

### 3. Methoden

#### 3.1 DNA-Präparationen

##### 3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA nach der Rapid-Boiling-Methode (nach Evans and Wahl, 1987)

Zur schnellen Isolation von Plasmid-DNA für Restriktions- und PCR-Analysen wird die Minipräparation nach der Rapid-Boiling-Methode angewandt.

STET-Lösung	8% Sucrose
	5% Triton X-100
	50 mM EDTA
	50 mM Tris-HCl pH 8,0

Die Bakterien aus 1,5 ml Übernachtskultur werden in 300 µl STET-Lösung mit 0,8 mg/ml Lysozym aufgenommen und 2 min im Wasserbad gekocht. Nach kurzem Abkühlen werden die Zelltrümmer für 10 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert und das Pellet mit einem Zahnstocher entfernt. Aus dem Überstand wird die Plasmid-DNA nach Zugabe von 300 µl Isopropanol für 10 min bei Raumtemperatur ausgefällt. Die DNA wird anschließend 10 min bei 14.000 rpm sedimentiert, das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach kurzem Trocknen in 20 µl TE resuspendiert. Für Restriktionsanalysen werden 3,0 µl, für PCR-Tests 1,0 µl aus diesem Präparationsansatz eingesetzt.

##### 3.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA durch Adsorption an Säulenmaterial

Hochgereinigte DNA für Sequenzanalysen und Herstellung der RNA-Sonden für *in situ* Hybridisierungen wird durch Säulenchromatographie nach Protokollen der Bezugfirmen (Qiagen, Machery-Nagel oder Clontech) isoliert.

##### 3.1.3 Isolierung von Lambda-DNA aus Phagen-Lysaten (nach Helms *et al.*, 1985)

Lambda-Diluent	10 mM Tris-HCl pH 8
	2 mM MgCl <sub>2</sub>
Chasepuffer	10 mM Tris-HCl pH 8
	10 mM MgOAc
	60 mM NaOAc
Elutionspuffer	10 mM Tris-HCl pH 8
	50 mM MgOAc

Für die Präparation von Lambda-DNA aus Bakteriophagen werden diese auf L-Platten mit L-Top-Agar ausplattiert und 5 bis 7 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Platten werden 15 min bei 4°C gekühlt, mit 5 ml Lambda-Diluent überschichtet und bei 4°C über Nacht inkubiert. Aus diesem Plattenlysate wird nach der von Helms *et al.* (1985) beschriebenen Reinigungsmethode Lambda-DNA extrahiert.

Dazu wird gequollene DE52-Cellulose in Polycarbonat-Säulen bis zu einem Bettvolumen von 2 ml gefüllt. Das Plattenlysat wird auf die Cellulose aufgetragen und mit 5 ml Chasespuffer gewaschen. Die Phagen werden mit 1 ml Elutionspuffer am unteren Ende der Säule gesammelt und mit 0,6 ml Elutionspuffer eluiert. Es werden 10 µl 0,1 mg/ml Proteinase K und 24 µl 10%iges SDS zugegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 100 µl 3 M KOAc bildet sich ein Präzipitat, das sich durch 20 min Erhitzen bei 88°C wieder löst. Der Ansatz wird auf Eis abgekühlt (Präzipitat bildet sich wieder) und 15 min mit 12.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird mit 700 µl Isopropanol versetzt und die Phagen-DNA mindestens 1 Stunde bei -20°C gefällt. Sie wird 30 min mit 12.000 rpm pelletiert, mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und mindestens 15 min bei 68°C in 25 µl TE-Puffer gelöst.

### 3.2 Isolierung von RNA

Zur Vermeidung von Kontaminationen mit RNasen werden bei allen Arbeiten mit RNA die bei Sambrook *et al.* (1989) beschriebenen Arbeitsregeln eingehalten.

#### 3.2.1 RNA-Präparation nach der Single-Step-Methode (nach Chomczynski and Sacchi, 1987)

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe wird die Single-Step-Präparationsmethode mit stark denaturierenden Agenzien verwendet.

Lysis-Lösung	50 ml Guanidinisothiocyanat-Lösung: 1,7 ml 0,75 M Natriumcitrat pH 7,0 23,6 g Guanidinisothiocyanat 5 ml 2 M Natriumacetat-Lösung pH 4,0 50 ml Wasser-gesättigtes Phenol 350 µl 2-Mercaptoethanol
Guanidin-HCl-Lösung:	6 M Guanidin-HCl 50 mM NaOAc pH5,2

Verschiedene Maus-Organen oder -Gewebe werden nach der Präparation in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C aufbewahrt. Zur RNA-Isolation werden die Gewebe in flüssigem Stickstoff zermörsert und in Glas-Homogenisatoren mit 5 bis 10 fachem Volumen Lysislösung vollständig homogenisiert. Das Homogenisat wird in 10 ml Röhrchen transferiert, mit 0,1 Vol.

Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird zur Phasentrennung 20 min bei 9.000 rpm und 4°C (Sorvall, SS-34) zentrifugiert. Die RNA wird aus der wässrigen Phase durch Zugabe von 1 Vol. Isopropanol für mindestens 30 min bei -20°C ausgefällt und anschließend 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 400 µl Guanidin-Hydrochlorid-Lösung resuspendiert und die RNA durch Zugabe von 0,5 Vol. Ethanol erneut für mindestens 30 min bei -20°C präzipitiert. Nach 30 min Zentrifugation und Waschen in 75%igem Ethanol wird sie je nach ursprünglicher Gewebemenge in 25 bis 100 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und bei -80°C gelagert.

### 3.2.2 RNA-Präparation mit TRIzol-Reagens

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Nieren-Organkulturgewebe wird TRIzol-Reagens von GibcoBRL verwendet. Bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrtes Gewebe wird in 500  $\mu\text{l}$  TRIzol-Reagens mit feinen Kanülen homogenisiert und nach dem Protokoll des Herstellers weiter aufgearbeitet. Die Gesamt-RNA wird in 10  $\mu\text{l}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  gelöst.

### 3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur DNA- bzw. RNA-Mengenbestimmung der einzelnen Präparationsansätze wird mit dem Spektralphotometer die optische Dichte bei 260 nm gemessen. Dabei werden folgende Werte zugrunde gelegt:

DNA (doppelsträngig)	$\text{OD}_{260}=1$ entspricht 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$
RNA	$\text{OD}_{260}=1$ entspricht 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$

### 3.4 Gelelektrophoresen

#### 3.4.1 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird sowohl für analytische Zwecke als auch zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten eingesetzt.

