

Aus dem Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Analyse der Genexpression der frühen embryonalen Schild-
drüsenanlage im Mausmodell

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Caroline Béatrice Scholz

aus Bonn

Datum der Promotion: 25.10.2013

INHALTSVERZEICHNIS

ABSTRAKT	3
I EINLEITUNG	5
I.1 Kongenitale Hypothyreose	5
I.2 Bekannte Kandidatengene und Mutationen	6
I.3 Die embryonale Schilddrüsenentwicklung	7
I.4 Zielsetzung dieser Arbeit	9
II MATERIAL UND METHODEN	11
II.1 Material	11
II.1.1 Geräte und Gebrauchsmaterialien	11
II.1.2 Chemikalien und Substanzen	12
II.1.3 Reaktionskits	13
II.1.4 Lösungen und Puffer	14
II.1.5 Primer, Vektoren und Enzyme	16
II.1.6 Mausstamm	17
II.2 Methoden	18
II.2.1 Übersicht	18
II.2.2 "Screening" der <i>In-situ</i> -Hybridisierungsdatenbank	19
II.2.3 Histologische Methoden	20
II.2.3.1 Präparation von Mausembryonen	20
II.2.3.2 Dehydratation und Fixierung der Mausembryonen	21
II.2.3.3 Einbetten der Embryonen in Paraffin	21
II.2.3.4 Einbetten der Embryonen in Tissue-Tek	21
II.2.3.5 Anfertigung histologischer Schnitte am Mikrotom	21
II.2.3.6 Anfertigung histologischer Schnitte am Cryotom	22
II.2.3.7 Färbung histologischer Schnitte mit Hämatoxylin	22
II.2.3.8 <i>Nkx2.1</i> -Antikörperfärbung	22
II.2.4 Molekularbiologische Methoden	23
II.2.4.1 Gewinnung embryonaler RNS aus Schilddrüsenvorläuferzellen der Maus	23
II.2.4.2 Reverse Transkription	23
II.2.4.3 Polymerasekettenreaktion	23
II.2.4.4 Sequenzierung	25
II.2.4.5 Agarosegelelektrophorese	26
II.2.4.6 Photometermessung	26
II.2.4.7 Qualitätsmessung von RNS	27
II.2.4.8 DNS-Aufreinigung aus PCR-Gelen	28
II.2.4.9 <i>Topo</i> -Klonierung, Transformation und Bakterienanzucht	28
II.2.4.10 Plasmidpräparation	29
II.2.4.11 <i>In-vitro</i> -Transkription	30
II.2.5 <i>In-situ</i> -Hybridisierung	32
II.2.5.1 Schnitt- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	32
II.2.5.2 "Whole-mount"- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	33
II.2.6 Lasermikrodissektion	33
II.7 Photoarbeiten	36

III ERGEBNISSE	37
III.1 “Screening“ der <i>In-situ</i>-Hybridisierungsdatenbank	37
III.2 Rehybridisierung an histologischen Schnitten	37
III.3 Verifikation der <i>Hip1r</i>-Expression mittels RT-PCR	42
III.3.1 Gewinnung einer RNS-Probe mit Hilfe der Lasermikrodissektion	42
III.3.2 Nachweis von <i>Hip1r</i> mittels PCR	43
III.4 “Splice“-Varianten des <i>Hip1r</i>-Gens	44
III.5 Expression von <i>Hip1r</i> in verschiedenen Embryonalstadien	44
III.6 <i>Hip1</i> Expression in embryonalem Gewebe	45
IV DISKUSSION	47
IV.1 “Screening“ der <i>In-situ</i>-Hybridisierungsdatenbank	47
IV.1.1 Sensitivität und Spezifität der gewählten Methode	47
IV.1.2 Identifikation zweier, in der frühen Schilddrüsenanlage exprimierter Gene.....	48
IV.2 Die Expression von <i>Hip1r</i> (“<i>Huntington interacting protein 1 related</i>“) in der frühen Schilddrüsenanlage der Maus	50
IV.2.1 <i>Hip1r</i>	51
IV.3 Die Funktion von <i>Hip1r</i> (“<i>Huntington interacting protein 1 related</i>“) in der frühen Schilddrüsenanlage der Maus	56
IV.3.1 (K)eine spezifische Funktion von <i>Hip1r</i> in der frühen Schilddrüsenanlage der Maus?.....	58
IV.3.2 <i>Hip1r</i> -Expression im Verlauf der Embryonalstadien.....	59
IV.3.3 Bedeutung der unterschiedlichen “Splice“-Varianten.....	63
IV.3 <i>Hip1r</i> - ein neues Kandidatengen der angeborenen Hypothyreose?	66
LITERATURVERZEICHNIS	67
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	
LEBENS LAUF	
DANKSAGUNG	

Abstrakt

EINLEITUNG

Die meisten Fälle einer kongenitalen Hypothyreose lassen sich ursächlich auf eine Schilddrüsen-dysgenese zurückführen. Bis auf wenige Mutationen in den Genen *NKX2.1*, *PAX8*, *FOXE1* und *NKX2.5* ist der Pathomechanismus dieser Entwicklungsstörung bisher nicht geklärt. Ziel dieser Arbeit war es, weitere Gene, welche eine Rolle in der frühen Schilddrüsenentwicklung spielen, zu identifizieren.

METHODIK

Ausgehend von der Annahme, dass die spezifische Expression eines Gens in einer Organanlage einen Hinweis auf eine spezielle Funktion dieses Gens in der Embryogenese des Organs gibt, wurde das "Screening" von 2000 verschiedenen Expressionsmustern in einer *In-situ*-Hybridisierungsdatenbank zur Bearbeitung der Fragestellung gewählt. In einer Zweistufen-Selektion wurden anhand eines Referenzbildes 10 verschiedene Gene ausgewählt, welche ein Farbsignal, als Ausdruck der Expression, in der Region der Schilddrüsenanlage eines 9.5 Tage alten Mausembryos aufwiesen.

ERGEBNISSE

Mittels Rehybridisierung auf histologischen Schnitten unter Verwendung der gleichen Sonden, welche auch für die Erstellung der Datenbank eingesetzt worden waren, konnte eine Expression in den Schilddrüsenvorläuferzellen für zwei Gene nachgewiesen werden. Eines der beiden Gene ist der bekannte Schilddrüsen-Transkriptionsfaktor *Hhex*. Bei dem anderen Gen handelt es sich um *Hip1r*, dessen Expression in der frühen Schilddrüsenanlage bisher nicht bekannt war. In weiteren Experimenten konnte die Expression von *Hip1r* verifiziert werden. *Hip1r* gehört zusammen mit *Hip1* zur "Huntington-interacting-protein-1"-Familie. In publizierten Arbeiten zu einem *Hip1r*-/*Hip1*-"Doppelknockout"-Mausmodell wird über unauffällige TSH-Werte der Tiere berichtet. Somit ist es eher unwahrscheinlich, dass *Hip1r* eine zentrale Rolle in der Schilddrüsenentwicklung und -funktion spielt.

SCHLUSSFOLGERUNG

Das "Screening"-Ergebnis dieser Arbeit - ein bisher unbekanntes Expressionssignal ausgewählt aus 2000 Mustern in der frühen Schilddrüsenanlage - lässt vermuten, dass nicht viele weitere Gene mit einer spezifischen Expression in der Schilddrüse an Tag 9.5 der Embryonalentwicklung der Maus existieren. Für die vielen ungeklärten Fälle einer kongenitalen Hypothyreose sind andere Mechanismen, wie beispielsweise epigenetische Einflüsse, neben Mutationen in einzelnen Kandidatengenomen mit schilddrüsen-spezifischer Expression anzunehmen.

BACKGROUND

Congenital hypothyroidism is most often caused by thyroid dysgenesis. Only few mutations in the genes *NKX2.1*, *PAX8*, *FOXE1* and *NKX2.5* have been shown to be causative. For most cases the pathogenesis remains unknown. Therefore the aim of this work was the identification of other genes with a critical role in early thyroid development.

METHODS

Assuming that a specific expression of a gene in a developing organ indicates a particular function of the gene in the embryogenesis of that organ, the screening of a whole-mount-*in-situ*-hybridization database containing 2000 different expression patterns was chosen as the method of choice. Using a two-step-selection process 10 genes were selected with positive colour signals in the thyroid precursor region of 9.5 day old mice embryos, suggesting an expression of these genes in thyroid precursor cells.

RESULTS

Positive genes were re-hybridized on histological slices using the same probes as were used for the whole-mounts again. Expression of two genes in thyroid precursor cells could be proven. One of them is the known thyroid transcription factor *Hhex*. The other gene, *Hip1r*, was not known so far to be expressed in thyroid precursor cells. The expression of *Hip1r* was verified using other methods. *Hip1r* and *Hip1* represent the “*Huntingon-interacting-protein-1*“-family. A published paper on a *Hip1r*-/*Hip1*-double-knockout-mouse-modell reports on normal TSH-values in affected animals. Therefore a major role of *Hip1r* in thyroid development and function is unlikely.

CONCLUSION

As a result of this work – one selected gene out of 2000 screened patterns – one might not expect the existence of many other genes with specific expression in the thyroid precursor cells of 9.5 day old mice. Apart from mutations in single candidate genes expressed in thyroid precursor cells, other mechanisms like epigenetic effects are likely to play a role in unsolved cases of congenital hypothyroidism.

I Einleitung

I.1 Kongenitale Hypothyreose

Die kongenitale Hypothyreose ist mit 1:3000 bis 1:4000 Fällen die häufigste angeborene endokrine Störung. Definitionsgemäß ist die Schilddrüsenhormonproduktion eines Neugeborenen mit dieser Erkrankung reduziert oder nicht messbar. Abhängig von der Ursache des Defekts lässt sich eine permanente primäre von einer permanenten zentralen Störung unterscheiden. Bei der permanenten zentralen Hypothyreose liegt ein Defekt der Hypophyse oder des Hypothalamus vor. Wesentlich häufiger ist die permanente primäre kongenitale Hypothyreose, es liegt eine, die Schilddrüse selbst betreffende Pathologie vor. In 15-20% dieser Fälle handelt es sich um eine gestörte Hormonbiosynthese.[1, 2] Die adulte Schilddrüse enthält follikuläre Strukturen in welchen die Schilddrüsenhormone T3 (Triiodthyronin) und T4 (Tetraiodthyronin) produziert werden. Diese sind von entscheidender Bedeutung für Wachstum, Reifung und Stoffwechsel des Körpers. Reguliert wird die Synthese und Ausschüttung der Hormone über die Achse TRH/ Thyroliberin (Hypothalamus) und TSH/ Thyrotropin (Hypophyse). Mit Hilfe des NIS (Natrium/Iodid-Symporter) nimmt die Schilddrüsenzelle Jod aus der Blutbahn auf. TSH kann die Transportkapazität von NIS erhöhen. Mit Hilfe des Transporters Pendrin gelangt das aufgenommene Jod in das Kolloid (der von den follikulär angeordneten Schilddrüsenzellen umgebene Raum), wird dort durch das Enzym TPO (Thyreperoxidase) oxidiert und an die Tyrosyl-Reste des Thyreoglobulins gebunden. Thyreoglobulin wird in der Schilddrüsenzelle synthetisiert und mittels Exozytose in das Kolloid abgegeben. Zwei iodierter Tyrosylreste reagieren im Kolloid miteinander und es entstehen Tetraiodthyronylreste oder Triiodthyronylreste. Diese stellen die Speicherform der Hormone T3 und T4 dar. Diese Syntheseschritte, wie auch die Ausschüttung von T3 und T4 werden von TSH durch die Bindung an seinen Schilddrüsenrezeptor TSHR stimuliert. Zur Hormonsekretion wird das iodierter Thyreoglobulin durch Endozytose in die Zelle aufgenommen und nach Fusion mit Lysosomen werden T3 und T4 abgespalten und freigesetzt.[3] In allen beteiligten Faktoren sind Mutationen beim Menschen bekannt, welche zu einer angeborenen, meist autosomal-rezessiven Hypothyreose führen. [2, 4-6]

Zumeist, in 80% der Fälle, liegt der primären kongenitalen Hypothyreose ein Defekt der frühen embryonalen Entwicklung des Organs zu Grunde. Dies schließt die Schilddrüsenhypoplasie, -ektomie und die komplette Athyreose ein. Je nach Arbeit lassen sich etwa 2-5% dieser Fälle durch Mutationen in einzelnen bekannten Schilddrüsen-Transkriptionsfaktoren erklären.[1, 7] Arbeiten aus den letzten Jahren zeigen, dass nicht-Mendelsche Mechanismen bei der Entstehung

von Dysgenesen in vielen Fällen beteiligt sein müssen. So treten über 95% aller Fälle von Schilddrüsendysgenesen sporadisch und zum Teil diskordant zwischen monozygoten Zwillingen auf.[8] Es wird diskutiert über multigene Ursachen und epigenetische Faktoren.[9, 10] Eine familiäre Häufung der Erkrankung wird in etwa 2%, in neueren Arbeiten sogar in etwa 7,9% der Fälle beobachtet, was für eine genetische (monogene) Komponente bei der Entstehung der Schilddrüsendysgenesen spricht.[11-13]

I.2 Bekannte Kandidatengene und Mutationen

Viele der Patienten mit Schilddrüsendysgenesen weisen kongenitale Malformationen in anderen Organen auf. Dies zeigt, dass pathogenetische Faktoren, welche an der Entwicklung der Schilddrüse beteiligt sind, auch für die Entwicklung anderer Organe von Bedeutung sind.[14] Malformationen des Herzens und Gefäßsystems werden am häufigsten beobachtet. In größeren Patientenserien wird außerdem von Anomalien des zentralen Nervensystems und des muskuloskeletalen Systems berichtet.[15]

In Patienten mit Schilddrüsendysgenesen wurden Mutationen in vier verschiedenen Genen (*NKX2.1*, *PAX8*, *FOXE1*, *NKX2.5*) detektiert. Zunächst waren die Expression dieser Gene und deren mögliche Funktionen in Schilddrüsenvorläuferzellen aus Mausmodellen bekannt.[16, 17] Anhand solcher Modelle konnte gezeigt werden, dass *Nkx2.1*, *Pax8*, *Foxe1* und *Hhex* - ein Kandidat, für welchen noch keine Mutation beim Menschen bekannt ist - von Tag E8.5 an in der Schilddrüsenanlage in allen Stadien der Entwicklung und auch noch in der adulten Schilddrüsenzelle exprimiert werden. Die Coexpression dieser vier Transkriptionsfaktoren charakterisiert die Zellen der frühen Schilddrüsenanlage.[18-21]

Das "Knockout"-Mausmodell für *Nkx2.1* beweist die Notwendigkeit dieses Transkriptionsfaktors für den Erhalt der einmal gebildeten Schilddrüsenanlage: In diesen Tieren bildet sich zum erwarteten Zeitpunkt eine Schilddrüsenanlage, welche aber innerhalb von zwei Tagen untergeht. Den betroffenen Mäusen fehlt zudem die Hypophyse außerdem ist die Entwicklung der Lungen gestört.[22, 23] Eine heterozygote Deletion von *NKX2.1* konnte zuerst 1998 bei einem Neugeborenen mit einer Schilddrüsendysfunktion und Atemstörungen nachgewiesen werden.[24] Außer diesen phänotypischen Merkmalen ist auch die benigne hereditäre Chorea mit *NKX2.1*-Mutationen assoziiert.[25] Wie anhand des Mausmodells schon zu vermuten war, führen Mutationen dieses Gens auch beim Menschen zu Pathologien der Lunge, der Schilddrüse (meist in Form einer Hypoplasie) und des Gehirns.[26]

