorado, USA): Bei diesen Emx-1Cre Mäusen wird das Cre Rekombinase Gen unter der Kontrolle des Promotors des Emx-1 Gens exprimiert (Gorski *et al.*, 2002).

Thy1-YFP (H) Mäuse (Guoping Feng, Joshua R. Sanes, St. Louis, USA): Bei diesen Mäusen wird das Reporter Gen YFP (kodiert für das Yellow Fluorescent Protein) unter

der Kontrolle des neuronal-spezifischen Elementes des Thy-1 Gens exprimiert. Bei dem Thy1 Gen ist das 3. Exon deletiert, wodurch die Expression in nicht-neuronalen Zellen unterdrückt wird (Feng *et al.*, 2000). Die Thy1-YFP Mäusen wurden von Charles River (Sulzfeld) bezogen.

R26R Mäuse (Phillipe Soriano, Seattle, USA): LacZ-Reporter Mauslinie zum Nachweis Cre induzierter Rekombination (Soriano, 1999).

2.1.8 Nährmedien

Medien und Platten für die Anzucht und Kultivierung der *Escherichia coli* Stämme wurden gemäß Standard-Protokolle verwendet (Sambrook und Russel, 2001). Die Konzentration von Ampicillin oder Carbencillin in Agar und Medien betrug 100 µg/ml bzw. 50 µg/ml.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA Isolierung und Aufreinigung

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). Die Plasmid-DNA wurde zum Schluss in 40 µl TE Puffer mit 0,2 µg/µl RNase A gelöst und bei 4°C gelagert. Die Präparation von Plasmid-DNA im größeren Maßstab erfolgte mit dem Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) oder dem Nucleobond PC-500 Kit (Machery-Nagel, Düren) gemäß Herstellerangaben. Die DNA wurde anschließend in 50-100 µl TE Puffer eluiert und bei -20 °C gelagert. Die präparative Isolierung von DNA Fragmenten erfolgte durch Elektroelution (McDonnel *et al.*, 1977) bzw. mittels des „QUIAEX II/QUIAQUICK Gel Ectraction Kit“ (Qiagen, Hilden; Vogelstein und Gillespie, 1979). Die DNA wurde hier meist in 25 µl TE gelöst und bei -20°C gelagert.

2.2.1.2 Isolierung genomischer DNA aus embryonalem Gewebe, Ohrlöchern bzw. Schwanzstücken

Dottersäcke oder andere embryonale Gewebe bis zum Stadium E14.5 wurden in Embryonen-Lysis-Puffer, Ohrlöcher und Schwanzstücke junger oder adulter Mäuse dagegen in Ohr-/Schwanz-Lysis Puffer für 2h oder über Nacht bei 55°C inkubiert. Darauf erfolgte die Inaktivierung der Proteinase K für 10 min bei 95°C. Nach Zugabe von 250 µl

H₂O wurden je 1-2 µl dieser verdünnten Lösung für die Genotypisierung in einer PCR-Reaktion eingesetzt.

2.2.2 Restriktionshydrolyse von DNA, Ligationen 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 in einer 20 µl Reaktion eingesetzt. Die Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien erfolgte nach Inoue *et al.*, 1990.

2.2.3 Amplifikation von DNA Fragmenten

2.2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Saiki *et al.*, 1985) wurde zur Genotypisierung von präparierten Maus-Embryonen bzw. Jungtieren sowie zur Klonierung verschiedener Plasmid-Konstrukte eingesetzt. Die PCR wurde gemäß Standardmethoden (Sambrook und Russel, 2001) in PCR-Maschinen von Bio-Rad (München) und Biometra (Göttingen) durchgeführt. Der Standard PCR-Ansatz enthielt 1µl dNTPs (2,5 mM jedes Nukleotids; Invitak, Berlin), 2 µl 10x Puffer (Invitrogen, Karlsruhe), 1 µl Primer1 (0,5 µM), 1µl Primer2 (0,5 µM), 0,2 µl Taq Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) und MilliQ H₂O auf 20 µl. Als Template wurde entweder 50-100 ng Plasmid-/genomische DNA oder zur Genotypisierung 1-2 µl des hitzeinaktivierten Lysats eingesetzt. Das PCR Programm umfasste folgende Schritte: 5 min 94°C, dann 35x der Zyklus 30s 95°C, 30s 63°C und 1 min 72°C, schließlich folgte 4°C.

Für die präparative PCR und anschließende Klonierung wurde das Amplifikationsprodukt elektrophoretisch aufgetrennt und dann isoliert oder direkt für die Klonierung mit dem pGEM-T-Easy Kit (Promega, Mannheim) eingesetzt.

2.2.3.2 RT-PCR

Die Generierung und Klonierung von cDNA Fragmenten erfolgte durch die RT-PCR mit Hilfe des One-Step-Reverse-Transkriptase Kits von Invitrogen (Karlsruhe). Hierbei wird

die aufgereinigte RNA mittels des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Als Primer für die Reverse Transkriptase dienten genspezifische Sequenzen. Aus der cDNA wurden durch PCR dann die gewünschten DNA Sequenzen amplifiziert.

2.2.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde zur Überprüfung 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: 3min 95°C, dann 30x der Zyklus 35s 95°C, 35s 53°C, 1min 70°C und 3min 95°C. Die Reaktionen wurden auf 6% Sequagel XR-Sequenziergelen (Biozym) in 1x TBE-Laufpuffer mit Hilfe des Li-Cor-Sequenzierautomaten (Model 4000L bzw. 4200, MWG-Biotech) bei 1500V, 50W, 50°C analysiert.