50 x TAE-Puffer	2 M Tris-Essigsäure pH 7,5 - 8,0 50 mM EDTA
6 x GL-Puffer (Gel-Lade-Puffer)	15 % Ficoll (Type 400) 0,25 % Bromphenolblau 6 mM EDTA pH 8

Entsprechend der Größen der aufzutrennenden Fragmente werden 0,8 bis 2%ige Agarosegele in 1 x TAE-Puffer verwendet. Zur Färbung der DNA wird dem Gel 1,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ethidiumbromid zugegeben. Die Proben werden vor dem Laden mit 2 bis 3  $\mu\text{l}$  6 x GL-Puffer versetzt und anschließend bei 6-8 V/cm für 1 bis 3 Stunden elektrophoretisch getrennt. Nach dem Lauf werden die aufgetrennten DNA-Fragmente im UV-Licht (254 nm) analysiert. DNA-Fragmente, die zur Klonierung oder Sequenzierung eingesetzt werden sollten, wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit Gelextraktionskits nach Protokollen der Hersteller (Qiagen, Macherey-Nagel) aufgereinigt. Für die Präparation von DNA-Fragmenten, die als Sonden für radioaktive Hybridisierungen eingesetzt werden sollen, werden 0,8%ige LMP (low melting point)-Agarosegele verwendet.

#### 3.4.2 RNA-Agarose-Gelelektrophorese

20 x MOPS-Puffer	0,4 M MOPS 0,1 M Na-Acetat 10 mM EDTA
------------------	---

RNA-GL-Puffer	1,0 µl 20 x MOPS
	3,5 µl Formaldehyd
	10,0 µl Formamid
	5,5 µl H <sub>2</sub> O

Zur Auftrennung der gereinigten Gesamt-RNA für die Herstellung von Northern Blots werden 1,3%ige Agarosegele mit 1,1% Formaldehyd in 1 x MOPS-Puffer verwendet, wobei pro Spur etwa 10 µg RNA bzw. 1 µl der Organkultur -RNA eingesetzt werden. Um die RNA zu konzentrieren, wird die entsprechende Menge mit 1 Vol. 5 M Lithiumchlorid-Lösung für 20 min auf Eis gefällt und anschließend 20 min abzentrifugiert. Zum Laden wird die ausgefällte RNA in 20 µl RNA-GL-Puffer resuspendiert und 15 min bei 68°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgt bei 8 bis 9 V/cm für 3 bis 4 h. Die Gele werden nach der Elektrophorese 20 min in Ethidiumbromid-Lösung gefärbt (1,0 µg/ml Ethidiumbromid in 1 x MOPS) und für 45 min in H<sub>2</sub>O entfärbt. Die Banden der 28S- und 18S-rRNA sind im UV-Licht sichtbar.

### 3.4.3 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von Differential Display PCR-Produkten (ddPCR-Produkten) und Sequenzreaktionen werden denaturierende Polyacrylamid-Gele der Größe 31,0 cm x 38,5 cm x 0,4 mm verwendet.

10 x TBE-Puffer	0,9 M Tris-Borat pH 8,0 20 mM EDTA
Gellösung	50 % Harnstoff 6 % Acrylamidlösung:Bisacrylamid (38:2) 1 x TBE 0,1 % APS 0,02 % TEMED
denaturierender Ladepuffer	10 mM NaOH 95 % Formamid 0,05 % Bromphenolblau 0,05 % Xylencyanol

Die Proben werden vor dem Auftragen auf das Gel mit denaturierendem Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 80°C denaturiert. Nach einem Vorlauf von etwa 15 min erfolgt die Elektrophorese in 1 x TBE-Puffer unter folgenden Bedingungen:

ddPCR-Produkte:	2,5 h bei 1200 V bzw. 68 W
PCR-Sequenzierungsreaktionen:	3,0 h bei 1600 V bzw. 68 W

Zur besseren Auftrennung eines größeren Sequenzbereichs, wird zur Elektrophorese von PCR-Sequenzierungsreaktionen 0,5 Vol. 3 M Natriumacetat-Lösung in das untere Pufferreservoir gegeben. Nach Abschluß werden die Gele auf 3MM Whatman Papier getrocknet und mit Röntgenfilmen exponiert.

### 3.5 Transfer von DNA und RNA

#### 3.5.1 Southern Blot

Transferlösung	0,5 M NaOH
	1,5 M NaCl
1M Na-Phosphat-Puffer	89,0 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 2 H <sub>2</sub> O
	4,0 ml/l H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>

Zum Transfer von DNA aus Agarosegelen wird der Kapillar-Blot nach Southern (1975) durchgeführt. Die Übertragung mit alkalischer Transferlösung erfolgt auf ungeladene Nylonmembranen (Qiabrane, Qiagen) für 16 bis 18 Stunden. Im Anschluß wird die Membran 1 min in 40 mM Na-Phosphatpuffer neutralisiert und zur endgültigen Fixierung der DNA mit UV-Licht einer Wellenlänge von 245 nm bestrahlt (Crosslinking, 150 mJ im GS Gene linker, Biorad).

#### 3.5.2 Northern Blot

20 x SSC	3M NaCl
	0,3 M Na-Citrat

Die in Formaldehyd-Agarosegelen aufgetrennte Gesamt-RNA wird mit Hilfe der Kapillar-Blot-Technik auf ungeladene Nylonmembran (Qiabrane, Qiagen) übertragen, wobei der Transfer mit 10 x SSC für 16 bis 18 Stunden erfolgt. Anschließend werden die Membranen 1 min in 2 x SSC gespült und die RNA nach kurzem Trocknen der Filter durch UV-Crosslinking fixiert. Zusätzlich werden die Northern Blots im Anschluß an die UV-Fixierung für 30 min bei 80°C gebacken.

### 3.6 Radioaktive Markierung von DNA und Filterhybridisierung

Proben für die Hybridisierung von Northern- oder Southern Blots werden nach der Random Priming-Methode von Feinberg und Vogelstein (1983) markiert.

