

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

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), 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).

#### 2.1.1 Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRF <sup>+</sup>	Jerpseth <i>et al.</i> , 1992
<i>Escherichia coli</i> NS3529	Sternberg und Cohen, 1989
<i>Escherichia coli</i> NS3516	Sternberg und Cohen, 1989

#### 2.1.2 Vektoren

pADSacBII	Sternberg und Cohen, 1989
pBluescript-SK II (+/-)	Sorge, 1988
pGEM-T bzw. pGEM-T Easy	Promega, Mannheim

#### 2.1.3 Mausstämme

Die verwendeten C57Bl/6J-Mäuse stammten aus eigener Zucht bzw. wurden wie die CB6F1-Mäuse (F1-Hybrid aus BALB/c x C57Bl/6N) von Charles River (Sulzfeld).

#### 2.1.4 Nährmedien

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

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Isolierung von Desoxyribonukleinsäuren

#### 2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten

Die Mini-Präparationen von Plasmid-DNA erfolgten durch alkalische Lyse (Birnboim and 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 (McDonell et al. 1977) bzw. mit Hilfe des "QIAEX II Gel Extraction Kit" (Qiagen, Hilden; (Vogelstein and Gillespie 1979).

#### 2.2.1.3 Isolierung genomischer DNA aus embryonalem Gewebe, Ohrlöchern bzw. Schwanzstücken

Dottersäcke oder andere embryonale Gewebe bis zum Stadium E14,5 der Embryogenese wurden in Embryonen-Lyse-Puffer (10mM Tris pH 8,9, 50mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% Gelatine, 0,45% Nonidet P40, 0,45% Tween 20, 100µg/ml Proteinase K), Ohrlöcher und Schwanzstücke junger oder adulter Mäuse dagegen in Ohr-/Schwanz-Lyse-Puffer (100mM Tris pH 8,5, 200mM NaCl, 5mM EDTA, 0,2% SDS, 100µg/ml Proteinase K) für 1h oder über Nacht bei 55°C inkubiert. Darauf erfolgte die Inaktivierung der Proteinase K für 10min bei 95°C. Nach Zugabe von 300µl H<sub>2</sub>O wurde je 1µl dieser verdünnten Lösung für die Genotypisierung in einer PCR-Reaktion eingesetzt.

Die DNA aus Schwanzstücken wurde für die genomische Southern-Analyse präpariert und daher Phenol/Chloroform-extrahiert. Nach Fällung und Waschen der DNA wurde das Präzipitat in 100µl H<sub>2</sub>O/50µg/ml RNase A aufgenommen.

### 2.2.2 Modifikation von Desoxyribonukleinsäuren und Transformation kompetenter Bakterien

Restriktionsverdauung von Plasmid- und genomischer DNA wurden mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen gemäß Standardmethoden durchgeführt (Sambroock). Die Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien erfolgte nach (Inoue et al. 1990).

### 2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion PCR (Saiki et al. 1985) wurde zur Genotypisierung von präparierten Maus-Embryonen bzw. Jungtieren aus der Nachzucht eingesetzt. Die Etablierung der verwendeten PCR-Programme erfolgte dabei in Anlehnung an Standard-PCR-Methoden (Innis et al. 1989). Hier die Liste der verwendeten Genotypisierungs-PCR-Programme inklusive der eingesetzten Primer und MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen:

#### 1. Lbx1

##### a) Wildtyp-Primer, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>

lbx1/HB20: 5'-TCACGCACGGCCTTCACCAACCACCAGAT-3'

lbx1/HB23: 5'-CGGCCCGGATTTATTGCTTCGAAAAGGAA-3'

oder lbx1/HB24: 5'-CCGTACGCCGTTTCAGCATCGAGGACATC-3'

lbx1/HB27: 5'-GAGGCAGGGGGTACGAAGGGCAGGACAC-3'

oder lbx1/HB28: 5'-CGGGCCTGAGTCGGTTGGAGAGTTATGGG-3'

lbx1/HB29: 5'-GCTGCTGGCCCGCTGGTCCGTGAGT-3'

##### b) Mutante-Primer, 2mM MgCl<sub>2</sub>

lbx1/HB24: 5'-CCGTACGCCGTTTCAGCATCGAGGACATC-3'

NLS-as2: 5'-TTGTTTTTCGAGCTTCAAGGTTTCAT-3'

##### c) Programm

95°C	2.30min	} 40x
95°C	30s	
65°C	30s	
72°C	40s	
4°C	∞	

##### d) Produkte

HB20/HB23: 644bp

HB24/HB27: 301bp

HB28/HB29: 559bp

HB24/NLS-as2: 161bp

#### 2. lacZ

##### a) Primer, 3mM MgCl<sub>2</sub>

lacZ-a: 5'-TCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATG-3'  
 lacZ-b: 5'-ATATCCTGATCTTCCAGATAACTGCCG-3'

b) Programm			c) Produkt
94°C	35s	} 38x	463bp
65°C	30s		
72°C	45s		
.....+2s/Zyklus			
4°C	∞		

### 3. GFP

a) Primer, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>

GFP4: 5'-GGCGCGGTCCCAGGTCCAC-3'  
 GFP5: 5'-CTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCC-3'

b) Programm			c) Produkt
95°C	2min	} 35x	373bp
94°C	45s		
66°C	30s		
72°C	30s		
4°C	∞		

#### 2.2.4 Sequenzierung

Sequenzierungen erfolgten nach dem Kettenabbruchverfahren (Sanger et al. 1977); modifiziert von (Tabor and 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:

Sequenzier-Programm

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

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, 37mA, 50W, 50°C analysiert.