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

Zur Herstellung von RNA-Sonden für die *in situ*-Hybridisierung wurde Plasmid-DNA zunächst für die anschließende *in vitro*-Transkription und DIG-Markierung linearisiert. Die Linearisierung erfolgte mit 30 µg Plasmid-DNA in einem 150 µl Reaktionsansatz mit 50 U des entsprechenden Enzyms üN bei 37°C. Danach wurde die linearisierte DNA mit Phenol/Chloroform extrahiert, mit Ethanol/NaAcetat gefällt und mit 70% Ethanol gewaschen. Die getrocknete DNA wurde anschließend in 25 µl H₂O eluiert und bei -20°C gelagert.

Für die *in vitro*-Transkription und DIG-Markierung von RNA Sonden wurden, wenn nicht anders angegeben, Reagenzien und Enzyme von Roche (Mannheim) verwendet. Der Transkriptionsansatz enthielt 1 µg der linearisierten DNA Matrize, 2 µl 10x Transkriptionspuffer, 2 µl DIG-Labeling Mix, 0,5µl Rnase-Inhibitor (40U/µl, Invitrogen), 1µl der entsprechenden Polymerase (T7, T3, SP6; 20U/µl), wurde auf 20µl mit H₂O_{DEPC} aufgefüllt, für 2h bei 37°C inkubiert und anschließend auf Eis gestoppt. Danach erfolgte eine Säulenaufreinigung der DIG-markierten RNA-Sonde mit dem Rneasy Mini Elute

Cleanup-Kit (Qiagen, Hilden) oder dem NucleoSpin RNA II Kit (Machery-Nagel, Düren) gemäß Herstellerangaben. Die DIG-markierte RNA-Sonde wurde am Ende mit 50 µl H₂O_{DEPC} eluiert und mit 50 µl Formamid gemischt. Die Lagerung der RNA-Sonden erfolgte bei -70°C.

2.2.6 Microarray-Expressionsanalyse

2.2.6.1 RNA Isolierung und Aufreinigung

Zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene wurde eine Microarray-Expressionsanalyse an RNA durchgeführt, die aus Hippocampi von P7 Jungtieren isoliert wurde. Die Hippocampi von Kontrolltieren und Bcl11b Mutanten wurden in kaltem PBS_{DEPC} herauspräpariert, in je 100 µl Trizol aufgenommen, sofort in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bis zur RNA Isolierung bei -80°C gelagert. Die Hippocampi aus je 7 Kontrolltieren bzw. Mutanten wurden in je 4 ml Trizol vereinigt, 3 min homogenisiert und anschließend 5 min bei RT inkubiert, bevor die Proben auf je 4x 1 ml in 1.5 ml Reaktionsgefäßen verteilt wurden. Es wurden je 200 µl Chloroform/ml Probe zugegeben, 15 s vorsichtig gemischt und 3 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 15 min bei 10000 x g in einer Tischkühlzentrifuge (Universal 32R; Hettich, Tuttlingen) bei 4°C zentrifugiert, die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und je 2 µl Polyacrylträger (MRC; Fermentas, St. Leon-Rot) zugegeben. Nun wurden je 1ml Isopropanol zugegeben, die Proben 10 min bei RT inkubiert und die gesamte RNA 10 min mit 12000 x g in einer Tischkühlzentrifuge bei 4°C präzipitiert. Das Pellet wurde mit je 1,5 ml 75 % Ethanol gewaschen, 2 min mit 14000 rpm in einer Tischzentrifuge (Centrifuge 5417; Eppendorf) bei RT abzentrifugiert, luftgetrocknet und in 25 µl H₂O_{DEPC} aufgenommen. Zur weiteren Säulenaufreinigung wurden die RNA Proben zu je 100 µl vereinigt. Die Säulenaufreinigung erfolgte mit dem RNeasy MinElute Cleanup-Kit (Qiagen) gemäß Herstellerangaben. Schließlich wurde die RNA zweimal mit je 15 µl H₂O_{DEPC} eluiert, die Konzentration photometrisch bestimmt und die Quantität und Qualität der totalen RNA in einem Agarosegel überprüft. Die RNA wurde nun für die cDNA-Synthese verwendet.

2.2.6.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese für die *in vitro*-Transkription und Biotin-Markierung von cRNA wurde mit dem SuperScript Double-Stranded cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden je drei parallele Reaktionsansätze pro Genotyp (Kontrolle/Mutante) durchgeführt. Der Reaktionsansatz für die Erststrangsynthese enthielt 1 µl 100 µM Oligo-(dT)₂₄-T7 Primer (MWG, Ebersberg) und 8 µg gesamte RNA aus der Säulenaufreinigung (s. 2.2.6.1). Der Ansatz wurde mit H₂O_{DEPC} auf 12 µl aufgefüllt und 10 min bei 70°C erhitzt. Dann wurden 4 µl 5x Erstrangpuffer, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTPs und nach einer Inkubation von 2 min bei 42 °C, 1 µl Superscript III RT (Invitrogen) zugegeben. Die Erststrangsynthese erfolgte für 2 h bei 42 °C.

Das Produkt wurde auf Eis gekühlt. Für die Zweitstrangsynthese wurde zum Probenvolumen der Erststrangsynthese 91 µl H₂O, 30 µl 5x Zweitstrangpuffer, 3 µl 12,5 mM dNTPs, 1 µl *E.coli* DNA Ligase, 4 µl *E.coli* Polymerase, 1 µl RNase H gegeben und 2 h bei 16°C inkubiert. Nun wurden 2 µl T4 DNA Polymerase zugegeben, für 5 min bei 16°C inkubiert und die Reaktion mit 10 µl EDTA abgestoppt.

