

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), Invitex (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> XLI-Blue MRF'	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
pTV-0	(Grundgerüst: pIC19R, Marsh <i>et al.</i> , 1984)
konstruiert von Barbara Walter	
pTV-0-nls lacZ-floxed neo	
konstruiert von Dieter Riethmacher und Martin Sachs	

2.1.3 Genomische *PI*-Phagen Bibliothek

Zur Isolierung der genomischen *Lbx1* DNA-Klone wurden zunächst die Bedingungen für eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) etabliert (siehe 2.2.3), welche die Amplifikation

von genomischer *Lbx1*-DNA gestattet. Hiermit identifizierte die Firma Genome Systems Inc. (St. Louis, MO, USA; jetzt: Incyte Genomics Inc.) als Auftragsarbeit zwei Klone in ihrer *P1*-Phagen-Bibliothek (P1 ES 129/Ola; Sternberg und Cohen, 1989).

2.1.4 Zelllinie

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

2.1.5 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) oder Bomholtgard (jetzt: M&B A/S, Ry, Dänemark) bezogen.

2.1.6 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.

2.1.7 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
(10000u/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)
	60 μ l	LIF („Leukemia Inhibitory Factor“)

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 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 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 50µl ES-Zell-Lyse-Puffer/Well (10mM Tris pH 7,5, 10mM EDTA, 10mM NaCl, 0,5% N-Lauroylsarcosin (= „Sarcosyl“), 200µg/ml Proteinase K) bei 60°C in einer mit Parafilm abgedichteten Feuchtkammer über Nacht inkubiert. Nach Zugabe von 100µl eiskaltem 100% Ethanol mit $\frac{1}{20}$ Vol. 3M Natriumacetat/Loch wurde die DNA für 30 Minuten bei Raumtemperatur gefällt. Anschließend wurden die Überstände abgegossen, die DNA dreimal mit 70% Ethanol gewaschen und für etwa 20min leicht luftgetrocknet, bevor der Restriktionsverdau in 50µl Restriktionsmix (1x Restriktionspuffer, 100µg/ml BSA, 50µg/ml RNase, 10 - 15u 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.

2.2.2 Restriktionsverdau von Desoxyribonukleinsäuren und Transformation kompetenter Bakterien

Restriktionsverdau von Plasmid- und genomischer DNA wurden mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen gemäß Standardmethoden durchgeführt (Berger und Kimmel, 1987; Sambrook und Russell, 2001).

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

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (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 MgCl₂-Konzentrationen:

1. Lbx1

a) Wildtyp-Primer, 1,5mM MgCl₂

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 MgCl₂

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 MgCl₂

lacZ-a: 5'-TCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATG-3'

lacZ-b: 5'-ATATCCTGATCTTCCAGATAACTGCCG-3'

b) Programm

94°C	35s	} 38x
65°C	30s	
72°C	45s	
.....	+2s/Zyklus	
4°C	∞	

c) Produkt

463bp

3. Scatter Factor (SF)

a) Primer, 4mM MgCl₂

81L: 5'-CCCGCAGAGGTATATTGTGTTGTCC-3'

82W: 5'-CTGTTCTGATACACCTGTTGGCAC-3'

neo1L: 5'-CCTGCGTGCAATCCATCTTGTTC AATG-3'

b) Programm

94°C	45s	} 40x
70°C	30s	
72°C	15s	
.....	+1s/Zyklus	
4°C	∞	

c) Produkte

Wildtyp: 800bp
Mutante: 460bp

4. c-Met

a) Wildtyp-Primer, 3mM MgCl₂

Wmet8S: 5'-CTTTTCAATAGGGCATTGGCTGTG-3'