OLB-Mix	50 mM Tris-HCl (pH 7,2)
	10 mM MgCl <sub>2</sub>
	0,1 mM DTT
	100 µg/ml BSA
	6,25 Einheiten (=OD <sub>260</sub> )/ml Hexanukleotide
	25 µM dATP
	25 µM dGTP
	25 µM dTTP

Hybridisierungslösung	0,5 M Na-Phosphatpuffer 5% SDS 1 mM EDTA 100 µg/ml denaturierte Lachssperma-DNA
Waschlösung	40 mM Na-Phosphat-Puffer 0,5 % SDS
Striplösung	1 mM Tris/HCl pH 8,0 0,1 % SDS 0,1 mM EDTA pH 8,0

Zunächst werden 50 bis 100 ng der Sonde in einem Gesamtvolumen von 35 µl durch Kochen denaturiert. Nach kurzem Abkühlen auf Raumtemperatur werden 5 µl OLB-Mix, 1 U DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) und 1 bis 3 µl  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP zugegeben und der Ansatz für 3 bis 5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Prähybridisierung werden die Nylonmembranen mit 2 ml/100 cm<sup>2</sup> Hybridisierungs-Lösung in Plastiktüten luftblasenfrei eingeschweißt und bei 68°C für mindestens 30 min inkubiert. Anschließend wird die markierte Probe 5 min im kochenden Wasserbad denaturiert. Die einzelsträngige Sonde wird dann zu den Filtern in die Hybridisierungslösung pipettiert und erneut luftblasenfrei verschweißt. Die Hybridisierung erfolgt bei 68°C über Nacht. Die Filter werden im Anschluß 1 mal 2 min bei Raumtemperatur und 3 mal 10 - 15 min bei 68 °C gewaschen. Zur Autoradiographie werden die Membranen in Röntgenkassetten mit Verstärkerfolie für einige Stunden bis zu 10 Tagen bei -80°C exponiert.

Um die Filter für erneute Hybridisierungen zu verwenden wird die gebundene Sonde durch 10 - 20 min Waschen in Striplösung bei 80°C entfernt.

### Quantifizierung von RNA durch Northern Blot Hybridisierung

Zur Quantifizierung der Nierenorgankultur-RNA werden Northern Blots mit einem Oligonukleotid komplementär der 28S-rRNA (Hassouna *et al.*, 1984) hybridisiert. Dazu wird das 28S-rRNA-Oligonukleotid mit T4 Polynukleotid-Kinase am 5'-Ende radioaktiv markiert:

5'-Markierung:	1 µl	30 µM 28S-rRNA-Oligonukleotid
	2 µl	10 x Polynukleotid-Kinase-Puffer
	3 µl	$\gamma^{32}\text{P}$ -dATP
	2 µl	10 U/µl T4 Polynukleotid-Kinase
	ad 20 µl H <sub>2</sub> O	

Die Markierungsreaktion wird 1 Stunde bei 37°C durchgeführt und anschließen 20 min bei 68°C denaturiert. Prähybridisierung, Hybridisierung und Waschen der Northern Blots werden wie oben beschriebenen durchgeführt, wobei die Hybridisierungstemperatur auf 55°C und die Waschttemperatur auf 50°C herabgesetzt wird. Die Auswertung der Autoradiogramme erfolgt mittels Phosphor-Imager (Molecular Dynamics).

### 3.7 PCR-Methoden (polymerase chain reaction)

#### 3.7.1 Präparative PCR

Mittels PCR werden spezifische DNA-Fragmente mit Primern amplifiziert, die Restriktionsschnittstellen enthalten. Diese Fragmente werden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten, durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, aufgereinigt und zur weiteren Klonierung eingesetzt.

PCR-Ansatz:	10 ng	Plasmid-DNA
	4 µl	10 x PCR-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 9, 500 mM MgCl <sub>2</sub> , 1% Triton-X 100, 2 mg/ml BSA)
	0,2 µl	25 mM dNTPs
	2 µl	10 µM Primer 1
	2 µl	10 µM Primer 2
	0,5 µl	5 U/µl Pwo DNA-Polymerase
	ad 40 µl H <sub>2</sub> O	

Programm:	1.	5 min	94°C
	2.	30 sec	94°C
	3.	30 sec	jeweilige Annealingtemperatur
	4.	30 sec - 2 min	72°C
	Schritte 2.- 4. 29 x		
	5.	10 min	72°C

#### 3.7.2 Analytische PCR

Für die Analyse von DNA wird obiger PCR-Ansatz halbiert und Taq DNA-Polymerase verwendet. Als Matrize können neben gereinigter DNA auch Bakterienkolonien oder -kulturen nach Transformation mit rekombinanter DNA verwendet werden. Dazu werden 1 µl einer DNA-Präparation, einer Bakterienkultur oder wenige Zellen direkt in den PCR-Ansatz gegeben. Als Primer werden Promotorsequenzen der Vektoren oder genspezifische Sequenzen verwendet.

#### 3.7.3 Differential Display PCR-Analyse (nach Linskens *et al.*, 1995 ,modifiziert)

Zur Identifizierung differentieller Genexpression in eukaryotischen Zellen wird die Differential Display PCR Analyse (ddPCR-Analyse) verwendet. Sie beruht auf der systematischen Amplifikation der 3'-Enden von mRNAs und deren Auftrennung in denaturierenden Polyacrylamidgelen.

#### Reverse Transkription

Einzelne Subpopulationen der mRNAs werden mit Hilfe der spezifischen oligo-dT-Primer revers transkribiert. Dazu werden 0,5 µg der Gesamt-RNA zunächst mit 2,5 µl 20 µM oligo-dT-Primer in einem Gesamtvolumen von 13 µl 10 min bei 75°C präinkubiert. Nach schnellem Abkühlen wird dem Ansatz zugegeben:

5,0 µl	5 x first strand buffer (200 mM Tris-HCl pH 8,3, 500 mM KCl, 25 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mg/ml BSA)
2,5 µl	0,1 M DTT

2,5 µl	250 µM dNTPs
1,5 µl	H <sub>2</sub> O
0,5 µl	Superscript II Reverse Transkriptase (100 -200 U/µl)

und für 70 min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wird der Ansatz 10 min auf 95°C erhitzt und die cDNA bei -70°C gelagert.

### ddPCR

Die Reaktionen der ddPCRs werden in einem Gesamtvolumen von 10 µl, überschichtet mit einem Tropfen Paraffinöl (ca. 40 µl), durchgeführt (Tri-Thermoblock, Biometra; PTC-100, MJ-Research).

PCR-Ansatz:	1,0 µl	10 x PCR Puffer (Zusammensetzung siehe oben)
	0,375 µl	100 µM dNTPs
	0,625 µl	20 µM 5' -arbitrary-Primer
	0,1 µl	α <sup>32</sup> P-dCTP
	0,1 µl	5 U/µl Taq DNA-Polymerase
	0,1 µl	0,25 U/µl Pwo DNA-Polymerase
	1,0 µl	cDNA
	ad 10 µl H <sub>2</sub> O	

Programm	1.	94°C	60 sec
	2.	94°C	45 sec
	3.	41°C	60 sec
	4.	72°C	120 sec
	Schritte 2. - 4. 8 x		
	5.	94°C	45 sec
	6.	60°C	45 sec
	7.	72°C	120 sec
	Schritte 5. - 7. 15 x		
	8.	72°C	5 min

Nach Beendigung des Programms werden 4,5 µl denaturierender Ladepuffer zugegeben und die PCR-Ansätze bis zur Trennung im Gel bei -20°C gelagert. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgt in 6 %igen denaturierenden Polyacrylamidgelen.