## 2.2.5 Radioaktive Markierung von Desoxyribonukleinsäuren

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

## 2.2.6 *In vitro*-Transkription

### 2.2.6.1 Synthese radioaktiv markierter *in vitro*-Transkripte

Die *in situ*-Hybridisierung auf Gewebeschnitten erfolgte mit radioaktiv markierter antisense RNA. Zunächst wurde die Plasmid-Matrize zur Transkriptbegrenzung linearisiert und danach Phenol/Chloroform-extrahiert, gefällt, gewaschen, getrocknet und in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Synthese des *in vitro*-Transkripts fand in folgendem Ansatz für 1h bei 37°C statt:

- 1 $\mu$ l linearisierte Plasmid-DNA (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)
- 2 $\mu$ l 10x Transkriptionspuffer (Roche)
- 2 $\mu$ l je 10mM GTP, ATP (Sigma)
- 0,5 $\mu$ l RNase-Inhibitor (105U/ $\mu$ l, Amersham-Pharmacia)
- 2,5 $\mu$ l  $\alpha$ -<sup>35</sup>S-UTP (12,5mCi/ml, 1250Ci/mmol, Amersham)
- 2,5 $\mu$ l  $\alpha$ -<sup>35</sup>S-CTP (12,5mCi/ml, 1250Ci/mmol, Amersham)
- 8,5 $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O
- 1 $\mu$ l RNA-Polymerase (20U/ $\mu$ l, Roche)

Nach Zugabe von 90 $\mu$ l TE-Puffer, 2 $\mu$ l 0,5M MgCl<sub>2</sub>, 3 $\mu$ l DNase (10U/ $\mu$ l, Roche) wurde das DNA-Template durch Inkubation des Ansatzes für 10min bei 37°C entfernt. Anschließend wurden 100 $\mu$ g tRNA hinzupipettiert, das Volumen auf 200 $\mu$ l erhöht und die Probe einmal mit 100 $\mu$ l 7,5M NH<sub>4</sub>Ac/750 $\mu$ l 100% Ethanol in flüssigem Stickstoff für 3min gefällt. Im Anschluß an die Zentrifugation wurde das Präzipitat in 100 $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen, mit 50 $\mu$ l NH<sub>4</sub>Ac/375 $\mu$ l 100% Ethanol

erneut in flüssigem Stickstoff gefällt und dieser Schritt noch einmal wiederholt. Hiernach erfolgte die Resuspendierung der Probe in 30 $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O, 30 $\mu$ l Formamid und 1 $\mu$ l 1M DTT sowie die Bestimmung der Aktivität durch Messung von 1 $\mu$ l der Sonde in 100 $\mu$ l H<sub>2</sub>O und 3ml Szintillationslösung im Szintillationszähler. Sie lag in der Regel bei 0,75-1,5 · 10<sup>6</sup>cpm/ $\mu$ l.

### **2.2.6.2 Synthese Digoxigenin-markierter *in vitro*-Transkripte**

Für die Whole Mount *in situ*-Hybridisierung wurden Digoxigenin-markierte *in vitro*-Transkripte eingesetzt. Die Plasmid-Matrizen wurden wie unter 2.2.6.1 beschrieben vorbehandelt. Danach erfolgte die *in vitro*-Transkription mit Hilfe des „DIG-RNA-Labeling-Kits“ der Firma Roche.

### **2.2.7 Southern-Hybridisierung**

DNA wurde gemäß Standard-Methoden auf Nylonmembranen (Hybond-N, Amersham-Pharmacia) transferiert (Sambroock; Southern 1975). Bei sehr großen Fragmenten (> 8kb), wurde dabei vor dem Denaturieren ein Depurinierungsschritt mit 0,2M HCl für 10 min gesetzt.

Die Vorhybridisierung erfolgte gemäß eines nach Denhardt (1966) modifizierten Verfahrens in 5x SSC, 5x Denhardt's, 0,5% SDS und 100 $\mu$ g/ml denaturierter Lachsspermien-DNA für 2h bei 65°C in einem Rollerofen (Biometra). Die Hybridisierung wurde daraufhin bei gleicher Temperatur durchgeführt. Nach 16-24h Hybridisierung wurde die Membran aufeinanderfolgend zweimal mit 2x SSC für je 5min und je einmal mit 1x SSC/0,1% SDS und 0,1x SSC/0,1% SDS für jeweils 30 min bei Hybridisierungstemperatur gewaschen. Abschließend wurde die Membran auf einem Röntgenfilm (Kodak Biomax MR) bei -80°C exponiert oder mit Hilfe des "Phospho-Imagers" (Fujix, BAS 2000, Raytest Isotopenmeßgeräte, Straubenhardt) entwickelt.

