

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BCIP	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie cpm “counts per minute”
dATP	Desoxyadenosinphosphat
dCTP	Desoxycytosinphosphat
ddH ₂ O	Aqua bidestillata
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGTP	Desoxyguanosinphosphat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Embryonalstadium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl-)piperazin-1-ethansulfonsäure
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Molar
mA	Miliampere
mCi	Milicurie
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
μM	Mikromolar
mRNA	“messenger” Ribonukleinsäure
NaAc	Natriumacetat
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
PCR	Polymmerase-Ketten-Reaktion (Polymerase chain Reaction)
PBS	“Phosphate Buffered Saline”
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentium hydrogenii
RNA	Ribonukleinsäure

RNase	Ribonuklease
Rpm	“rotations per minute”
RT	Raumtemperatur
SSC	“Standard Saline Citrate”
SDS	Natriumdodecylsulfat
t	Zeit
TBS	“Tris Buffered Saline”
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
U	“unit” (=Enzymeinheit)
UTP	Uraciltriphosphat
V	Volt
W	Watt
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Inolyl-D-Galakttopyranosid

2.1.2 Chemikalien und Enzyme

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).

2.1.3 Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> XLI-Blue MRF	Jerpseth <i>et al.</i> , 1992
<i>Escherichia coli</i> NS3529	(Cohen and Sternberg 1989; Sternberg and Cohen 1989)
<i>Escherichia coli</i> NS3516	(Cohen and Sternberg 1989; Sternberg and Cohen 1989)
<i>Escherichia coli</i> DY380	(Yu <i>et al.</i> 2000)

2.1.4 Vektoren

pBluescript-SK II (+/-)	(Sorge 1988)
pGEM-T bzw. pGEM-T Easy	Promega, Mannheim
pSlax13	Stephen Hughes, National Cancer

	Institute
RCASBP (A / B)	“ “ “
pCS2+MT	
pCAGGS	
pCig	(Megason and McMahon 2002)

2.1.5 Antikörper

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

Maus anti Mash1 und Maus anti Ngn2 (David Anderson); Meerschweinchen anti Lmx1b, Meerschweinchen anti Islet1, Kaninchen anti Dbx1 und 2 (Tom Jessell); Kaninchen anti Gsh1/2 (Martin Goulding); anti Ngn1 (Jane Johnson); Kaninchen und Meerschweinchen anti Lbx1, Meerschweinchen anti MafA, Kaninchen anti Tlx3 Kaninchen wurden im Labor von Carmen Birchmeier generiert; Maus anti Lhx1/5, Maus anti Pax6 und Pax7 (Developmental Studies Hybridoma Bank); Pax2 (Zymed); Maus anti Tuj1 (Babco); Maus anti BrdU (Sigma); Kaninchen anti β -Gal (CAPPEL); Kaninchen anti-GFP (Abcam); Kaninchen anti-peripherin (Chemicon); Maus anti-NeuN (Chemicon); Maus und Kaninchen anti phospho Histon 3 (Upstate Biotechnology).

2.1.6 Zelllinie

In der Zellkultur wurde die embryonale Stammzelllinie E14.1 eingesetzt, die aus einer männlichen 129/Ola Maus-Blastozyste stammte (Kühn *et al.*, 1991).

2.1.7 Hühnerstamm

Befruchtete Hühnereier (White Leghorn) wurden von Charles River bezogen.

2.1.8 Mausstämme und transgene Mauslinien

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

Mash1^{-/-} Mäuse (Francois Guillemot, NIMR,London): Bei Mash1^{-/-} Tieren wurde durch homologe Rekombination in ES Zellen die kodierende Sequenz von *Mash1* durch eine Neomycin Selektionskassette ersetzt (Guillemot et al. 1993).

Mash1^{Ngn2/Ngn2} Mäuse (Francois Guillemot, NIMR,London): In anderen Regionen des Nervensystems war beobachtet worden, daß Ngn2 die Neurogenese-Funktionen, aber nicht Spezifizierungsfunktionen von Mash1 ersetzen kann. Ich überprüfte deshalb, ob die in den *Mash1* mutanten Mäusen beobachteten Veränderungen in der Entwicklung von dorsalen Neuronen durch die Expression von Ngn2 verhindert werden können. Dazu wurden *Mash1^{Ngn2/Ngn2}* Embryonen benutzt, die *Ngn2* statt *Mash1* exprimieren. (Parras et al. 2002).

2.1.9 Nährmedien

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

2.1.10 Zellkulturmedien

Fibroblasten-Medium: 500ml Dulbecco's MEM mit Glutamax-I, 4500mg/l Glucose, mit Pyridoxin, Natriumpyruvat (Gibco BRL)

60ml FCS (zuvor 30min bei 55°C inaktiviert, Sigma)

5,7ml 100x nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco BRL)

5,7ml Penicillin/Streptomycin-Lösung

(10000ug/ml Penicillin G/10000µg/ml Streptomycin; Gibco BRL)

1,2ml 50mM β-Mercaptoethanol (Gibco BRL)

ES-Zell-Medium: 500ml DMEM/Glutamax (siehe oben, Gibco BRL)

90ml FCS (zuvor 30min bei 55°C inaktiviert, Sigma)

6ml nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco BRL)

6ml Penicillin/Streptomycin-Lösung (Gibco BRL)

1,2ml β-Mercaptoethanol (Gibco BRL)

60µl LIF („Leukemia Inhibitory Factor“)

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von Desoxyribonukleinsäuren und Ribonucleinsäuren

2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten

Die Mini-Präparationen von Plasmid-DNA erfolgten durch Alkalische Lyse (Birnboim und 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 McDonnell *et al.*, 1977) bzw. mit Hilfe des "QIAEX II / QUIAQUICK Gel Extraction Kit" (Qiagen, Hilden; Vogelstein und Gillespie, 1979).