Diejenigen PCR-Produkte, die im Röntgenfilm als differentiell identifiziert werden, werden aus dem getrockneten Gel ausgeschnitten und bei 4°C gelagert.

### Reamplifikation von ddPCR-Produkten

Für die Subklonierung oder direkte Sequenzierung von einzelnen, aus den Gelen isolierten ddPCR-Produkten werden diese mit den ursprünglich in der ddPCR verwendeten Primern nochmals amplifiziert. Dazu wird das auf Papier getrocknete Gelstück verwendet. Die Reamplifikation wird in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt.

PCR-Ansatz:	5,0 µl	10 x PCR Puffer (Zusammensetzung siehe oben)
	2,5 µl	1 mM dNTPs

3,0 µl	20 µM oligo-dT-Primer
3,0 µl	20 µM 5' -arbitrary-primer
0,5 µl	5 U/µl Taq DNA-Polymerase
1/3	ausgeschnittenes Gelstück
ad 50 µl H <sub>2</sub> O	

Programm:	1.	94°C	120 sec
	2.	94°C	45 sec
	3.	60°C	60 sec
	4.	72°C	120 sec
	Schritte 2. - 4. 30 x		
	5.	72°C	5 min
	6.	4°C	

Zur qualitativen und präparativen Analyse werden die PCR-Produkte auf 1,2%igen Agarosegelen aufgetrennt.

### 3.8 DNA-Klonierungstechniken

#### 3.8.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur analytischen sowie präparativen Spaltung von Plasmid-DNA wird jeweils 1 U/µg DNA des entsprechenden Restriktionsenzym eingesetzt. Puffer und Reaktionsbedingungen werden gemäß den Herstellerangaben gewählt.

#### 3.8.2 Ligation von DNA

Für die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit kompatiblen, überhängenden oder glatten Enden wird die T4 DNA-Ligase verwendet. Die Konzentration der zu ligierenden Fragmente wird so gewählt, daß das molare Verhältnis von Vektor zu Insert 1:3 bis 1:10 beträgt. Zur Vermeidung der Selbstligation von Vektor-Fragmenten mit identischen Enden werden die 5'-Phosphatgruppen durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (calf intestinal phosphatase, CIP) abgespalten. Dazu wird nach dem Restriktionsverdau dem Ansatz 1 U CIP zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Abtrennung des Enzyms wird die DNA in einem Agarosegel aufgetrennt und das Fragment aus dem Gel gereinigt. Für den Ligationsansatz werden etwa 100 bis 200 ng DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt. Die Ligation erfolgt in 1 x Ligase-Puffer (40 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP, pH 7,8) mit 5 U T4 DNA-Ligase mehrere Stunden bei 16°C oder Raumtemperatur. Aus diesem Ligationsansatz werden 1 - 5 µl in der anschließenden Transformation eingesetzt.

### 3.9 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation wird der Bakterienstamm *E. coli* DH5 $\alpha$  verwendet.

#### 3.9.1 Herstellung kompetenter Zellen

SOB Medium pH 7,6	20 g/l Bacto-Trypton
	5 g/l Hefeextrakt
	2,5 mM KCl
	10 mM NaCl

Vor Gebrauch 20 ml/l 1 M MgSO<sub>4</sub> zugeben.

TB-Puffer pH 6,7	10 mM PIPES
	15 mM CaCl <sub>2</sub>
	250 mM KCl

55 mM MnCl<sub>2</sub> zugeben und steril filtrieren

DH5 $\alpha$ -Zellen werden auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Zehn Kolonien werden isoliert und in 250 ml SOB Medium in einer 2 Liter-Flasche bei Raumtemperatur unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 inkubiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis wird die Kultur in Zentrifugenbecher überführt und mit 3000 rpm für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wird in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert und wie oben abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 20 ml TB-Puffer resuspendiert und vorsichtig unter Schwenken DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7% zugegeben. Nach 10 min Inkubation auf Eis wird die Zellsuspension in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aliquotiert (250  $\mu$ l), in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C aufbewahrt.

#### 3.9.2 Transformation

Zur Transformation werden 50  $\mu$ l kompetente Zellen mit der zu transformierenden DNA gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschockbehandlung des Zell-DNA-Gemischs für 3 min bei 37°C und sofortiger Abkühlung auf Eis, werden 250  $\mu$ l LB-Medium zugegeben und der Ansatz 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden auf Selektionsplatten ausplattiert und 14 bis 16 Stunden bei 37°C inkubiert.

### 3.10 Sequenzierung

In der ddPCR-Analyse identifizierte PCR-Produkte werden unter Verwendung des SequiTherm bzw. des Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kits entsprechend den Protokollen der Hersteller sequenziert. Als Primer der Sequenzreaktion werden die entsprechenden 5'-arbitrary-Primer verwendet.

Die Reaktionen mit dem Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator-Kit wurden von Barbara Klamt durchgeführt. Alle anderen DNA-Sequenzen wurden mit dem ALFexpress Sequenzer von Cuong Kien analysiert.

### 3.11 Screening von cDNA-Bibliotheken

Lambda-Platten	1% Pepton 0,5% NaCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> (nach Autoklavieren zugeben) 1,1% Agar
Lambda-Top-Agarose	Medium wie Lambda-Platten 0,7% Agarose
L-Platten	1% Pepton 0,5% Hefe-Extrakt 0,5% NaCl 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1,2% Agar
L-Top-Agar	Medium wie L-Platten 0,7% Agar

Bei der verwendeten 11 Tage embryonalen Maus cDNA-Bibliothek (Novagen) handelt es sich um cDNA, die zwischen T7 und SP6 Promotoren in den Phagenvektor Lambda-SHlox kloniert ist (Palazzolo *et al.*, 1990). Die cDNA ist außerdem von Plasmidvektorsequenzen flankiert, die durch Excision mit Cre-Endonuklease aus dem Phagenvektor isoliert werden können. Bei dieser cDNA-Bibliothek werden für Screening und Bestimmen des Titers ER1647-Bakterienzellen, zur *in vivo* Excision BM25.8-Wirtszellen verwendet. Die embryonale E8,5 Maus cDNA-Bibliothek von Brigid Hogan ist in den Phagenvektor Lambda-gt10 kloniert und enthält kein Excisionssystem. Deshalb muß DNA aus den entsprechenden Phagenklonen isoliert und die enthaltenen cDNAs subkloniert werden. Für das Screening dieser cDNA-Bank werden LE392-Zellen verwendet.