Für die Aufreinigung der cDNA wurden 162 µl Phenol-Choroform-Isoamylalkohol zum Reaktionsansatz gegeben, kurz gemischt und in ein vorbereitetes Reaktionsgefäß mit Phase Lock Gel (Eppendorf) gegeben. Dann wurde 2 min mit 14000 rpm in einer Tischzentrifuge (Centrifuge 5417; Eppendorf) zentrifugiert, die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die cDNA mit 0,5 Volumen 7,5 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumen von -20°C kaltem 100% Ethanol gefällt. Die cDNA wurde 2 min mit 14000 rpm pelletiert, mit 80% Ethanol gewaschen, 2 min mit 14000 rpm abzentrifugiert, luftgetrocknet und in 12 µl H₂O_{DEPC} eluiert. Nach Überprüfung der Qualität und Quantität der cDNA Proben in einem Agarosegel, wurden diese zur Herstellung Biotin-markierter cRNA verwendet.

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

Die *in vitro*-Transkription und Biotin-Markierung von cRNA erfolgte mit der aufgereinigten cDNA (s. 2.2.6.2) und dem IVT Labeling Kit (Affymetrix, High Wycombe, UK). Ein Reaktionsansatz enthielt 10 µl cDNA Lösung, 2 µl 10x Labeling Puffer, 6 µl IVT NTP-Mix, 2 µl IVT Enzym-Mix und wurde ca. 16 h bei 37°C inkubiert. Die Biotin-markierte cRNA wurde danach mit dem GeneChip Sample Cleanup Module (Affymetrix) aufgereinigt und mit 21 µl H₂O eluiert. Anschließend wurden die Konzentration und die

Fragmentgrößen photometrisch bzw. elektrophoretisch bestimmt und je 15 µg cRNA für die Hybridisierung von Microarrays eingesetzt.

2.2.6.4 Microarray-Hybridisierung

Die Biotin-markierte cRNA wurde gemäß Herstellerangaben auf Affymetrix MOE430 2.0 Microarrays hybridisiert. Die Hybridisierung der cRNA und die Aufzeichnung der Hybridisierungsergebnisse wurden als Dienstleistung von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Norbert Hübner (Experimentelle Genetik von Herz-Kreislaufkrankungen, MDC, Berlin) durchgeführt. Die Expressionsdaten, bestehend aus den Hybridisierungsintensitäten, wurden im Rahmen dieser Arbeit weiter bearbeitet und analysiert.

2.2.7 Herstellung von Antikörpern

Zur Herstellung von Antikörpern gegen das Bcl11b Protein wurde ein Teil der kodierenden Sequenz von Bcl11b mit Hilfe der PCR amplifiziert und in den bakteriellen Expressionsvektor pET4b (Novagen) kloniert.

Unter Verwendung eines Bcl11b-spezifischen cDNA Klons (IMAGE Klon 4457123, Accession Nr. BC019503.1; RZPD, Berlin) und Bcl11b-spezifischen Primern wurde ein für 173 Aminosäuren kodierender Sequenzabschnitt (AS 462-634) amplifiziert, zunächst in den pGEM-T Easy Vektor kloniert und anschließend in den pET4b Vektor umklontiert.

Der pET4b Vektor kodiert unter anderem die Sequenz für den His6-tag, der für die Aufreinigung des exprimierten Proteins genutzt wird.

His6-Bcl11b wurde mit Hilfe des Bakterienstammes BL21 (DE3)pLysS produziert. Hierfür wurde ein den Vektor enthaltene BL (DE3)pLysS Bakterienklon in Kultur genommen und bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 kultiviert. Anschließend erfolgte die Induktion der Protein-Expression von His6-Bcl11b durch die Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 0,4 mM. Die Bakterienzellen wurden durch Zentrifugation mit 12000 x g bei 4°C geerntet, in Lysis-Puffer resuspendiert, erneut mit 12000 x g bei 4°C zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand der lysierten Zellen abgenommen. Das Protein wurde danach mit einem TALON-Metall-Granulat (Clontech) entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt und die Konzentration nach der Bradford Methode (BioRad) nach den Herstellerhinweisen bestimmt. Das Molekulargewicht des aufgereinigten Proteins wurde außerdem in einem SDS-Polyacrylamid-Proteingel (Mini Protean II; Biorad) überprüft. Das aufgereinigte Bcl11b Protein wurde als Antigen zur

Antikörper-Produktion in Kanninchen und Meerschweinchen verwendet und erfolgte durch Charles River (Sulzfeld).

2.2.8 Präparation von Mausgewebe

Zur Gewinnung von Gewebe pränataler Stadien wurde zur Abschätzung des Alters der Embryonen am Tag des Vaginalpfropfens beim Weibchen 12:00 als 0,5 d nach Koitus/der Embryonalentwicklung (E0.5) angenommen. Schwangere Weibchen wurden durch Rückratsdislokation getötet, E15.5-E18.5 Embryonen dem Uterus entnommen, schnell in eiskaltes PBS überführt und präpariert. E18.5 Embryonen wurden dem Weibchen entnommen, zur Spontanatmung animiert und dabei trocken und warm gehalten, bevor sie präpariert wurden. Während der Präparation erfolgte eine genaue Bestimmung des Entwicklungsstadiums der Embryonen anhand der Größe und anatomischer Kriterien.

Zur Gewinnung von Gewebe postnataler Stadien erfolgte meist eine Vorfixierung des Gewebes vor der Präparation durch eine Perfusion der Tiere mit eiskalter PFA-Lösung (4% PFA in 0,1M Phosphatpuffer). Hierfür wurden die Tiere mit Chloroform getötet und sofort danach der linke Ventrikel mit einer Kanüle punktiert sowie der rechte Vorhof des Herzens mit einer Pinzette vorsichtig geöffnet. Mit Hilfe einer Pumpe und einer im linken Ventrikel platzierten Infusionskanüle wurde zunächst das Blut des großen Kreislaufs mit ca. 20 ml eiskaltem PBS herausgespült und anschließend das Gewebe mit ca. 20-30 ml PFA-Lösung perfundiert. Danach wurden die Tiere dekapitiert und das Gehirn in eiskaltem PBS präpariert.