Wmet10: 5'-GTACACTGGCTTGTACAATGTACAGTTG-3'

b) Mutante-Primer, 4mM MgCl₂

Wmet5: 5'-CACTGAGCCCAGAAGAGCTAGTGG-3'

neo1L: 5'-CCTGCGTGCAATCCATCTTGTTC AATG-3'

c) Programm

94°C	45s	} 40x (Wildtyp), 35x (Mutante)
70°C	30s	
72°C	30s	
.....	+1s/Zyklus	
4°C	∞	

d) Produkte

Wildtyp: 520bp
Mutante: 310bp

5. Splotch

a) Primer, 1,5mM MgCl₂

splotch1: 5'-CAGCGCAGGAGCAGAACCACCTTC-3'

splotch2: 5'-CCTCGGTAAGCTTCGCCCTCTG-3'

b) Programm

95°C	2,30min	} 40x
95°C	30s	
60°C	30s	
72°C	30s	
4°C	∞	

c) Produkte

Wildtyp: 127bp
Mutante: 95bp

6. Gab1

a) Wildtyp-Primer, 2mM MgCl₂

Gab-Wt1: 5'-CCCTTTGTGGATGGCTTCTTTGT-3'

Gab-Wt2: 5'-TTCTTGGCATGATCGTTTTTGTA A-3'

b) Mutante-Primer, 2mM MgCl₂

Gab-Wt1: 5'-CCCTTTGTGGATGGCTTCTTTGT-3'

NLS-as2: 5'-TTGTTTTTCGAGCTTCAAGGTTTCAT-3'

Wildtyp- und Mutante-Primer wurden in einer kombinierten PCR-Reaktion eingesetzt.

c) Programm

95°C	2,30min	} 40x
95°C	30s	
60°C	30s	
72°C	40s	
4°C	∞	

d) Produkte

Wildtyp: 336bp

Mutante: 280bp

7. Deleter

a) Primer, 2mM MgCl₂

Deleter1: 5'-CGCCATCCACGCTGTTTTGACC-3'

Deleter2: 5'-CAGCCCGGACCGACGATGAAG-3'

b) Programm

94°C	2min	} 36x
94°C	45s	
60°C	30s	
72°C	30s	
4°C	∞	

c) Produkt

371bp

8. Cre

a) Primer, 1,5mM MgCl₂

cre1: 5'-TAATCGCCATCTTCCAGCAG-3'

cre2: 5'-CAATTTACTGACCGTACAC-3'

b) Programm

94°C	2min	} 35x
94°C	45s	
58°C	45s	
72°C	2min	
4°C	∞	

c) Produkt

1032bp

9. Neomycin

a) Primer, 1,5mM MgCl₂

neo19: 5'-GGCGCGGTCCCAGGTCCAC-3'

neo23: 5'-CTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCC-3'

b) Programm

95°C	2min	} 35x
94°C	45s	
66°C	30s	
72°C	30s	
4°C	∞	

c) Produkt

373bp

2.2.4 Sequenzierung

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	} 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 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.

2.2.6 *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 ddH₂O aufgenommen. Die Synthese des *in vitro*-Transkripts fand in folgendem Ansatz für 1h bei 37°C statt:

- 1µl linearisierte Plasmid-DNA (1µg/µl)
- 2µl 10x Transkriptionspuffer (Roche)
- 2µl je 10mM GTP, ATP (Sigma)
- 0,5µl RNase-Inhibitor (105U/µl, Amersham-Pharmacia)
- 2,5µl α-³⁵S-UTP (12,5mCi/ml, 1250Ci/mmol, Amersham)
- 2,5µl α-³⁵S-CTP (12,5mCi/ml, 1250Ci/mmol, Amersham)
- 8,5µl DEPC-H₂O
- 1µl RNA-Polymerase (20U/µl, Roche)

Nach Zugabe von 90µl TE-Puffer, 2µl 0,5M MgCl₂, 3µl DNase (10U/µl, Roche) wurde das DNA-Template durch Inkubation des Ansatzes für 10min bei 37°C entfernt. Anschließend wurden 100µg tRNA hinzupipettiert, das Volumen auf 200µl erhöht und die Probe einmal mit 100µl 7,5M NH₄Ac/750µl 100% Ethanol in flüssigem Stickstoff für 3min gefällt. Im Anschluß an die Zentrifugation wurde das Präzipitat in 100µl DEPC-H₂O aufgenommen, mit 50µl NH₄Ac/375µl 100% Ethanol erneut in flüssigem Stickstoff gefällt und dieser Schritt noch einmal wiederholt. Hiernach erfolgte die Resuspendierung der Probe in 30µl DEPC-H₂O, 30µl Formamid und 1µl 1M DTT sowie die Bestimmung der Aktivität durch Messung von 1µl der Sonde in 100µl H₂O und 3ml Szintillationslösung im Szintillationszähler. Sie lag in der Regel bei 0,75-1,5 · 10⁶cpm/µl.

