

2) Material und Methoden

2.1) Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.1.1) DNA-Isolation

Die Präparation von DNA aus Schwanzbiopsien erfolgte nach einem Standardprotokoll (Hogan et al., 1996). Plasmid-DNA aus Bakterien wurde mit den Nucleobond-AX Kit von Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.1.2) RNA-Isolation

Die Isolation von gesamt-RNA aus Gewebe erfolgte über die Trizol-Methode (Gibco-Invitrogen). Das Gewebe wurde in 1ml Trizol bei RT in einem Ultra-Turrax homogenisiert und dann 5 min stehen gelassen. Dann wurden 200µl Chloroform dazu gegeben und stark geschüttelt. Nach 3 min Inkubation bei RT wurde 15 min bei 12000 rpm bei 4°C in einer Mikrozentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert. Die wässrige Phase mit der RNA wurde dann in ein frisches Eppendorf-Tube überführt und mit 500µl Isopropanol gefällt (10min bei RT). Anschließend wurde wieder zentrifugiert und das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde dann bei RT getrocknet und anschließend in 50µl DEPC-H₂O gelöst. Die Konzentration wurde bei 260nm photometrisch bestimmt und die Qualität auf einem Agarose-Gel überprüft.

2.1.3) RT-PCR

Die Umschreibung von RNA in cDNA wurde mit dem SuperScript-Kit (Gibco-Invitrogen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Pro Reaktion wurden jeweils 2µg gesamt-RNA eingesetzt.

2.2) Histologie und Skelettpräparationen

2.2.1) Paraffinschnitte

Das Gewebe wurde nach Standardmethoden vorbehandelt (Mundlos, 2000) und in Paraffin eingebettet. Schnitte wurden an einem Leica-Mikrotom in der Dicke von 7µm angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträger (Roth) aufgezogen und über Nacht bei 37°C getrocknet. Die Darstellung der Histologie erfolgte durch Färbung mit Hämatoxylin / Eosin

(HE) (Mundlos et al., 1999). Die Schnitte wurden in Kayser's Glyceringelatine eingedeckelt. Die Darstellung calcifizierten Gewebes erfolgte nach der van-Kossa Methode (Mundlos, 2000). Die Färbung von Osteoclasten erfolgte mit Hilfe des Leukocyte Acid Phosphatase Kit (Sigma) nach Angaben des Herstellers.

2.2.2) Plastikschnitte

Das Gewebe wurde mit dem Historesin Plastic Embedding Kit (Leica) nach Angaben des Herstellers eingebettet und anschließend zu einer Dicke von 2µm geschnitten. Die Schnitte wurden mit Toluidinblau angefärbt und in Kayser's Glyceringelatine eingedeckelt.

2.2.3) Skelettpräparationen

Präparationen von Mausembryonen und neugeborenen Mäusen wurden nach Mundlos et al., 2000 durchgeführt. Die fotografische Auswertung erfolgte an einem Stereomikroskop (Leica MZ 12) mit einer Digitalkamera (Leica DC 200).

2.2.4) Bestimmung der Teilungsrate

Um beurteilen zu können, inwiefern ein Mutations-Phänotyp auf Änderungen der Zellproliferation zurückzuführen ist, wurde die Proliferationsrate durch einen BrdU-Assay bestimmt. Dabei werden Zellen, die sich in der S-Phase befinden – und somit die G₀-Phase verlassen haben – durch den Einbau des Basenanalogons Bromdesoxyuridin (BrdU, Roche) identifiziert. Zur Durchführung der Proliferationsbestimmung wurden schwangere Mäuse am Tag E13.5 und E15.5 intraperitoneal mit BrdU injiziert (300µg pro Gramm Körpergewicht, gelöst in PBS, 10mg/ml). Nach 6 bzw. 8 Stunden wurden die Mäuse getötet und die Vorderbeine der Embryonen präpariert. 3 Tage alte Mäuse wurden mit 50µl einer 15mg/ml BrdU-Lösung injiziert und die Vorderbeine ebenfalls nach 8 Stunden präpariert. Die Vorderbeine wurden über Nacht in 70% Ethanol/50mM Glycin, pH 2,0 fixiert, in Paraffin eingebettet und zu einer Dicke von 7µm geschnitten. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte zuerst mit Proteinase K (Roche Biochemicals; 10µg/ml) für 10 Min bei 37°C, dann mit Hyaluronidase (Sigma; 10mg/ml in PBS) für 1 Stunde bei 37°C und schließlich mit 2 N HCl für 10 Min bei 37°C vorbehandelt. Die Markierung der Zellen, in deren DNA das BrdU inkorporierte, erfolgte mit dem BrdU Labeling and Detection Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers durch einen monoklonalen anti-BrdU-Antikörper. Dieser wird durch einen AP-gekoppelten Zweitantikörper erkannt und die BrdU-gelabelten Zellen werden anschließend durch eine Farbreaktion mit NBT/BCIP (Roche) schwarz markiert. Zur Bestimmung der Proliferationsraten wurden dann in den Schnitten der Stadien E15.5 und 4Tage jeweils die positiven Zellen innerhalb einer definierten Region der Wachstumsfuge gezählt. Beim Stadium E13.5 wurden degegen die positiven Zellen innerhalb eines festgelegten Bereichs