2.2.1.2 Isolierung genomischer DNA aus ES-Zellen

Für den Nachweis von homologer Rekombination in embryonalen Stammzell- (= ES Zell-) Klonen mittels Southern-Hybridisierung wurde die genomische DNA nach (Ramirez-Solis *et al.*, 1992) präpariert. Die auf gelatinisierten 96 Loch-Platten konfluenten ES-Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 50 μ l ES-Zell-Lyse-Puffer/Well (10mM Tris pH 7,5, 10mM EDTA, 10mM NaCl, 0,5% N-Lauroylsarcosin (= „Sarcosyl“), 200 μ g/ml Proteinase K) bei 60°C in einer mit Parafilm abgedichteten Feuchtkammer über Nacht inkubiert. Nach Zugabe von 100 μ l eiskaltem 100% Ethanol mit 1/20 Vol. 3M Natriumacetat/Loch wurde die DNA für 30 Minuten bei Raumtemperatur gefällt. Anschließend wurden die Überstände abgossen, die DNA dreimal mit 70% Ethanol gewaschen und für etwa 20min leicht luftgetrocknet, bevor der Restriktionsverdau in 50 μ l Restriktionsmix (1x Restriktionspuffer, 100 μ g/ml BSA, 50 μ g/ml RNase, 10 - 15ul Restriktionsenzym) bei 37°C über Nacht unter leichtem Schütteln erfolgte. Die Hälfte dieses Ansatzes wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und das Gel zur Southern-Hybridisierung eingesetzt.

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 MgCl₂, 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 H₂O 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 H₂O/50µg/ml RNase A aufgenommen.

2.2.1.4 Isolierung von total RNA aus embryonalem Gewebe

Embryonen wurden in kaltem, DEPC behandeltem PBS präpariert, Neuralrohrgewebe oder ganze Embryonen wurden in kaltes Trizol gegeben und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C verwahrt.

Gewebe eines Genotyps wurde vereinigt und in 1ml Trizol pro 50-100mg Gewebe homogenisiert. Unlösliche Bestandteile des Homogenisats wurden durch 10 min Zentrifugation bei 12000 g und 2-8°C pelletiert. Zum Überstand wurden 0.2 ml Chloroform / 1ml Trizol gegeben und durch Schütteln vermischt. Erneutes Zentrifugieren bei 12000 g und 2-8°C für 15min führte zur Phasentrennung. Die wässrige Phase wurde abgenommen und die gelöste RNA durch 0.5ml Isopropanol / 1ml Trizol gefällt. Das Pellet wurde dann noch zweimal mit 75% Ethanol gewaschen und abschließend in Rnase freiem Wasser gelöst. In einigen Fällen wurde die RNA mithilfe des "Rneasy cleanup" Kits (Quiagen) weiter aufgereinigt.

2.2.2 Restriktionshydrolyse von Desoxyribonukleinsäuren, Ligationen von DNA Fragmenten und Transformation kompetenter Bakterien

Restriktionshydrolysen von Plasmid- und genomischer DNA wurden mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen gemäß Standardmethoden durchgeführt (Berger und Kimmel, 1987; Sambrook und Russell, 2001). Bei der Ligation von DNA Fragmenten wurden in der Regel 50ng Vektor DNA und ein etwa dreifacher molarer Überschuss

an Fragment DNA in einer 20 μ l Reaktion eingesetzt.

Die Herstellung und Transformations kompetenter Bakterien erfolgte nach Inoue *et al.*,1990.

2.2.2.1 Klonierung der Hühnchenexpressionsvektoren

Die kodierenden Sequenzen der Gene, die überexprimiert werden sollten, wurden in den Vektor pCIG oder den retroviralen Vektor RCASBP A kloniert. Der pCIG Vektor besitzt 3' der „multiple cloning site“, die zum Einklonieren der jeweiligen cDNA verwandt wurde eine IRES NLS GFP Sequenz.

Der Expressionvektor RCASBP A besitzt eine Reihe von Erkennungssequenzen von häufig verwendeten Restriktionsenzymen mehrfach. Daher wurde die jeweilige cDNA zuerst in den Transfer-Vektor pSlax kloniert. Dieser verfügt über eine NcoI Erkennungssequenz mit Kozak optimierter Sequenz-Umgebung, so daß das ATG innerhalb der NcoI Erkennungssequenz als Initiationscodon fungiert. Alle verwendeten cDNA's (Mash1 und Mash1 Fusionsproteine, EGFP) wurden daher in ein zum ATG der NcoI Erkennungssequenz kompatibles Leseraster kloniert. Anschließend wurde ein ClaI Fragment, welches die NcoI Erkennungssequenz und die cDNA umfaßt aus, dem pSlax- in den RCASBP A Vektor kloniert.

2.2.3 Rekombination in Bakterien

Die homologe Rekombination in Bakterien ermöglicht die sequenzspezifische Integration beliebiger DNA Fragmente unabhängig von Restriktionsenzymen.