#### 3.11.1 Bestimmung des Phagen-Titers

Wirtszellen (Bakterienstämme LE392 oder ER1647) werden über Nacht bei 37°C in LB-Medium inkubiert und bei 4°C aufbewahrt. Es werden Reihen von 1:100 Verdünnungen der Phagenbank in SM-Puffer hergestellt. 100 µl Wirtszellen werden mit 100 µl Phagenverdünnung gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann werden 3 ml geschmolzene, auf 50°C äquilibrierte Lambda-Top-Agarose mit der Phagen/Wirtszell-Suspension gemischt und auf 94 mm Lambda-Platten ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C werden die Phagenplaques gezählt und daraus der Phagentiter (pfu/ml) bestimmt: Anzahl der Plaques auf einer Platte x Verdünnungsfaktor x 10.

#### 3.11.2 Ausplattieren der DNA-Bibliotheken und Transfer auf Filtermembranen

Von jeder DNA-Bank werden 500.000 bis 1 Million Phagenplaques in einer Dichte von 50.000 Plaques pro Platte auf 145 mm Lambda-Agarose-Platten ausplattiert. Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert, kurz abgekühlt und 135 mm Nylon-Rundfilter aufgelegt. Die Filter und Platten werden mit einer Kanüle in asymmetrischen Mustern markiert. Nach 5 min Adsorption werden die

Filter in Denaturierungslösung, Neutralisationslösung und 50 mM NaHPO<sub>4</sub>-Puffer je 5 min inkubiert, getrocknet und mit UV-Licht fixiert (Crosslinking).

### 3.11.3 Detektierung und Analyse rekombinanter Phagen

Die an Filter gebundene Bakteriophagen-DNA wird durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden detektiert. Bereiche, die positive Plaques enthalten, werden mit dem breiten Ende einer Pasteurpipette aus den Platten ausgestochen und in 1 ml SM-Puffer mit 1 Tropfen Chloroform transferiert. Nach Inkubation von mehreren Stunden bei Raumtemperatur, werden 1 µl und 20 µl einer 1:500 Phagen-Verdünnungen auf 94 mm Lambda-Platten mit Top-Agarose ausplattiert. Die Plaques werden erneut auf Filter übertragen und hybridisiert. Dieses Rescreening wird so lange durchgeführt, bis einzelne Plaques einzelnen radioaktiven Signalen zugeordnet werden können. Diese Plaques werden mit dem feinen Ende von Pasteurpipetten isoliert und in 100 µl SM-Puffer ohne Chloroform eluiert. 50 µl der Phagensuspension werden nun auf 94 mm L-Platten mit L-Top-Agar ausplattiert und 5 bis 7 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Platten werden im Kühlraum 15 min vorgekühlt, mit 5 ml Lambda-Diluent überschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. 500 µl dieser Phagensuspension werden mit Chloroform versetzt und bei 4°C aufbewahrt. Die übrige Suspension kann zur DNA-Präparation mit DEAE-Cellulose Säulen verwendet werden (siehe 3.1.3).

### 3.11.4 Cre-vermittelte *in vivo* Excision von Plasmiden

BM25.8-Wirtszellen werden über Nacht bei 37°C in LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin und 34 µg/ml Chloramphenicol inkubiert. 100 µl Übernachtskultur werden mit 100 µl einer geeigneten Phagenverdünnung gemischt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und auf einer LB-Ampicillin-Platte mit einem Spatel ausplattiert. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht erhält man Kolonien, die Plasmide (pSHlox) mit cDNA-Insert enthalten. Da die Cre-Rekombinase ein Gemisch aus Plasmidmultimeren produziert, muß die durch Rapid-Boiling-Präparation gewonnene DNA zur weiteren Analyse (Restriktionsverdau oder Sequenzierung) in DH5α transformiert werden. Die BM28.5-Kolonien können vor der Retransformation mit analytischer PCR (Kap. 3.7.2) getestet werden.

## 3.12 Protein-Expression

### 3.12.1 Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen in *E. coli*

Bakterien, die cDNA für das zu exprimierende Protein im richtigen Leseraster in dem Plasmidvektor pGEX-KG enthalten, werden in 100 ml LB-Ampicillin/Methicillin über Nacht bei 37°C kultiviert. Diese Kultur wird 1:10 mit LB-Ampicillin-Medium verdünnt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 bis 0,5 inkubiert. Die Expression der GST-Fusionsproteine wird durch Zugabe von 0,1 bis 0,5 mM IPTG induziert. Nach 3 Stunden Inkubation bei 37°C werden die Bakterien 10 min bei 6000 rpm pelletiert und in 10 ml eiskaltem PBS/1 mM PMSF resuspendiert. Die Bakteriensuspension wird in 1 bis 2 ml Aliquots 15 min in Intervallen mit Ultraschall behandelt, 1% Triton-X 100 wird zugegeben und 10 min mit 6.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der klare Überstand wird ohne weitere Aufreinigung für GST-pulldown-Analysen eingesetzt oder mit Gluthation-Sepharose aufgereinigt. Dazu wird der Proteinüberstand mit 1 ml PBS-äquibrierter Glutathion-Sepharose (1:1 Suspension) 30 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Die Sepharose wird 5 min bei 500 rpm pelletiert, 3 mal mit 10 fachen

Vol. PBS gewaschen, in 1 ml PBS aufgenommen und in eine Polycarbonat-Säule (Biorad) überführt. Die Fusionsproteine werden mit 3 ml Elutionspuffer eluiert und in 250 µl Fraktionen aufgefangen. Die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen wird nach der Bradford-Methode bestimmt und auf einem denaturierenden SDS-Polyacrylamid Gel analysiert.

### 3.12.2 *In vitro* Synthese von Proteinen durch Transkription/Translation von klonierten Genen

Radioaktiv-markierte Proteine (<sup>35</sup>S-Methionin) für Protein-Protein-Interaktionsstudien sowie nicht radioaktiv-markierte Proteine für Protein-DNA-Bindungsstudien werden mit dem TNT-Kit (Promega) nach dem Protokoll des Herstellers synthetisiert. Dafür werden Plasmidvektoren verwendet, die die entsprechenden Gene im Anschluß an SP6 oder T7 RNA-Polymerase Promotoren enthalten.

## 3.13 Protein-Analyse

### 3.13.1 Konzentrationsbestimmung (nach Bradford, 1976)

Die Methode basiert auf der Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine. Die Bindung verursacht eine Verschiebung des Absorptionsmaximums der Farbstoffs von 465 nm nach 595 nm, welche photometrisch detektiert werden kann.