der Hand ausgezählt. Die Bereiche enthielten je eine komplette Fingeranlage und es wurden pro Schnitt 3 Bereiche ausgezählt.

2.2.5) Bestimmung der Apoptose

Um zu untersuchen, ob es in den *spdh/spdh* Mäusen zu einer Zunahme der Apoptose von Zellen kommt, wurden apoptotische Zellen durch einen TUNEL-Assay nachgewiesen. Wenn eine Zelle apoptotisch wird, kommt es zur Degradierung der DNS, wodurch Fragmente mit freien 3'-hydroxyl-Enden entstehen. Diese kann man mit TdT (Terminal deoxynukleotid Transferase) markieren. Für den Assay wurde das Apop-Tag-Kit von INTERGEN verwendet, bei dem an TdT ein anti-Dioxigenin-Peroxidase-Antikörper-Konjugat gebunden wird. Zunächst wurden Paraffinschnitte der Vorderpfoten von *wt* und mutanten Mäusen des Stadiums E13.5 deparafiniert und dann der TUNEL-Assay nach Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend wurde eine Färbereaktion mit dem DAB Substrat Kit für Peroxidase von VECTOR Laboratories nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt und in Glycerin-Gelatine eingebettet.

2.3) In situ Hybridisierungen

2.3.1) Verwendete Sonden

Die Sonden für die Hox-Gene wurden durch RT-PCR auf cDNA von *wt* Mäusen hergestellt. Es wurden folgende Primer verwendet: Hoxd13-F: ggctatggctaccactcg, Hoxd13-R: acgcacatgtccggctgg; Hoxd12-F: cagtctctacagagctggc, Hoxd12-R: ggcactgtttaccgtcggg; Hoxd11-F: tgcaacgagatctgctccc, Hoxd11-R: ttaccgccaccgccttc; Hoxa13- F: caacgccatcaagctgtgc und Hoxa13- R ctataggagctggcgtctg. Die amplifizierten PCR-Fragmente wurden in den Vektor pCR-II-TOPO (TOPO-TA-cloning Kit, Invitrogen) nach Angaben des Herstellers kloniert.

Sonde	Restriktionsenzym	Polymerase	Referenz
Hoxd13	HindIII	T7	-
Hoxd12	EcoRV	SP6	-
Hoxd11	SpeI	T7	-
Hoxa13	XhoI	SP6	-
Bmp2	EagI	SP6	Bitgood und McMahon, 1995
Bmp4	EcoRI	SP6	Bitgood und McMahon, 1995
Bmp7	HindIII	T7	Bitgood und McMahon, 1995
Col1a1	XbaI	T7	Kim et al., 1999
Col2a1	HindIII	T7	Kim et al., 1999
Col10a1	XhoI	T3	Kim et al., 1999
Noggin	NotI	T7	Vortkamp et al., 1999
Gli1	NotI	T3	Joyner et al., 1997
Gdf5	SacI	T7	Reponen et al., 1994
Ihh	XbaI	T7	Vortkamp et al., 1996
Pthr	BamHI	SP6	Vortkamp et al., 1996
Ptc1	BglII	T7	Vortkamp et al., 1996

2.3.2) Linearisierung der Sonden

30µg des Plasmids wurden mit ca. 50U des entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und anschließend durch eine Phenol / Chloroform- Extraktion gereinigt. Die wässrige Phase wurde daraufhin ethanolgefällt und zu einer Konzentration von ca. 1µg/µl in DEPC-H₂O aufgenommen.