30-50 bp Homologie an dem 5' und 3' Ende eines Fragments sind ausreichend um eine hohe Rekombinationsfrequenz zu erzielen.

Um ein DNA Fragment in einen Vektor zu rekombinieren (s. auch (Lee et al. 2001)), wurde der Vektor in DY380 Bakterien transformiert. Dieser Stamm trägt die für die Rekombination notwendigen red Gene (*exo* und *pol*) unter der Kontrolle des temperatursensitiven λ Repressors, da die permanente Expression der red Gene letal für die Bakterien ist. Das DNA-Fragment, das in den Vektor integriert werden soll, wurde über PCR amplifiziert. Die Primer enthielten auch die ca 45 bp der homologen Sequenz, welche den exakten Rekombinationsort mit dem Vektor bestimmen. Das PCR Fragment wurde dann in einen Vektor positiven DY380 Klon transformiert,

welcher durch einen 15 minütigen Temperaturwechsel auf 42°C auch rekombinationskompetent gemacht wurde. Um ausreichend positive Klone zu erhalten, musste das PCR Fragment eine Antibiotikaresistenz als Selektionsmarker beinhalten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die homologe Rekombination in Bakterien zur Generierung des Mash1-GFP targeting Vektors eingesetzt. Die Bereiche der Homologie wurden dabei so gewählt, daß nur die kodierenden Sequenzen des Mash1 Gens ausgetauscht wurden. Die Mash1-kodierende Sequenz wurde dabei gegen die cDNA von GAP43-EGFP plus einer mit loxP Sequenzen versehenen Neomycin Selektionskassette ausgetauscht. PCR amplifizierte Bereiche wurden durch Sequenzierung verifiziert. Als Ausgangsvektor für die Rekombination diente ein 13 kb großer genomischer Subklon des Mash1 Locus (s. (Guillemot et al. 1993)).

Sequenz der Primer, welche die 45bp der Homologie zum Mash1 Locus in das GFP-neo^{loxP} PCR Fragment einführen:

5'UTR homologer Primer

5`GCGTCCCCAACTCGTTCTCCCCCGCGACAGTTTGGCCCGGCATGGTGTG
CTGTATGAGAAGAACCAAA 3`

3'UTR homologer Primer

5`AAGCGTACCTGCTTCCAAAGTCCATTCCCAGGAGAGCCTGGCAGGTCCG
GCCGCTCTAGACTCGAGGAATT 3`

2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

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

1.Mash1

a) Primer, 1,8mM MgCl₂

Mash1 wt fwd: 5'- GGGTTCTCCGGTCTCGTCCTACT-3'

Mash1 wt rev: 5'- GCCCACCCCTGTTTGCTGAGAA-3'

b) Programm c) Produkt

94°C 2min 663bp

94°C 30s

66°C 30s 40x

72°C 35s

4°C °€

2. Mash1^{GFP}

a) Primer, 1,5mM MgCl₂

Mash1 GFP 360bp fw: 5'-TTCCTCCGCTGCAGCCTGACAACTC-3'

Mash1 GFP 360bp rev: 5'-TCGCCCTCGCCGGACACGCTGAACT-3'

b) Programm c) Produkt

94°C 2min 360bp

94°C 30s

66°C 30s 40x

72°C 35s

4°C °€

3. Deleter

a) Primer, 2mM MgCl₂

Deleter1: 5'-CGCCATCCACGCTGTTTTGACC-3'

Deleter2: 5'-CAGCCCGGACCGACGATGAAG-3'

b) Programm c) Produkt

94°C 2min 371bp

94°C 45s

60°C 30s 36x

72°C 30s

4°C °€

4. Neomycin

neo3'upper: 5'-CGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGG-3'

neo 3'lower: 5'-TTGCCGATCCCCTCAGAAGAAGACTC-3'

a) Primer, 1,5mM MgCl₂

neo

neo

b) Programm c) Produkt

95°C 2min 510bp

94°C 45s

66°C 30s 35x

72°C 30s

4°C °

2.2.4.2 RT-PCR

Zur Generierung und Klonierung von cDNA Fragmenten wurde die RT-PCR angewandt. Dabei wird aufgereinigte mRNA mittels des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Als Primer für die reverse Transkriptase dienten entweder genspezifische Sequenzen oder aber Oligo dT Sequenzen, um die gesamte polyA⁺ RNA zu amplifizieren. Aus der cDNA wurden durch PCR dann die gewünschten DNA Sequenzen amplifiziert.

2.2.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde vor allem zur Verifikation 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:

Sequenzier-Programm

95°C 3min

95°C 35s

53°C 35s 30x

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.

2.2.6 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 α -³²P-dCTP radioaktiv markiert (Feinberg und Vogelstein, 1983). Die Proben wurden mit Sephadex G50-Mikrosäulen (Probe Quant G50, Amersham-Pharmacia) aufgereinigt und vor Beginn der Hybridisierung denaturiert.