### **2.2.8 Histologische Methoden**

### 2.2.8.1 Herstellung von Methacrylatschnitten

Für die histologische Analyse, bei der es auf hervorragende Gewebeerhaltung ankam, wurden Gewebe bzw. Embryonen in Hydroxyethylmethacrylat (Technovit 7100, kaltpolymerisierender Kunststoff; Heraeus-Kulzer, Wehrheim) eingebettet. Hierbei wurden die Präparate mit 4% Paraformaldehyd (PFA) vorfixiert und in Abhängigkeit von der Gewebegröße schrittweise in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 85%, 96% und 3x 100%) für je 15min bis zwei Tage (pro Schritt) dehydriert. Daraufhin wurden die Gewebe 1h bis über Nacht in Technovit 7100/100% Ethanol (1:1) inkubiert und große Präparate zusätzlich für zwei Tage in Technovit 7100 präinfiltriert. Danach erfolgte die Infiltration in Vorbereitungslösung (100ml Technovit 7100 mit 1g Härter I) für 1h bis zweimal zwei Tage. Das Einbetten der Präparate fand in Vorbereitungslösung/Härter II (15:1) statt, wobei die Gewebe in dieser Lösung kurz in der „Speed-Vac“ entgast wurden. Nach dem Auspolymerisieren des Kunststoffs über Nacht wurden die Präparate mit Technovit 3040 auf Histoblöcke fixiert und bis zum Schneiden bei RT aufbewahrt. 5-10 $\mu$ m dicke Rotationsmikrotomschnitte (Microm HM360, Walldorf) wurden im warmen Wasserbad gestreckt, auf Objektträger (Roth, Karlsruhe) aufgezogen und auf einer Heizplatte getrocknet.

### 2.2.8.2 Hämatoxilin/Eosin-Färbung von Methacrylatschnitten

Für Delafield's Hämatoxilin (Prudden, 1885; aus: (Clark 1981), Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA, 1981) wurden 4g Hämatoxilin in 25ml 100% Ethanol und 40g/400ml  $\text{NH}_4\text{Al}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  gelöst und für eine Woche der Luft- und Licht-Exposition ausgesetzt (Oxidation). Nach Filtration wurden je 100ml Glycerol und Methanol hinzugegeben und die Lösung für 6-8 Wochen weiter exponiert. Die „reife“ Lösung war über Monate mehrfach verwendbar.

Die Hämatoxilin-Färbung wurde bis zur gewünschten Signalintensität für etwa 15-20min auf einem Schüttler durchgeführt (dunkelblaue Färbung der Zellkerne). Nach Spülen für 15min unter fließendem Leitungswasser ("Bläuen") erfolgte ein kurzes Waschen in  $\text{dH}_2\text{O}$  und die Gegenfärbung in frisch angesetzter Eosin-Lösung (0,25% Eosin Y, 0,1M Essigsäure) für 8-10min unter erneutem Schütteln (orange bis rosa Färbung der übrigen Zellstrukturen). Anschließend wurden die Schnitte in  $\text{dH}_2\text{O}$  gewaschen (ca. 5min), sorgfältig getrocknet und darauf die Hintergrundfärbung durch

Eintauchen der Schnitte in 70% Ethanol für 15-20s reduziert. Abschließend mußten die Schnitte sofort wieder in dH<sub>2</sub>O gewässert werden, um das Ablösen vom Objektträger zu vermeiden. Die getrockneten Schnitte wurden in „Entellan“ (Merck, Darmstadt) eingedeckelt.

### **2.2.8.3 Toluidin Blau O-Färbung von Methacrylatschnitten**

Die Gewebeschnitte wurden bis zur gewünschten Stärke für ca. 15-30min in Toluidin Blau O-Lösung gefärbt (0,05% Toluidin Blau O in 0,2M Walpol-Puffer {0,2M Essigsäure/0,2M Natriumacetat (3:2), pH 4,45}; selektive blaue Zell-Färbung, z.B. von Nissl Granula und Glia-Zellkernen). Die Hintergrundfärbung konnte daraufhin durch Waschen unter Leitungswasser entfernt werden. Nach kurzem Spülen in dH<sub>2</sub>O wurden die Schnitte getrocknet und in „Entellan“ (Merck, Darmstadt) eingedeckelt.