2.2.9 Histologische Methoden

2.2.9.1 Herstellung von Methacrylatschnitten

Zur histologischen Analyse wurden die präparierten Gewebestücke in Hydroxyethylmethacrylat (Technovit 7100, kaltpolymerisierender Kunststoff; Heraeus-Kulzer, Wehrheim) eingebettet. Hierfür wurden die Präparate 2 Tage in 4% PFA in PBS vorfixiert und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 1 Tag 25%, 50%; 75%, 95%, 99% und 3 Tage 100%) schrittweise dehydriert. Danach erfolgte eine Präinfiltration des Gewebes in 1:1 100% Ethanol: Technovit 7100 bei 4°C für einen Tag, bevor es für mindestens 2 Tage in Vorbereitungslösung (100 ml Technovit 7100 mit 1g Härter I) bei RT infiltriert wurde. Das Einbetten der Präparate fand in 15:1

Vorbereitungslösung: Härter II statt. Nach dem Auspolymerisieren des Kunststoffes über Nacht wurden die Präparate mit Technovit 3040 auf Histoblöcke fixiert und bis zum Schneiden bei RT aufbewahrt. Es wurden 5 µm Semidünnschnitte mit einem Rotationsmikrotom (Microm HM360, Walldorf) angefertigt, die in einem warmen Wasserbad gestreckt, auf Objektträger (Roth, Karlsruhe) aufgezogen und auf einem Heizblock getrocknet wurden.

2.2.9.2 Kresylviolett-Färbung von Methacrylatschnitten

Zur Kresylviolett-Färbung (Kernfärbung; klassischen Nisseltechnik) von Methacrylatschnitten wurden die Semidünnschnitte für 30-45 min bei RT auf einem Schüttler in Kresylviolett-Färbelösung (0,02% Kresylviolett in 0,2 M Walpole-Puffer) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte kurz in fließendem Wasser gespült bevor sie für maximal 15 s in 70% Ethanol gewaschen wurden, um Hintergrundfärbung zu reduzieren. Danach wurden die Schnitte sofort 3x 10 min mit VE-Wasser und 3x 10 min mit MilliQ H₂O gewaschen. Die Schnitte wurden über Nacht getrocknet und mit Entellan (Merck, Darmstadt) und Deckgläschen eingedeckt.

2.2.9.3 Herstellung von Gefrierschnitten

Auf Gefriergewebeschnitten wurden immunhistologische Färbungen oder *in situ*-Hybridisierungen durchgeführt.

Zur Herstellung von Gefriergewebeschnitten wurden die frisch präparierten Gewebestücke je nach Größe 1.5 – 3 h in 4% PFA in Phosphatpuffer bei 4°C nachfixiert. Anschließend wurde das Gewebe für mindestens 3x 10 min mit PBS gewaschen, bevor es zur Kryoprotektion in 30% D(+) Saccharose in Phosphatpuffer bei 4°C inkubiert wurde. Dann wurde das Gewebe kurz in Tissue-Tek O.C.T Compound (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) geschwenkt, in eine Peel-A-Way Einbettform (Thermo) mit Tissue Tek überführt und ausgerichtet. Die Präparate wurden anschließend in einer Mischung aus Ethanol und Trockeneis eingefroren und bei -70°C gelagert.

Die Gefrierschnitte wurden mit einem Kryostaten (Microm HM560 Cryo-Star; Microm Walldorf) bei einer Blocktemperatur von -18 bis -23 °C angefertigt. Die Schnittdicke betrug 12-20 µm. Die Schnitte wurden auf Adhäsions-Objektträger (Histobond, Marienfeld) aufgezogen, bei 37°C getrocknet und dann feuchtigkeitsgeschützt und luftdicht bei -80°C gelagert.

2.2.9.4 Immunhistologie auf Gewebeschnitten

Am ersten Tag der Immunhistologie auf Gefrierschnitten wurden die Schnitte 1-2 h bei RT aufgetaut, mit einem Fettstift umrandet und 3x 10 min in einer Glasküvette in PBT-X (PBS mit 1% TritonX-100) bei RT inkubiert. Danach wurde 1h bei RT in einer Feuchtkammer in Blockierungslösung I (10% Pferde-Serum in PBT-X) blockiert, bevor die Inkubation der Primär-Antikörper (s. 2.1.6) in Blockierungslösung II (5% Pferde-Serum in PBT-X) üN bei 4°C in der Feuchtkammer erfolgte.

Am zweiten Tag wurden die Schnitte 3x 10 min in Blockierungslösung II gewaschen und anschließend für 1 h bei RT mit dem Sekundär-Antikörper (s. 2.1.6) in Blockierungslösung II inkubiert. Danach wurden die Schnitte 3x 10 min mit PBT-X bei RT in einer Glasküvette gewaschen. Der letzte Waschschrift erfolgte mit PBS.

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Objektträger mit den gefärbten histologischen Schnitten zum Schluß mit Immunomount (Shandon, Frankfurt) und Deckgläschen eingedeckt.

Bei Immunhistologien auf „free-floating“ Gewebeschnitten (40 µm Vibratomschnitte) erfolgte die Inkubation mit dem Primär-Antikörper 48 h bei 4°C und die Inkubation der Sekundär-Antikörper für 4 h bei RT. Bevor die Schnitte auf Objektträger gezogen und mit Immunomount eingedeckelt wurden, wurden die gefärbten Schnitte nochmals üN bei 4°C in 4% PFA in 0,1 M Phosphatbuffer nachfixiert.

2.2.9.5 Detektion von Zellproliferation und Apoptose

Die Quantifizierung mitotisch aktiver und apoptotischer Zellkerne erfolgte auf Gefriergewebeschnitten.