2.2.7 *In vitro*-Transkription

Synthese von Digoxigenin oder Fluoreszein -markierten *in vitro*-Transkripten. Zunächst wurde die Plasmid-Matrize zur Transkriptbegrenzung mittels Restriktionshydrolyse linearisiert und danach Phenol/Chloroform-extrahiert, gefällt, gewaschen, getrocknet und in ddH₂O aufgenommen. Die Synthese des *in vitro*-Transkripts fand in folgendem Ansatz für 1h bei 37°C statt:

1 μ l linearisierte Plasmid-DNA (1 μ g/ μ l)

2 μ l 10x Transkriptionspuffer (Roche)

2 μ l Dig LabelingMix bzw Fluoreszein Labeling-Mix(Sigma)

0,5 μ l RNase-Inhibitor (105U/ μ l, Amersham-Pharmacia)

13 μ l DEPC-H₂O

1,5 μ l RNA-Polymerase (20U/ μ l, Roche)

Das Transkript wurde entweder durch eine Lithiumchlorid-Fällung, oder durch Verwendung des RNAeasy Cleanup Kits (Quiagen) aufgereinigt und in 100 μ l 50% Formamid/50% H₂O aufgenommen

2.2.8 Southern-Hybridisierung

DNA wurde gemäß Standard-Methoden auf Nylonmembranen (Hybond-N, Amersham-Pharmacia) transferiert (Southern, 1975; Sambrook und Russell, 2001). 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 μ 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.

2.2.9 Zellkultur

2.2.9.1 Präparation und Kultur primärer embryonaler Fibroblasten

Primäre embryonale Fibroblasten ("Feeder-Zellen") wurden aus Embryonen präpariert, die aus Kreuzungen von Wildtyp-Tieren mit transgenen Neomycin-homozygoten Mäusen stammten (nach Joyner, 1999). Diese Neomycin-resistenten Fibroblasten bilden die ideale Matrix für das Wachstum embryonaler Stammzellen (= ES-Zellen).

Maus-Embryonen der Stadien E13,5 - E16,5 wurden steril entnommen, Kopf, Leber und innere Organe entfernt und die übrigen Gewebe mehrfach in PBS⁺⁺ (1,47mM KH₂PO₄, 8,1mM Na₂HPO₄, 137mM NaCl, 2,68mM KCl, 0,9mM CaCl₂, 0,5mM MgCl₂, pH 7,2) gewaschen. Anschließend wurden die Gewebe weiter zerkleinert und durch ein Sieb in einen mit Glasperlen gefüllten Erlenmeyerkolben gepreßt. Gleichzeitig erfolgte die Zugabe von 50ml 0,05% Trypsin/0,02% EDTA- sowie einiger Tropfen DNase-Lösung und die Inkubation der Zellsuspension unter Rühren für 30min bei 37°C. Daraufhin wurde erneut 50ml Trypsin/EDTA-Lösung

hinzugegeben, die Inkubation fortgesetzt und dieser Vorgang wiederholt. Nach Dekantieren der Glasperlen wurde die Zellsuspension bei 1500rpm für 5min abzentrifugiert. Die Präzipitate wurden zweimal mit PBS gewaschen, und in 5ml PBS (1,47mM KH_2PO_4 , 8,1mM Na_2HPO_4 , 137mM NaCl , 2,68mM KCl , pH 7,2) resuspendiert. Im Anschluß daran erfolgte das Ausplattieren in Fibroblasten-Medium mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen/150mm

Schale. Nach zwei bis drei Tagen konnten die konfluent gewachsenen Fibroblasten eingefroren werden.

Dazu wurden die abzentrifugierten Zellen in kaltem Einfriermedium A (ES-Zell-Medium/50% FCS) resuspendiert, langsam das gleiche Volumen kaltes Einfriermedium B (ES-Zell-Medium/20% DMSO) hinzugegeben und die Suspension auf Kryoröhrchen (Nalgene) aufgeteilt. Der Einfrierprozess wurde langsam bei -20°C für mehrere Stunden begonnen und die Röhrchen daraufhin kurzfristig bei -70°C oder aber für längere Zeit in flüssigem Stickstoff gelagert.

Das Auftauen der Zellen erfolgte dagegen durch schnelles Erwärmen bei 37°C . Zu den Zellen wurden langsam Fibroblasten-Medium hinzugegeben, gemischt und die Suspension bei 1100rpm, 4°C abzentrifugiert. Die Zellpräzipitate wurden wiederum in Fibroblasten-Medium aufgenommen und ausplattiert.

Die Fibroblasten mußten vor der Kultur mit ES-Zellen wachstumsinaktiviert werden. Dazu wurde zu 10ml Medienvolumen/150mm Schale $100\mu\text{l}$ Mitomycin C-Lösung hinzupipettiert (1mg/ml Mitomycin C in PBS, 5% DMSO, Sigma). Nach 2h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und auf neue Zellkulturschalen transferiert. Die wachstumsinaktivierten Fibroblasten konnten etwa zwei bis drei Wochen in Kultur gehalten werden.

2.2.9.2 Kultur, Transfektion und Selektion embryonaler Stammzellen

Nach schnellem Auftauen wurden die ES-Zellen sorgfältig vereinzelt in ES-Zell-Medium aufgenommen und ihrer Anzahl entsprechend auf Fibroblasten in 35 oder 60mm Schalen kultiviert. Dieses Medium wurde jeden Tag gewechselt und die Zellen bei Erreichen einer geeigneten Dichte (viele einzelne Zellklone, jedoch keine Konfluenz) auf 100mm Schalen kultiviert.