### **2.2.8.4 Herstellung von Gefrierschnitten**

Immunhistologien oder *in situ*-Hybridisierungen wurden auf Gefrierschnitten durchgeführt. Nach dem Spülen in PBS wurden die präparierten Embryonen entweder in 4% PFA für mehrere Stunden oder über Nacht fixiert (für den immunhistologischen Einsatz) oder die Gewebe unfixiert (für *in situ*-Hybridisierungen) direkt eingefroren. Dieses Einfrieren erfolgte in „Tissue Tec“ (= „OCT-Compound“; Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) in einer Einbettform („Peel-Away“; Shandon, Frankfurt) oder in Aluminiumhütchen in einer Alkohol/Trockeneis-Mischung. In Abhängigkeit von Gewebeart bzw. dem Embryonalstadium wurden die Schnitte im Kryostaten (Leica, Bensheim bzw. Microm HM560, Walldorf) bei einer Blocktemperatur zwischen -10°C und -20°C angefertigt, wobei die Schnittdicke bei 10-20µm lag. Die Schnitte wurden auf Adhäsions-Objektträger (Histobond, Marienfeld) aufgezogen, bei 37°C (Immunhistologie) bzw. 46°C (*in situ*-Hybridisierung) getrocknet und dann feuchtigkeitsgeschützt eingefroren. Wie die gefrorenen Präparate konnten auch die Schnitte über mehrere Wochen bei -80°C aufbewahrt werden.



### 2.2.8.5 Immunhistologie auf Gefrierschnitten

Die Gefrierschnitte wurden für 10min in 4% PFA in PBS postfixiert, dreimal für je 5min in PBT (PBS mit 0,1% Tween 20) gewaschen und danach für 1h bei RT in 10% Ziegen Serum/PBT blockiert. Alternativ wurde bei Einsatz sekundärer Esel-Antikörper Pferdeserum verwendet. Im Anschluß erfolgte die Inkubation mit dem Primär-Antikörper für 1h bei 37°C, für mehrere Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C. Hierauf wurden die Schnitte dreimal für je 5min mit PBT gewaschen und dann für 1h mit dem Sekundär-Antikörper in Blockierungslösung inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in PBT zur Reduktion des unspezifischen Hintergrunds wurde in einigen Fällen die DNA mit 1mg/ml DAPI (= 4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid) gefärbt und die Schnitte in „Immu-Mount“ (Shandon, Frankfurt) eingedeckelt.

### 2.2.8.6 Immunhistologie auf *floating Sections*

Immunhistologien wurden auch auf *floating sections* durchgeführt. Nach dem Spülen in PBS wurden die präparierten Embryonen für mehrere Stunden in 4% PFA fixiert. Anschließend mehrmals in eiskaltem PBS gespült und über Nacht in 20% Saccharose /PBS infiltriert. Die Embryonen/Gewebe wurden in 20% Gelatine/20% Saccharose/PBS eingebettet. Auf das Trimmen folgte die Fixierung des Blocks über Nacht in 4% PFA, worauf eine Lagerung bis zum Schneiden in PBS bei 4°C möglich war. Die Gelatineböcke wurden in „Tissue Tec“ (= „OCT-Compound“; Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) in einer Einbettform („Peel-Away“; Shandon, Frankfurt) in einer Alkohol/Trockeneis-Mischung eingefroren.

In Abhängigkeit von Gewebeat bzw. dem Embryonalstadium wurden die Schnitte im Kryostaten (Microm HM560, Walldorf) bei einer Blocktemperatur zwischen -10°C und -20°C angefertigt, wobei die Schnittdicke bei 35-40µm lag. Die einzelnen Schnitte wurden in PBS aufgenommen, mehrfach in PBS gewaschen und danach für 1h bei RT in 10% Pferdeserum/PBT blockiert. Im Anschluß erfolgte die Inkubation mit dem Primär-Antikörper über Nacht bei 4°C. Hierauf wurden die Schnitte dreimal für je 5min mit PBT gewaschen und dann für 1h mit dem peroxidasegekoppelten Sekundär-Antikörper in Blockierungslösung inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in PBT zur Reduktion des unspezifischen Hintergrunds wurde die Schnitte in Peroxidase Puffer mit DAP gefärbt.

Nach der Dehydrierung in einer Alkohol Reihe (75%, 90%, 100%, Xylol) wurden die Schnitte in „Entellan“ (Merck, Darmstadt) eingedeckelt.

#### **2.2.8.7 $\beta$ -Galaktosidase-Färbung**

Der  $\beta$ -Galaktosidase-Nachweis wurde sowohl auf Gefrierschnitten (Hogan et al. 1994), als auch als Whole Mount-Färbung angewendet. Die Kryotomschnitte wurden in 0,2% Glutaraldehyd für 10min auf Eis postfixiert, dreimal mit PBS/2mM MgCl<sub>2</sub> gespült und dann in Detergenz-Lösung (0,1M Phosphat-Puffer pH 7,3, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% Natriumdesoxycholat, 0,02% Nonidet P-40) für 10min inkubiert. Danach schloß sich die Färbung für 2-3h bei 37°C an (Detergenz-Lösung mit 1mg/ml X-Gal, 5mM Kaliumferricyanid, 5mM Kaliumferrocyanid). Abschließend wurden die Schnitte in PBS gewaschen, kurz in dH<sub>2</sub>O gespült, wenn notwendig gegengefärbt und eingedeckelt.