Bei Patienten mit *PAX8*-Mutationen findet sich eine milde bis stark ausgeprägte Schilddrüsenhypoplasie. Solche Mutationen konnten sowohl bei sporadischen als auch bei familiären Fällen der Schilddrüsenhypoplasie nachgewiesen werden. Nur zwei Patienten sind beschrieben, die zusätzlich eine renale Malformation aufweisen.[27, 28]

Die ersten Fallberichte über Neugeborene mit einer Athyreose, abstehendem („spiky“) Haar, einer Atresie der Choanen, gespaltenem Gaumen und zweigeteilter Epiglottis wurden bereits 1989 und 1993 veröffentlicht [29, 30]. In späteren Jahren konnten bei vier Patienten mit diesem Phänotyp Mutationen in *FOXE1* nachgewiesen werden. [31, 32] In einem neueren Bericht wird außerdem eine weitere *FOXE1* Mutation beschrieben, welche mit einer syndromalen kongenitalen Hypothyreose ohne komplette Agenesie einhergeht.[33]

NKX2.5 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher hauptsächlich eine Rolle in der embryonalen Herzentwicklung spielt. Die Tatsache, dass Kinder mit einer angeborenen Schilddrüsenerkrankung eine erhöhte Prävalenz für kongenitale Herzerkrankungen haben, führte zu einem *NKX2.5*-Mutationsscreening in Patienten mit Schilddrüsendysgenesien. Innerhalb des untersuchten Kollektivs konnten vier Patienten mit *NKX2.5*-Mutationen identifiziert werden, die teilweise zusätzlich eine kardiale Fehlbildung aufwiesen.[17] Mutationen in Patienten mit Schilddrüsendysgenesien wurden bisher am häufigsten im *PAX8*-Gen gefunden.[34]

I.3 Die embryonale Schilddrüsenentwicklung

Nach der Gastrulation am Tag E7.5 (Embryonaltag 7.5) besteht das Endoderm der Maus, aus einer ca. 500-1000 Zellen umfassenden Zellschicht.[35] Diese Schicht formiert sich bis zum Tag E8.5 zum primitiven Darmrohr. Ösophagus, Trachea, Lungen, Thymus, Magen, Leber, Pankreas, Dünn- und Dickdarm, der Urogenitaltrakt und die Schilddrüse, sind Organe, die ihren Ursprung aus dem Endoderm des primitiven Darmrohrs nehmen. Ab Tag E8.5 werden Gene in einem genau definierten Muster entlang der anterior-posterioren Achse des Darmrohres exprimiert. So werden beispielsweise die Transkriptionsfaktoren *Nkx2.1*, *Hex1* und *Foxa1* in dem Abschnitt exprimiert, aus dem Leber, Lunge und Schilddrüse später entstehen.[36]

Die Schilddrüse der Säugetiere besteht hauptsächlich aus zwei verschiedenen Zelltypen. Zum einen Follikelzellen, welche die Schilddrüsenhormone T3 und T4 produzieren, zum anderen C-Zellen, welche Calcitonin produzieren. In einer neueren Arbeit wird die Hypothese einer polyklonalen (2 Klone) Schilddrüsenanlage aufgestellt, aufgrund der Beobachtung von Patienten mit einer dualen Ektopie (ein Teil der Schilddrüsenzellen ist unvollständig migriert, ein zweiter Teil befindet sich am Zungengrund).[37] C-Zellen entstehen ursprünglich aus Zellen der vierten

Pharynxtasche. Diese Vorläuferzellen werden als “ultimobranchial bodies“ bezeichnet und können ab Tag E11.5 als Ausstülpung des Endoderms dorsolateral und inferior der medianen Schilddrüsenanlage detektiert werden und wandern erst spät von dort in die Schilddrüsenanlage ein.[38] Die Vorläufer der Follikelzellen, die eigentliche Schilddrüsenanlage, entwickeln sich aus einer Gruppe von Endodermzellen des Zungengrundes und tauchen zum ersten Mal an Tag E8.5 der Embryonalentwicklung der Maus (Tag E20 beim Menschen) auf. Identifiziert werden können diese Zellen in der Mittellinie des pharyngealen Endoderms durch die gemeinsame Expression von *Nkx2.1*, *Pax8*, *Foxe1*, *Hhex*. Welche Mechanismen diesen ersten Schritt der Differenzierung der frühen Schilddrüsenanlage steuern, ist bisher unbekannt.[39] Möglicherweise erhält die Schilddrüse induktive Signale aus mesenchymalen Zellen, wie es für andere endodermale Organe beschrieben wurde.[39-41] Auffallend ist die räumliche Nähe der Anlage an Tag E8.5 und Tag E9.5 zum sogenannten “Aortensack“, ein großes Gefäß, welches mit dem Ausflusstrakt des Herzens verbunden ist und aus dem sich später die Pharyngealarterien entwickeln. [42, 43] Die Interaktion mit Gefäßendothel spielt auch während der Entwicklung anderer, sich aus dem Endoderm entwickelnden Organe wie Leber und Pankreas eine Rolle.[44] [45, 46] Ist die initiale Aktivierung der Anlage erfolgt, nimmt sie deutlich an Volumen zu, Tag E8.5-E9.5 (E20-E24) und bildet eine Ausstülpung (“Budding“). Als Ursache für die starke Zunahme der Progenitorzellzahl zu diesem Zeitpunkt wird hauptsächlich die Rekrutierung von Zellen aus der Umgebung beschrieben und nicht die Proliferation der vorhandenen Schilddrüsenvorläuferzellen.[42] Etwa an Tag E10.5 (E25-E30) beginnt die Migration, die Schilddrüsenanlage löst sich vom Endoderm und es besteht nur noch eine schmale Verbindung beider Teile, der spätere Ductus thyreoglossus. Die Zellen der Anlage stehen nun nicht mehr in Verbindung mit den Endothelzellen des “Aortensacks“. Sowohl in der Schilddrüsenanlage als auch im umgebenden Mesenchym-Gewebe kann nun eine starke Zell-Proliferation nachgewiesen werden. Diese hält bis zum Tag E12.5 (E40-E45) an und es kommt zur Bildung zweier Schilddrüsenlappen durch das Ausdünnen der mittleren Anteile der vorher ovalen Organanlage. Die Proliferation der Schilddrüsenvorläuferzellen an Tag E11.5-E12.5 findet entlang einer paarigen Gefäßstruktur, den sich entwickelnden Karotiden, statt.[43] An Tag E13.5 (E45-50) fusionieren die Vorläufer der C-Zellen mit der Schilddrüsenanlage. An Tag E13.5-14.5 (E45-E60) nimmt die Schilddrüse, bestehend aus zwei Lobi und einem, beide Teile miteinander verbindenden Isthmus, ihre endgültige Position, hinter dem mittleren Blatt der Halsfaszie, vor und neben der Luftröhre, ein.[43] Die funktionelle Differenzierung der Schilddrüse beginnt, wenn die Migration der Anlage abgeschlossen ist und das Organ seine endgültige Position erreicht hat, an Tag E14.5. Die Expression schilddrüsenpezifischer Gene wie *Tg* (*Thyreoglobulin*), *TPO* (*Thyreoperoxidase*) und *TSHR*

(*Thyreotropin-Rezeptor*) ist ab diesem Zeitpunkt nachweisbar, etwas später zudem *NIS* (*Sodium/Iodid-Symporter*). Die Expression dieser Gene wird durch *PAX8*, *NKX2.1* und *TSH* reguliert, unbekannt sind hingegen die Faktoren, welche die funktionelle Differenzierung initiieren.[47] Bis zum Tag E15.5 (E70) vergrößern sich die Schilddrüsenlappen beidseits weiter, proliferativ-aktive Zellen finden sich hauptsächlich in der Peripherie der Drüse.[42] Die Follikulogenese beginnt an Tag E15.5 (E70) mit der Umorganisation des Parenchyms. Es lassen sich bereits follikuläre Formationen benachbarter Zellen erkennen, die zum großen Teil Thyreoglobulin und weitere (s. Kapitel I.1), für die Synthese des T3 und T4 notwendige Proteine exprimieren. Zudem kann die Calcitonin-Expression in mehreren Zellen nachgewiesen werden. An Tag E16.5 hat die Schilddrüse weiter an Größe zugenommen und hat die für adulte Organe typische follikuläre Struktur angenommen, wenig später kann zum ersten Mal T4 detektiert werden (Für ein ausführliches Review zur Schilddrüsenentwicklung siehe [16]).

I.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Die meisten Fälle einer kongenitalen Hypothyreose lassen sich ursächlich auf eine Schilddrüsen-dysgenese zurückführen. Bis auf wenige Mutationen in den Genen *NKX2.1*, *PAX8*, *FOXE1* und *NKX2.5* ist der Pathomechanismus dieser Entwicklungsstörung bisher nicht geklärt. Es besteht die Möglichkeit, dass Mutationen in weiteren, bisher nicht bekannten Genen der Schilddrüsenentwicklung eine Rolle bei der Pathogenese der Dysgenesen spielen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Gene, welche eine Rolle in der frühen Organentwicklung der Schilddrüse spielen, zu identifizieren. Ausgehend von der Annahme, dass die spezifische Expression eines Gens in einer Organanlage einen Hinweis auf eine spezielle Funktion des Gens in der Embryogenese dieses Organs gibt, wurden ebensolche Gene gesucht, welche eine Expression in der frühen Schilddrüsenanlage zeigen.

Als Grundlage für die Suche neuer Kandidatengene diente die Datenbank der Arbeitsgruppe Herrmann (Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin). Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit enthielt die Datenbank Bilder von *In-situ*-Hybridisierungen von etwa 2000 verschiedenen Genen auf 9.5 Tage alten Mausembryonen. Diese 2000 Gene wurden aus etwa 10000, zu diesem Zeitpunkt exprimierten Genen ausgewählt, wobei "Housekeeping"-Gene und Gene mit unspezifischem Expressionsmuster aussortiert wurden. ([48] und mündliche Information Dr. M. Werber, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin). Mit Hilfe eines Referenzbildes des früh in der Schilddrüse exprimierten Gens, *Nkx2.1*, sollten die verfügbaren 2000 Expressionsmuster im Hinblick auf Signale in der Region der Schilddrüsenanlage ausgewertet

werden. Es sollte nachfolgend geprüft werden, ob es sich bei den identifizierten Mustern tatsächlich um eine spezifische Expression in Schilddrüsenzellen handelt. Hierzu sollten die Hybridisierungen an histologischen Schnitten von Mausembryonen wiederholt werden, sowie RT-PCR-Ansätze aus DNS isolierter Schilddrüsenvorläuferzellen durchgeführt werden.

II Material und Methoden

II.1 Material

II.1.1 Geräte und Gebrauchsmaterialien

Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies
Binokular MZ75	Leica
Biophotometer 6131	Eppendorf
Cryotom HM560	Microm
Deckgläser für Objektträger	Roth
Digitalkamera HRc, MRc5	Zeiss
Eismaschine AF-30	Scotsman
Entwässerungsautomat TP1020	Leica
Geldokumentationssystem EASY Win 32	Heraeus
Gelkammern und Spannungsquellen	Biometra, peqlab
Glasküvetten mit Einsatz	Roth
Heizblock DB3	Techne
Heizplatte TP1220	Leica
Hybridisierungsöfen OV2	Biometra
Klingen (Mikrotom/Cryotom)	Leica
Laborröhrchen, Non-stick RNase-free Microfuge Tubes	Ambion
Lasermikrodissektion	P.A.L.M. Micro Beam
Lasermikrodissektionsmikroskop	Axiovert 200, Zeiss
Lichtundurchlässige Boxen	Roth
Mikroskope:	
Axiostar plus	Zeiss
Leica DMR HC	Leica
Stereomikroskop MZ 6,	Leica
Mikrotom HM355S	Microm
Objektträger Super-Frost® plus	Menzel-Gläser
PALM Membrane Slides, PEN Membrane	P.A.L.M. Microlaser Technologies
Paraffin Einbettkassetten/	Richard-Allan Scientific

Tissue Loc Kassetten Hist Screen	
Paraffin Einbettstation EC350-2	Microm
Petrischalen	Falcon
Pipetten	Eppendorf research
Pipettenspitzen	Gilson, Biozym, Eppendorf
pH-Meter MP 220	Mettler-Toledo
Reagenzgefäße	Eppendorf, Applied Biosystems, Roth
Wipptisch, Rocking platform	Biometrics
Sequenzier ABI 3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Thermocycler, MasterCycler Gradient	Eppendorf
Trockenofen für Objektträger	Heraeus Instruments
Vortexer K550 GE	Bender & Hobin
Zentrifugen Typ 5415 C, 5415 D, 5415 M, 5417 R	Eppendorf
37°C Bad, Haake W13	Memmert

II.1.2 Chemikalien und Substanzen

Becton Dickinson (Heidelberg)

Tryptone Pepton

Dako (Hamburg)

HISS (Sheep serum), Anti-mouse-TTF1-AB, Faramount Aqueous Mounting Medium

Fermentas (St. Leon-Rot)

10 x PCR-Puffer (KCl, 15 mM MgCl₂), dNTPs, 6x PCR- Ladepuffer

Gibco Laboratories (Detroit, USA)

Agarose, Yeast tRNA

Invitrogen (Life Technologies GmbH Darmstadt)

50x Denhardt's, Agarose, Salzlösung (salt solution), S.O.C.-Medium, 1kb DNS-Leiter

Leica (Wetzlar)

Paraffin

Micro-Tech-Lab (office@micro-tech-lab.de)

Hydro Matrix (watersolved mounting medium)

Promega (Mannheim)

DTT (100 mM), 5xTranskriptionspuffer

Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)

5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP), 4-Nitro blue tetrazolium chloride (NBT), ACG-Nukleotide, Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments (150 U), Digoxigenin-II-UTP, Glykogen, NTPs, RNase Inhibitor, 10x Transkriptionspuffer

J.T. Baker (Deventer, Holland)

Ultra Clear

Roth (Karlsruhe)

Agar-Agar, Ammoniumacetat, β -Mercaptoethanol, dNTPs, Essigsäureanhydrid, Hefeextrakt, NaCl, SDS, Silicagel, Triethanolamin (TEA), Tris-Acetat

Merck (Lehrte)

Essigsäure (96%), EtOH p.a., Formamid, Tris(hydroxymethyl)aminomethan, Chloroform, Phenol, Isopropanol, Aceton, Ethidiumbromid, HCL, KCL, LiChroSolv® (HPCL-H₂O), NaOH, Paraformaldehyd (PFA), Natriumacetat, Natriumcitrat, KH₂PO₄, Na₂HPO₄

Sakura (Staufen)

Tissue-Tek OCT™ Compound

Sigma (München)

Maleinsäure, Ampicillin (75 g/l), Betain, DEPC, Dextransulfat, EDTA, Hämatoxylin-Färbelösung, LiCl₂, MgCl₂, Tween20, xGal, RNase Zap

II.1.3 Reaktionskits

V3 ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 - Ready	Applied Biosystems
Reaction Cycle Sequencing kit	
ARK™ Animal research Kit	Dako
RNeasy Micro Kit	Qiagen
Sensiscript RT Kit	Qiagen
Agilent RNA 6000 Pico Kit	Agilent Technologies
QiaQuick Gel Extraction Kit	Qiagen
Qiagen® Plasmid Mini/Maxi Kit	Qiagen
DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)	Roche
TOPO TA Cloning Kit (pCR®2.1-Vektor)	Invitrogen

II.1.4 Lösungen und Puffer

Die folgenden Lösungen und Puffer wurden verwendet und werden im weiteren Teil nur noch mit Namen und Abkürzungen genannt.