2.3.3) Whole-Mount In situ Hybridisierung (WM-ISH)

Herstellung der DIG-markierten Sonde:

Die in-vitro Transkription / Markierung mit DIG-UTP erfolgte mit dem DIG-RNA-Labeling Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers. Nach erfolgter Reaktion wurden 2µl des Ansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen, um die Ausbeute abzuschätzen.

Hybridisierung:

Für die WM-ISH wurden Mausembryonen der Stadien E10.5 – E13.5 präpariert und über Nacht in 4% PFA fixiert. Die fixierten Embryonen wurden durch eine aufsteigende Methanolreihe dehydriert und entfettet und dann in 100% Methanol gelagert. Zur Hybridisierung wurden die Embryonen in einer absteigenden Methanolreihe rehydriert, in 6% H₂O₂ für eine Stunde gebleicht und für 3-8 Min mit Proteinase K (10µg/µl) verdaut. Nach gründlichem Waschen mit PBST wurden die Embryonen für 20 Min in 4% PFA / 0,2% Glutaraldehyd fixiert und wiederum mehrfach in PBST gewaschen. Zur Prähybridisierung wurden die Embryonen für eine Stunde bei 65°C in Hybridisierungspuffer inkubiert, dann wurde die denaturierte Sonde zugegeben (Endkonzentration ca. 0,25µg/µl).

Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C. Die Embryonen wurden zunächst zweimal 30 Min. bei 65°C mit frischem Hybridisierungspuffer gewaschen und dann auf RT abgekühlt, dann erfolgte ein RNase-Verdau (10µg/ml) bei 37°C. Danach wurde mehrfach mit 2xSSC / 50% Formamid / 0,1% Tween20 bei 65°C gewaschen, gefolgt von zweimaligem Waschen in MABT. Zur Blockierung für die nachfolgende Antikörperinkubation wurden die Embryonen mit 10% Blocking Reagent (Roche) in MABT behandelt. Dann erfolgte die Antikörperinkubation über Nacht bei 4°C (anti-DIG-F_{ab}, Roche, 1:5000 in MABT). Ungebundene Antikörper wurden durch 24-stündiges Waschen mit PBST/0,05% Levamisol (Sigma) mit mehrfachem Lösungswechsel ausgewaschen. Zur Signaldetektion wurden die Embryonen in AP-Puffer überführt und für 3x 20 Min präinkubiert und dann mit NBT/BCIP gefärbt. Zur Konservierung des Signals wurden die Embryonen zunächst 3x mit AP-Puffer gewaschen und dann für eine Stunde in 4% PFA / 0,2% Glutaraldehyd fixiert. Zur fotografischen Auswertung wurden die Proben schließlich in 80% Glycerin überführt und dort gelagert.

2.3.4) ³³P-ISH

Herstellung einer ³³P-markierten RNA-Sonde:

Die Labeling-Reaktion wurde nach folgendem Schema angesetzt:

- 0,5 µl linearisierte Template-DNA
- 1µl 10x Transcription Buffer (Roche)
- 1µl NTP-Mix (C,A,G; jeweils 250pM; Roche)
- 0,5 µl RNase-Inhibitor (Roche)
- 2µl ³³P-UTP (Amersham)
- 1µl RNA-Polymerase (Roche)
- 4µl H₂O (DEPC-behandelt)

Die in-vitro-Transkription erfolgte für eine Stunde bei 40°C. Anschließend wurde 1µl DNase (Roche) zugegeben und für 20 Min. bei 37°C inkubiert, um die Template-DNA abzubauen.

Die markierte Sonde wurde anschließend mit Ethanol gefällt, getrocknet und in 30µl H₂O aufgenommen.

Vorbehandlung der Schnitte (Prähybridisierung):

Die Schnitte wurden in Xylol deparaffiniert, durch eine absteigende Alkoholreihe rehydriert, für 3 Min. bei Raumtemperatur in Proteinase K (10 µg/ml in PBS) verdaut und anschließend in 4% Paraformaldehyd fixiert. Dann wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe wieder dehydriert und anschließend luftgetrocknet.

Hybridisierung und stringentes Waschen:

Zur Hybridisierung wurde die Sonde mit 500µl Hybridisierungspuffer (siehe Anhang) versetzt, für 5 Min. bei 90°C denaturiert und 2 Min. auf Eis abgekühlt. Dann wurden pro Objektträger ca. 70µl der Sondenlösung aufgetragen und mit Parafilm bedeckt. Die Schnitte wurden dann über Nacht bei 70°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Das stringente Waschen der Schnitte vollzog sich nach folgendem Protokoll:

- 30 Min. in 5x SSC bei 55°C, anschließend Abziehen der Parafilmabdeckung.
- 30 Min. in 2x SSC bei 55°C
- 30 Min. RNase-Verdau (10µg/ml in RNase-Waschpuffer)
- 30 Min. in 2x SSC / 50% Formamid bei 55°C
- 30 Min. in 2x SSC bei 55°C, diesen Schritt wiederholen.