Zum Nachweis mitotisch aktiver, proliferierender Zellen wurde den Mäusen bzw. schwangeren Maus-Weibchen BrdU (2-Bromo-5-desoxyuridin) intraperitoneal injiziert (50 bzw. 75 µg BrdU/g Körpergewicht in 0,09% NaCl) und die Gehirne 2h nach der Injektion präpariert. BrdU ist ein Thymidin-Analogon, das während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA sich teilender Zellen integriert wird und mittels eines BrdU-Antikörpers immunhistologisch in den Zellkernen nachgewiesen werden kann.

Hierfür wurden die von den präparierten Gehirnen angefertigten Gefriergewebeschnitte zunächst dreimal 5 min mit PBS gewaschen, bevor eine Nachfixierung der Schnitte für 5 min in 4% PFA in 0.1M Phosphatpuffer bei RT erfolgte. Anschließend wurden die Schnitte dreimal 5 min mit PBS gewaschen und für 30 min bei 37°C in 2.4 M HCl

inkubiert. Danach wurde wieder dreimal 5 min mit PBS gewaschen und 1h in Blockierungslösung (10% Ziegen-Serum in PBT-X) bei RT blockiert. Dann erfolgte die Inkubation des BrdU-Antikörpers in 5% Ziegen-Serum in PBT-X üN bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen, bevor die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper für 1h bei RT erfolgte. Schließlich wurde wieder dreimal 5 min mit PBS gewaschen und die Schnitte mit Immunomount und Deckgläschen eingedeckelt. Die Detektion von Apoptosen erfolgte durch Nachweis von DNA-Fragmentierung (= TUNEL Färbung; Gavrieli *et al.*, 1992) mit Hilfe des „Apop Taq Plus, Fluorescein in situ Apoptosis Detection Kits“ (Intergen, Gaithersburg, MD 20877, USA).

2.2.9.6 Herstellung von Vibratomschnitten

Vibratomschnitte wurden von präparierten Gehirnen für β -Galaktosidase-Färbungen (X-Gal), Golgi-Färbungen, Immunhistologien, nach Whole Mount *in situ*-Hybridisierungen sowie von präparierten Gehirnen aus den transgenen Thy1-YFP Mäusen angefertigt. Nach Whole-Mount *in situ*-Hybridisierungen wurden die Präparate in eine Peel-A-Way Einbettform (Thermo) mit flüssiger 20% Gelatine in PBS (ca. 55°C) überführt, ausgerichtet und die Einbettform dann zum Aushärten der Gelatine auf Eis gegeben. Die Gelatine-Blöcke wurden anschließend für 1-2 Tage in 4% PFA in PBS bei 4°C fixiert und dann in PBS bei 4°C gewaschen und gelagert. Die Gewebepräparate von den *Thy1*-YFP Mäusen sowie für die Golgi-Färbungen, X-Gal Färbungen und Immunhistologien wurden in flüssiger 4% Low-melt-Agarose (ApliChem, Darmstadt) in PBS in Peel-A-Way Einbettförmchen eingebettet und nach erfolgter Aushärtung der Agarose direkt ohne Nachfixierung geschnitten. Es wurden Schnitte mithilfe des Vibratoms (Leica VT1000S, Bernsheim) im Bereich von 30 bis 150 μ m angefertigt. Diese wurden entweder auf Objektträger (Roth) aufgezogen, kurz getrocknet und mit Immunomount (Shandon, Frankfurt) und Deckgläschen eingedeckelt oder für die folgende Färbung (X-Gal- und Golgi- Färbung, Immunhistologien) als „free-floating“ Schnitte in PBS bzw. H₂O auf Eis gesammelt.

2.2.9.7 Histologische Färbung für β -Galaktosidase

Der β -Galaktosidase-Nachweis (X-Gal-Färbung) wurde sowohl auf Vibratomschnitten (Gehirne postnataler Stadien) als auch als Whole-Mount-Färbung (embryonale Stadien) angewendet. Zur Fixierung der Gehirne postnataler Stadien wurden die Mäuse mit einer

Fixierungslösung (1% PFA, 0,2% Glutaraldehyd, 2 mM MgCl₂, 5mN EGTA in PBS) perfundiert und die präparierten Gehirne danach bei 4°C üN weiter fixiert. Das Gewebe wurde dreimal für 15 min mit PBS gewaschen, bevor 60 µm dicke Vibratonschnitte angefertigt wurden. Gehirne embryonaler Stadien (E 15.5) wurden 45 min bei 4°C fixiert. Die Vibratonschnitte bzw. Gehirne wurden anschließend dreimal 20 min mit 0,02% NP40 (Sigma) in PBS gewaschen, bevor das Gewebe üN bei RT lichtgeschützt in einer X-Gal-Färbelösung inkubiert wurde. Die Färbung wurde durch Waschen mit PBS gestoppt. Von den gefärbten Whole-Mount Gewebstücken wurden schließlich nach Einbettung in 20% Gelatine in PBS, 60 µm dicke Vibratonschnitte angefertigt.

2.2.9.8 Golgi-Färbung

Zur Analyse der Morphologie von Neuronen wurden Golgi-Färbungen mit dem FD Rapid GolgiStain Kit von FD NeuroTechnologies (Ellicott City, MD 21041, USA) nach Herstellerangaben angefertigt. Die präparierten Gehirne adulter Tiere wurden kurz mit H₂O gespült und für 2 Wochen in einer Imprägnierungslösung A bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine lichtgeschützte Inkubation des Gewebes für mindestens 48 h bei 4°C in Lösung C, bevor 150 µm dicke Vibratonschnitte von den Gehirnen angefertigt wurden. Die Schnitte wurden zweimal 2 min mit H₂O gespült und für 10 min bei RT in einer Färbelösung inkubiert. Danach wurden die Schnitte zweimal 4 min mit H₂O gewaschen, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 4 min 50%, 75%, 95% Ethanol) dehydriert und dreimal 4 min in Xylol inkubiert. Schließlich wurden die Gewebeschnitte auf Objektträger gezogen und mit Entellan und Deckgläschen eingedeckelt.