Alkalischer Phosphatase Puffer pH9.5

(NTMT)

4 ml 5M NaCl

20 ml 1M Tris pH9.5

10 ml 1M MgCl₂

100 µl 0.05% Tween20

auf 200 ml mit Aqua bidest auffüllen

DEPC-H₂O

0,1% DEPC

1 l Aqua bidest

über Nacht bei 37°C inkubieren

autoklavieren

10X PBS/DEPC

2 g KCl

2,4 g KH₂PO₄

14,4 g Na₂HPO₄

80 g NaCl

Auf 1 l mit Aqua bidest auffüllen

auf pH7,4 einstellen

1ml DEPC zusetzen

über Nacht bei 37°C inkubieren

autoklavieren

4% PFA/PBS

40 g Paraformaldehyd

bei 55°C in 1x PBS lösen

pH7,4 einstellen

LBamp-Medium nach Miller (pH7.0)

10 g Tryptone

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

1 l Aqua dem

autoklavieren

auf 55°C abkühlen lassen

50 µg/ml Ampicillin zusetzen, bei 4°C lagern

LBamp-Agar

wie LB-Medium

mit 15 g/l Agar versetzt

in Petrischalen gießen

Platten bei 4°C lagern

50 x TAE

242 g Tris-Acetat

2 g EDTA

57,1 ml 96% Essigsäure

auf 1 l mit Wasser auffüllen

PBST

1 l 1X PBS

10 ml 10% Tween 20

1xMABT

100 ml 1M Maleinsäure pH7.5
30 ml 5M NaCl
0.05% Tween20
auf 1000 ml mit Aqua bidest auffüllen

20 x SSC (pH7,0)

175 g NaCl
88,2 g Natriumcitrat
1 l DEPC-H₂O

RNase Waschpuffer

80 ml 5M NaCl
10 ml 1M Tris pH7.5
10 ml 0.5M EDTA pH8.0
auf 1000 ml mit Aqua bidest auffüllen

Hybridisierungspuffer

1 ml 1M Tris pH7.5
12 ml 5M NaCl
0.2 ml 0.5M EDTA
1.25 ml 20% SDS
25 ml 40% Dextran Sulfat
2 ml 50x Denhardt's
20 mg Yeast-tRNA 10mg/ml
50 ml 50% Formamid
auf 100 ml mit DEPC-H₂O auffüllen

In-vitro-Transkriptionspuffer

3 µl ACG nucleotides (4mM)
6 µl 5X Puffer
0,75 µl Dig-UTP-Mix (4mM)
3 µl DTT (100mM)
7,8 µl DEPC- H₂O

II.1.5 Primer, Vektoren und Enzyme

Vektoren mit einklonierter cDNA (Fragmente aus *Hhex-rs2*, *Hip1r*, *Ss18*, *Lphn2*, *Msx1*, *Pvrl1*, *Kdr*, *Txnip*, *Hspb1*, *Slc34a2*) und die dazugehörigen Primer zur Erstellung von Sonden wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Bernhard G. Herrmann (Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin) zur Verfügung gestellt. Alle anderen Primer wurden bei der Firma TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH (Berlin) bestellt.

Primer

Lion-5	AGC GTG GTC GCG GCC GAG GT
Lion-3sp6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT CGA GCG GCC GCC CGG GCA GGT
RZPD-M13for	GCT ATT ACG CCA GCT GGC GAA AGG GGG ATG TG
RZPD-M13rev	CCC CAG GCT TTA CAC TTT ATG CTT CCG GCT CG
L2	AAG CAG CAA GCA TAT GCA GCT AGT TTA ACA CAT TA
U5	ACT CCG CCC AGT TCC GCC CAT TCT
mNkx2.1 1F	GTGTCTTTCTGGTAGTTCAAATGG
mNkx2.1 1R	GATTGGTGCTGCAAATACCAAAC
Hip1r mouse F	CCGAGCTTCAGACATGCTGT
Hip1r mouse R	CTTCATCTCAGACTCACGCT
mHip1 F	GCAGGAATCCACAGATCACCTT
mHip1 R	CTCCTGCTCGGGACTTACTG
M13F	GTAAAACGACGGCCAG
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC
Oligo-dT-Primer	Qiagen

Vektoren

pBluescript Lion	Prof. Dr. B.G. Herrmann
pSV-Sport1	Prof. Dr. B.G. Herrmann
pT7T3D-PacI	Prof. Dr. B.G. Herrmann
pCR®2.1-TOPO-Vektor	Invitrogen

Enzyme

<i>DNase</i> I (10U/ μ l)	Roche
EcoRI/V- Restriktionsenzym	New England Biolabs
SpeI-Restriktionsenzym	Fermentas
Proteinase K (20mg/ml)	Boehringer
RNA-Polymerase	Roche
RNase A	Sigma
TAQ-Polymerase Biotaq	Bioline
Mango-Taq	Bioline
Reverse Transkriptase	Invitrogen
Topo-Isomerase	Invitrogen

II.1.6 Mausstamm

Es wurden ausschließlich weibliche Mäuse des Stammes NMRI (Max Planck Instituts für Molekulare Genetik, Berlin) verwendet. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Präparation alle trächtig. Das Alter der Embryonen lag bei 9.5, 10.5, 11.5, 12.5, 15.5 Tagen. Nach der Verpaarung über Nacht, zählte der Morgen, an dem ein Vaginalpfropf sichtbar wurde, als Tag 0.5 der Embryonalentwicklung (E0.5)

II.2 Methoden

II.2.1 Übersicht

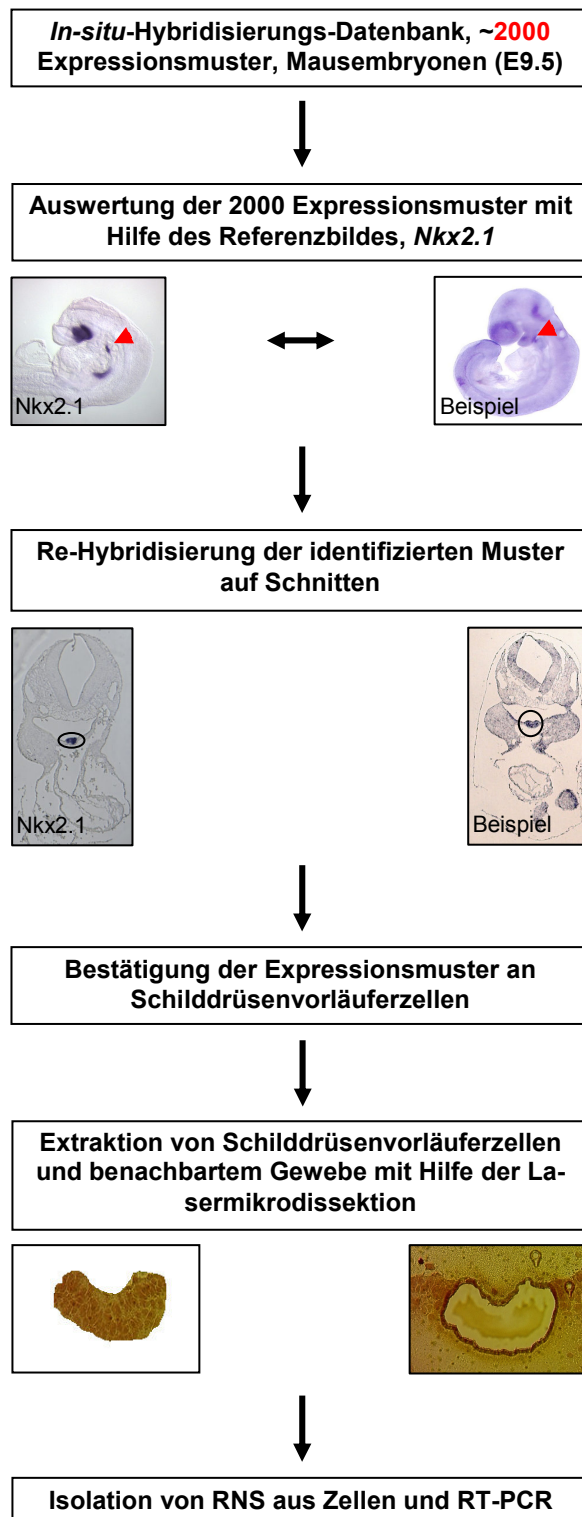


Abbildung II.1: Übersicht der Methoden Anhand des Diagramms ist der Ablauf der einzelnen Arbeitsschritte dargestellt. Eine detaillierte Beschreibung der Schritte findet sich in den folgenden Kapiteln.

II.2.2 “Screening“ der In-situ-Hybridisierungsdatenbank

Der Zugang zu der “Whole-mount“-*in-situ*-Hybridisierungsdatenbank, MAMEP: “Molecular Anatomy of the Mouse Embryo Project“, wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Herrmann, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin, gewährt. Die Datenbank ist in veränderter Form mittlerweile frei zugänglich unter <http://mamep.molgen.mpg.de/index.php>. Zur Erstellung dieser Datenbank wurde von der Arbeitsgruppe Herrmann ein Protokoll zur Hoch-Durchsatz-Methode der “Whole-mount“-*in-situ*-Hybridisierung entwickelt. Ausgehend von etwa 10000 zum Zeitpunkt E9.5 in Mausembryonen exprimierten Genen, wurden “Housekeeping“-Gene und Gene mit unspezifischem Expressionsmuster aussortiert, und es wurden von den verbliebenen Genen *In-situ*-Hybridisierungen angefertigt (s. auch Kapitel IV.1.1). Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit enthielt die Datenbank Bilder von *In-situ*-Hybridisierungen von etwa 2000 verschiedenen Genen auf Mausembryonen E9.5 (Embryonaltag 9.5). ([48] und mündliche Information Dr. M. Werber, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin) Es wurde ein Referenzbild einer “Whole-mount“-*in-situ*-Hybridisierung eines bekannten Schilddrüsenmarkergens, *Nkx2.1*, mit jedem der 2000 verschiedenen Muster verglichen. Dabei wurde besonders auf den pharyngealen Teil des Endoderms, welches das primitive Darmrohr auskleidet, geachtet, in welchem sich auch die Zellen der Schilddrüsenanlage befinden. Auf dem Referenzbild, welches ebenfalls einen Mausembryo an E9.5 darstellt, ist deutlich ein Farbsignal, als Zeichen der Expression sichtbar (s. Abb. II.2). Bilder mit ähnlichem Signal wurden in die erste Auswahl aufgenommen. Erst im Nachhinein wurden den Bildern die jeweiligen Gennamen zugeordnet. Die selektierten Bilder wurden noch einmal mit dem Referenzbild verglichen, sowie von einer zweiten, unabhängigen Person (Prof. Krude) betrachtet. Sowohl auf dem Referenzbild, als auch auf den Darstellungen aus der Datenbank, sind die Embryonen in einer seitlichen Ansicht dargestellt. Das Signal auf dem Referenzbild ist deutlich im anterioren Teil des pharyngealen Endoderms, knapp unterhalb des ersten Branchialbogens, auf Höhe des zweiten Branchialbogens zu erkennen (s. Abb. II.2). Die im ersten Durchgang selektierten Bilder wurden nun noch einmal sorgfältig auf ein eindeutig positives Signal in der beschriebenen Lage geprüft. Bilder mit weiter aboral oder am posterioren Teil des Endoderms gelegenen Signalen, oder mit nicht eindeutig positiven Signalen wurden aussortiert. Die ausgewählten Kandidaten wurden auf histologischen Schnitten rehybridisiert. Hierfür wurden dieselben Sonden, welche für die “Whole-mount“-*in-situ*-Hybridisierungen“ eingesetzt worden waren, verwendet.

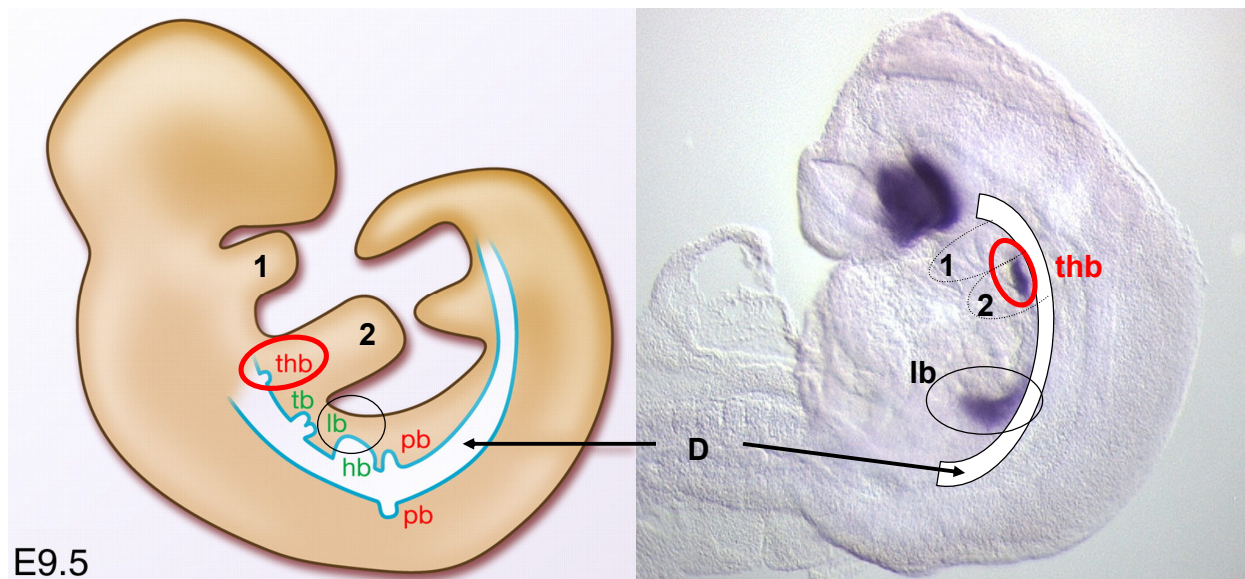


Abbildung II.2: Grobe Darstellung einiger Strukturen des 9.5 Tage alten Mausembryos. Links: Schematische Darstellung aus [49], rechts Expressionsmuster von *Nkx2.1* auf einem 9.5 Tage alten Mausembryo nach “Whole-mount“-*in-situ*-Hybridisierung. D, Darmrohr, thb, “thyroid bud” (Schilddrüsenanlage), lb, “lung bud” (Lungenanlage), tb, “tracheal bud“ (Anlage der Trachea), hb, “hepatic bud“ (Leberanlage), pb, “pancreatic bud“ (Pankreasanlage).

II.2.3 Histologische Methoden

Für die Präparation der Embryonen, das Einbetten in Paraffin, Erstellen von histologischen Schnitten am Mikrotom und die *In-situ*-Hybridisierungen auf histologischen Schnitten wurde das Protokoll der AG Mundlos (Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin) genutzt (beispielsweise [50]). Für den Versuchsablauf Präparation der Embryonen, Einbetten in Tissue-Tek, Erstellen histologischer Schnitte am Cryotom zur Gewinnung von Schilddrüsenzellen mittels Lasermikrodissektion und anschließender RNS-Extraktion wurde das im folgenden beschriebene Protokoll der einzelnen Abläufe aus unterschiedlichen veröffentlichten Protokollen zusammengestellt [51-57]

II.2.3.1 Präparation von Mausembryonen

Nach Exitus durch Genickbruch des Muttertiers wurden Mausembryonen des Stadiums E9.5 (E10.5, E11.5, E12.5, E15.5) präpariert. Dazu wurde der Bauchraum eröffnet, der Uterus entfernt

und in eiskaltes 1%PBS/DEPC transferiert. Die Embryonen wurden einzeln aus den Uteruskammern herauspräpariert, alle Eihäute wurden entfernt.