Im Anschluss wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Ethanolreihe dehydriert und anschließend luftgetrocknet.

Autoradiographie und Entwicklung:

Um die Signalintensität abschätzen zu können, wurde über Nacht ein Röntgenfilm (Kodak X-Omat) auf die hybridisierten Objektträger gelegt und am nächsten Tag entwickelt. Die Slides wurden dann in Fotoemulsion (Kodak) gedippt und bei 4°C für zwei bis 10 Tage inkubiert. Die Länge der Inkubationszeit wurde anhand der Schwärzung auf dem Röntgenfilm abgeschätzt. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden die Objektträger entwickelt (Kodak Entwicklerlösung) und fixiert (Kodak Fixierlösung). Nach ausgiebigem Waschen in demineralisiertem H₂O wurden die Schnitte mit Toluidinblau (0,1% in H₂O) gegengefärbt, durch eine aufsteigende Ethanolreihe dehydriert und mit Xylol auf das Eindeckeln vorbereitet. Anschließend wurden die Schnitte mit Entellan (Roche) eingedeckelt. Die fotografische Dokumentation erfolgte am Mikroskop in Hell- und Dunkelfeld (Leica DMR) mit Digitalkamera (Leica DC 200).

2.4) Zellkulturmethoden**2.4.1) Klonierung der Konstrukte**

Für die Klonierung des kompletten *Hoxd13*-Gens wurde Maus cDNA von wt/wt und *spdh/spdh* (+7 Alanine) Mäusen verwendet. Aus diesen wurde das Gen in 2 Fragmenten über PCR amplifiziert und anschließend in einen Expressionsvektor mit einem HA-Tag (pTL1-HA) kloniert. Die verwendeten Primer enthielten Schnittstellen, mit denen die Fragmente anschließend verdaut wurden und über diese in den Vektor ligiert wurden (Abb.7). Für die PCRs wurden folgende Primer verwendet:

5' Fragment: EcoRI-For: ATCGAATTCATGAGCCGCTCGGGGACTTG,

BamHI-Rev: GAGGTTCCCCGGATCCAAAAGTGGACAC

3' Fragment: BamHI-For: CACTTTTGGATCCGGGGAACCTCG,

XhoI-Rev: ATACTCGAGTCAGGAGACAGTGTCTTTAGG

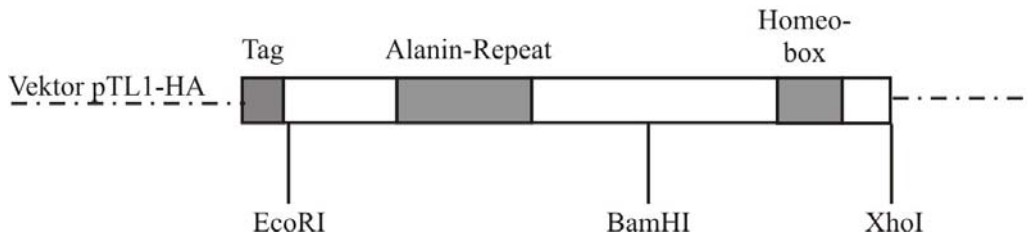


Abbildung 7: Schematische Darstellung des pTL1-HA-Vektors mit den zur Klonierung verwendeten Schnittstellen

Um Konstrukte mit unterschiedlich langen Alanin-Repeats zu konstruieren, wurde eine NotI-Schnittstelle innerhalb des Alanin-Repeats im Hoxd13-Gen verwendet. Zunächst wurde ein Fragment, das den Repeat enthält über EcoRI und SapI aus dem pTL1-HA Vektor ausgeschnitten und in einen Zwischenvektor ohne NotI-Schnittstelle kloniert. Über die NotI-Schnittstelle wurden dann Oligos, die für unterschiedlich lange Alanin-Repeats kodieren, in den wt-Repeat hineinligiert. Der Repeat wurde auf diese Weise auf insgesamt 23, 24, 25, 29 und 36 Alanine verlängert (Abb.8).