800 µl Bradford-Lösung (Biorad) wird mit 1 µl der zu vermessenden Proteinlösung gemischt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich die Absorption bei 595 nm im Spektralphotometer ermittelt. Als Referenz dient eine mit BSA erstellte Eichgerade.

### 3.13.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteingemischen nach dem Molekulargewicht. Hierbei werden die Proteine zunächst in einem niedrigprozentigen Sammelgel (5%) fokussiert und dann in einem höherprozentigen Trenngel separiert. Die Acrylamidkonzentration richtet sich dabei nach der Größe der aufzutrennenden Proteine (zwischen 8% und 15%).

Sammelgel	125 mM Tris-HCl pH 6,8 5 % Acrylamid:Bisacrylamid (19:1) 0,1 % SDS 0,1 % APS 0,1 % TEMED
Trenngel	375 mM Tris-HCl pH 8,8 8 - 15 % Acrylamid:Bisacrylamid (19:1) 0,1 % SDS 0,1 % APS 0,06 % TEMED
5 x SDS-Laufpuffer	0,5 % SDS 1,25 M Glycin 12,5 mM Tris-Base

2 x Laemmli-Probenpuffer	4% SDS
	20% Glycerin
	0,125 Tris-HCl pH 6,8
	0,2 M DTT
	0,01% Bromphenolblau

Die zu analysierenden Proben werden vor dem Gellauf mit 2 x Laemmli-Probenpuffer 1:1 gemischt und 5 min bei 85°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgt bei 100 bis 200 V in 1 x SDS-Laufpuffer.

#### 4.13.3 GST-pulldown-Assay

GST-Fusionsproteine können zur Affinitätsreinigung anderer Proteine eingesetzt werden (GST-pulldown-Reinigung). Dabei werden die Fusionsproteine z.B. mit <sup>35</sup>S-markierten *in vitro* translatierten Test-Proteinen und Glutathion-Sepharose inkubiert, gewaschen und die gebundenen Proteine im SDS-Polyacrylamidgel nachgewiesen.

Bindungspuffer	50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,4
	150 mM KCl
	1 mM MgCl <sub>2</sub>
	10% Glycerin
	1% Triton-X 100

GST-Fusionsproteine werden wie beschrieben in *E. coli* exprimiert und extrahiert. Für GST-pulldown-Analysen wird das nicht über Glutathion-Sepharose gereinigte Rohextrakt verwendet. <sup>35</sup>S-markierte Test-Proteine werden mit dem TNT-Kit hergestellt.

1 bis 5 µl *in vitro* translatierte <sup>35</sup>S-markierte Proteine werden mit 1 bis 5 µg GST-Fusionsprotein-Rohextrakt und 250 µl Bindungspuffer/1 mM PMSF gemischt. Zellreste werden 15 min mit 13.000 rpm bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand mit 20 µl Glutathion-Sepharose (1:1 Suspension) 2-3 Stunden im Vertikalroller bei 4°C inkubiert. Die Sepharose wird 1 min pelletiert und 3 mal mit Bindungspuffer gewaschen. Danach wird der Überstand möglichst vollständig entfernt und das Sepharose-Proteinpellet mit 2 x Laemmli-Probenpuffer 5 min gekocht. Die Sepharose wird 1 min pelletiert und der Proteinüberstand auf einem denaturierenden SDS-Polyacrylamid Gel aufgetrennt. Zum Vergleich wird 0,5 - 1 µl nicht behandeltes <sup>35</sup>S-markiertes Protein in 1 x Probenpuffer aufgetragen. Das Gel wird 10 min mit Coomassie-Blau gefärbt und über Nacht entfärbt, um die Reinigung der entsprechenden GST-Fusionsproteine zu untersuchen. Es wird für 30 min mit Amplify behandelt, auf 3MM Whatman Papier 2 Stunden bei 60°C mit dem Vakuumtrockner getrocknet und mit Röntgenfilmen bei -80°C exponiert.

#### 4.13.4 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Der EMSA ist eine sehr sensitive Methode zum Nachweis der sequenzspezifischen Bindung von Proteinen an DNA. Proteine, die an markierte DNA-Sequenzen binden, verzögern die Wanderung dieser DNA-Fragmente bei der Gelelektrophorese, so daß diskrete Banden von DNA-Protein-Komplexen entstehen.

### Präparation der radioaktiv markierten DNA-Sonde

Komplementäre Oligonukleotide werden so synthetisiert, daß durch Aneinanderlagern von Plus- und Minusstrang-Oligonukleotid überhängende 5'-Enden entstehen. Diese freien Enden werden mit Klenow-Polymerase und  $^{32}\text{P}$ -markierten Nukleotiden aufgefüllt.

Oligo-Annealing:	2 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{M}$ Plusstrang-Oligo
	2 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{M}$ Minusstrang-Oligo
	4 $\mu\text{l}$	5 x Klenow-Reaktionspuffer
	ad 20 $\mu\text{l}$ mit $\text{H}_2\text{O}$	

Der Ansatz wird auf  $80^\circ\text{C}$  erhitzt und langsam im Wasserbad abgekühlt.

Auffüllreaktion:	1 $\mu\text{l}$	0,1 $\mu\text{M}$ doppelsträngiges Oligonukleotid
	4 $\mu\text{l}$	5 x Klenow-Reaktionspuffer
	1 $\mu\text{l}$	5 mM dATP, dGTP, dTTP
	2 $\mu\text{l}$	$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP
	0,5 $\mu\text{l}$	2 U/ $\mu\text{l}$ Klenow-Fragment
	ad 20 $\mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}$	

Der Ansatz wird 15 bis 30 min bei  $30^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend werden die markierten DNA-Fragmente von nicht eingebauten Nukleotiden und Enzym durch Gelfiltration über eine Sephadex G50-Säule getrennt. 1  $\mu\text{l}$  der radioaktiven Probe wird im Szintillationszähler vermessen (Cerenkov Counts) und die spezifische Aktivität in cpm/ $\mu\text{l}$  bestimmt. Für eine Bindungsreaktion werden etwa 10-100 fmol DNA mit einer spezifischen Aktivität von 5.000 bis 20.000 cpm benötigt.