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- Labelling-Kits“ der Firma Roche.

2.2.7 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 100µg/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 Zellkultur

2.2.8.1 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 KH₂PO₄, 8,1mM Na₂HPO₄, 137mM NaCl, 2,68mM KCl, pH 7,2) resuspendiert. Im Anschluß daran erfolgte das Ausplattieren in Fibroblasten-Medium mit einer Dichte von $5 \cdot 10^6$ 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 100µl 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.

2.2.8.2 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 $1 \cdot 10^7$ ES-Zellen/800 μ 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. Ab dem vierten Tag wurde zusätzlich mit 2 μ M Gancyclovir doppelselektioniert. 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 einem 96 Loch oder auf einer 35mm Schale kultiviert.

2.2.9 Etablierung von „Knockout“-Mäusen

2.2.9.1 Superovulation und Isolierung von Blastozysten

Um eine große Anzahl von Blastozysten zur Injektion der rekombinanten ES-Zellklone isolieren zu können, wurden 20-23 Tage alte C57Bl/6J-Weibchen superovuliert (nach Hogan *et al.*, 1994). Dazu wurden den Weibchen zuerst 100µl 50u/ml PMS in PBS („Pregnant Mare's Serum“ = Intergonan, Intervet GmbH, Tönisvorst) intraperitoneal injiziert. Dieses Serum enthält Follikel-Stimulierendes Hormon (FSH). Zwei Tage später erfolgte die intraperitoneale Injektion von 100µl 50u/ml hCG in PBS („humanes Chorion-Gonadotropin“ = Ovogest, Intervet GmbH, Tönisvorst) und die Verpaarung der Weibchen mit C57Bl/6J-Männchen. Am Morgen danach wurde das Auffinden eines Vaginalpfropfs mit einer erfolgreichen Kopulation gleichgesetzt. Dieser Tag wird allgemein als Tag 0,5 post coitum (p.c.) gezählt. Am Tag 3,5 p.c. wurden die Uteri zusammen mit Eierstöcken und Eileitern präpariert und die Blastozysten durch Einstechen einer Mundkapillare kurz unterhalb der Eileiter mit Blastozysten-Medium (Fibroblasten-Medium mit 30mM HEPES pH 7,2) aus den Uteri herausgespült. Die gesammelten Blastozysten wurden bis zur Injektion der ES-Zellen in Blastozysten-Medium unter Silikonöl DC200 (Serva, Heidelberg) bei 37°C inkubiert.

2.2.9.2 Injektion embryonaler Stammzellen in Blastozysten

(nach Bradley und Robertson, 1986)

In der Injektionskammer wurden ca. 2000-2500 zu injizierenden ES-Zellen in einem Tropfen Blastozysten-Medium vorgelegt, mit Silikonöl DC200 (Serva, Heidelberg) überschichtet und mit einer Mundkapillare 20 bis 30 Blastozysten hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Injektion der Blastozysten an einem Axiovert 10 Mikroskop (Zeiss) mit seitlich befestigtem Mikromanipulator (Brindi AG, Basel bzw. Eppendorf, Hamburg). Halte- und Injektionsnadeln wurden von Eppendorf (Hamburg) bezogen. Gelegentlich mußte dabei die Injektionsnadel durch Behandlung mit 300u/ml DNase I bzw. Proteinase K gereinigt werden. Der Transfer der injizierten Blastozysten in die Ammen wurde im Anschluß an eine mehrstündige Inkubation bei 37°C unter Silikonöl und nach der Bestätigung ihrer Weiterentwicklung durchgeführt.