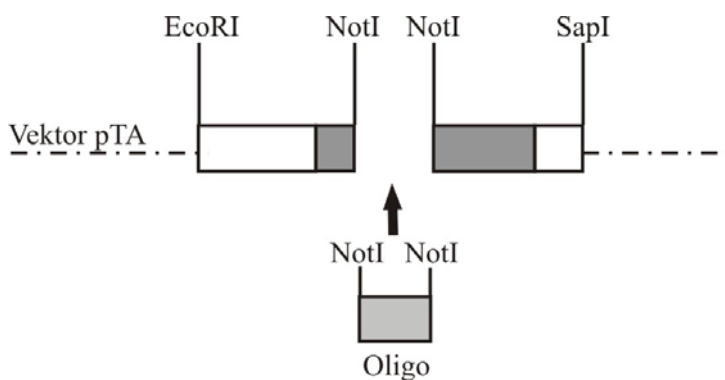


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Klonierung der verschieden langen Oligos in den Polyalaninrepeat von Hoxd13

Für die Herstellung der Oligos wurden folgende Primer verwendet:

+8Ala: For: GGCCGCCGACGCGCCGCGGCTGC;

Rev: CGGCGTCGCCGCGCCGACGCCGG;

+9Ala: For:GGCCGCCGCAGCGGCCGCGGCTGCAGC;

Rev:CGGCGTCGCCGGCGCCGACGTCGCCGG;

+10Ala: For:GGCCGCCGCAGCGGCCGCGGCTGCAGCAGC;

Rev:CGGCGTCGCCGGCGCCGACGTCGTCGCCGG;

+14Ala: For:GGCCGCCGCAGCGGCAGCCGCGGCTGCTGCAGCTGCTGCAGC;

Rev:GGCCGCTGCAGCAGCTGCAGCAGCCGCGGCTGCCGCTGCGGC;

+21Ala:

For:GGCCGCCGCAGCAGCTGCGGCAGCCGCGGCTGCTGCGGCCGCAGCTGCCGC
TGCTGCAGCCGC;

Rev:

GGCCGCGGCTGCAGCAGCGGCAGCTGCGGCCGCAGCAGCCGCGGCTGCCGCAG
CTGCTGCGGC

Die Primer wurden phosphoryliert und dann in 1xSSC annealt (95°C für 5 Min im Heizblock, dann im Heizblock langsam auf RT abgekühlt).

In einem weiteren Konstrukt wurde der Alanin-Repeat von 15 Alaninen im wt auf 2 Alanine verkürzt. Dazu wurde der gesamte Repeat mit den Enzymen BspEI und SapI aus dem pTL1-HA Vektor ausgeschnitten und das so entfernte Stück durch einen Oligo ersetzt. Dazu wurde folgende Primer wie oben beschrieben annealt:

2Ala-For:

CCGGACGCGCGGGCGTCCAGCTTCGCTTACCCAGGGACCTCTGAGCGCACAGGCT
CTTCG;

2Ala-Rev:

CGACGAAGAGCCTGTGCGCTCAGAGGTCCCTGGGTAAGCGAAGCTGGACGCCG
CGCGT.

Aus dem pTL1-HA-Vektor wurden die verschiedenen Hoxd13-Konstrukte mit den Enzymen EcoRI (blunt aufgefüllt) und KpnI herausgeschnitten und in den pTL10-Flag-Vektor (PstI (blunt abgetrennt) und KpnI geschnitten) umklont.

Für die Klonierung der Gene Hoxd11 und Hoxd12 in den Vektor pTL1-HA wurden folgende Primer und Enzyme verwendet:

Hoxd11-EcoRI-For: ATCGAATTCATGAACGACTTTGACGAGTGCG

Hoxd11-KpnI-Rev: ATCGGTACCCTCAAATAAGGGGTTTCCAGTG;

Hoxd12-BamHI-For: ATCGGATCCATGTGTGAGCGCAGTCTCTAC

Hoxd12-KpnI-Rev: ATCGGTACCCTAATAGAGGGCCAGTGCTTG.

Um das Gen Hoxa13 zu klonieren, wurde ein 5'-Fragment, indem der Alanin-Repeat enthalten ist, aus normaler menschlicher DNA und Patienten-DNA, mit einer Expansion des Alanin-kodierenden Bereichs um 33 Basen (+11 Alanine), amplifiziert. Dazu wurden folgende Primer und Enzyme verwendet:

EcoRI-For: ATCGAATTCATGACAGCCTCCGTGCTCCTCC

AatII-Rev: GGAGACGACGTCGGGCAGAGTGGACTTCC.