II.2.3.2 Dehydratation und Fixierung der Mausembryonen

Die Embryonen, die in Paraffin eingebettet werden sollten, wurden über Nacht bei 4°C in 4%igem PFA fixiert. Am nächsten Tag wurden sie zweimal in 1x PBS für 5-10 min gewaschen. Danach erfolgte eine Dehydratation per Hand für ≥ 1 h in 50% EtOH/PBS und für > 1 h in 70% EtOH. Für die restlichen Dehydratationsschritte wurde ein Entwässerungsautomat mit folgender Einstellung verwandt: Inkubiert wurden die Embryonen jeweils für 90 min in 90% EtOH, 95% EtOH, 100% EtOH, Ultra Clear und schließlich in flüssigem Paraffin.

II.2.3.3 Einbetten der Embryonen in Paraffin

Das Einbetten der Embryonen in Paraffin erfolgte an einer Einbettstation. Die Embryonen wurden einzeln in Formen mit flüssigem Paraffin gesetzt und nach Bedarf ausgerichtet. Zum Aushärten des Paraffins wurden die Formen anschließend auf die in der Einbettstation integrierte Kälteplatte gestellt. Die erkalteten Paraffinblöcke konnten dann aus den Formen entnommen und sofort weiterverarbeitet oder bei 4°C aufbewahrt werden.

II.2.3.4 Einbetten der Embryonen in Tissue-Tek

Direkt nach Präparation wurden die Embryonen in eine Metallform mit bei Raumtemperatur flüssigem OCT Tissue-Tek® überführt und nach Bedarf in verschiedenen Ebenen ausgerichtet. Auf Trockeneis wurden das Einbettmedium und die Embryonen zum Erkalten und Aushärten gebracht. Die Blöcke wurden bei -80°C gelagert.

II.2.3.5 Anfertigung histologischer Schnitte am Mikrotom

Die Erstellung histologischer Schnitte aus den in Paraffin eingebetteten Embryonen erfolgte mit Hilfe eines Mikrotoms. Es wurden 7 μ m dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden aus dem Wasserbad heraus auf speziell beschichtete Objektträger aufgezogen und auf einer Heizplatte bei 60°C 1-2 h und über Nacht bei 37°C getrocknet. Danach erfolgte die Lagerung der Schnitte für bis zu vier Wochen bei 4°C.

II.2.3.6 Anfertigung histologischer Schnitte am Cryotom

Histologische Schnitte aus den in OCT Tissue-Tek® eingebetteten Embryonen wurden mit Hilfe eines Cryotoms angefertigt. Alle Geräte und eingesetzten Objektträger mussten zuvor mit RNase Zap behandelt werden, um ein RNase-freies Arbeiten zu sichern. Die speziell für die spätere Lasermikrodissektion eingesetzten membranbeschichteten Objektträger mussten nach Produktanleitung etwa 30 min unter einer UV-Lampe trocknen, bevor sie verwendet werden konnten. Es wurde bei Temperaturen von -11°C (Gewebe) und -13°C (Messer) gearbeitet. Die 10 µm dicken Schnitte wurden abwechselnd auf membranbeschichtete Objektträger gezogen, die dann im Cryotom bei -20°C gelagert wurden, und auf solche gezogen, die zur Antikörperfärbung genutzt werden konnten und bei Raumtemperatur getrocknet und gelagert wurden. Beschichtete Objektträger wurden, sobald drei Schnitte aufgezogen waren, von -20°C auf Trockeneis, -80°C, überführt. Die Schnitte wurden eine Nacht bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert.

II.2.3.7 Färbung histologischer Schnitte mit Hämatoxylin

Zur Orientierung unter dem Mikroskop bei der Lasermikrodissektion wurden die am Cryotom angefertigten Schnitte kurz gefärbt. Hierzu wurden die bei -80°C gelagerten Schnitte in -20°C kalten 75%-EtOH überführt. Nach zwei Minuten erfolgte die Färbung bei Raumtemperatur. Auf jeden Objektträger wurden 300 µl Hämatoxylin pipettiert und für einige Sekunden dort belassen. Die Objektträger wurden anschließend noch einmal kurz in 75% EtOH-Lösung und dann 30 s in 100% EtOH-Lösung eingetaucht. Nachdem die Objektträger bei Raumtemperatur getrocknet waren, konnten die Schnitte bis zur weiteren Bearbeitung höchstens eine Woche in einer Box mit frischem Silicagel, dunkel, staubfrei und trocken bei Raumtemperatur gelagert werden. Es war in allen Schritten darauf zu achten, dass RNase-frei gearbeitet wurde.

II.2.3.8 Nkx2.1-Antikörperfärbung

Zur besseren Darstellung der Schilddrüsenanlage im frühen Stadium E9.5, wurde eine Antikörperfärbung auf histologischen Mausembryoschnitten durchgeführt. Dafür wurde ein Nkx2.1-Antikörper (Anti-mouse-TTF1-Antibody, Dako) benutzt. Es wurde das „Animal research kit“ (Dako) verwendet und alle Reaktionsschritte gemäß des beiliegenden Protokolls bearbeitet. Am Schluss erfolgte das Deckeln mit einem Medium auf Wasserbasis.

II.2.4 Molekularbiologische Methoden

II.2.4.1 Gewinnung embryonaler RNS aus Schilddrüsenvorläuferzellen der Maus

Zur Bestätigung der Expression einzelner Gene in der Schilddrüsenanlage wurde ein RT-PCR Ansatz mit isolierten Schilddrüsenvorläuferzellen gewählt. Hierzu wurde RNS aus mittels Lasermikrodissektion (s. Kapitel II.2.6) gewonnenen Schilddrüsenvorläuferzellen extrahiert, um anschließend mit Hilfe der PCR die gewünschten Sequenzen nachweisen zu können. Die in 14 µl RLtbuffer/β-Mercaptoethanol aufgefangenen Zellen wurden mit Hilfe des Vortex gemischt und kurz zentrifugiert. Es wurden teilweise Zellen aus mehreren Embryonen für die RNS-Isolation gemischt, um die Ausbeute an Nukleinsäuren zu vergrößern. Die Isolation erfolgte nach Angaben des Protokolls RNeasy Microkit (Qiagen). RNS wurde in 14 µl DEPC-H₂O eluiert und bei -80°C aufbewahrt.

II.2.4.2 Reverse Transkription

Um RNS aus Schilddrüsenvorläuferzellen in der PCR einsetzen zu können, musste die RNS vorher in cDNS umgeschrieben werden. Dies erfolgte nach dem Protokoll des Reaktionskits Sensiscript (Qiagen). Es wurden je nach Konzentration 1-4 µl RNS eingesetzt. cDNS konnte bei 4°C oder länger bei -20°C aufbewahrt werden.

II.2.4.3 Polymerasekettenreaktion

Zur exponentiellen Amplifikation ausgewählter DNS-Fragmente wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung zweier sequenzspezifischer Oligonukleotid-Primer sowie einer thermostabilen DNS-Polymerase (TAQ) durchgeführt [58]. Der Amplifikations-Zyklus wurde 30-40x wiederholt. Folgende PCR-Programme wurden genutzt, wobei als Vorlage für die PCR cDNS aus embryonalen Schilddrüsenvorläuferzellen E9.5 (*Nkx2.1*, *Hip1r*), aus dem, die Schilddrüsenanlage umgebenden Gewebe E9.5 (*Nkx2.1*, *Hip1r*) und aus ganzem Embryo E9.5 (*Hip1*) verwendet wurden.

Tabellen II.1-II.6 PCR-Bedingungen für *Nkx2.1*-, *Hip1r*- und *Hip1*-PCR-Programme

Nkx2.1-PCR

Ansatz		Cycler-Programm	
10X PCR-Puffer	5,0 µl	95°C	2:00 min
MgCl ₂ (1,5 mM)	1,5 µl	95°C	0:30 min
Betain 1 M	10,0 µl	60,6°C	0:30 min
dNTPs (1,25 mM)	0,5 µl	72°C	1:30 min
F(oward)-Primer mNkx2.1 (50 µM)	2,5 µl	72°C	8:00 min
R(everse)-Primer mNkx2.1 (50 µM)	2,5 µl	4°C	∞
TAQ-Polymerase (Mango Taq 1 U/µl)	1,0 µl		
H ₂ O	25,0 µl		
cDNS (50-100 µg/ml)	2,0 µl		
Gesamtvolumen	50,0 µl		

Hip1r-PCR

Ansatz		Cycler-Programm	
10X PCR-Puffer	2,5 µl	95°C	2:00 min
MgCl ₂ (1,5 mM)	0,75 µl	95°C	0:30 min
dNTPs (1,25 mM)	0,25 µl	60°C	1:30 min
F(oward)-Primer Hip1r mouse (50 µM)	0,25 µl	72°C	1:30 min
R(everse)-Primer Hip1r mouse (50 µM)	0,25 µl	72°C	8:00 min
TAQ-Polymerase (Mango Taq 1 U/µl)	0,5 µl	4°C	∞
H ₂ O	19,5 µl		
cDNS (50-100 µg/ml)	1,0 µl		
Gesamtvolumen	25,0 µl		

PCR-Programm für die Sondenherstellung

Hip1

Ansatz		Cycler-Programm	
10X PCR-Puffer	2,5 µl	95°C	2:00 min
MgCl ₂ (1,5 mM)	0,75 µl	95°C	0:30 min
dNTPs (1,25 mM)	0,25 µl	58°C	1:30 min
F(oward)-Primer mHip1 (50 µM)	0,25 µl	72°C	1:30 min
R(everse)-Primer mHip1 (50 µM)	0,25 µl	72°C	8:00 min
TAQ-Polymerase (Mango Taq 1 U/µl)	0,5 µl	4°C	∞
H ₂ O	19,5 µl		
cDNS (50-100 µg/ml)	1,0 µl		
Gesamtvolumen	25,0 µl		

PCR-Programm für die Sondenherstellung aus Plasmid Vektoren

Hip1r, Hspb1, Kdr, Lphn2, Msx1, Ss18, Txnip, Slc34a2, Pvr11, Hhex

Als Matrize für die PCR diente in einen Plasmid-Vektor einklonierte cDNS. Plasmide mit fertig einklonierter cDNS, sowie das weiterführende Protokoll wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Herrmann (Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin) zur Verfügung gestellt.[59] Die Sequenz der cDNS stellte jeweils einen Ausschnitt der Sequenz des Genes, welches mit der Sonde später detektiert werden sollte, dar. Es handelte sich um dieselben Sequenzen, die auch zur Erstellung der "Whole-mount"-*in-situ*-Hybridisierungs-Datenbank genutzt wurden. Die Primer waren im Vektor so gelegt, dass die Amplifikate an beiden Enden um die Sequenz der Promotoren für die Transkription verlängert wurden. Abhängig von den Vektoren und den dazugehörigen Primerpaaren wurde in PCR-Programmen die "Annealing"-Temperatur variiert (L2/U5: 65°C, Lion-3sp6/Lion-5: 56°C, RZPD-M13for/rev: 68°C).

Tabellen II.7 und II.8 Bedingungen für PCR-Programme aus Plasmid Vektoren

Ansatz		Cycler-Programm	
10X PCR-Puffer	5,0 µl	94°C	3:15 min
MgCl ₂ (1,5 mM)	1,5 µl	95°C	0:45 min
dNTPs (1,25 mM)	0,5 µl	56 (65, 68)°C	0:45 min
F(orward)-Primer (100 µM)	0,25 µl	72°C	4:00 min
R(everse)-Primer (100 µM)	0,25 µl	72°C	4:00 min
TAQ-Polymerase (Mango Taq 1 U/µl)	0,5 µl	4°C	∞
H ₂ O	41,0 µl		
Plasmid (50/500 µg)	1,0 µl		
Gesamtvolumen	50,0 µl		

II.2.4.4 Sequenzierung

Sequenziert wurden PCR-Produkte und Sequenzen in Plasmiden, um die Orientierung des "Inserts" zur späteren Erstellung von anti-sense-RNS-Sonden zu bestimmen. PCR-Produkte, je 8 µl, wurden zunächst zur Aufreinigung einem Verdau mit 0,18µl Exo I (Exonuclease) und 0,32 µl SAP (shrimp alkaline phosphatase) unterzogen. Danach folgte die eigentliche Sequenzreaktion, eine PCR mit nur einem Primer und farblich markierten Nukleotiden. Für Ansätze mit Plasmiden wurden je nach Plasmid m13F/R, Lion-5/-3sp6, U5/L2, RZPD-M13for/-M13rev Primer benutzt, in allen übrigen Ansätzen kamen die jeweiligen PCR-Primer in verdünnter Form (5 µM) zum Einsatz. Als Matrize dienten die aufgereinigten PCR-Produkte oder Plasmide.

Tabellen II.9 und II.10 Bedingungen für Sequenzreaktions-PCR-Programme

Ansatz		Cycler-Programm (30 Zyklen)	
BigDye-Sequenziermix (Applied Biosystems)	4,0 µl	95°C	1:00 min
F(oward)-Primer (5 µM) oder R(everse) -Primer (5 µM)	1,0 µl	95°C	0:30 min
H ₂ O	3,0 µl	55°C	0:15 min
ExoI-SAP-PCR-Ansatz/ linearisiertes Plasmid	3,0 µl	72°C	4:00 min
		4°C	∞
Gesamtvolumen	11,0µl		

Nach der Sequenzreaktions-PCR wurden die Produkte mit Zusatz von 2 µl 1,5 M Natriumacetat (pH 5,5) und 20 µl 100% EtOH durch Zentrifugation (30 min bei 10500 rpm und 4°C) ausgefällt. Die Flüssigkeit wurde im Anschluss abgesaugt und das Pellet mit 100µl 70% EtOH gewaschen, sowie noch einmal 15 min zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde abgesaugt und das Pellet 3 min bei 95°C getrocknet.

Resuspendiert wurde in 10 µl HCLP-H₂O. Die Erstellung der Sequenzen erfolgte mit dem ABI 3130 Genetic Analyzer.

II.2.4.5 Agarosegelelektrophorese

Die Elektrophorese in Agarosegelen (je nach erwarteter Größe der Fragmente 1-4% Agarose in 1x TAE-Puffer) diente der Auftrennung von DNS-Fragmenten, sowie der Darstellung von RNS zur Bestätigung der *In-vitro*-Transkription. Zur Visualisierung der Fragmentlängen wurde den Gelen Ethidiumbromid (4 µl pro 100 ml 1x TAE) zugesetzt. Erhärtete Gele wurden in mit 1x TAE-Puffer gefüllte Horizontalkammern überführt. 5–10 µl des PCR-Produktes oder der transkribierten RNS wurden zusammen mit 1-2 µl PCR-Ladepuffer in die Geltaschen eingebracht. Bei Einsatz von Mango-Puffer in der PCR wurde kein Ladepuffer verwendet. Es wurde eine Spannung von 80–120 V angebracht. Als Größenstandard wurde eine 1 kb-DNA-Leiter mitgeführt.