Für die Transfektion wurden 1×10^7 ES-Zellen/ $800\mu\text{l}$ in PBS eingesetzt, in einer Elektroporationsküvette (Gene-Pulser Küvette 0,4cm, Bio-Rad, München) mit 20-

25 μ g linearisiertem Targeting-Vektor gemischt und bei 300V, 1200 μ F mit einem Impuls von 2ms elektroporiert (L. Fischer, Heidelberg). Im Anschluß wurden die ES-Zellen in der Küvette resuspendiert und direkt auf vier dicht mit Fibroblasten bewachsenen 100mm Schalen ausplattiert.

Am zweiten Tag nach der Elektroporation wurde die Selektion auf homolog rekombinante ES-Zellklone mit Hilfe von 400 μ g/ml Geneticin (= G418) in ES-Zell-Medium begonnen. Die resistenten Zellklone konnten sieben bis acht Tage nach der Transfektion isoliert werden. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und die Klone daraufhin mit einer Pipettenspitze in etwa 25 μ l PBS auf eine unbehandelte 96 Loch-Platte überführt. Danach wurden die ES-Zellen durch Zugabe von 25 μ l 0,05% Trypsin/0,02% EDTA bei 37°C vereinzelt, 50 μ l ES-Zell-Medium hinzupipettiert und die Zellen auf eine neue mit Fibroblasten dicht bewachsene 96 Loch-Platte transferiert.

Etwa zwei Tage später wurden die Zellen gewaschen, trypsinisiert und ES-Zell-Medium hinzugegeben. Die eine Hälfte dieser Zellsuspension wurden auf eine mit 0,5% Gelatine/H₂O vorbehandelte 96 Loch-Platte, die andere Hälfte auf eine mit „Feeder“-Zellen bewachsene 96 Loch-Platte überführt. Auf der „Feeder“-Platte wurden die Stammzellklone bis zur Ausbildung von ausreichend großen Einzelkolonien kultiviert und anschließend folgendermaßen eingefroren: Die Klone wurden mit PBS/5mM EDTA gewaschen, trypsinisiert und 75 μ l eiskaltes Einfriermedium (ES-Zell-Medium/30% FCS/13,3% DMSO) hinzugegeben. Die in Papiertücher eingewickelte 96 Loch-Platte wurde unmittelbar bei -70°C eingefroren.

Auf der gelatinisierten 96 Loch-Platte ohne Fibroblasten wurden die ES-Zellen bis zur Konfluenz hochgezogen, da hier vorwiegend eine ausreichende Zellzahl zur Isolierung genomischer DNA aus den Klonen (siehe 2.2.1.2) wichtig war, und eine frühzeitige Differenzierung in Kauf genommen werden konnte. ES-Zellklone, in denen das Targeting-Konstrukt homolog integriert hatte, wurden mittels Southern-Hybridisierung identifiziert, dann aufgetaut und der Zellzahl entsprechend auf Fibroblasten in einer 96 Loch-Platte oder auf einer 35mm Schale kultiviert.

2.2.10 Etablierung von „Knockout“-Mäusen

Superovulation und Isolierung von Blastozysten sowie die Injektion embryonaler Stammzellen in Blastozysten (nach Bradley und Robertson, 1986) und der

anschließende Uterustransfer der Blastozysten wurde durch die Zentrale Transgene Einrichtung des MDC durchgeführt. Die Keimbahntransmission des mutierten Allels wurde mittels Southernhybridisierung und PCR überprüft.

2.2.11 Manipulation am Hühnerembryo

2.2.11.1 Kultivierung-Inkubation

Befruchtete Hühnereier wurden bis zum Inkubationsbeginn für maximal 10 Tage bei 4°C gelagert. Die Inkubation erfolgte in einem Brutgerät (Ehret Brutgerät BSS160) bei 38°C und 60% relativer Luftfeuchtigkeit.

2.2.11.2 Elektroporation von Hühnerembryonen

Die befruchteten Hühnereier wurden nach 2 1/2 bis 5 1/2 Tagen Inkubation aus dem Inkubator genommen. Das jeweilige Stadium wurde gemäß den von Hamburger und Hamilton gegebenen Richtlinien bestimmt (Hamburger, Hamilton...). Durch ein kleines Loch am basalen Pol des Eies wurden 4-6 ml Albumin entnommen. Darauf wurde mit einer Pinzette ein etwa 3x3 cm großes Loch in die obere Schale gebrochen. Das entnommene Albumin wurde ins Ei zurückgegeben wodurch sich der Embryo in der Mitte der Öffnung befand. Die zu elektroporierende DNA Lösung (1-1,5µg/µl Expressionsplasmid, 0,5-1µg/µl Markerplasmid*¹, 0,1% Fast green in Ringer Lösung*²) wurde mit Hilfe einer Glaskapillare in den Ventrikel des Neuralrohrs injiziert. Das Fast green ermöglichte es, den Injektionserfolg visuell zu verfolgen. Für die Elektroporation wurden die Elektroden beidseitig parallel zum Neuralrohr platziert. Die fünf Pulse (25 mV, 50ms, 1sec Intervall) erfolgten dann durch einen "Electro Square Porator ECM 830" der Firma BTX Instruments. Für die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse diente der RCAS A Vektor als Expressionsplasmid.

Elektroporierte Embryonen wurden für weitere 24-72h inkubiert und dann präpariert. Der Elektroporationserfolg wurde anhand der GFP Expression abgeschätzt. Nur GFP positive Embryonen wurden für die weitere Analyse ausgewählt.