Für die Färbung intakter Embryonen (Sham et al. 1993) wurden die Stadien zunächst je nach Alter (E9,5-E12,5) für 10-30min in einer Lösung aus 1% PFA/0,2% Glutaraldehyd, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM EGTA in PBS bei 4°C fixiert. Darauf folgte ein dreimaliges Waschen unter Schütteln in PBS/0,2% Nonidet P-40 bei 4°C und schließlich die Färbung (5mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 5mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01% Natriumdesoxycholat, 1mg/ml X-Gal in PBS) bei 37°C oder bei RT über Nacht. Die Färbung wurde durch Waschen mit 0,1% PBT abgestoppt, die Embryonen postfixiert und in PBS aufbewahrt.

#### **2.2.8.8 Detektion von Zellproliferation und Apoptosen**

Die Quantifizierung mitotisch aktiver und pyknotischer Zellkerne erfolgte auf Gewebeschnitten nach Färbung der DNA mit DAPI durch mikroskopische Inspektion (siehe 2.2.10.6).

Zur Bestimmung des Zeitpunkts der Bildung der verschiedenen Nervenzelltypen im embryonalen Neuralrohr wurde BrdU (= 5-Brom-2'-desoxy-Uridin) intraperitoneal in schwangere Maus-Weibchen injiziert (75 $\mu$ g/g Körpergewicht in 0,9% NaCl) und die Embryonen anschließend zu unterschiedlichen Zeiten präpariert. Das BrdU, welches als Thymidin-Analogon nur in die DNA mitotisch aktiver Zellen inkorporiert wird,

wurde danach immunhistologisch auf Embryonalschnitten mit einem Anti-BrdU-Antikörper (Sigma; siehe 2.2.10.6) nachgewiesen.

Die Detektion von Apoptosen erfolgte anhand der 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).

#### **2.2.8.9 Herstellung von Vibratomschnitten**

Mit Hilfe des Vibratoms (Leica VT1000S, Bensheim) wurden Schnitte von 20-50 $\mu$ m Dicke zur histologischen Analyse von Embryonen angefertigt, die zuvor in einer Whole Mount *in situ*-Hybridisierung gefärbt wurden. Dazu erfolgte das Einbetten der fixierten Embryonen in 20% Gelatine/PBS. Auf das Trimmen folgte die Fixierung des Blocks über Nacht in 4% PFA, worauf eine Lagerung bis zum Schneiden in PBS bei 4°C möglich war. Nach dem Schneiden in PBS wurden die Schnitte bei RT getrocknet und in 85% Glyzerol/PBS oder in „Immu-Mount“ (Shandon, Frankfurt) eingedeckelt.

#### **2.2.8.10 Herstellung von Parafinschnitten**

Hierzu wurden Maus-Embryonen oder Gewebe in kaltem DEPC-PBS aus dem Uterus präpariert und über Nacht in 4% PFA/DEPC-PBS bei 4°C fixiert. Am nächsten Tag erfolgte zweimal ein Waschschrift in 0,15% DEPC-PBT (PBS mit 0,15% Tween 20) auf Eis, bevor sich die Dehydratation mittels einer aufsteigenden Methanol-Reihe (25%, 50%, 75% und zweimal 100%) ebenso auf Eis für 45min pro Schritt anschloß. An diesem Punkt wurde die Weiterbehandlung in der Regel gestoppt und die vorbehandelten Embryonen bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Für die Einbettung in Paraffin wurden die Präparate zunächst zwei mal 30min in 100% Ethanol und anschließend zwei mal 1h in Toluol gewaschen. Die Präparate wurden drei mal über Nacht mit flüssigen Paraffin infiltriert und anschließend in Paraffinblöcken eingebettet. 5-10 $\mu$ m dicke Rotationsmikrotomschnitte (Microm HM360, Walldorf) wurden im warmen Wasserbad gestreckt, auf Objektträger (Roth, Karlsruhe) aufgezogen und bei 37°C 2h getrocknet. Eine Lagerung sowohl der Paraffinblöcke bis zum Schneiden oder der Schnitte ist bei 4°C möglich.

## 2.2.9 *In situ*-Hybridisierung

### 2.2.9.1 Whole Mount *in situ*-Hybridisierung

Die Detektion der Expression bestimmter Gene im intakten Maus-Embryo wurde mit Hilfe von Whole Mount *in situ*-Hybridisierungen durchgeführt (Wilkinson 1992). Hierzu wurden E9,0 bis E12,5 Maus-Embryonen in kaltem DEPC-PBS aus dem Uterus präpariert und dabei sorgfältig von der Plazenta sowie umgebenden Geweben getrennt. Die den Embryo umgebenden extraembryonalen Hüllen, der Dottersack und das Amnion, wurden für die Genotypisierung bis zum Stadium E11 benutzt. Bei älteren Embryonen ist die Trennung dieser extraembryonalen Anteile von mütterlichem Gewebe schwieriger, so daß hier ein Stück des Embryos (meistens der Schwanz) zur Genotypisierung verwendet wurde, um Kontaminationen in der PCR zu vermeiden. Ein besserer Zugang für die nachfolgend eingesetzten Lösungen wurde dadurch gewährleistet, indem das Herz, die Hirnvesikel und die Ohranlagen mit einer extrem feinen Wurzelkanalfeile (Hedströmfeile Stärke 08 bzw. K-Flex/Kerr Stärke 06; Altwig Dentaldepot, Berlin) durch Punktion geöffnet wurden.

