

2 Material

2.1 Tierstämme

wildtyp Tierstämme:

Mus musculus, Naval Medical Research Institute (NMRI)-Wildtyp, Charles River

Gallus gallus, (befruchtete Hühnereier, SPF), Charles River, Sulzfeld

transgene Mausstämme:

Ihh -/- (St-Jacques et al. 1999)

Col-II-GAL4, UAS-Ihh (Long et al. 2001; Minina et al. 2001)

2.2 Zelllinien

Huhn Fibroblasten Zellen DF-1, ATCC, Rockville, USA

2.3 Bakterienstämme

DH5 α , Invitrogen, Groningen, NL

TOP10, Invitrogen, Groningen NL

2.4 Plasmid-Vektoren

2.4.1 Klonierungsvektoren

pBluescript II KS (+) Stratagene, La Jolla, CA

pGEM-T easy, Promega

pCR 2.1, Invitrogen

2.4.2 Vektoren zur *in-ovo*-Genmißexpression

pSlax, Labor C. Tabin, Boston, USA (Logan und Tabin 1998)

RCAS BP (A), Labor C. Tabin, Boston, USA (Logan und Tabin 1998)

2.4.3 Vektoren zur Herstellung von Hybridisierungsproben

Für die Herstellung von Hybridisierungsproben für *in-situ* Hybridisierung, Northern oder Southern Blot und RNase-Protection Assay (RPA) wurden die o.g. Klonierungsvektoren verwendet.

2.5 I.M.A.G.E.-Klone

Alle I.M.A.G.E.-Klone wurden vom RZPD (Ressourcen-Zentrum Primär-datenbank), Berlin bezogen.

2.6 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von den Firmen TibMol Biol (Berlin) und MWG Biotech (Martinsried) bezogen.

<u>Name</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Verwendung</u>
PMP22-5' BbsI:	5'-CAACTCGAAGACACCATGCTCC-3'	RCAS-Klonierung
PMP22-3' EcoRI:	5'-CTCAGGAATTCGACGGACGGTG-3'	RCAS-Klonierung
TSG-5' BbsI	5'-GAAGACACCATGAAGTCACACTATATTG-3'	RCAS-Klonierung
TSG-3' EcoRI	5'-CGAATCTTTAAACATGCAGTTC-3'	RCAS-Klonierung
M13 fw	5'-GTTTTCCAGTCACGACG-3'	Seq. / Insertampl.
M13 rv	5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'	Seq. / Insertampl.
RPA-ST1D11	5'-CCCTCTTCTCCATTCCTC-3'	RPA
RPA-ST1E7	5'-TGTGGTTAAGTGGGAAGC-3'	RPA
RPA-ST1B7	5'-TTCCTGAGGAGGAGGAAC-3'	RPA
RPA-CT3F4	5'-GGCATGTGGAACAGGTAG-3'	RPA
RPA-CT3H8	5'-ACTGGTGAAGGGGATAGC-3'	RPA
RPA-CT3F10	5'-CTGGGGTGATCATTGTTG-3'	RPA
RPA-CT3F9	5'-TTCTCCATCTCCTTGACAG-3'	RPA
RPA-ST2G6	5'-AGCTCTCTGGCAAGATCC-3'	RPA
RPA-ST3C7	5'-CAAAGTGTGGGGACAAAC-3'	RPA
RPA-CT1F2	5'-AGTTCCATTGTGGGTTTG-3'	RPA
RPA-CT2A6	5'-GTTTCAAGGCCACAGATG-3'	RPA
RPA-CT2G8	5'-TCAAAGAGCTTGGTGATG-3'	RPA
RPA-CT2G3	5'-GTGCAGAGCAGAGGTGTC-3'	RPA
RPA-ST1C8	5'-CACCACAGAGAGGCTGAG-3'	RPA
RPA-ST1H3	5'-TGAACGTTTTGCATCCTC-3'	RPA
RPA-CT2D11	5'-TGGATGGCACTTTAATCC-3'	RPA
RPA-ST3C12	5'-AAGTGGCTTCTCTCCAC-3'	RPA
RPA-ST2C6	5'-CCGCCTGGTGTATTATTG-3'	RPA
RPA-CT2B4	5'-GCACACTCCTAGGCACAC-3'	RPA
RPA-CT3B7	5'-AAGCCAGTGTGAGTCACG-3'	RPA
RPA-ST2F9	5'-GTGGTCTGGAAGCTCATC-3'	RPA
RPA-CT1H8	5'-TTGAAGAGGAAGCTGCTG-3'	RPA
RPA-ST3A3	5'-TTCGGCTTCAGTTTCAAG-3'	RPA
CoIII-Gal4 FW	5'-CTTCTATCGAACAAGCATGCG-3'	Genotypisierung
CoIII-Gal4 RV	5'-GCCAATCTATCTGTGACGGC-3'	Genotypisierung
UAS-Ihh FW	5'-GGGCGGGCGCTGGCGACGCTG-3'	Genotypisierung
UAS-Ihh RV	5'-CGGGCTGCACGTGGCTG-3'	Genotypisierung
Ihh -/- FW	5'-AGGAGGCAGGGACATGGATAGGGTG-3'	Genotypisierung
Ihh -/- RV	5'-TACCGGTGGATGTGGAATGTGTGCG-3'	Genotypisierung