<p>*²Ringer Lösung: 9.0g NaCl CMV 0.42g KCl 0.24g CaCl₂ auf 100 ml H₂O</p>	<p>*¹ pEGFP-C1 (Clontech): Die Expression des EGFP wird von dem humanen CMV Promotor kontrolliert pCIG (McMahon A): Die Transkription der IRES NLS-EGFP Expressionskassette wird von dem CMV Enhancer sowie dem Hühnchen β-actin Promotor kontrolliert.</p>
--	--

2.2.11.3 Zellschicksals-Analyse durch die Injektion replikationsdefizienter Retroviren

Die Zellschicksals-Analysen wurden im Labor von Constance Cepko (Department of Genetics /Harvard Medical School, Boston) und mit der Hilfe von Seo-Hee Cho durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden retroviralen Vektoren verwendet: pRdLac1 (Reddy et al., 1991) und pRAVE GFPnLacZ (modifizierte Version von pRAVE nLacZ Peters et al 2002). Um eine ausreichend hohe Infektionseffizienz zu erreichen, wurden die Viren mit dem VSV-G Hüllprotein versehen und in DF1 Zellen produziert. Die Produktion der Viren wurde von Seo-Hee Cho (Department of Genetics /Childrens Hospital Boston) vorgenommen. Um dorsale Vorläuferzellen zu infizieren und dadurch genetisch zu markieren, wurde die virale Suspension in den Zentralkanal des Neuralrohrs von Hühnerembryonen der Stadien HH25-26+ injiziert. Zur Analyse wurden die Embryonen 36 – 54 std später für die Immunhistologie vorbereitet. Zellklone die auf die Infektion zurückgingen wurden mittels Immunhistologie gegen β -Galaktosidase identifiziert. Dorsale Lhx1/5+ /Lbx1+ / β -Gal+ Zellen wurden als dILA Neurone definiert und Lhx1/5- /Lbx1+ / β -Gal+ als dILB Neurone; diese Zellen befanden sich lateral der Ventrikularschicht. Lhx1/5- /Lbx1- / β -Gal+ Zellen in der Ventrikulärzone wurden als Vorläuferzellen definiert. Doppel- bzw. Dreifachfärbungen von Klonen mit neuronalen Markern wurden mittels Konfokaler-Lasermikroskopie verifiziert. Dazu wurden Klone als Z-Stapel mit einer Schichtdicke von 1 μ m und einem Intervall von 0,84 μ m aufgenommen und analysiert.

2.2.12 Histologische Methoden

2.2.12.1 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 Vakuum-Zentrifuge 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 μ m dicke Rotationsmikrotomschnitte (Microm HM360, Walldorf) wurden im warmen Wasserbad gestreckt, auf Objektträger (Roth, Karlsruhe) aufgezogen und auf einer Heizplatte getrocknet.

2.2.12.2 Hämatoxilin/Eosin-Färbung von Methacrylatschnitten

Für Delafield's Hämatoxilin (Prudden, 1885; aus: Clark, „Staining Procedures“, 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 Lichtexposition 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 dH₂O 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 dH₂O 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 dH₂O gewässert werden, um das Ablösen vom Objektträger zu vermeiden. Die getrockneten Schnitte wurden in „Entellan“ (Merck, Darmstadt) eingedeckelt.

2.2.12.3 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 Zellfärbung, z.B. von Nissl Granula und Glia-Zellkernen). Die Hintergrundfärbung konnte daraufhin durch Waschen unter Leitungswasser entfernt werden. Nach kurzem Spülen in dH₂O wurden die Schnitte getrocknet und in „Entellan“ (Merck, Darmstadt) eingedeckelt.

2.2.12.4 Herstellung von Gefrierschnitten

Auf Gefrierschnitten wurden Immunhistologien oder *in situ*-Hybridisierungen durchgeführt. Nach dem Spülen in PBS wurden die präparierten Embryonen in 4% PFA (in 100mM NaPO₄, 150mM NaCl oder in PBS) für eine bis maximal zwei Stunden fixiert. Dieses Einfrieren erfolgte in „Tissue Tec“ (= „OCT-Compound“; Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) in einer Einbettform („Peel-Away“; Shandon, Frankfurt) auf 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 Schnittdicke für die Analyse der Retroviralen Klone betrug 35µm. Die Schnitte wurden auf Adhäsions-Objektträger (Histobond, Marienfeld) aufgezogen, bei 37°C getrocknet und dann feuchtigkeitsgeschützt eingefroren. Wie die gefrorenen Präparate konnten auch die Schnitte über mehrere Wochen bei -80°C aufbewahrt werden.

2.2.12.6 Immunhistologie auf Gewebeschnitten

Die Gefrierschnitte wurden für 1h bei RT in 1% Pferdeserum/ PBX (PBS mit 1% TritonX-100) blockiert. 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 10min mit 1% Pferdeserum/ PBX gewaschen und dann für 1h mit dem Sekundär-Antikörper in Blockierungslösung inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in 1% Pferdeserum/ PBX, 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.

Schwache Signale wurden mittels des TSA Cyanine Cy3 Systems (Perkin Elmer) entsprechend der Herstellerangaben amplifiziert.

2.2.12.7 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).

Um den Zeitpunkt der Bildung der verschiedenen Nervenzelltypen im embryonalen Neuralrohr zu bestimmen wurde BrdU (= 5-Brom-2'-desoxy-Uridin) intraperitoneal in schwangere Maus-Weibchen injiziert (75µg/g Körpergewicht in 0,9% NaCl) und die Embryonen anschließend zu unterschiedlichen Zeiten präpariert. Das BrdU, welches als Thymidin-Analogon nur in die DNA von Zellen inkorporiert wird, die sich in der S-Phase befinden, wurde immunhistologisch auf Embryonalschnitten mit einem Anti-BrdU-Antikörper aus der Maus (Sigma) oder der Ratte (Oxford Biotechnology) nachgewiesen. 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).