2.2.10 *In situ*-Hybridisierung

2.2.10.1 *In situ*-Hybridisierung auf Gefrierschnitten

Am ersten Tag der *in situ*-Hybridisierung auf Gefrierschnitten wurden die Schnitte 1-2 h bei RT aufgetaut, mit einem Fettstift umrandet, dann in eine Küvette überführt, 10 min in 4 % PFA in PBS_{DEPC} bei RT nachfixiert und dreimal 5 min mit PBS_{DEPC} gewaschen. Danach wurde 10 min in Acetylierungspuffer acetyliert und dreimal 5 min mit PBS_{DEPC} gewaschen. Die Schnitte wurden schließlich 1,5-3 h in 600 µl Hybridisierungslösung in einer Feuchtkammer bei RT prähybridisiert. Währenddessen wurden Deckgläschen silanisiert; sie wurden kurz in Sigmacote getaucht, 20 min getrocknet, kurz mit Ethanol gewaschen und 5 min getrocknet. Vor der Hybridisierung wurden 3 µl der DIG-markierten

RNA-Sonde 5 min in 150 µl Hybridisierungslösung bei 80°C denaturiert und die Lösung danach schnell abgekühlt. Die Prähybridisierungslösung wurde schließlich von den Schnitten entfernt und die Hybridisierungslösung mit Sonde aufgetragen. Die Objektträger wurden nun mit einem silanisierten Deckgläschen bedeckt und üN in einer Feuchtkammer (mit 5x SSC/50 % Formamid) bei 70°C hybridisiert.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger in eine Küvette überführt und die Deckgläschen 5 min in 5x SSC bei RT abgelöst. Es wurde danach zweimal 30 min mit 0,2x SSC bei 70°C stringent gewaschen. Anschließend wurde 5 min mit 0,2x SSC bei RT gewaschen und 5 min in B1-Puffer umgepuffert. Vor der Inkubation mit dem anti-DIG-Antikörper, an den AP gekoppelt war, wurden die Schnitte 1 h in 1 ml B1-Puffer mit 10 % Ziegen Serum (Blockierungslösung) in einer Feuchtkammer bei 4°C vorinkubiert. Danach wurde die Blockierungslösung entfernt und die Schnitte üN in 600 µl 1:2500 anti-DIG-Antikörper in B1-Puffer mit 10 % Ziegen Serum bei 4°C inkubiert.

Am dritten Tag wurden die Objektträger wieder in Küvetten überführt, dreimal 10 min mit B1-Puffer bei RT gewaschen und 5 min in NTMT-Puffer bei RT umgepuffert. Anschließend wurden die Schnitte in die Färbelösung mit je 0,1 µl/ml NBT und BCIP in NTMT-Puffer gegeben und mehrere Tage lichtgeschützt bei 4°C inkubiert bis die gewünschte Färbungsintensität erreicht war. Die Lösung wurde dabei täglich gewechselt. Zum Schluss wurde dreimal mit H₂O gewaschen und die Objektträger mit Immunomount und Deckgläschen eindeckt.

2.2.10.2 Whole Mount *in situ*-Hybridisierung

Das präparierte Gewebe wurde üN bei 4°C in 4% PFA in PBS_{DEPC} fixiert und am nächsten Tag dreimal mit PBT gewaschen. Anschließend wurde das Gewebe durch eine aufsteigende Methanol-Reihe (je 15 min in 25%, 50%, 75% in PBT und zweimal 100%) bei 4°C dehydriert. Um den Hintergrund bei der späteren Färbung zu reduzieren, wurden die Präparate in 4:1 Methanol:H₂O₂ für 1 h bei -20°C gebleicht. Danach wurde das Gewebe dreimal mit Methanol gewaschen und konnte bis zur *in situ*-Hybridisierung bis zu einige Monate bei -20°C gelagert werden.

Am ersten Tag der Whole Mount *in situ*-Hybridisierung wurden die Präparate in kleine Glasfläschchen (3 ml Volumen) überführt, in einer Methanolreihe (je 15 min in 75 %, 50 %, 25 % Methanol in PBT) bei 4°C rehydriert und dreimal 15 min mit PBT bei 4°C gewaschen. Anschließend wurde das Gewebe 20 min in 20 µg/ml Proteinase K in PBT bei