### Bindungsreaktion und nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bindungsreaktion:	2 $\mu\text{l}$	10 x Bindungspuffer (200 mM HEPES pH 7,6, 500 mM KCl, 30 mM $\text{MgCl}_2$ , 10 mM EDTA)
	2,3 $\mu\text{l}$	90%iges Glycerin
	1,5 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Poly-dI/dC
	1 $\mu\text{l}$	$\alpha^{32}\text{P}$ -markiertes DNA-Fragment (20.000 cpm)
	5 $\mu\text{l}$	<i>in vitro</i> translatierte Proteine
	ad 20 $\mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}$	

Der Ansatz wird vorsichtig gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

5%iges Polyacrylamidgel:	1 x TBE
	5% Acrylamid:Bisacrylamid (19:1)
	0,75% APS
	0,1% $\mu\text{l}$ TEMED

Nach 20 min Polymerisation erfolgt ein Vorlauf von 1h bei 100 V und  $4^\circ\text{C}$  mit 1 x TBE Laufpuffer, bevor die Bindungsreaktionen aufgetragen und bei 25 bis 30 mA im Kühlraum etwa 2 Stunden aufgetrennt werden.

Anschließend wird das Gel bei  $80^\circ\text{C}$  Vakuum-getrocknet und bei  $-80^\circ\text{C}$  mit Röntgenfilmen exponiert.

### 3.14 Gewebe-Präparationen und –Kulturen

#### 3.14.1 Präparation gezielt angepaarter Mausembryonen

Für die Präparation von Mausembryonen zur *in situ* Hybridisierung werden CD1-Mäuse über Nacht verpaart und die Weibchen auf einen Vaginalplug kontrolliert. Der Zeitpunkt der Plugkontrolle wird als Embryonaltag 0,5 (E0,5) gesetzt. Für die Präparation von Nierenanlagen aus E11-Mausembryonen wird die Verpaarung am Tag für 6 Stunden durchgeführt und der Zeitpunkt der Plugkontrolle als E0 gesetzt.

Trächtige CD1-Weibchen werden mit CO<sub>2</sub>-Asphyxiation oder cervikaler Dislokation getötet. Der Uterus wird in eiskaltes PBS oder L15-Medium überführt und die Embryonen herauspräpariert. Nach Entfernen aller extraembryonaler Membranen werden die Embryonen für die *in situ* Hybridisierung über Nacht in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert.

#### 3.14.2 Präparation und Kultur von Maus-Nierenanlagen

Für die Organkultur werden Mausembryonen zum Zeitpunkt E11 in L15-Medium mit 10 mg/ml Streptomycin/25 µg/ml Amphotericin B (Sigma) aus dem Uterus freigelegt und die Nierenanlagen herauspräpariert. Nach Entfernen von extra-metanephrogenem Mesenchym und Wolffschen Gang werden die Nierenanlagen in DMEM/F12-Medium mit 2,5% Trypsin/EDTA, 10% Pankreatin und 10 K units DNaseI für 15 min inkubiert und dann in DMEM/F12-Medium überführt. Die Ureterknospe wird mit feinen Wolframnadeln komplett entfernt und das metanephrogene Mesenchym in DMEM/F12-Medium mit 20%igem FCS überführt. Alle Nieren-Mesenchyme eines Wurfs werden dann für die RNA-Präparation verwendet oder auf dorsalem Rückenmark kultiviert. Dazu wird das Neuralrohr eines E11-Mausembryos freipräpariert und die dorsale Hälfte auf einem in Kulturmedium schwimmenden Millipore-Polycarbonat-Filter (0,45 µm Porengöße) platziert. Die Nieren-Mesenchyme werden darauf - durch einen zweiten Filter getrennt - für 1 bis 3 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in DMEM/F12-Medium mit 5% FCS und 10 mg/ml Streptomycin/25 µg/ml Amphotericin B inkubiert.

#### 3.14.3 Präparation von Hühnerembryonen

Bruteier werden bei 38°C und 65% Luftfeuchtigkeit etwa 48 Stunden inkubiert (ca. HH13 nach Hamburger-Hamilton). Die Hühnerembryonen werden in PBS präpariert und in 4% PFA über Nacht fixiert.

### 3.15 Einbett- und Schnitt-Techniken

#### 3.15.1 Einbetten und Schnitte von Mausembryonen in Paraffin

In 4% PFA fixierte Mausembryonen werden 2 mal 10 min in PBS und 1 mal 10 min in 0,9% NaCl gewaschen. Anschließend werden sie in einer ansteigenden Isopropanolreihe (30%, 50%, 70%, 85%, 95%, 2 mal 100%) je 2 Stunden dehydriert und dann über Isopropanol:Chloroform (1:1) in Chloroform als Zwischenmedium überführt. Für die Einbettung werden sie bei 60°C in Chloroform:Paraffin in offenen Gefäßen so lange inkubiert bis alles Chloroform verdunstet ist. Das flüssige Paraffinwachs wird noch 3 mal gewechselt bevor die Embryonen in Blöcke eingebettet und bei 4°C gelagert werden. 5 µm Paraffin-Schnitte werden mit dem Mikrotom geschnitten, im 37°C-



präzipitiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen, in 100 µl DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert, mit 900 µl Hybridisierungslösung (1:10) verdünnt und bei -20°C gelagert.

### 3.16.2 RNA *in situ* Hybridisierung ganzer Mausembryonen (nach Henrique *et al.*, 1995 ,modifiziert)

Alle Lösungen, die vor oder während der Hybridisierung mit RNA-Proben verwendet werden, werden mit DEPC-H<sub>2</sub>O angesetzt oder mit DEPC-behandelt.

PBT	1 x PBS 0,1% Tween-20
4%PFA, pH 7,0	1 x PBS 4% PFA
RIPA	0,1% SDS 150 mM NaCl 1% NP-40 0,5% Deoxycholat 1 mM EDTA 50 mM Tris-HCl pH 8,0
Hybridisierungslösung	50% Formamid (deionisiert) 1,3 x SSC pH 5 5 mM EDTA 0,5 % CHAPS 100 µg/ml Heparin 0,2% Tween-20 100 µg/ml Hefe tRNA
Lösung X	50% Formamid 1% SDS 1 x SSC pH 4,5
NTE (RNase-Puffer)	0,5 M NaCl 10 mM Tris-HCl pH 7,0 5 mM EDTA
TBST	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 25 mM Tris-HCl pH 7,5 0,1% Tween-20
MABT pH 7,5	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl

	1% Tween-20
NTMT	10 mM NaCl
	50 mM MgCl <sub>2</sub>
	100 mM Tris-HCl pH 9,5
	0,1% Tween-20

In 4% PFA fixierte Mausembryonen werden 2 mal 10 min mit PBT gewaschen, mit 25%, 50%, 75% Methanol/PBS, 100% Methanol je 15 min entwässert und über Nacht (bis zu 1 Jahr) bei -20°C aufbewahrt. Nach Rehydrierung in 75%, 50%, 25% Methanol/PBS für je 15 min werden die Embryonen 2 mal 10 min mit PBT gewaschen und anschließend 1 Stunde in 6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PBT gebleicht. Sie werden 3 mal 10 min mit PBT gewaschen und je nach Entwicklungsstadium unterschiedlich lange mit 20 µg/ml Proteinase K behandelt:

<E10,5	1 min
E10,5	3 min
E12,5	5 min
E13,5	7 min
>E13.5	10 min

Danach wird 3 mal 5 min mit PBT gewaschen, 3 mal 5 min mit RIPA behandelt, 3 mal 5 min mit PBT gewaschen und 20 min mit 4% PFA/0,2% Glutaraldehyd refixiert. Nach 3 mal 5 min Waschen mit PBT werden die Embryonen zunächst 10 min in Hybridisierungslösung:PBT (1:1) und dann 10 min in Hybridisierungslösung inkubiert. Die Embryonen werden 1 bis 3 Stunden bei 70°C in Hybridisierungslösung prähybridisiert. Die bereits 1:10 in Hybridisierungslösung verdünnte RNA-Probe wird 3 min bei 80°C denaturiert und in einer Endverdünnung von 1:100 eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 70°C. Die Hybridisierungslösung mit Probe wird bei -20°C aufbewahrt und etwa 3 mal wiederverwendet. Nach Hybridisierung mit der RNA-Probe werden die Embryonen 1 mal gespült und 3 mal 30 min bei 70°C mit vorgewärmter Hybridisierungslösung (ohne tRNA) gewaschen. Die Embryonen werden 15 min bei Raumtemperatur in NTE gewaschen, 1 Stunde bei 37°C mit 20 µg/ml RNase A und 100 Units RNase T1 inkubiert, wieder 15 min bei Raumtemperatur in NTE und 30 min bei 70°C in Hybridisierungslösung gewaschen. Dann wird 20 min bei 70°C mit Hybridisierungslösung:TBST (1:1) gewaschen, 2 mal mit TBST gespült und 2 mal 30 min mit MABT gewaschen. Embryonen und anti-Digoxigenin-Antikörper (Verdünnung 1:2000) werden in MABT mit 20% inaktiviertem Schafserum und 1% Blocking Reagens (Boehringer) vorinkubiert. Anschließend wird die Antikörper-Lösung kurz abzentrifugiert und die Embryonen mit dem Überstand über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Antikörper-Behandlung werden die Embryonen 2 Tage intensiv unter ständigem Lösungswechsel mit MABT gewaschen. Für die Färbung wird zunächst 2 mal 10 min mit NTMT und 1 mal 10 min mit NTMT/2mM Levamisol gewaschen. Das BM-Purple-AP-Substrat (Färbelösung) wird 10 min bei 3000 rpm abzentrifugiert, mit 1% Tween-20 und 2 mM Levamisol versetzt und die Embryonen darin unter Lichtausschluß inkubiert. Die Entwicklung der Färbung wird dabei unter dem Stereomikroskop (Stemi SV6, Zeiss) verfolgt. Anschließend werden die Embryonen in PBT gewaschen und über Nacht in 4% PFA bei 4°C fixiert. Vor dem Photographieren werden sie in 50% Glycerin/PBS geklärt und in PBS aufbewahrt.

### 3.16.3 RNA *in situ* Hybridisierung von Hühnerembryonen

Die *in situ* Hybridisierung von Hühnerembryonen mit Digoxygenin-markierten RNA-Proben wird wie die der Mausembryonen mit geringen Veränderungen durchgeführt: die Inkubationsschritte bei der De- und Rehydrierung werden auf 5 min verkürzt. Außerdem wird auf eine Proteinase K Behandlung verzichtet, dafür aber die Inkubation mit RIPA auf 3 mal 20 min verlängert. Nach Hybridisierung mit der RNA-Sonde wird mit Lösung X (anstatt Hybridisierungslösung ohne tRNA) gewaschen.

### 3.16.4 RNA *in situ* Hybridisierung von Paraffinschnitten

Tris/Glycin-Puffer	0,1 M Tris
	0,1 M Glycin

5 µm Paraffinschnitte auf Polylysin-beschichteten Objektträgern werden 2 mal 10 min in Chloroform entparaffiniert, 2 mal 5 min mit 100% Ethanol gewaschen, in absteigender Ethanolreihe rehydriert und 2 mal 5 min mit PBS gewaschen. Die Schnitte werden 30 min mit 4% PFA refixiert, 2 mal 5 min mit PBS gewaschen und 10 min mit 10 µg/ml Proteinase K behandelt. Nach 5 min Waschen mit PBS wird erneut 30 min mit 4% PFA fixiert, 2 mal 5 min mit PBS, 2 mal 5 min mit 2 x SSC und 2 mal 15 min mit Tris/Glycin-Puffer gewaschen. Dann werden die Objektträger in HeraeusQuadrupern-Kästen gelegt, je Objektträger 55 µl denaturierte RNA-Probe (1:100 mit Hybridisierungslösung verdünnt) auf die Schnitte pipettiert und mit Parafilm abgedeckt. Die Hybridisierung wird in einer Feuchtkammer im Wasserbad bei 70°C über Nacht durchgeführt. Die Schnitte werden dann 3 mal 20 min mit 5 x SSC bei Raumtemperatur und 1 mal 40 min mit vorgewärmtem 0,5 x SSC/20% Formamid bei 60°C gewaschen. Letztere Waschlösung wird gewechselt und auf 37°C abgekühlt, bevor die Schnitte 15 min bei 37°C mit NTE, 30 min bei 37°C mit 10 µg/ml RNase A in NTE und 15 min bei 37°C mit NTE inkubiert werden. Nach erneutem Waschen für 30 min bei 60°C in 0,5 x SSC/20% Formamid und 30 min bei Raumtemperatur in 2 x SSC werden die Schnitte 1 Stunde mit MABT/1% Blocking Reagens/20% Schafserum bei Raumtemperatur prähybridisiert. Der anti-Digoxygenin-Antikörper wird 1:5000 in gleicher Lösung verdünnt und die Schnitte damit über Nacht bei 4°C inkubiert. Vor der Färbung wird 4 mal 10 min und 1 mal 40 min mit TBST, 2 x 10 min mit NTMT und 1 x 10 min mit NTMT/2 mM Levamisol gewaschen. Unlösliche Partikel im BM-Purple-AP-Substrat werden wie oben abzentrifugiert, 0,1% Tween-20 und 2 mM Levamisol zugegeben und die Schnitte mehrere Tage unter Lichtausschluß gefärbt. Anschließend werden die Schnitte 2 mal 15 min mit NTMT und 1 mal 10 min mit PBS gewaschen und in Kaiser's Glyceringelatine eingebettet.

Die *in situ* Hybridisierung von Paraffinschnitten wurde von Alexandra Externbrink durchgeführt.