2.2.9.3 Uterustransfer von Blastozysten

Injizierte Blastozysten wurden in 8-35 Wochen alte scheinchwangere CB6F1-Weibchen transferiert (Hogan *et al.*, 1994). Dabei wurden die Weibchen mit sterilen, vasktomierten Männchen verpaart. Nach einer solchen Verpaarung durchlaufen die Weibchen alle hormonellen Veränderungen einer normalen Schwangerschaft und sind deshalb für die transferierten Blastozysten empfänglich. Da die Blastozysten (Tag 3,5 p.c.) durch die *in vitro*-Manipulation eine Entwicklungsverzögerung erfahren, wurden sie in Tag 2,5 p.c. scheinchwangere Weibchen transferiert. Für den Uterustransfer wurden die Weibchen durch intraperitoneale Injektion von 50µl Rompun/ Ketamin-Lösung/25g Körpergewicht (120µl Rompun [Wirkstoff: Xylazin, Methylhydroxybenzoan], 340µl Ketamin [Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid], 540µl NaCl [physiol. Kochsalzlösung] auf 1ml; Pharmazeutische Handelsgesellschaft mbH, Garbsen) betäubt und die Uteri operativ freigelegt. Am Übergang zum Infundibulum wurden sechs bis acht injizierte Blastozysten mit einer Mundkapillare in jede Uterusseite transferiert. Abschließend wurde das Peritoneum (Bauchfell) genäht und das Fell mit Autoclips geklammert (9mm Wundclips; Becton Dickinson, Sparks, MD, USA).

2.2.10 Histologische Methoden

2.2.10.1 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. 5-10µm dicke Rotationsmikrotomschnitte (Microm HM360, Walldorf) wurden im warmen Wasserbad gestreckt, auf Objektträger (Roth, Karlsruhe) aufgezogen und auf einer Heizplatte getrocknet.

2.2.10.2 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 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 dH_2O

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.

2.2.10.3 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 dH₂O wurden die Schnitte getrocknet und in „Entellan“ (Merck, Darmstadt) eingedeckelt.

2.2.10.4 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 feuchtigkeits-

geschützt eingefroren. Wie die gefrorenen Präparate konnten auch die Schnitte über mehrere Wochen bei -80°C aufbewahrt werden.

2.2.10.5 β -Galaktosidase-Färbung

Der β -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_2 gespült und dann in Detergenz-Lösung (0,1M Phosphat-Puffer pH 7,3, 2mM MgCl_2 , 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 Kaliumferri-cyanid, 5mM Kaliumferrocyanid). Abschließend wurden die Schnitte in PBS gewaschen, kurz in dH_2O 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_2 , 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 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 5mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 10mM MgCl_2 , 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.

2.2.10.6 Immunhistologie auf Gewebeschnitten

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 Pferde-serum 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.

2.2.10.7 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).

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 (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 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).

2.2.10.8 Herstellung von Vibratomschnitten

Mit Hilfe des Vibratoms (Leica VT1000S, Bensheim) wurden Schnitte von 20-50µm 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.

2.2.11 *In situ*-Hybridisierung

2.2.11.1 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, 675µl Essigsäureanhydrid in 250ml H₂O). 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 $5 \cdot 10^6$ cpm/Objektträger in Hybridisierungspuffer verdünnt (50% entionisiertes Formamid, 10mM Tris pH 7,5, 10mM NaHPO₄ pH6,8, 5mM EDTA, 2x SSC, 150µg/ml denaturierte Lachsspermien-DNA, 150µg/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 20µg/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 H₂O 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 H₂O, 20min H₂O. Darauf erfolgte die Entfernung von Salzresten kurz in dH₂O 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 NaPO₄-Puffer pH 6, ad H₂O 200ml) und mit „Entellan“ (Merck) eingedeckelt.

2.2.11.2 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 (nach 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:H₂O₂ (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, 40µg Heparin, 100µg denaturierte Lachsspermien-DNA, 50µg 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 Digoxigeninmarkierten 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 Waschschritte 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 50µg/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% Ziegenserum mit 1µl 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% Ziegenserum 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 MgCl₂, 0,15% Tween 20) bei RT leicht schüttelnd inkubiert und darauf in 2ml Alkalische Phosphatase-Puffer mit je 7µl 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% Glycerol erforderlich.

2.2.11.3 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.