Das Ergebnis wurde mit dem Geldokumentationssystem festgehalten.

II.2.4.6 Photometermessung

DNS- und RNS-Konzentrationen wurden mit Hilfe eines Photometers gemessen. Es wurden je 2 µl der betreffenden Probe in 98 µl H₂O gegen 100 µl einer reinen H₂O-Probe (Nullwert) ge-

messen. Die gemessenen Werte der DNS-Konzentrationen lagen etwa zwischen 700-800 µg/ml, für RNS etwa zwischen 500-600 µg/ml.

II.2.4.7 Qualitätsmessung von RNS

Für die RNS-Qualitätsmessungen wurden das Agilent 2100 Bioanalyzer System und das Agilent RNA 6000 Pico Kit genutzt. Mit Hilfe dieses Systems wird farbmarkierte RNS durch Elektrophorese aufgetrennt und die Fluoreszenz der RNS gegen die Zeit gemessen. Es wurde dafür RNS nach Protokoll (Agilent RNA 6000 Pico Kit Quick Start Guide) mit einem Farbstoff markiert und auf die dafür vorgesehenen Pico-Chips aufgetragen. Ein Pico-Chip hat mehrere Kanäle, wobei 11 verschiedene Proben und eine „Leiter“ mit den Größenstandards geladen werden konnten. Ein Chip wurde in die Bioanalyzer-Kammer eingelegt und die Messung gestartet. Durch eine Spannung wird jede einzelne RNS-Probe elektrophoretisch aufgetrennt und wandert dabei durch Mikrokanäle, wobei die Menge an Fluoreszenz über die Zeit gemessen wird und in einem Elektropherogramm (s. Abb. II.1) dargestellt wird. Anhand des Elektropherogramms lassen sich die Quantität und die Qualität der RNS nach bestimmten Kriterien ablesen. Der RIN („RNA integrity number“) Algorithmus besagt wie gut die Qualität der gemessenen RNS ist. Eine RIN von 10 gilt als höchste, 1 als niedrigste Qualitätsstufe. Beurteilt wird dies unter anderem mit Hilfe eines Quotienten der ribosomalen Einheiten 18S zu 28S und anhand des Hintergrundrauschens zwischen den Peaks.[60] Je nach späterer Verwendung kann RNS verschiedener Qualitätsstufen ausgewählt werden. Für eine PCR ist beispielsweise eine RIN von etwa 6 einsetzbar.[61]

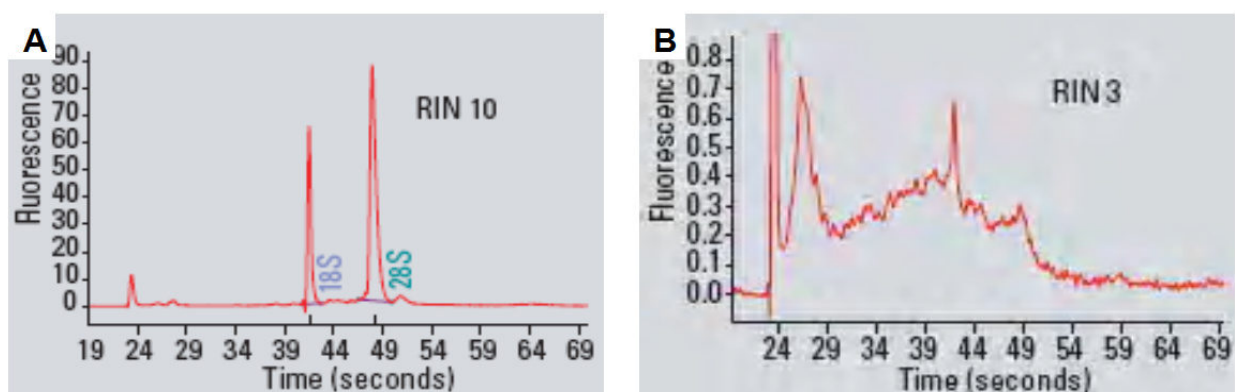


Abbildung II.3: In Abbildungen II.1 A und B sind Beispiele für RNS-Elektropherogramme des Agilent 2100 Bioanalyzer Systems dargestellt.[60] (A) Die anhand der Kurve ablesbare RNS-Qualität der gemessenen Probe erhält die beste Integritätsnummer RIN 10. (B) Das dargestellte Elektropherogramm spiegelt degradierte RNS in der gemessenen Probe wider. Anhand der

Kurve wird der RNS-Qualität die Integritätsnummer RIN 3 zugeordnet. Mit Hilfe dieses Systems wurde die Qualität selbst erstellter RNS-Proben beurteilt.

II.2.4.8 DNS-Aufreinigung aus PCR-Gelen

Die *Hip1*-PCR-Produkte aus verschiedenen Ansätzen wurden zur Sondenherstellung gepoolt und aufgereinigt. Dazu wurden die Banden aus drei verschiedenen PCR-Ansätzen aus einem Gel ausgeschnitten. Nach Herstellerangaben des QiaQuick Spin-Kits wurde dann die DNS eluiert und für die Klonierung aufgereinigt.

II.2.4.9 Topo-Klonierung, Transformation und Bakterienanzucht

In Vorbereitung auf die Sondenherstellung wurden aufgereinigte *Hip1*-PCR-Produkte, welche die für die Sonde gewünschte Nukleotidsequenz aufwiesen, in Plasmide eingebracht. So konnten die T7-/Sp6-Promotoren für die Polymerase, welche DNS in RNS transkribiert, an die Enden des PCR-Produktes gekoppelt werden.

Zu 4 µl PCR-Produkt wurden 1 µl Vektor-Mix (pCR®2.1-Vektor und TOPO-Isomerase) und 1 µl Salzlösung gegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Transformation wurden die Vektoren und *E.-coli*-Bakterien (Top10, TOPO TA Cloning Kit) 30 min auf Eis gestellt. Bakterien wurden dann 45 min bei 37°C in 200 µl S.O.C.-Medium geschüttelt und zur Anzucht auf mit x-Gal bestrichene LBamp-Agar-Platten aufgetragen und über Nacht in einem 37°C-Brutschrank bebrütet. Der verwendete Vektor zeichnet sich zum einen durch eine Ampicillin-Resistenz und zum anderen durch das LacZ-Gen aus. Wird der Vektor von Bakterien aufgenommen, welche in Medien mit Ampicillin wachsen, überleben diese, dank der vom Vektor kodierten Ampicillin-Resistenz. Durch das eingebaute LacZ-Gen können solche Bakterienkolonien identifiziert werden, welche Vektoren mit einklonierter DNS-Sequenz aufgenommen haben. Die hinzugefügte DNS wird in den Vektor vor das LacZ-Gen kloniert, welches dann nicht mehr abgelesen werden kann. Bakterien mit solchen Vektoren verlieren die Fähigkeit, x-Gal zu verstoffwechseln. Diese Kolonien erscheinen weiß.

Zur weiteren Amplifikation und Plasmidpräparation wurden weiße Kolonien gepickt, mit 4 ml (für Minipräparation) / 150 ml (für Maxipräparation) LBamp-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C in einem Schüttler inkubiert.

II.2.4.10 Plasmidpräparation

Je nach geforderter Plasmidmenge wurde zur Isolation der Plasmide eine Minipräparation aus 4 ml oder eine Maxipräparation aus 150 ml angeimpftem und inkubiertem Medium durchgeführt.

Minipräparation und Restriktionsenzymverdau

Die Minipräparation und der Restriktionsenzymverdau wurden im Vorfeld der Maxipräparation als Kontrolle durchgeführt. Die Minipräparation erfolgte nach dem Standardprotokoll des Qiagen Minipräparationskits.

5 µl der auf diese Art isolierten Plasmide wurden einer einstündigen Inkubation mit 0.5 µl *Eco-RI*-Enzym ausgesetzt. Da pCR®2.1-Vektoren auf beiden Seiten der „Cloning-site“ eine Restriktionsstelle für *Eco-RI* besitzen, konnte das inklonierte DNS-Fragment aus dem Vektor geschnitten werden. Aufgetragen auf ein Agarosegel konnte abhängig von der Größe des „Inserts“ bestimmt werden, ob es sich um das erwartete Fragment handelte.

Maxipräparation

Nach Bestätigung der erwarteten Klonierung wurden größere Mengen Plasmid nach Herstellerangaben des Qiagen Reaktionskits zur Maxipräparation isoliert.

Linearisierung

Zur Linearisierung wurden in zwei 100 µl Ansätzen jeweils 30 µg Plasmid und 10 µl 10x Restriktionspuffer eingesetzt, 5 µl *Eco-RV*- oder *SpeI*-Restriktionsenzym hinzugegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Abhängig von der Restriktionsstelle des jeweiligen Enzyms blieb im linearisierten Plasmid rechts oder links des Inserts ein Sp6- oder T7-Promotor angehängt. Um in den Proben enthaltene RNAsen zu zerstören, wurden die Ansätze danach 1 h bei 37°C mit jeweils 1 µl Proteinase K verdaut. Zur Aufreinigung wurden die linearisierten Produkte einer Phenol-Chloroformfällung unterzogen. Dazu wurde zu den Proben 380 µl 10 M Ammoniumacetat und je 200 µl Phenol und Chloroform hinzugegeben, per Hand geschüttelt und 10 min bei 4°C und 12000 g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde dann abgenommen, es wurde erneut Chloroform (200 µl) hinzupipettiert, wieder geschüttelt und 5 min zentrifugiert. Aus der nun entstandenen wässrigen Phase folgte die Fällung der DNS mit 350 µl Isopropanol während einer 30minütigen Zentrifugation. Das sichtbare Pellet wurde mit 75% EtOH gewaschen, luftgetrocknet und dann in 14 µl DEPC-H₂O eluiert. Zur Kontrolle wurde je 1 µl linearisiertes, aufgereinig-

tes Produkt und 1 µg unverdautes Plasmid auf ein 1% Agarosegel aufgetragen. Außerdem wurde eine Photometermessung und Kontroll-Sequenzierung durchgeführt.

In den weiteren Schritten (*In-vitro*-Transkription) war für die Herstellung von “antisense“-RNS-Sonden darauf zu achten, dass dasjenige linearisierte Plasmid mit DNS-Fragment eingesetzt wurde, welches in der Kontroll-Sequenzierung zur Produktion von “antisense“-Fragmenten geführt hatte.

II.2.4.11 *In-vitro*-Transkription

Es wurden verschiedene Protokolle zur *In-vitro*-Transkription für die Herstellung der *Hip1*-RNS-Sonde und für die Herstellung der weiteren RNS-Sonden (s. Tab. II.11) verwendet. Bei diesen Protokollen musste auf ein RNase-freies Arbeiten achtgegeben werden.

Erstellung der Hip1-Sonde

Zur Erstellung einer Digoxigenin-markierten RNS-Sonde wurde die Transkription gemäß des Protokolls des DIG RNA labelling Kit durchgeführt. Es wurden 1 µg linearisiertes Plasmid mit einklonierter *Hip1* cDNS sowie 2 µl *SP6*-Polymerase eingesetzt. Abweichend vom Standardprotokoll wurde dem Ansatz zusätzlich 1 µl *RNase*-Inhibitor beigelegt. Zur Aufreinigung wurde die Probe zunächst mit DEPC-H₂O auf 75 µl aufgefüllt. Es erfolgte die Fällung der gelabelten RNS mittels 10 µl 4 M Lithiumchlorid und 300 µl 100% EtOH bei 80°C und einer Inkubationszeit von 30 min sowie einer darauf folgenden 20minütigen Zentrifugation (4°C, 13000 rpm). Das entstandene Pellet wurde in 75% EtOH gewaschen und danach in 100 µl DEPC-H₂O resuspendiert. 5 µl der fertig gestellten Sonde wurden auf ein 1% Agarosegel aufgetragen, der Rest wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

Erstellung weiterer RNS-Sonden

Es wurde das Protokoll zur Herstellung von Digoxigenin-gelabelten RNS-Sonden der Arbeitsgruppe Herrmann (Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin) verwendet.

Zu 9 µl PCR-Produkt (s. *PCR-Programm für die Sondenherstellung aus Plasmid Vektoren*; Tab. II.7-II.8) wurden 20,55 µl *In-vitro*-Transkriptionspuffer und 0,45 µl T7-Polymerase (30 u/µl) zur Erstellung der Antisense-Sequenz hinzugegeben. Die Transkriptionsreaktion erfolgte in 2,5 h, bei 40°C und wurde anschließend einer Inkubation mit 1 µl DNase (10 u/µl) für 15 min bei 37°C unterzogen. Die Aufreinigung erfolgte mit 1,2 µl Glycogen und 12 µl Ammoniumacetat. Es wurden jedem Ansatz außerdem 150 µl 100% EtOH hinzugefügt und 30 min bei 4°C und

14.000 rpm zentrifugiert. Nach dem Waschen mit 150 µl 70% EtOH und Trocknen des Pellets wurde dieses in 100 µl DEPC-H₂O resuspendiert. Es wurden 5 µl der fertiggestellten Sonde zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen und der Rest bei -80°C aufbewahrt.

RNS-Sonden

Tabelle II.11 Es ist eine Übersicht über alle zur Anwendung gekommenen RNS-Sonden dargestellt. Mit den Nummern unter den Gennamen werden die offiziellen NCBI –Sequenzen angegeben (www.ncbi.nlm.nih.gov/). Auf diesen Sequenzen basierend wurde die Lage der einzelnen Sonden-Produkte mit Hilfe der Funktion „Blat“ des UCSC Genome Browsers (<http://genome.ucsc.edu/>) bestimmt, oder die von der AG Herrmann angegebene Sondenlage aufgeführt.

Sonde	Produktlänge (ohne Introns)	Produktlage	Vektor (Vektor-Primer)	RNS- Polymerase
Hhex-rs2 (=Hhex, NM_008245)	244bp	37505572- 37505816	pBluescript Lion (Lion-5/-3sp6)	T7
Hip1r (NM_145070.2)	356bp	124449541- 124450259	pSV-sport1 (L2/U5)	T7
Hip1 (NM_146001)	483bp	135905035- 135900751	pCR®2.1-Vektor (M13F/R)	Sp6
Hspb1 (NM_013560)	357bp	136364944- 136365430	pSV-sport1 (L2/U5)	T7
Kdr (NM_010612)	418bp	76328861- 76329278	pSV-sport1 (L2/U5)	T7
Lphn2 (NM_001081298)	485bp	148521730- 148513927	pSV-sport1 (L2/U5)	T7
Msx1 (NM_010835)	869bp	38109151- 38112187	pSV-sport1 (L2/U5)	T7
Pvrl1 (NM_021424)	308bp	Genaue Lage der Sonde ist nicht bekannt	pSV-sport1 (L2/U5)	T7
Slc34a2 (NM_011402)	891bp	53359021- 53359912	pT7T3D-PacI (RZPD-M13for/-rev)	T7

Ss18 (NM_009280)	961bp	14770264- 14769303	pSV-sport1 (L2/U5)	T7
Txnip (NM_001009935)	1022bp	96645649- 96646671	pSV-sport1 (L2/U5)	T7

II.2.5 In-situ-Hybridisierung

II.2.5.1 Schnitt-*in-situ*-Hybridisierung

Die *In-situ*-Hybridisierung ist ein Verfahren, mit dem Nukleinsäuren, in unserem Falle mRNA, gewebespezifisch nachgewiesen werden können. Dazu wird eine markierte, aus Nukleinsäuren künstlich hergestellte Sonde an die nachzuweisende Nukleinsäure hybridisiert.[62]

Das Protokoll für die *In-situ*-Hybridisierung wurde freundlicherweise von der AG Mundlos (Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin) zur Verfügung gestellt.