Die derart präparierten Embryonen wurden über Nacht in 4% PFA/DEPC-PBS bei 4°C fixiert. Am nächsten Tag erfolgte zweimal ein Waschschrift in 0,15% DEPC-PBT (PBS mit 0,15% Tween 20) auf Eis, bevor sich die Dehydratation mittels einer aufsteigenden Methanol-Reihe (25%, 50%, 75% und zweimal 100%) ebenso auf Eis für 5-15min pro Schritt anschloß. Zur Reduktion des Hintergrunds bei der späteren Farbreaktion wurden die Embryonen daraufhin in Methanol:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4:1) für 1h bei RT gebleicht und im Anschluß daran dreimal mit 100% Methanol auf Eis gewaschen. An diesem Punkt wurde die Weiterbehandlung in der Regel gestoppt und die vorbehandelten Embryonen bei -20°C u.U. für mehrere Monate bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Für die Hybridisierung wurden die Embryonen auf Eis rehydriert (je 10-15min in 75%, 50%, 25% Methanol), dreimal kurz in 0,15% DEPC-PBT gewaschen und dann abhängig vom embryonalen Alter und der Lokalisation des erwarteten Signals für 10-30min mit 20µg/ml Proteinase K in 0,15% DEPC-PBT bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Dieser Verdau wurde durch Fixation in 4% PFA/0,2%

Glutaraldehyd in DEPC-PBS für 20min bei RT beendet, die stabilisierten Embryonen dreimal kurz in 0,15%-DEPC-PBT gewaschen und in Hybridisierungspuffer präinkubiert (50% entionisiertes Formamid, 5x SSC, 40 $\mu$ g Heparin, 100 $\mu$ g denaturierte Lachsspermien-DNA, 50 $\mu$ g tRNA, 0,1% Tween 20, pH 4,5-5 mit 1M Zitronensäure). Anschließend erfolgte die Prähybridisierung für 1-3h bei Hybridisierungstemperatur (65-70°C) in einem Schüttelwasserbad. Die Hybridisierung wurde mit der zuvor für 5-10min bei 80°C denaturierten Digoxigenin-markierten Sonde über Nacht durchgeführt.

Am nächsten Tag erfolgte das Waschen der Embryonen bei Hybridisierungstemperatur zweimal in Lösung I (50% Formamid, 5x SSC, 0,1% Tween 20) für je 30min und einmal in Lösung I/II für 10min. Hierauf schlossen sich drei kurze Waschschrte in Lösung II (10mM Tris pH 7,5, 0,5M NaCl, 0,1% Tween 20) bei RT an, sowie im Fall der *Lbx1*-Sonde der Verdau mit 50 $\mu$ g/ml RNase A in Lösung II für zweimal je 30min bei 37°C auf einem Schüttler. Anschließend wurden die Embryonen dreimal je 1h in Lösung III (50% Formamid, 2x SSC, 0,1% Tween 20) im Schüttelwasserbad gewaschen, wobei die Temperatur 5°C unter Hybridisierungsbedingungen gehalten wurde. Nach dreimaligem kurzen Waschen in TBST bei RT erfolgte die Inkubation der Embryonen unter Schütteln mit 10% Ziegen Serum für 1h.

Währenddessen wurde eine Spatelspitze Embryo-Pulver in 2ml TBST (2,5mM Tris pH 7,4, 13,7mM NaCl, 0,27mM KCl, 0,15% Tween 20) für 30min bei 70°C inaktiviert, 10min bei 5000rpm, 4°C abzentrifugiert, das Präzipitat pro Ansatz in 0,5ml TBST/1% Ziegen Serum mit 1 $\mu$ l Anti-Digoxigenin-Antikörper (Roche) resuspendiert und bei 4°C für 1h inkubiert. Im Anschluß daran wurde die Antikörper-Lösung für 10min bei 5000rpm, 4°C abzentrifugiert und der Überstand vierfach mit TBST/1% Ziegen Serum verdünnt (endgültige Antikörper-Verdünnung 1:2000). 2ml dieser Lösung wurden zu jedem Ansatz gegeben und die Embryonen über Nacht bei 4°C inkubiert.

Den gesamten dritten Tag erfolgte das Waschen der Embryonen in TBST bei RT auf einem Schüttler, wobei die Lösung etwa stündlich gewechselt wurde. Das Waschen mit TBST wurde über Nacht bei 4°C fortgesetzt.