Das 3'-Fragment wurde mit folgenden Primer aus Maus-DNA amplifiziert:

AatII-For: CTCTGCCCGACGTCGTCTCCCATCCTTCAG

KpnI-Rev: ATCGGTACCTTAACTAGTGGTCTTGAGTTTATTGATG und anschließend beide Fragmente in den pTL1-HA-Vektor kloniert.

Für die Klonierung des Runx2-Gens wurde ein bereits vorhandenes Plasmid verwendet, das das komplette wt-Gen aus der Maus enthält (pSlax-mRunx2). Aus menschlicher Patienten-DNA wurde dann ein Fragment amplifiziert, das im Alanin-kodierenden Repeat eine Expansion (+10 Alanine) enthält und dieses über die Enzyme BsaI und NcoI in das pSlax-mRunx2 kloniert. Dazu wurden folgende Primer verwendet:

BsaI-For: ATAGGTCTCTCATGCGTATTCCTGTAGATCCGAGC

NcoI-Rev: CTCCACCATGGTGCGGTTGTCGTGG.

Anschließend wurden sowohl wt-Runx2 und +10Ala-Runx2 mit folgenden Primer amplifiziert und über die angegebenen Enzyme in den pTL1-HA-Vektor kloniert:

BamHI-For: ATAGGATCCATGCGTATTCCTGTAGATCCGAG

XhoI-Rev: ATACTCGAGTCAATATGGCCGCCAAACAGAC.

Für die Klonierung in den pTL10-Flag-Vektor (PstI (blunt abgetrennt) und BglII geschnitten) wurden folgende Primer und Enzyme verwendet: BamHI-For (s.o.; blunt aufgefüllt) und BglII-Rev: ATAAGATCTTCAATATGGCCGCCAAACAGAC.

Das Sox3 Gen wurde aus normaler und Patienten-DNA (+11 Alanine) mit folgenden Primern amplifiziert und über das Enzym EcoRI in den pTL1-HA-Vektor kloniert:

EcoRI-For: CAGCCGGAATTCATGCGACCTGTTTCGAGACAACCTC

EcoRI-Rev: GAACGGGAATTCTCAGATGTGGGTCAGCGGC.

2.4.2) Transfektion in COS-1 Zellen

Für die Zelltransfektionsversuche wurden jeweils 4×10^4 COS-1 Zellen pro Loch einer 12-Loch-Platte auf Glasplättchen (\varnothing 15 mm) ausgesät und über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert, so dass die Zellen 40-80% konfluent gewachsen waren. Für die Transfektionen

wurde PolyFect Reagenz von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Es wurde pro Loch 600ng DNA und 4µl PolyFect-Reagenz eingesetzt und die Zellen nach der Transfektion ca. 40 Std. inkubiert.

2.4.3) Antikörperanalyse auf transfizierten COS-1 Zellen

Nach der gewünschten Inkubationszeit wurden die transfizierten Zellen 1x mit PBS gewaschen und dann mit 4% PFA/PBS bei RT für 15 Min fixiert. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 0,2% TritonX-100/PBS bei RT für 15 Min permeabilisiert und dann 3x mit PBS gewaschen. Für den Maus-anti- γ Tubulin-Antikörper wurden die Zellen stattdessen in Methanol für 10 Min. bei -20°C fixiert und permeabilisiert und anschließend mit PBS gewaschen. Die Blockierung erfolgte bei RT für mindestens 45 Min mit Blockierungs-Lösung (10% FCS/PBS). Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte in einer feuchten Kammer. Sowohl erster als auch zweiter Antikörper wurden in Blockierungs-Lösung verdünnt. Die Inkubationszeit betrug jeweils 1 Std., danach wurde jeweils 3x kurz und 3x 5 Min. mit PBS gewaschen. Es wurden folgende Antikörper und Verdünnungen verwendet:

1. Antikörper:

Maus-anti-HA (Sigma), Kanninchen-anti-HA (Sigma), Maus-anti-Flag (Sigma) und Kanninchen-anti-Flag (Sigma) wurden 1:500 verdünnt; Maus-anti-Vimentin (Sigma) wurde 1:400 verdünnt; Ziege-anti-Hsp40 und Ziege-anti-Hsp70 (Santa Cruz Biotechnology) wurden 1:50 verdünnt; Kanninchen-anti- γ -Adaptin (Golgi) (Sigma) wurde 1:300 verdünnt; Kanninchen-anti-Proteasom 11S (Affiniti) wurde 1:250 verdünnt; Kanninchen-anti-Proteasom 20S (Calbiochem) wurde 1:60 verdünnt. Maus-anti- γ Tubulin (Sigma) wurde 1:100 verdünnt.