2.2.12.7 Herstellung von Paraffinschnitten

Neben der *in situ* auf Gefrierschnitten wurden auch *in situ* Hybridisierungen auf Paraffinschnitten durchgeführt. Embryonen wurden in PBS präpariert und mit 4%

PFA ü.N. bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Embryonen durch eine Methanolreihe (25%, 50%, 75% und 2x100% Methanol) dehydriert. Die Embryonen wurden dann entweder bei -20°C verwahrt oder für 1h in Ethanol überführt und zweimal für 1h in Tuluol inkubiert. So behandelt konnten sie dann in flüssiges Paraffin (60°C) gegeben werden. Dort wurden sie unter zweimaligem Wechseln des Paraffinbades für 3 Tage belassen. Die Embryonen wurde im flüssigen Paraffin ausgerichtet, bevor dieses aushärtete. Die Präparate wurden mit einer Schichtdicke von 5-10 μm geschnitten, im Wasserbad (48°C) gestreckt und auf Adhäsions-Objekträger (Histobond, Marienfeld) aufgezogen. Die Objekträger wurden bei 4°C verwahrt.

2.2.13 *In situ*-Hybridisierung

2.2.13.1 *In situ*-Hybridisierung auf Gefriergewebeschnitten

Die Gefrierschnitte wurden für 10min mit 4% PFA fixiert, dreimal mit PBS gewaschen und hierauf die Objekträger für 10min in Triethanolamin-Lösung acetyliert (4ml Triethanolamin, 500 μl konz. HCl, 750 μl Essigsäureanhydrid in 250ml H₂O). Nach kurzem Waschen in PBS erfolgte die Prähybridisierung. 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 80°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und auf etwa 100-200ng/150 μl in Hybridisierungspuffer verdünnt (50% entionisiertes Formamid, 5xDenhardts, 5x SSC, 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ denaturierte Lachsspermien-DNA, 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hefe-tRNA). Die Hybridisierung fand über Nacht bei 70°C in einer Feuchtkammer mit einem Kammerpuffer aus 50% Formamid und 5x SSC statt. Darauf wurden die Deckgläser durch 5min Waschen in 5x SSC, bei RT abgeschwemmt und die Präparate in 0,2x SSC bei 70°C für 60 min gewaschen. Nach erneutem kurzen Waschen in 0.2xSSC bei RT wurden die Objekträger in B1 Puffer überführt (0.1M Tris pH 7.5, 0,15M NaCl) und 5min inkubiert. Es folgte die Blockierung mit 10% Ziegen Serum in B1 Puffer für 60min. Die Inkubation mit dem anti-Dig Antikörper (in 10% Ziegen Serum / B1)

erfolgte ü.N bei 4°C. Danach wurden die Objektträger 3-4mal für je 10min mit B1-Puffer gewaschen, und kurz in NTMT (0.1M Tris pH9.5, 0.1M NaCl, 50mM Mg₂Cl, 0.1%Tween) inkubiert bevor sie in die Färbelösung transferiert wurden (3.5µl NBT und BCIP/1ml NTMT).

Um die Färbereaktion zu stoppen wurden die Objektträger mit H₂O gewaschen und anschließend mit Immunomount eingedeckelt.

2.2.13.2 *In situ*-Hybridisierung auf Paraffinschnitten

In situ-Hybridisierungen auf Paraffinschnitten haben gegenüber Hybridisierungen auf Gefrierschnitten den Vorteil, daß die Gewebestruktur besser erhalten bleibt. Der Nachteil bestand darin, daß Parallelschnitte des gleichen Embryos nicht für sowohl Atikörperfärbungen als auch in situ-Hybridisierungen eingesetzt werden konnten. Denn nur ein Teil der in dieser Arbeit verwandten Antikörper war in der Lage, das Antigenepitop auf Paraffinschnitten zu erkennen.

Zu Beginn der in situ-Hybridisierung wurden die Schnitte entwacht. Das erfolgte durch dreimaliges Waschen in Xylol (je 5min) und einer nachfolgenden absteigenden Ethanolreihe (2x 100% für 5min, 1x 95%, 1x85%, 1x70%, 1x50%, 1x30% je 3min). Die Objektträger wurden dann in PBS überführt (5min bei RT) und anschließend 15min nachfixiert (4% PFA). Nach zweimaligem Waschen in PBS erfolgte ein 15min Bleichschritt in 6% H₂O₂ und erneutes dreimaliges Waschen in PBS. Zur besseren Zugänglichkeit des Gewebes wurde ein 10min Proteinase K (10µg/ml) Schritt durchgeführt. Die Proeinase wurde dann durch zweiminütige Inkubation in 0,2% Glycin (in PBS) wie auch durch zweimaliges waschen in PBS gefolgt von einer 15minütigen Inkubation in 4% PFA inaktiviert. Nach Auswaschen des PFA durch PBS erfolgte eine zweiminütige Inkubation in 100mM Tris (pH 7,5). Danach wurden die Objektträger acetyliert (0,23% Essigsäureanhydrid in 0,1M Tris pH 7,5). Bevor die Schnitte wieder dehydriert wurden, erfolgte zweimaliges Waschen in 2xSSC (pH7,5). In der aufsteigenden Ethanolreihe wurden die Objektträger je 2min in 30%, 50%, 70%, 85%, 95% und 100% Ethanol inkubiert und anschließend für cirka 30min getrocknet. Während dessen wurden die Deckgläser silanisiert (s. 2.2.13.1).