Hybridisierung

Zunächst wurden die histologischen Schnitte deparaffinisiert. Dafür wurden sie eine Stunde bei 60°C auf eine Heizplatte gelegt und danach 2x15 min in Ultra Clear gewaschen. Danach erfolgte die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe: 2x10 min 100%EtOH, je 5 min 75%EtOH/DEPC, 50%EtOH/PBS, 25%EtOH/PBS, 2x5 min 1xPBS/DEPC. Die Schnitte wurden dann jeweils 10 min in 4%iges PFA/PBS und in Proteinase K (1,5 µg/ml in 1xPBS) und 5 min noch einmal in 4%iges PFA/PBS gelegt. Zwischen allen drei Schritten wurde mehrfach in PBT gewaschen.

Die Acetylierung erfolgte in TEA (0,1 M) und Essigsäureanhydrid (500 µl) in DEPC-H₂O. Nach mehrmals wiederholten PBT-Waschschritten, wurden die Schnitte mit jeweils 100 µl vorgewärmtem Hybridisierungspuffer für 1-4 h bei 65°C prähybridisiert. Danach erfolgte die Hybridisierungsreaktion über Nacht. Hierzu wurde je 1 µl einer DIG-gelabelten-RNS-Sonde in 150 µl Hybridisierungspuffer auf die Schnitte gegeben und die Schnitte danach in einer lichtundurchlässigen Box über Nacht in einen 65°C heißen Ofen gestellt.

Bindung des Antikörpers an die DIG-gelabelte-RNS-Sonde

Am nächsten Tag wurden die Schnitte in 50%Formamid/1xSSC für 30 min bei 65°C gewaschen und danach 30 min bei 37°C einer RNase (*RNase A*, 20 µg/ml) ausgesetzt. Es folgten wieder drei Waschschrte bei 65°C je 20 min in 2x, 0,2x und nochmals 0,2x SSC. Die Antikörper-Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C in einer lichtundurchlässigen Box mit α -DIG-Antikörper (Fab-Fragmente 1:2500) in 5% HISS/MABT.

Färbung

Durch den Zusatz der Reagenzien NBT/BCIP kann die an den α -DIG-Antikörper gebundene Alkalische Phosphatase einen Farbstoff umsetzen, der dann kovalent im betroffenen Gewebe gebunden bleibt. Das heißt, es werden nur die Zellen angefärbt, in denen die gesuchte RNS exprimiert wird.

Für diese Färbung wurden die Schnitte am dritten Tag zunächst einige Male in MABT gewaschen und danach in einer Lösung von je 70 µl NBT und BCIP und 200 ml NTMT-Puffer in einer dunklen Box bei Raumtemperatur etwa 2-5 Tage geschwenkt, bis ein Farbsignal zu sehen war.

II.2.5.2 “Whole-mount“-*in-situ*-Hybridisierung

Die *In-situ*-Hybridisierung aller in der Datenbank befindlichen Gene auf ganzen Mausembryonen wurde von Mitarbeitern der Abteilung Herrmann durchgeführt (Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin).[48]

Die *Hip1*-“Whole-mount“-*in-situ*-Hybridisierung wurde freundlicherweise von Pamela Schrupf durchgeführt (Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie, Charité Berlin). Dazu wurde die selbsthergestellte *Hip1*-Sonde verwendet.

II.2.6 Lasermikrodissektion

Die Lasermikrodissektion (LMD) ist ein Verfahren, bei der Zellen aus histologischen Schnitten extrahiert werden und in Laborröhrchen gesammelt werden, um beispielsweise Expressionsprofile einzelner Zellpopulationen erstellen zu können.[51] Unter dem Mikroskop eingestellte Ausschnitte werden auf einem angeschlossenen Computerbildschirm sichtbar und können auf diesem markiert werden. Ein in das Mikroskop eingebauter Laser schneidet dann die markierten Zellen

aus und „schießt“ diese in den Deckel eines in der dafür vorgesehenen Halterung hängenden Laborröhrchens.

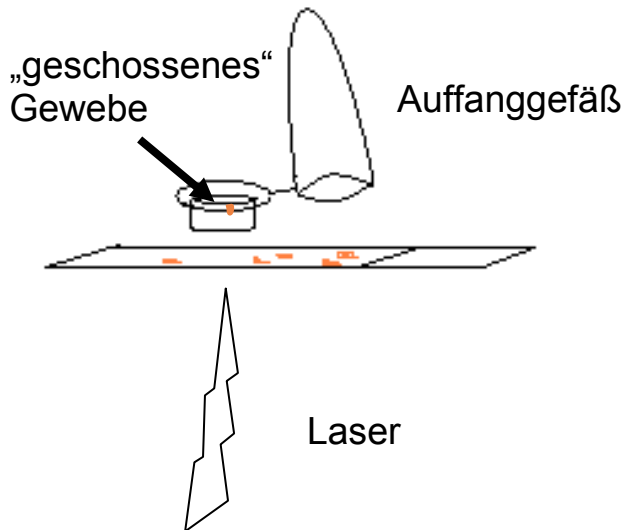


Abbildung II.2 stellt eine schematische Zeichnung zum besseren Verständnis der Laser-mikrodissektion dar. Der Laserstrahl trifft von unten auf den Objektträger mit aufgezogenen histologischen Schnitten. Durch die Energie des Lasers werden die markierten Zellen ausgeschnitten und in das Auffanggefäß „geschossen“.

Im Falle dieser Arbeit sollten Schilddrüsenvorläuferzellen und Gewebe, welches die Schilddrüsenanlage umgibt, extrahiert werden, um daraus spezifische mRNS zu gewinnen. Zunächst wurden alle Schnitte, auf denen die Schilddrüsenvorläuferregion mit Hilfe von Nkx2.1-Antikörperfärbungen markiert worden waren, in 10facher und 40facher Vergrößerung unter dem Mikroskop fotografiert. Der spätere Vergleich mit diesen Bildern verhalf zur Orientierung bei der Suche nach den relevanten Strukturen auf den Schnitten, welche für die LMD vorgesehen waren. Wie oben beschrieben, wurden die Schnitte eines Embryos immer abwechselnd auf spezielle LMD-Objektträger aufgezogen oder der Antikörperfärbung unterzogen. So konnten immer zwei direkt aufeinander folgende Schnitte verglichen werden. (Abb.II.4)

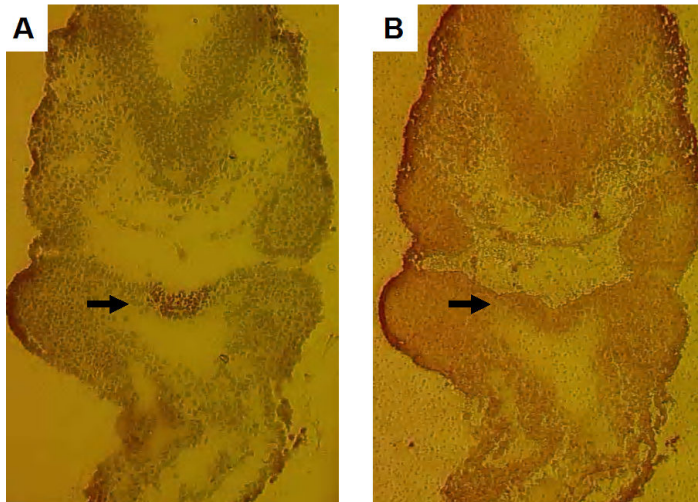


Abbildung II.4 Dargestellt sind zwei direkt aufeinander folgende am Cryotom angefertigte histologische Schnitte eines Mausembryos (E9.5) in 10facher Vergrößerung. (A) Anti-Nkx2.1-Antikörperfärbung. Durch den Pfeil sind angefärbte Zellen markiert, es handelt sich um Schilddrüsenvorläuferzellen. (B) Hämatoxylin-Färbung. Durch den Pfeil ist die Region markiert, in welcher Bild (A) zufolge die Schilddrüsenanlage zu erwarten ist. Auf diese Weise wurden alle Schnitte beurteilt, bevor Schilddrüsenvorläuferzellen ausgeschnitten wurden.

Nachdem ein Schnitt mit Schilddrüsenanlage identifiziert war, wurden an einem weiter entfernten Gewebe desselben Schnittes die Parameter Laserenergy und Laserpower eingestellt und ein Probeschnitt gemacht. Es wurde in 40facher Vergrößerung im Modus „RoboLPC“ gearbeitet. Erst wenn der Probeschnitt exakt, ohne viel umliegendes Gewebe zu zerstören, ausfiel, wurde die relevante Struktur unter dem Mikroskop und auf dem Bildschirm eingestellt und mit Hilfe der Option „Freihandzeichnen“ umrandet. In den Deckel eines 0,5 ml Röhrchens wurde dann 7 μ l RLTbuffer/ β -Mercaptoethanol (RNeasy-Microkit, Qiagen) gefüllt und dieses geöffnet in die Halterung eingespannt. Das Röhrchen musste so ausgerichtet werden, dass der Deckel mit der geöffneten Seite über dem zu bearbeitenden Schnitt hing (Abb. II.2). Hierbei wurde der Laser durch den Computer gesteuert, so dass er exakt an der gemalten Linie entlang schnitt, und der ausgeschnittene Teil in das Röhrchen „geschossen“ wurde. Ein Röhrchen konnte für 3-4 Schnitte genutzt werden und wurde bis zur weiteren Verarbeitung mit 7 μ l RLTbuffer/ β -Mercaptoethanol (RNeasy-Microkit) aufgefüllt und bei Raumtemperatur gelagert. Die RNS-Isolation wurde sofort nach der LMD durchgeführt, um den Verlust der instabilen Nukleinsäuren so gering wie möglich zu halten.

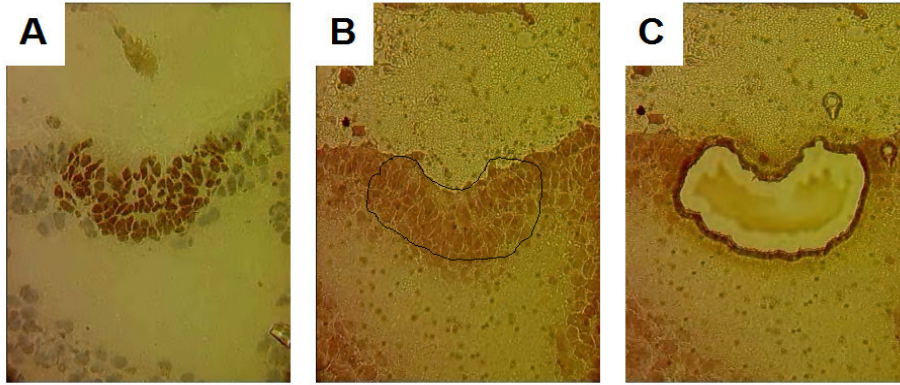


Abbildung II.5 In dieser Abbildung ist der Ablauf der Lasermikrodissektion (LMD) am Beispiel von 40fachen Ausschnittsvergrößerungen der Bilder aus Abb. II.4 dargestellt. (A) Es sind die mittels einer Anti-Nkx2.1-Antikörperfärbung angefärbten Schilddrüsenvorläuferzellen zu sehen. (B) Die Region der Schilddrüsenanlage ist mit Hilfe der Funktion „Freihandzeichnen“ umrandet. (C) Die markierte Region ist mittels LMD entfernt worden, es ist nur noch umgebendes Gewebe zu sehen.

II.7 Photoarbeiten

Die Photos der histologischen Schnitte wurden unter dem Leica DMR HC Durchlichtmikroskop mit der Zeiss HRc, MRc5 Digitalkamera aufgenommen. Für die Photographie wurde die Axiovision 4.5-Software verwendet. Bilder, welche unter dem Lasermikroskop aufgenommen wurden, wurden mit der zum Mikroskop gehörenden Digitalkamera photographiert.

Die Geldokumentation erfolgte mit Hilfe des EASY Win 32-Systems.

III Ergebnisse

III.1 “Screening“ der *In-situ*-Hybridisierungsdatenbank

Ziel dieser Arbeit war es, weitere Gene, welche eine Rolle in der frühen Schilddrüsenentwicklung spielen, zu identifizieren. Ausgehend von der Annahme, dass die spezifische Expression eines Gens in einer Organanlage einen Hinweis auf eine spezielle Funktion dieses Gens in der Embryogenese des Organs gibt, wurde das “Screening“ von verschiedenen Expressionsmustern in einer *In-situ*-Hybridisierungsdatenbank zur Bearbeitung der Fragestellung gewählt.

Die von uns genutzte Datenbank enthielt zum Zeitpunkt der Auswertung Bilder von *In-situ*-Hybridisierungen etwa 2000 verschiedener Gene auf Mausembryonen E9.5 (Embryonaltag 9.5) ([48] und mündliche Information Dr. M. Werber, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin). Ein aus der gleichen Perspektive aufgenommenes Bild eines ebenfalls 9.5 Tage alten Mausembryos wurde nach *In-situ*-Hybridisierung mit dem bekannten Schilddrüsen-Transkriptionsfaktor *Nkx2.1* als Referenzbild eingesetzt. In einem ersten Durchgang wurde nach vergleichbaren Expressionsmustern gesucht, wobei alle 2000 Bilder neben das Referenzbild gelegt wurden und auf ein Farbsignal im pharyngealen Endodermbereich geachtet wurde. Die Genamen waren zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt. Diese erste Auswahl ergab eine Ausbeute von 100 Kandidaten mit einem fraglichen Signal in den Vorläuferzellen der frühen Schilddrüsenanlage. Diese wurden noch einmal mit dem Referenzbild verglichen, sowie von einer zweiten Person betrachtet. Es wurde nun auf ein eindeutig positives Signal im anterioren Bereich des Endoderms, knapp unterhalb des ersten Branchialbogens geachtet. Anhand dieser Kriterien wurde die Auswahl auf 10 verschiedene Expressionsmuster eingegrenzt. Folgende Gene waren ausgewählt worden: *Hhex*, *Hip1r*, *Hspb1*, *Kdr*, *Lphn2*, *Msx1*, *Pvr11*, *Slc34a2*, *Ss18* und *Txnip* (s. Abb. III.1).