2. Antikörper:

AlexaFluor 546 Ziege-anti-Kanninchen IgG, AlexaFluor 546 Ziege-anti-Maus IgG, AlexaFluor 488 Ziege-anti-Kanninchen IgG, AlexFluor 488 Ziege-anti-Maus IgG, AlexFluor 546 Esel-anti-Kanninchen IgG und AlexFluor 488 Esel-anti-Ziege IgG (alle Molecular Probes) wurden 1:500 verdünnt.

Anschließend wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt und die Glasplättchen mit Fluoromount-G (Electron Microscopy Sciences) auf Objektträgern eingedeckelt. Die Proben wurden dann an einem Axiovert-200 Fluoreszenz-Mikroskop von Zeiss ausgewertet.

2.4.4) Elektronenmikroskopie

Für die Untersuchungen im Elektronenmikroskop wurden COS-1 Zellen auf sterilen Plastik-Plättchen ausgesät und wie oben beschrieben transfiziert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen fixiert und in LR White (London Resin Company) eingebettet und geschnitten. Die Markierung mit Immunogold wurde wie beschrieben durchgeführt, mit dem Kanninchen-anti-HA-Antikörper (1:80 verdünnt) und einem 10nm Gold-anti-Kanninchen Zweitantikörper (British Bio Cell; 1:100 verdünnt). Die Auswertung der Proben erfolgte an einem Philips CM 100 Elektronenmikroskop.

2.4.5) Luciferase-Messung

Für die Luciferase-Messung wurde die Zelllinie NG108-15 (ATCC) verwendet. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine Hybridzelllinien aus Maus-Neuroblastomazellen und Ratten-Gliomazellen. Für die Transfektion wurden die pTL1-HA-Vektoren mit den verschiedenen Hoxd13-Konstrukten verwendet, sowie ein pMiw-Bmp4-Promoter Luciferase-Konstrukt und pMiw-SP-1-Konstrukt (von Suzuki et al., 2003). Als interne Kontrolle wurde ein Renilla-Konstrukt mittransfiziert. Als Transfektions-Reagenz wurde Lipofectamine und PLUS-Reagenz (beide von Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet. Es wurden jeweils 4×10^4 Zellen pro Loch einer 12-Loch-Platte ausgesät und über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden je Loch mit insgesamt 600ng DNA transfiziert. Davon waren 330ng das Effektorplasmid (Hoxd13), 165ng das Reporter-Plasmid (Bmp4), 70ng das Co-Effektor-Plasmid (SP-1) und 35ng die interne Kontrolle (Renilla). Pro Loch wurden je 2,5µl PLUS-Reagenz und Lipofectamine-Reagenz eingesetzt. Nach ca. 30 Std. wurden die Zellen lysiert und anschließend bei -80°C eingefroren. Für die Messung wurde das Dual-Luciferase Reporter Analyse Kit (Promega) nach Herstellerangaben verwendet. Die Messung erfolgte im 1450 MicroBeta Trilux "Liquid scintillation and Luminescence counter" von Wallac.

2.5) Proteinbestimmung *in vivo*

2.5.1) Immuncytochemie auf Paraffinschnitten

Paraffinschnitte von Vorderpfoten von wt/wt und spdh/spdh Mäusen E13.5 wurden über eine Alkoholreihe entparaffiniert und 1x in PBS gewaschen. Um mögliche Antigene zu entfernen wurden die Schnitte anschließend in einem 0,01M Natrium-Zitratpuffer pH 6,0 für 10 Min.

geköchelt. Nach Abkühlen wurden die Schnitte in einer feuchten Kammer für 1 Std. mit 3% BSA 0,1% TritonX-100/PBS blockiert und permeabilisiert. Als erster Antikörper wurde ein spezifischer Kanninchen-anti-Hoxd13-Antikörper von Atsushi Kuroiwa (Japan) verwendet. Der Antikörper wurde 1:1000 in der Blockierungs-Lösung verdünnt und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Als 2. Antikörper wurde der AlexaFluor 488 Ziege-anti-Kanninchen Antikörper 1:500 verdünnt verwendet und 1 Std. inkubiert. Die Zellkerne wurden anschließend mit Propidium Iodid gefärbt und die Schnitte in FluoromountG eingedeckelt. Die Proben wurden dann an einem Axiovert-200 Fluoreszenz-Mikroskop von Zeiss ausgewertet.