Die Hybridisierunslösung (6.7xSSC, 33,3% Formamid, 3.3% Boeringer Block Reagenz, 2.27 % Dextran, 3,3mM EDTA, 0,06%Tween20, 0,6mM Heparine, 66.6µg/ml tRNA, 66.6µg/ml Lachsspermien DNA und 100-150ng/150µl Dig-markierte Sonde) wurde direkt auf die getrockneten Schnitte gegeben und mit einem

Deckgläschen bedeckt. Die so behandelten Objektträger wurden in einer feuchten Kammer (5xSSC, 50% Formamid) bei 60°C ü.N hybridisiert. Am nachfolgenden Tag wurden die Deckgläser bei 60°C in 5xSSC abgeschwemmt. Es folgte zweimaliges Waschen bei 60°C in 2xSSC, 50% Formamid. Zur Reduzierung unspezifischen Hintergrundes wurde eine RNase Behandlung durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte zunächst in TES (0,5M NaCl, 10mM Tris pH8, 1mM EDTA) umgepuffert und dann für 15min in RNase (20µg/ml in TES) bei 37°C inkubiert. Die RNase wurde mit TES ausgewaschen (1x5min RT) und es folgten zwei weitere Posthybridisierungs-Waschungen (2x15min 1xSSC/50% Formamid, 1x 0,2xSSC/50% Formamid je bei 60°C). Danach wurden die Objektträger zweimal bei RT in TBS gewaschen (150mM NaCl, 100mM Tris HCl pH7,4, 2mM KCl). Die Blockierung vor der Antikörperinkubation erfolgte in 1% Boehringer blocking reagent, 10% Ziegen-Serum (hitzeinaktiviert) in TBSX (TBS mit 0,1% TritonX100) für 2h bei 4°C in einer feuchten Kammer. Der Anti-Dig Antikörper wurde in 1:1000 der Blockierungslösung verdünnt und ü.N. bei 4°C auf den Objektträgern belassen. Ungebundener Antikörper wurde durch sechsmaliges Waschen in TBSX (je 30min bei RT) entfernt. Die Färbereaktion erfolgte wie zuvor beschrieben (2.2.13.1).

2.2.13.3 Präparation von Embryo-Pulver

Das Embryo-Pulver diente zum Präadsorbieren des Anti-Dig Antikörpers welcher in *in situ*-Hybridisierungen eingesetzt wurde. Präparierte Maus-Embryonen wurden in einem möglichst kleinen Volumen eiskaltem PBS homogenisiert, 4 Vol. eiskaltes Aceton hinzugegeben und diese Mischung für 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.

2.2.14 Elektrophysiologie

Die Messungen erfolgten nach Heppenstall und Lewin, PNAS 2001 und wurden unter Anleitung von Paul Heppenstall im Labor von Gary Lewin (Max-Delbrück-Centrum, Berlin) durchgeführt. Für die Messungen des spinalen Reflexbogens wurde ein zweigeteiltes E19 Rückenmark verwendet. Dazu wurde einer E19 Maus das

Rückenmark entfernt und entlang der Mittellinie zweigeteilt. Die Präparationen fanden in mit O₂ begaster Krebs* Lösung statt. Eine Rückenmarkshälfte wurde dann in eine Plexiglas Aufnahmekammer plaziert und mit O₂ begaster Krebs Lösung umspült. Nach einer ca. einstündigen Erholungsphase wurden mittels genau passender Glas-Ansaugel Elektroden direkte Spannungsmessungen durchgeführt. Gemessen wurde an ventralen Wurzeln des L5 Levels, wobei dorsale Wurzeln des gleichen Levels wurden stimuliert wurden. Die Stimulation erfolgte durch einen 500 μ A, 500 μ s Puls, der ausreichend war, die dünnen unmyelinisierten C-Fasern zu stimulieren. Das als "windup" bezeichnete Phänomen der aktivitätsabhängigen Steigerung des ventralen Wurzelpotentials (VWP) wurde durch wiederholte Pulse (20 Pulse à 1Hz) der genannten Stärke hervorgerufen. Der A-Faser vermittelte Impuls des VWP wurde als maximal Antwort auf die dorsale Stimulation gemessen. Der C-Faser vermittelte Anteil wurde als Integral unter der Erregungskurve, und auch als die Antwort die 2 sec nach der Stimulation gemessen werden konnte bestimmt. Zur Bestimmung des "wind-up" wurde die gemessene aktivitätsabhängige Steigerung des Potentials gegen die initiale Grösse des VWP normalisiert und als prozentuale Steigerung dargestellt. Der GABA Antagonist Bicuculine wurde in einer Konzentration von 20 μ M durch 10min Umspülen des Präparats verabreicht.

*Krebs Lösung:

138 mM	NaCl
1,35 mM	Kcl
21 mM	NaHCO ₃
0,58 mM	NaH ₂ PO ₄
1,16 mM	MgCl ₂
1,26 mM	CaCl ₂
10 mM	Glucose