III.2 Rehybridisierung an histologischen Schnitten

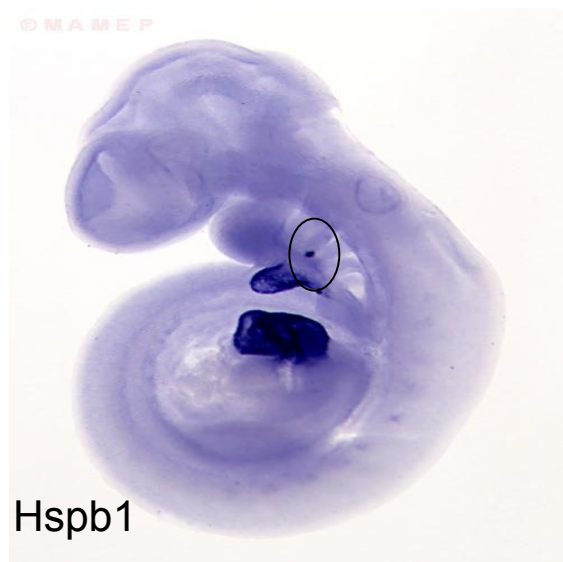
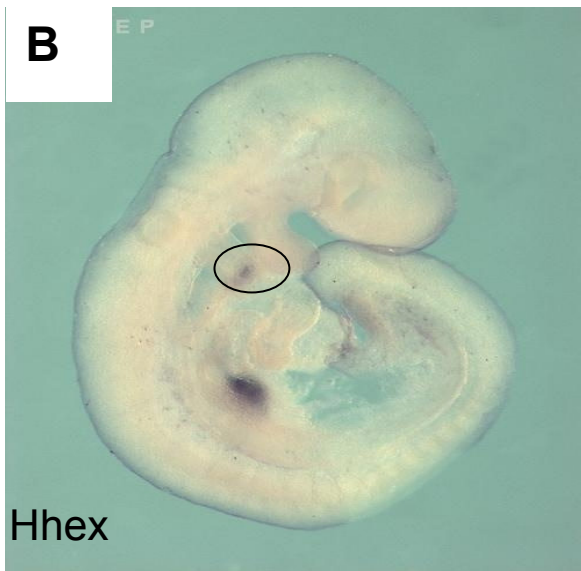
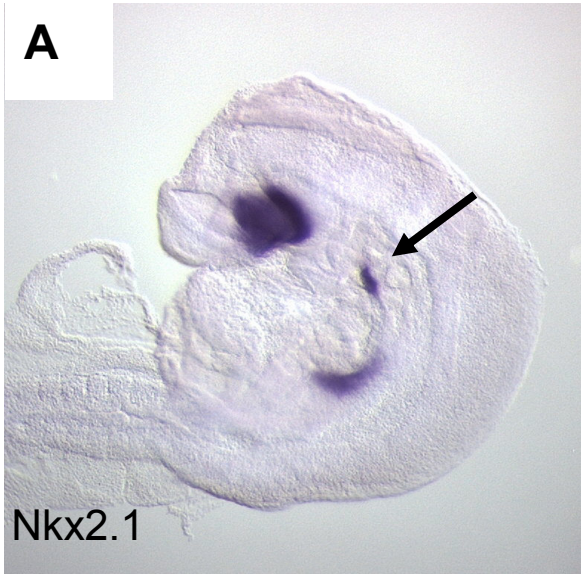
Da es sich in der Datenbank um seitliche Aufnahmen ganzer Mausembryonen und nicht um Längsschnitte dieser handelte, war es nicht möglich, zu entscheiden, in welcher Ebene sich das gesehene Signal befand. Zur genaueren Beurteilung des Expressionsmusters wurden die ausgewählten 10 Gene auf histologischen Querschnitten rehybridisiert. Es wurden die Sonden noch einmal verwendet, welche auch zur Erstellung der Datenbank zum Einsatz gekommen waren. Auf den Schnitten konnte das Signal genauer lokalisiert und bestimmten Zellgruppen zugeordnet

werden. Nach dem “Screening“ der Datenbank, war *Hhex* bereits als bekanntes, in der Schilddrüsenanlage exprimiertes Gen identifiziert worden. Auch die Rehybridisierung auf histologischen Schnitten zeigte, wie erwartet, eine Expression dieses Gens in Schilddrüsenvorläuferzellen (s. Abb. III.2).

Von den weiteren 9 Kandidaten konnte von 8 Genen eine Expression in der frühen Schilddrüsenanlage der Maus nicht bestätigt werden. Die Rehybridisierung auf histologischen Schnitten zeigte entweder ein Expressionsmuster ohne ein Signal in Schilddrüsenvorläuferzellen oder ein ubiquitäres Expressionsmuster ohne deutliches Signal in der Schilddrüsenanlage (s. Abb. III.2).

Die Expression eines der zehn Kandidatengene in den Zellen der frühen Schilddrüsenanlage konnte mittels Rehybridisierung auf histologischen Schnitten bestätigt werden. Es handelt sich um das Gen *Hip1r*. Neben der Expression in den Schilddrüsenvorläuferzellen konnte eine geringere Expression, deutlich durch ein weniger intensives Farbsignal, im umgebenden Gewebe detektiert werden (s. Abb. III.2).

Die anderen bekannten Gene der Schilddrüsenanlage (*Nkx2.1*, *Pax8*, *Foxe1*, *Nkx2.5*, s. Kapitel I.2 und I.3) waren nicht unter den ausgewählten Kandidaten. Eine Durchsuchung der Datenbank nach diesen Genen zum Zeitpunkt der Erstellung der Auswahl ergab, dass keines der genannten Gene enthalten war. Bei einer neuerlichen Durchsuchung der Online-Version der Datenbank wurden Bilder für die Gene *Pax8* und *Foxe1* gefunden und wären wahrscheinlich auch in der Auswahl der Gene für diese Arbeit aufgefallen, da die Bilder ein starkes Farbsignal in der gesuchten Region zeigen (<http://mamep.molgen.mpg.de/>). Die Suche nach *Hhex*, *Nkx2.1* und *Nkx2.5* blieb erfolglos, ob *Nkx2.1* und *Nkx2.5* überhaupt hybridisiert worden, ist nicht bekannt, warum *Hhex*, welches für diese Arbeit als Positivkontrolle identifiziert wurde, in der Onlineversion nicht auftaucht, ist ebenfalls nicht bekannt.





Lphn2

©MAMEP



Msx1

©MAMEP



Pvr11

©MAMEP



Slc34a2

©MAMEP



Ss18

©MAMEP



Txnip

Abbildung III.1: “Whole-mount“-*in-situ*-Hybridisierungen auf Mausembryonen, E9.5 (Embryonaltag 9.5). Durch die Pfeile wird jeweils die Region der Schilddrüsenvorläuferzellen markiert. Gennamen der jeweiligen Sonden sind angegeben. **(A)** Referenzbild mit einem bekannten Schilddrüsenmarkergen. **(B)** Expressionsmuster der 10 ausgewählten Gene mit Farbsignal und daher möglicher Expression in der Schilddrüsenvorläuferzellregion.

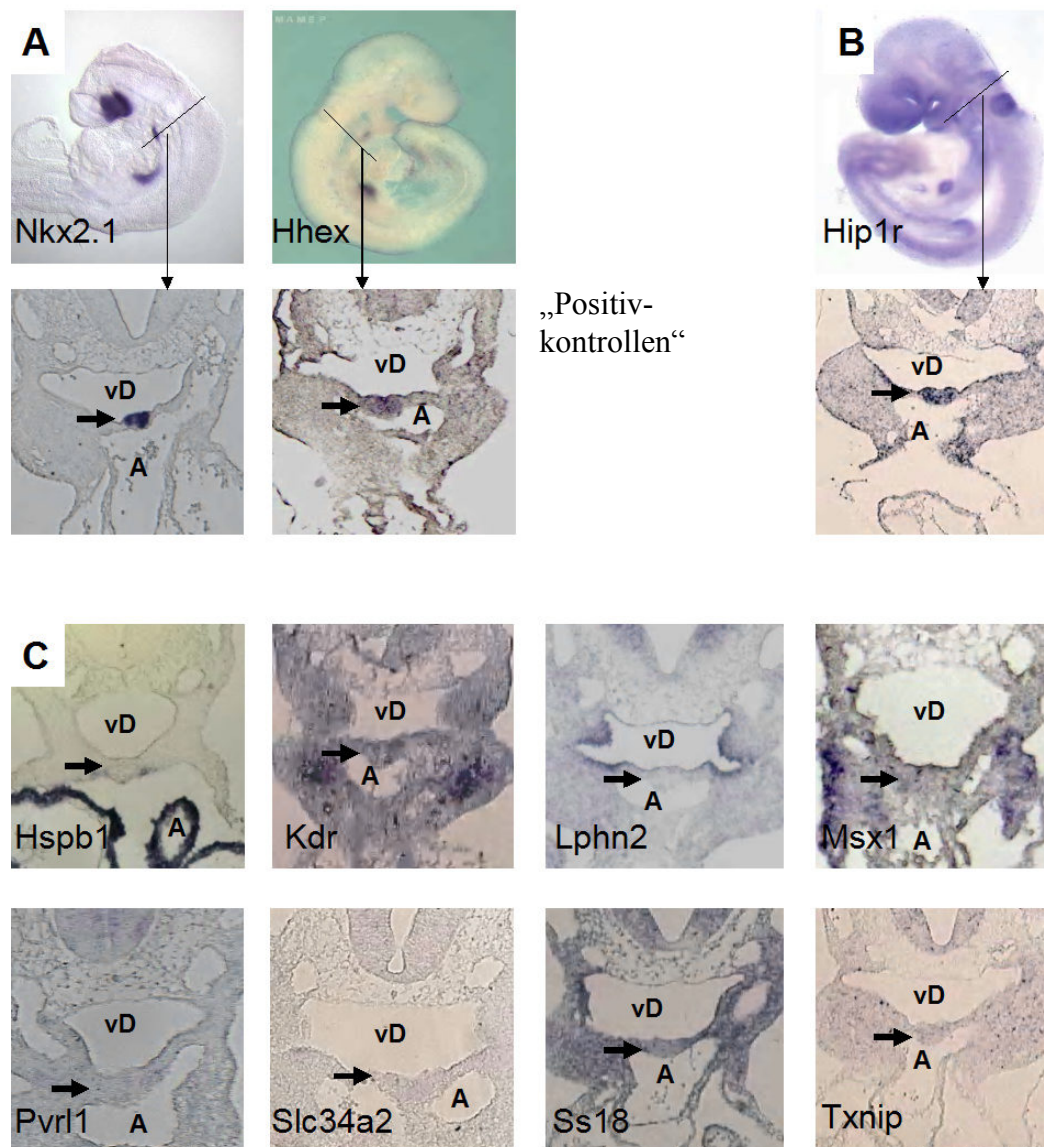


Abbildung III.2: Rehybridisierungen auf histologischen Schnitten von Mausembryonen, E9.5 (Embryonaltag 9.5). Durch die Pfeile wird jeweils die zu erwartende Position der Schilddrüsenanlage markiert. A, Aortensack, vD, vorderes Darmrohr [63] **(A)** Referenzhybridisierung,

Nkx2.1, und *Hhex*, als bekannter Kandidat identifiziert und somit Positivkontrolle. Beide zeigen ein deutliches Signal im Bereich der Schilddrüsenvorläuferzellen. **(B)** Hybridisierung mit *Hip1r*, hier lässt sich ebenfalls ein Signal im Bereich der Schilddrüsenvorläuferzellen erkennen, sowie ein abgeschwächtes Signal im Umgebungsgewebe. **(C)** Acht ausgeschlossene Gene, hier findet sich keine Expression im Bereich der Schilddrüsenanlage. Zum Teil zeigen die Gene eine deutliche Expression in anderen Geweben (*Hspb1*, *Lphn2*) oder eine ubiquitäre, nicht eindeutige Expression in verschiedenen Geweben. Bei den erkannten Farbsignalen dieser Gene in den “Whole-mount“-*in-situ*-Hybridisierungen handelt es sich um Signale aus direkt an die Schilddrüse angrenzenden Geweben oder um Überlagerungen ubiquitärer Signale.

III.3 Verifikation der *Hip1r*-Expression mittels RT-PCR

Zur Verifikation der in der *In-situ*-Hybridisierung nachgewiesenen *Hip1r*-Expression in Schilddrüsenvorläuferzellen wurde eine zweite, unabhängige Methode herangezogen. Es wurde eine *Hip1r*-PCR durchgeführt. Als Grundlage für die RT-PCR diente in cDNS umgeschriebene RNS aus Schilddrüsenvorläuferzellen von Mausembryonen. Im nachfolgenden Diagramm ist die Gewinnung der cDNS dargestellt.

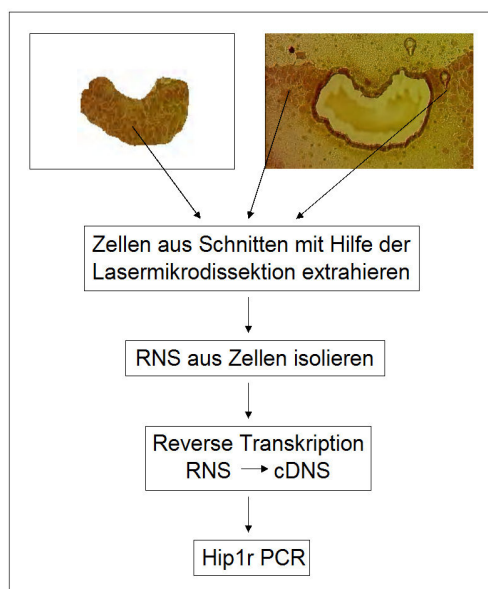


Abbildung III.3: Algorithmus zur Gewinnung von cDNS aus Schilddrüsenvorläuferzellen zum Einsatz in die *Hip1r* PCR

III.3.1 Gewinnung einer RNS-Probe mit Hilfe der Lasermikrodissektion

Da geprüft werden sollte, ob *Hip1r* in Schilddrüsenvorläuferzellen exprimiert wird, war es notwendig, zunächst RNS aus diesen Zellen zu gewinnen. Ein großes Problem stellte die RNS-

Extraktion aus Lasermikrodissektat dar. RNS ist eine empfindliche Nukleinsäure, welche, nachdem sie aus den Zellen isoliert worden ist, rasch durch RNAsen degradiert wird. Des Weiteren sind die Mengen, welche aus wenigen Zellen nach Lasermikrodissektion isoliert werden können, sehr gering. Es konnte schließlich nach mehreren Durchgängen ausreichend intakte RNS isoliert werden, die zur Reversen Transkription eingesetzt wurde und sich zum Einsatz in der PCR in intakte cDNS umschreiben ließ (s. Abb. III.4).

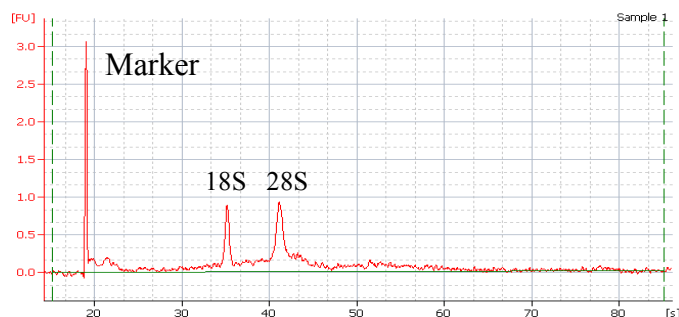


Abbildung III.4: Nachweis der Integrität der eingesetzten RNS. Diagramm des Agilent 2100 Bioanalyzer unter Einsatz von 1µl RNS-Probe auf einem “Agilent RNA 6000 pico chip“. RNS Konzentration 913pg/ µl.

III.3.2 Nachweis von *Hip1r* mittels PCR

Mit Hilfe einer PCR konnten *Hip1r*-Fragmente in Schilddrüsenvorläuferzellen und dem sie umgebenden Gewebe aus 9.5 Tage alten Mausembryonen nachgewiesen werden (s. Abb. III.5). Als Grundlage wurde cDNS aus Schilddrüsenvorläuferzellen und Umgebungsgewebe im Vergleich eingesetzt. In einer die Exone 10-16 umspannenden PCR wurden aus den unterschiedlichen Geweben zwei verschieden große Produkte nachgewiesen. Als Negativkontrolle wurde eine PCR ohne cDNS-Zugabe mitgeführt.