2.5.2) Western Blot

Der *Hoxd13*-exprimierende Bereich der Vorderpfoten von je 3 wt/wt und *spdh/spdh* Mäusen des Stadiums E13.5 wurden in 4mM HEPES-NaOH pH 7,4 und 320mM Sucrose gepoolt. Dann wurde ein Proteinase-Inhibitor (Complete Mini, Roche) und 10mM β -Mercaptoethanol zugegeben und das Gewebe auf Eis lysiert. Die Proteinkonzentration wurde durch die BioRad Microassay Prozedur (Bradford Methode) bestimmt. Es wurden jeweils 10 μ g Gesamtprotein pro Spur auf ein 12,5% SDS-PAGE geladen und bei 40mA für 2-3 Std. aufgetrennt. Die aufgetrennten Proben wurden dann durch Blotten auf eine Immobilon PVDF Membran übertragen. Anschließend wurde zuerst das Hoxd13-Protein mit dem Kanninchen-anti-Hoxd13-Antikörper (1:8000 verdünnt) und einem Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Kanninchen-Zweitantikörper (Oncogene, 1:2000 verdünnt) markiert und die Signale über eine Chemilumineszenz-Reaktion auf Fim detektiert. Die Antikörper wurden dann von der Membran entfernt (2x Waschen mit PBS; Inkubation für 2x 10 Min. in 150mM Glycin pH2,5/ 0,4% SDS; Neutralisation mit 1M Tris-HCl pH6,8; 3x Waschen mit PBS) und ein zweiter Antikörperassay mit einem Kanninchen-anti-Actin- Antikörper (Sigma, 1:8000 verdünnt) durchgeführt.

2.5.3) Verwendeter Mausstamm

Die “synpolydactyly homolog” (*spdh*) Maus wurde von The Jackson Laboratories, Maine, USA bezogen. Die *spdh*-Mutation trat spontan in B6C3-Mäusen auf (Jackson et al., 1998) und wurde in der Zuchteinrichtungen des MPI für molekulare Genetik auch weiter in diesem Stamm erhalten.

2.5.4) Genotypisierung der Mäuse durch PCR

Um die *spdh*-Mäuse zu genotypisieren, wurde über eine PCR der Alanin-Repeat des *Hoxd13*-Gens amplifiziert. Verwendete Primer: F: acttgggacatggatggct, R: cgctcagaggtccctgggta. Folgendes Programm wurde benutzt: 95°C / 2 Min, 35x (94°C / 30 Sek., 51°C / 1 Min, 72°C / 2 Min), 72°C / 10 Min. Die PCR wurde in 25µl-Ansätzen mit 0,75 mM MgCl₂, 14% DMSO und 2 pmol/µl jedes Primers durchgeführt. Das amplifizierte PCR-Produkt wurde dann über ein 3%iges Agarose-Gel mit 2% Ethidium Bromid aufgetrennt.

2.6) Lösungen und Puffer

AP-Puffer:	100mM Tris/Cl; 100mM NaCl; 5mM MgCl; pH 9,5
BCIP-Lösung	50mg BCIP / ml in Dimethylformamid
Blockierungslösung I	10% FCS / PBS
Blockierungslösung II	3% BSA, o,1% Triton-X 100 / PBS
Dig1	100mM Tris/Cl; 150mM NaCl; pH 7,5
HEPES-Puffer	4mM HEPES-NaOH, 320mM Sucrose
Hybridisierungspuffer	50% Formamid; 10mM Tris/Cl pH 7,6; 200µg/ml Hefe-tRNA(Sigma); 10% Dextran Sulfat (Merck); 600mM NaCl; 0,25% SDS; 1mM EDTA pH 8,0
Inkubationspuffer	150mM Glycin pH 2,4, 0,4% SDS
PBS	PBS-Pulver (Sigma P-3813) ad 1000ml H ₂ O
PBST	PBS; 0,1% Tween20
MABT	11,6g Maleinsäure (Sigma); 8,7g NaCl; 1ml Tween20; H ₂ O ad 200ml
NBT-Lösung	50mg NBT / ml in 70% Dimethylformamid
Neutralisationspuffer	1M Tris-HCl pH 6,8
SSC (20x)	3M NaCl; 300mM NaCitrat; pH 7,0
TE	10mM Tris/Cl; 150mM NaCl; pH 7,5