Am vierten Tag wurden die Embryonen zweimal für je 20min in Alkalische Phosphatase-Puffer (100mM Tris pH 9,5, 0,1M NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 0,15%

Tween 20) bei RT leicht schüttelnd inkubiert und darauf in 2ml Alkalische Phosphatase-Puffer mit je 7 $\mu$ l NBT und BCIP für mehrere Stunden (je nach Signal) bei RT oder 4°C im Dunkeln gefärbt. Dabei wurde die filtrierte Färbelösung alle 20-30min gewechselt. Abschließend erfolgte das Stoppen der Farbreaktion durch mehrmaliges Waschen mit 0,15-0,3% PBT bis ein zufriedenstellendes Signal erreicht war. Die Embryonen wurden daraufhin mit 4% PFA postfixiert und dann in sterilem PBS bei 4°C aufbewahrt. In besonderen Fällen wurde 0,1% Natriumazid zugesetzt, um ein Verkeimen zu verhindern. Für oberflächlich lokalisierte Expression verblieben die Embryonen in PBS, die photographische Dokumentation machte jedoch besonders bei tiefliegenden Signalen das vorherige Klären mit 100% Glyzerol erforderlich.

### **2.2.9.2 Präparation von Embryo-Pulver**

Das Embryo-Pulver diente zum Blockieren in der Whole Mount *in situ*-Hybridisierung. Präparierte Maus-Embryonen wurden in einem möglichst kleinen Volumen eiskaltem PBS homogenisiert, 4 Vol. eiskaltes Aceton hinzugegeben und diese Mischung für 30min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 10000g für 10min, 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.

### **2.2.9.3 *In situ*-Hybridisierung auf Paraffinschnitten**

Die Paraffinschnitte wurden 3 mal 5min in Xylol entparaffinisiert, anschließend über eine absteigende Ethanol-Reihe (zweimal 100%, 95%, 85%, 70%, 50%, 30%) rehydriert und in 1x PBS gewaschen. Die Schnitte wurden für 15min mit 4% PFA fixiert, zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend 15 min in 6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS gebleicht, drei mal in 1xPBS gewaschen und mit ProtinaseK behandelt. Im weiteren wurden die Schnitte mit 12% Glycin in PBS behandelt und 2 mal in PBS gewaschen. Nach einem 15 min Fixierungsschritt in 4% PFA wurden die Schnitte zwei mal in PBS gewaschen. Zur Acytelierung wurden die Schnitte zunächst in 100mM Tris pH7,5 gewaschen, 10 min mit 0,25% Essigsäureanhydrit (in 100mMTris pH7,5) und anschließend zweimal 2min in SSC pH 7,5 gewaschen. Vor der Hybridisierung wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanol Reihe (30%, 50%, 70%, 85%, 95% und zweimal 100%) dehydriert und 20 min getrocknet. In der Zwischenzeit

wurde die im folgenden einzusetzenden Deckgläser silanisiert. Die Deckgläser wurden einmal in „Sigmacote“ (Antihafsilan, Sigma) und hiernach kurz in 100% Ethanol gespült. Nach kurzer Trocknung bei RT konnten die Deckgläser eingesetzt werden. Zur Hybridisierung der Schnitte wurden pro Objektträger 10  $\mu$ l Dig markierter RNA in 150  $\mu$ l Hybridisierungsmix (3,3xSSC, 33% Formamid, 6,6% Dextran Sulfate 3,3 M EDTA, 0,3 M Heparin, 66  $\mu$ g/ml tRNA, 66  $\mu$ g/ml ssDNA, 0,05% Tween20) verwendet. Die Hybridisierung fand über Nacht bei 60°C in einer Feuchtkammer mit einem Kammerpuffer aus 50% Formamid und 5x SSC statt. Die Deckgläser durch 5min Waschen in 5x SSC, 50% Formamid bei 60°C abgeschwemmt und die Präparate zweimal in 2x SSC, 50% Formamid bei 60°C für 10 min und dreimal in TES Buffer (10mM Tris pH 8, 0,5M NaCl, 1mM EDTA) bei 37°C gewaschen, bevor der Verdau mit 20  $\mu$ g/ml RNase A in gleichem Puffer für 10min bei 37°C durchgeführt wurde. Nach erneutem Waschen in RNase-Puffer unter gleichen Bedingungen erfolgten aufeinanderfolgend Waschschrte bei 65°C in 50% Formamid, 1x SSC, 1mM DTT für 60 min, in 2x SSC für 15min und zweimal in 0,2x SSC für 15min ebenfalls bei 65°C. Nach zweimaligem kurzen Waschen in TBS (150mM NaCl, 100mM TrisHCl pH 7,4, 2mM KCl) bei RT erfolgte die Inkubation der Schnitte bei 4°C in einer feuchten Kammer mit 10% Ziegen Serum für 1h.

Währenddessen wurde eine Spatelspitze Embryo-Pulver in 2ml TBS (150mM NaCl, 100mM TrisHCl pH 7,4, 2mM KCl) für 30min bei 70°C inaktiviert, 10min bei 5000 rpm, 4°C abzentrifugiert, das Präzipitat pro Ansatz in 0,5 ml TBST/1% Ziegen Serum mit 0,5  $\mu$ l Anti-Digoxigenin-Antikörper (Roche) resuspendiert (1:1000) und bei 4°C für 1h inkubiert. Im Anschluß daran wurde die Antikörper-Lösung für 10min bei 5000rpm, 4°C abzentrifugiert und jeweils 0,5 ml der Überstand 2ml dieser Lösung wurden auf die Objektträger gegeben und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am dritten Tag wurden die Objektträger in TBSX (150mM NaCl, 100mM TrisHCl pH 7,4, 2mM KCl, 0,1% TritonX) 6 mal jeweils eine halbe Stunde gewaschen anschließend zweimal für je 10min in alkalische Phosphatase-Puffer (100mM Tris pH 9,5, 0,1M NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 0,15% Tween 20) inkubiert.