RT verdaut. Danach wurden die Präparate 20 min in 0,2 % Glutaraldehyd/4 % PFA in PBS_{DEPC} refixiert und dreimal 15 min mit PBT gewaschen. Dann wurde 15 min in Hybridisierungslösung umgepuffert 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. Sodann wurde die Sonde auf die Präparate in Hybridisierungslösung gegeben und üN bei 65°C hybridisiert. Am nächsten Tag wurden die Präparate zweimal 40 min mit Lösung I bei 65°C gewaschen, dann z. T. 15 min in 1:1 Lösung I:Lösung II bei 65°C und dreimal 15 min in Lösung II bei RT umgepuffert. Weiterhin optional wurde die unspezifische Bindung der Sonde mit einem Verdau in 50 µg/ml RNase A in Lösung II für zweimal 30 min bei 37°C weiter reduziert. Immer wurde danach dreimal 1 h mit Lösung III bei 62°C stringent gewaschen und anschließend dreimal 15 min in TBST bei RT umgepuffert. Vor der Inkubation mit dem anti-DIG-Antikörper, an den AP gekoppelt war, wurden die Schnitte 1 h in TBST mit 20 % Ziegen Serum (Blockierungslösung) vorinkubiert. Währenddessen wurde ein kleiner Laborlöffel Embryopulver 30 min in 4 ml TBST bei 65°C hitzeinaktiviert. Das Embryopulver wurde 5 min mit 5000 rpm in einer Bodenkühlzentrifuge (Heraeus Varifuge 3.0 OR; Thermo) bei RT pelletiert und der Überstand verworfen. Danach wurden 0,75 ml TBST mit 5 % Ziegen Serum und der Antikörper 1:500 zugegeben, mit dem Embryopulver vermischt und 1 h bei 4°C präadsorbiert. Das Embryopulver wurde wieder 5 min mit 5000 rpm bei 4°C pelletiert und der Überstand 1:4 mit TBST und 5 % Ziegen Serum verdünnt. Die Blockierungslösung wurde abgenommen und die Präparate üN mit anti-DIG-Antikörper 1:2000 in 3 ml TBST mit 5 % Ziegen Serum 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 üN mit TBST bei 4°C gewaschen. Am vierten Tag wurden die Präparate zweimal 45 min in AP-Puffer bei RT umgepuffert und anschließend wurde die filtrierte Färbelösung mit je 0,035-0,35 µl/ml NBT und BCIP in AP-Puffer zugegeben. Die Präparate wurden mehrere Tage lichtgeschützt bei 4°C in der Lösung inkubiert, bis die gewünschte Färbungsintensität erreicht war. Die Lösung wurde täglich gewechselt und ihre Konzentration an die gewünschte Reaktionsgeschwindigkeit angepasst. Zum Schluss wurde zweimal in AP-Puffer und dreimal mit PBS gewaschen. Die Präparate wurden danach üN in 4 % PFA in PBS bei 4°C postfixiert, zweimal mit filtriertem PBS gewaschen und darin bei 4°C gelagert.

2.2.10.3 Herstellung von Embryopulver

Das Embryopulver diente der Präadsorption des Anti-DIG-Antikörpers, der in *in situ*-Hybridisierungen eingesetzt wurde. Es wurde aus Mausembryonen der Stadien E10.5-E13.5 hergestellt, die nach der Präparation bei -20°C eingefroren wurden. Je nach Größe wurden 10-20 Embryonen in einem möglichst kleinen Volumen von eiskaltem PBS homogenisiert. Danach wurden 4 Volumen eiskaltes Aceton zugegeben und die Suspension 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Präzipitat 10 min mit 10000 x g in einer Bodenkühlzentrifuge (Heraeus Varifuge 3.0 OR; Thermo) bei 4°C pelletiert, mit eiskaltem Aceton gewaschen und erneut pelletiert. Das Präzipitat wurde nun luftgetrocknet, fein gemörsert und bei -20°C gelagert.

2.2.11 Verhaltensexperimente

2.2.11.1 Untersuchung des emotionalen Verhaltens – Open Field-Test

Der Open Field-Test dient zur Erfassung der motorischen Aktivität und des Erkundungsverhaltens der Mäuse mit emotionaler Komponente.

Das Open Field besteht aus einer 1x1 m großen Plattform mit einem 15 cm hohen Rand. Auf dem Boden dieser Plattform sind Linien aufgezeichnet, die die Fläche in Quadrate aufteilen. Die Tiere wurden einzeln in diesen Bereich gesetzt und durften sich dort frei bewegen. Sie wurden dabei in keiner Weise behindert. Das Erkundungsverhalten der Tiere wurde beobachtet und Verhaltensweisen wie „leaning“ (aufrichten auf den Hinterpfoten, wobei mindestens eine Vorderpfote die Wand berührt) und „rearing“ (Aufrichten auf den Hinterbeinen im freien Feld, ohne dass die Wand berührt wird) protokolliert. Als lokomotorische Aktivität wurde die Anzahl der überlaufenden Linien auf dem Boden der Plattform dokumentiert. Der Beobachtungszeitraum pro Tier betrug 10 Minuten.

Mit diesem Experiment erhält man auf eine einfache und schnelle Weise Verhaltensdaten, die sich aufgrund des komplexen Verhaltens allerdings aus den unterschiedlichen Komponenten wie Motivation, Exploration, Stress, Furcht und räumlichem Lernen zusammensetzen können.

2.2.11.2 Untersuchung der kognitiven Fähigkeiten – Radiallabyrinth

Im 8-Arm-Radiallabyrinth wurden die Mäuse im Alter von 10-11 Wochen für 8 Tage auf räumliches Lernen trainiert. Zunächst wurde das Ausgangskörpergewicht festgestellt. In den folgenden 2 Tagen erhielten die Tiere nur soviel Futter, dass das Körpergewicht um

10-12 % reduziert wurde. Dies ist notwendig, um die Tiere zum Lernen zu motivieren. Während des gesamten Verhaltensexperimentes wurden die Tiere einzeln gehalten, und das Körpergewicht blieb auf 88-90 % des Ausgangsgewichts.

Das Radiallabyrinth besteht aus einer Plattform mit einem zentralen Raum, von dem aus sternförmig 8 identische Plexiglas-Arme abgehen, an deren Ende eine Futterbelohnung hinter einem Sichtschutz versteckt war. Aufgabe der Tiere war es, diese Belohnungen einzusammeln und zu fressen. Dabei sollte jeder Arm möglichst nur einmal betreten werden. Als Hilfe wurden den Tieren außerhalb des Labyrinths Markierungen gezeigt, die die Orientierung im Raum erleichtern sollten. Die Position des Radiallabyrinths im Raum sowie die Orientierungshilfen wurden während der gesamten Dauer des Experiments nicht verändert. Die eigentliche Testdauer betrug 5 Tage. An den ersten beiden Tagen davor erfolgte je ein Habituationstrial von 10 Minuten, in dem die Tiere in alle Arme des Labyrinths laufen und das am Ende eines jeden Arms liegende Futter (mehrere größere Pellets) fressen durften. Ab dem dritten Tag erfolgte das eigentliche Training. Am Ende jedes Armes lag ab diesem Tag ein kleines Futterpellet als Belohnung versteckt. Das Trial lief jeweils so lange, bis das Tier alle Pellets gefressen hatte, maximal bis zu einer Testdauer von 15 Minuten am Tag 1-2 bzw. 10 min. am Tag 3-5. Während des Tests wurden folgende Parameter protokolliert: Gewicht des Tieres, Reihenfolge der betretenen Arme bzw. Fressen der Belohnungen, Laufzeit. Als Kriterium für das Betreten der Arme galt die Überschreitung der Grenze zwischen dem zentralen Raum und dem Arm mit allen vier Pfoten. Zur Bewertung der räumlichen Lernfähigkeit bzw. des Arbeitsgedächtnisses wurden aus den protokollierten Parametern die Anzahl der fehlerhaft doppelt besuchten Arme („working memory“ Fehler) sowie die Anzahl neu besuchter Arme innerhalb der ersten 8 Eintritte („new entries“) abgeleitet.