2.7 Gewebekultur-Medien und Seren

BGJ-B, GibcoBRL, Eggenstein

DULBECCOs, GibcoBRL, Eggenstein

Fötale Kälberserum, GibcoBRL, Eggenstein

Fötale Hühnerserum, GibcoBRL, Eggenstein

Lammserum, GibcoBRL, Eggenstein

2.8 Pufferlösungen

Alle nicht gesondert aufgeführten Pufferlösungen wurden nach (Sambrook et al. 1989) oder (Ausubel et al. 1987-1999) hergestellt.

2.9 Enzyme und Kits

Alle in dieser Arbeit verwendeten und nicht gesondert aufgeführten Enzyme und Kits wurden von folgenden Firmen bezogen: Amersham-Pharmacia, Freiburg; Sigma, Deisenhofen; Qiagen, Hilden; Macherey-Nagel, Düren; Clontech, Palo Alto, USA; Biozym, Hess. Oldendorf. Produkte für die *in-situ*-Hybridisierung stammen von Boehringer Mannheim (Roche-Molecular Biochemicals). SuperScript II Reverse Transcriptase wurde von GibcoBRL, Eggenstein verwendet, Taq DNA-Polymerase Eppendorf, Hamburg und TRIzol Reagens GibcoBRL, Eggenstein.

2.10 Chemikalien

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

2.11 Radiochemikalien

$\gamma^{32}\text{P}$ -dCTP (3000 Ci/mmol) AmershamPharmacia, Freiburg

$\gamma^{33}\text{P}$ -dATP (3000 Ci/mmol) AmershamPharmacia, Freiburg

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

2.12 Antikörper

<u>Name</u>	<u>Verwendung</u>	<u>Veröffentlichung/Hersteller</u>
mAb 5E1-Ascites (Maus IgG1)	Blockade des Ihh-Signalweges und Western Blot	Ericson et al. 1996, DSHB, Iowa, USA
Kontroll-Ascites (Anti-c-Myc IgG1)	Kontrollexperimente	Sigma, Deisenhofen
Ziege anti-Maus (AP-gekoppelt)	Western Blot	Sigma, Deisenhofen

2.13 Supplemente für die Gliedmaßenkultur

<u>Name</u>	<u>Veröffentlichung/Hersteller</u>
ShhN-Protein	Ontogeny, Cambridge, USA
Cyclopamin	W. Gaffield (Incardona et al. 1998)
humanes PTHrP (AS 1-34)	Peninsula, USA

2.14 Software

2.14.1 Bildverarbeitung

Adobe Photoshop 7.0, Canvas 7.0

2.14.2 Textverarbeitung und Layout

Microsoft Word 98 mit EndNote 4.0, Adobe PageMaker 7.0

2.14.4 Sequenzdatenvergleich

Wisconsin Package, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA

Lasergene 5.0, DNASTar, Madison, USA

2.14.4 Webtools

NCBI Blast und PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Celera Genomics (<http://www.celera.com>)

2.14.5 Bildquantifizierung

ImageQuant, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England