Für die Färbung wurden die Objektträger in alkalische Phosphatase-Puffer mit (jeweils 4,5  $\mu$ l NBT und BCIP in 20 ml Phosphatase-Puffer) bis ein zufriedenstellendes Signal erreicht war. Abschließend erfolgte das Stoppen der Farbreaktion durch mehrmaliges

Waschen mit 0,15-0,3% PBT und die Objektträger wurden mit „Immu-Mount“ (Shandon, Frankfurt) eingedeckelt.

#### **2.2.9.4 Radioaktive *in situ*-Hybridisierung auf Gewebeschnitten (nach Wilkinson, 1992)**

Die Gefrierschnitte wurden für 20min mit 4% PFA fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und hierauf die Objektträger für 10min in Triethanolamin-Lösung acetyliert (3,125ml Triethanolamin, 675 $\mu$ l Essigsäureanhydrid in 250ml H<sub>2</sub>O). Nach kurzem Waschen in PBS erfolgte das schnelle Entwässern der Schnitte in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (30%, 50%, 75%, 85%, 96%, 100%) und im Anschluß daran das Trocknen bei RT.

In der Zwischenzeit wurde die im folgenden einzusetzenden Deckgläser silanisiert. Die Deckgläser wurden einmal in „Sigmacote“ (Antihafsilan, Sigma) und hiernach kurz in 100% Ethanol gespült. Nach kurzer Trocknung bei RT konnten die Deckgläser eingesetzt werden.

Vor Beginn jeder Hybridisierung wurde die markierte Sonde (siehe 2.2.6.1) für 5 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und auf etwa 5 · 10<sup>6</sup>cpm/Objektträger in Hybridisierungspuffer verdünnt (50% entionisiertes Formamid, 10mM Tris pH 7,5, 10mM NaHPO<sub>4</sub> pH6,8, 5mM EDTA, 2x SSC, 150 $\mu$ g/ml denaturierte Lachsspermien-DNA, 150 $\mu$ g/ml Hefe-tRNA, 10% Dextransulfat), wobei 1/10 Vol. 1M DTT hinzugegeben wurde.

Die Hybridisierung fand über Nacht bei 60°C in einer Feuchtkammer mit einem Kammerpuffer aus 50% Formamid und 5x SSC statt. Darauf wurden die Deckgläser durch 20min Waschen in 5x SSC, 1mM DTT bei 65°C abgeschwemmt und die Präparate in 50% Formamid, 2x SSC, 1mM DTT bei 65°C für 30 min und zweimal für je 10min in RNase-Puffer (10mM Tris pH 7,5, 0,5M NaCl, 1mM EDTA) bei 37°C gewaschen, bevor der Verdau mit 20 $\mu$ g/ml RNase A in gleichem Puffer für 10min bei 37°C durchgeführt wurde. Nach erneutem Waschen in RNase-Puffer unter gleichen Bedingungen erfolgten aufeinanderfolgend Waschschrte bei 65°C in 50% Formamid, 2x SSC, 1mM DTT für 60 min, in 2x SSC für 15min und zweimal in 0,1x SSC für 15min. Die Schnitte wurden nun in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (30%, 50%, 75%, 85%, 96%, 100%) dehydriert und bei RT getrocknet, ehe durch



Exposition über Nacht auf einem Röntgenfilm (Kodak Biomax MR) die Signalintensität überprüft wurde.

Zur Autoradiographie mußte die Kodak NTB2 Fotoemulsion zunächst bei 42°C in der Dunkelkammer geschmolzen und daraufhin 1:1 mit H<sub>2</sub>O verdünnt werden. Anschließend wurden die Objektträger im Dunkeln in die Emulsion getaucht und bei RT für mindestens 2h getrocknet, bevor sie lichtdicht verpackt bei 4°C für 7-20 Tage exponiert wurden.

Zur Entwicklung wurden die Schnitte für etwa 30min auf RT aufgewärmt und dann nacheinander in folgende Lösungen getaucht: 3min Kodak D-19 Entwickler, 1min 2% Essigsäure, 3min 30% Natriumthiosulfat, 5min H<sub>2</sub>O, 20min H<sub>2</sub>O. Darauf erfolgte die Entfernung von Salzresten kurz in dH<sub>2</sub>O und nach kurzem Spülen in 70% Ethanol die Trocknung bei RT.

Die Schnitte wurden gegengefärbt (z.B. mit Giemsa-Lösung: 8ml Giemsa-Stock {0,85g Giemsa, 50ml Glycerin, 50ml Methanol}, 4ml 0,2M NaPO<sub>4</sub>-Puffer pH 6, ad H<sub>2</sub>O 200ml) und mit „Entellan“ (Merck) eingedeckelt.