Abb.2-1 Das 8-Arm-Radiallabyrinth zur Untersuchung der kognitiven Fähigkeiten der Mäuse.

2.2.11.3 Untersuchung der Höhenfurcht – Elevated Plus Labyrinth

Das Elevated Plus Labyrinth besteht aus 4 Armen (5 cm x 30 cm), von denen 2 mit einer seitlichen, ca. 40 cm hohen Wand versehen sind. Die beiden anderen Arme sind ungeschützt. Die Lauffläche befindet sich ca. 75 cm über dem Boden. Die Tiere wurden einzeln in die Mitte dieses Labyrinths gesetzt und es wurde sowohl die Zeit gemessen, die die Tiere in den geschützten und den ungeschützten Armen verbrachten als auch die Anzahl der Betretungen der offenen bzw. geschlossenen Arme protokolliert. Wie im Open Field-Test wurden auch hier die Tiere nicht beeinflusst und konnten ihren Aufenthaltsort frei wählen. Der Beobachtungszeitraum pro Tier betrug 10 Minuten.

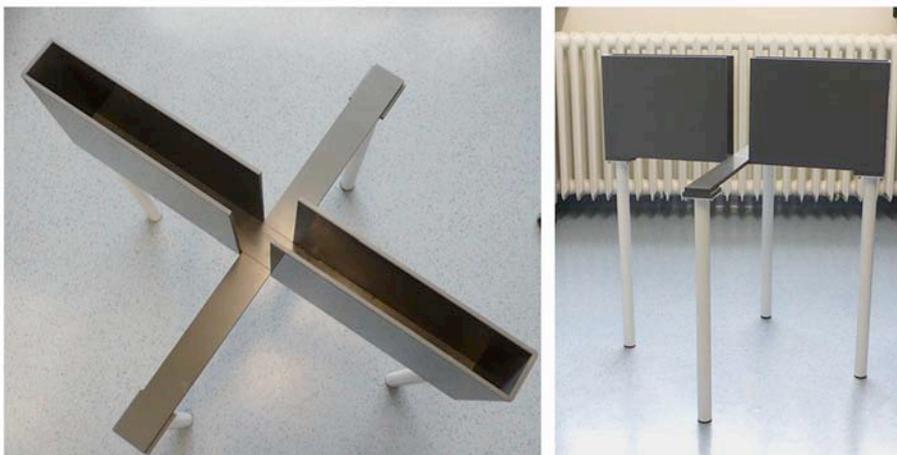


Abb.2-2 Das Elevated Plus Labyrinth zur Untersuchung der Höhenfurcht der Mäuse.

Die Durchführung der Verhaltensexperimente erfolgte mit der fachlichen Unterstützung von Prof. Dr. H. Schwegler (Universität Magdeburg).

2.2.12 Datenanalyse

2.2.12.1 Dokumentation histologischer Daten

Die Dokumentation histologischer Daten erfolgte mittels Licht- oder Fluoreszenzmikroskopie. Die Lichtmikroskopie von Schnitten erfolgte an einem aufrechten Mikroskop (Axiophot; Zeiss, Oberkochen) ausgestattet mit Kamera (Axiocam HRc; Zeiss) und der Axiovision AC Software Version (Vers.) 4.5 (Zeiss). Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte an einem Laser Scanning Mikroskop (LSM 5 Pascal; Zeiss) mit der LSM 5 Pascal Software Vers. 3.2 (Zeiss). Die generierten Bilder wurden mit Photoshop Vers. 8 (Adobe, München) bearbeitet.

2.2.12.2 Zellzahlen

Zellzahlen wurden auf Bildern von histologischen bzw. immunhistologischen Färbungen bestimmt, auf denen Zellen mit einem spezifischen Signal erkannt und ausgezählt wurden. Es wurden mindestens drei unabhängige Schnitte von mindestens drei verschiedenen Mäusen jeden Genotyps ausgezählt.

2.2.12.3 Statistik und Expressionsanalyse mittels Microarrays

Zellzahlen und -proportionen wurden mit Excel Vers. X (Microsoft, Unterschleißheim) statistisch ausgewertet und dargestellt. Die Berechnung der Signifikanz von beobachteten Differenzen erfolgte mit einem T-Test für eine zweiseitige Verteilung und eine ungleiche Varianz zweier Proben. Unterschiede wurden als signifikant betrachtet, wenn der p -Wert $< 0,05$ war. Bei der Expressionsanalyse mittels Microarrays zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene wurden die Rohdaten der Microarray-Hybridisierung mit der Basisinstallation der Software Bioconductor (Gentleman *et al.*, 2004) ausgewertet, die 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 dann mit dem gcrma-Modul (Zhijin *et al.*, 2004) normalisiert. Sonden mit geringer Varianz der Expression über alle Microarrays wurden herausgefiltert und differentiell 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.