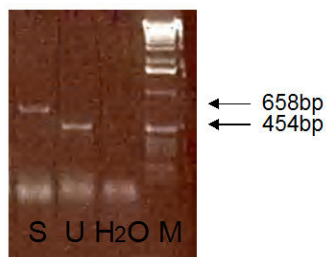


Abbildung III.5: Darstellung eines Agarosegels nach Beladung mit Produkten aus der *Hip1r* PCR. *Hip1r*-Fragmente konnten in beiden PCR-Ansätzen aus Schilddrüsenvorläuferzellen (S) und Umgebungsgewebe (U) nachgewiesen werden. Die unterschiedlichen Laufzeiten der Banden weisen auf eine unterschiedliche Länge der vervielfältigten Fragmenten hin. Als Marker (M) wurde eine 1kb

DNS-Leiter eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde eine PCR ohne cDNS-Zugabe mitgeführt (H₂O).

III.4 “Splice“-Varianten des *Hip1r*-Gens

Das Ergebnis der zwei unterschiedlich großen Produkt-Fragmente in der *Hip1r*-PCR sollte im Weiteren mittels Sequenzierung spezifiziert werden (s. Abb. III.5). Durch Sequenzierung dieser größendifferenten Produkte, konnte gezeigt werden, dass *Hip1r* gewebespezifische, unterschiedliche “Splice“-Varianten aufweist. In einem *Hip1r*-PCR-Ansatz, welcher die Exone 10-16 umfasst, ließ sich aus Umgebungsgewebe der Schilddrüse ein kürzeres Produkt vervielfältigen als aus Schilddrüsenzellen selbst. Durch die Sequenzierung konnte das Fehlen von Exon 14 im Ansatz der Umgebungszellen gezeigt werden (s. Abb. III.6).

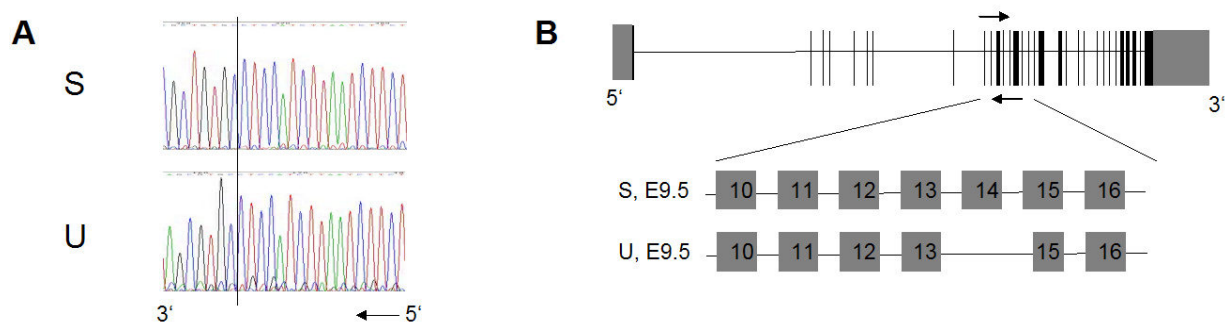


Abbildung III.6: Dargestellt sind die Ergebnisse der Sequenzierung der *Hip1r*-PCR-Produkte. (A) Es sind die beiden Ausschnitte aus den Sequenzen zu sehen, auf denen die unterschiedlichen “Splice“-Stellen deutlich werden. In der oberen Sequenz schließt sich Exon 13 Exon 14 an, wobei in der unteren Sequenz Exon 14 fehlt und Exon 15 auf 13 folgt. **(B)** Eine schematische Darstellung der Mausvariante des Gens *Hip1r* und der beiden PCR-Produkte mit ihren unterschiedlichen “Splice“-Varianten. S Schilddrüsenvorläuferzellen, U Umgebungsgewebe.

III.5 Expression von *Hip1r* in verschiedenen Embryonalstadien

In den histologischen *In-situ*-Hybridisierungen und in RT-PCR-Ansätzen konnte die Expression von *Hip1r* in frühen Schilddrüsenvorläuferzellen der 9.5 Tage alten Mausembryonen bestätigt werden. In weiteren Versuchen sollte das Expressionsverhalten des *Hip1r*-Gens während der folgenden Stadien der Embryonalentwicklung der Schilddrüse untersucht werden. Dazu wurden zusätzlich Schnitthybridisierungen von Mausembryonalstadien E10.5 (Embryonaltag 10.5), E11.5, E12.5 und E15.5 mit der *Hip1r*-Sonde, sowie der *Nkx2.1*-Sonde zum Vergleich getestet. Es zeigte sich ein spezifisches und alternierendes Expressionsmuster von *Hip1r* im Schilddrü-

sengewebe während der untersuchten Embryonalstadien. Dabei konnte an Tag E10.5 und E12.5 kein beziehungsweise ein sehr schwaches Signal beobachtet werden. An Tag E12.5 und E15.5 war dann wieder ein deutliches Signal nachweisbar. Die Sequenz dieser Hybridisierungen ist in Abbildung III.7 dargestellt.

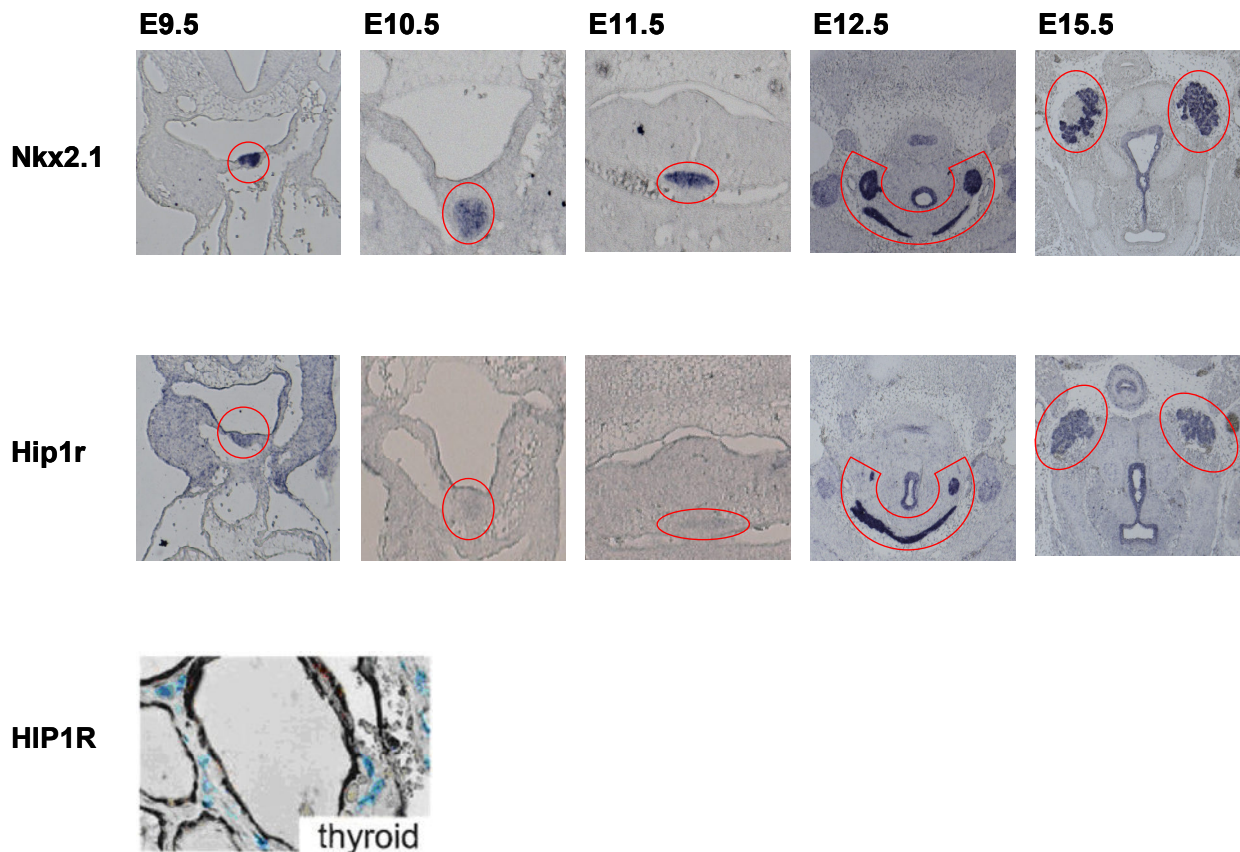


Abbildung III.7: Dargestellt ist die Expression von *Hip1r* in Schilddrüsengewebe der Maus während unterschiedlicher Stufen der Embryonalentwicklung (E9.5, E10.5, E11.5, E12.5, E15.5) in Vergleich zum bekannten Schilddrüsenmarkergen *Nkx2.1* (obere beiden Reihen). An weiteren E10.5-Schnitten zeigt sich ein Farbsignal weiter aboral im Endoderm, an weiteren Schnitten des E11.5-Embryos lassen sich in keinem Gewebe deutliche Farbsignale erkennen (nicht gezeigt). Die untere Abbildung stammt aus einer Veröffentlichung aus dem Jahre 2004, in welcher die Expression von *Hip1r* in adultem humanem Schilddrüsengewebe beschrieben ist.[64]

III.6 *Hip1* Expression in embryonalem Gewebe

Die hohe Homologie und die Überschneidung verschiedener Funktionen der Gene *Hip1* und *Hip1r* legten nahe, dass das Gen *Hip1* ebenfalls in der Schilddrüsenanlage exprimiert wird. Des-

halb wurde die Expression von *Hip1* in embryonalem Schilddrüsengewebe überprüft. Dazu wurden “Whole-mount“-*in-situ*-Hybridisierungen auf 9.5 und 10.5 Tage alten Mausembryonen angefertigt, da *Hip1* nicht in der Hybridisierungsdatenbank zur Verfügung stand. Es ließ sich eine ubiquitäre Expression, jedoch keine spezifische Expression von *Hip1* in der Schilddrüsenvorläuferregion darstellen (s. Abb. III.8). Ob die ubiquitäre Expression von *Hip1* auch die Schilddrüsenanlage einschließt, ist anhand der angefertigten Bilder nicht zu entscheiden.

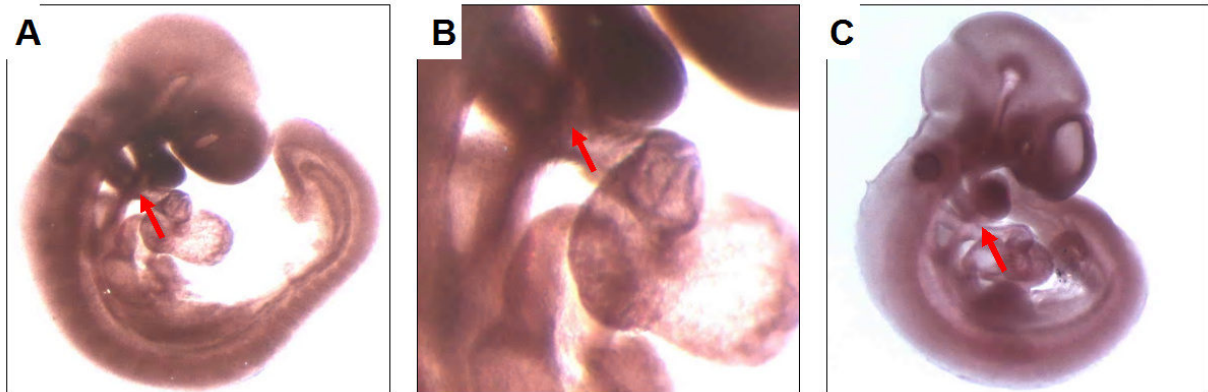


Abbildung III.8: Auf den Abbildungen A-C sind Bilder von *Hip1*-“whole-mount“-*in-situ*-Hybridisierungen auf Mausembryonen dargestellt. Durch die roten Pfeile ist jeweils die Schilddrüsenvorläuferzellregion markiert. (A) 9.5 Tage alter Embryo. Eine spezifische Expression von *Hip1* in der Schilddrüsenanlage ist nicht zu sehen. Viel mehr könnte es sich um eine ubiquitäre Expression im vorderen Darmrohr handeln. (B) Ausschnittsvergrößerung aus A. Der Befund aus A lässt sich bestätigen. (C) 10.5 Tage alter Embryo. Es ist keine spezifische Expression von *Hip1* in der Schilddrüsenanlage zu sehen. Ob die ubiquitäre Expression die Schilddrüsenanlage mit einschließt, ist unklar.

IV Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, weitere Gene, welche eine Rolle in der frühen Schilddrüsenentwicklung spielen, zu identifizieren. Ausgehend von der Annahme, dass die spezifische Expression eines Gens in einer Organanlage einen Hinweis auf eine spezielle Funktion dieses Gens in der Embryogenese des Organs gibt, wurde das "Screening" von 2000 verschiedenen Expressionsmustern in einer *In-situ*-Hybridisierungsdatenbank zur Bearbeitung der Fragestellung gewählt. In einer Zweistufen-Selektion wurden anhand eines Referenzbildes 10 verschiedene Gene ausgewählt, welche ein Farbsignal als Ausdruck der Expression, in der Region der Schilddrüsenanlage eines 9.5 Tage alten Mausembryos aufwiesen. Mittels Rehybridisierung auf histologischen Schnitten unter Verwendung der gleichen Sonden, welche auch für die Erstellung der Datenbank eingesetzt worden waren, konnte eine Expression in den Schilddrüsenvorläuferzellen für zwei Gene nachgewiesen werden. Eines der beiden Gene ist das bekannte Schilddrüsen-Gen *Hhex*. Bei dem anderen Gen handelt es sich um *Hip1r*, dessen Expression in der frühen Schilddrüsenanlage bisher nicht bekannt war. In weiteren Experimenten konnten die Expression von *Hip1r* mittels RT-PCR auf der Grundlage von cDNS aus Schilddrüsenvorläuferzellen nochmals verifiziert werden. Anhand der Sequenzierung der amplifizierten DNS aus Schilddrüsenvorläuferzellen und aus umgebendem Gewebe konnten verschiedene "Splice-Varianten" identifiziert werden. Mittels Schnitthybridisierungen weiterer Mausembryonalstadien konnte ein spezifisches, alternierendes Expressionsmuster von *Hip1r* im Schilddrüsenewebe während der einzelnen Stadien nachgewiesen werden. Die "Whole-mount"-*in-situ*-Hybridisierung des zweiten, der *Hip1*-Familie zugehörigen Gens, *Hip1*, ergab ein ubiquitäres Expressionsmuster in den Stadien E9.5 und E10.5, ohne dass eine genauere Aussage zur Expression in der Schilddrüsenanlage möglich wäre.

IV.1 "Screening" der In-situ-Hybridisierungsdatenbank

IV.1.1 Sensitivität und Spezifität der gewählten Methode

Die genutzte Datenbank enthielt Expressionsdaten einer cDNS-Bibliothek ganzer Mausembryonen des Stadiums E9.5. Neidhardt et. al. beschrieben bereits 2000 in ihrer Arbeit, das Prinzip der Erstellung dieser Datenbank. Durch eine Filterhybridisierung der cDNS-Klone von 9.5 Tage alten Mausembryonen gegen cDNS Proben, welche von 12.5 sowie von ebenfalls 9.5 Tage alten Mausembryonen stammen, konnte eine Anreicherung von unterrepräsentierten Klonen erreicht

werden. Hierzu wurden nach der Filterhybridisierung nur die Klone für die “Whole-mount“-*in-situ*-Hybridisierung ausgewählt, die kein oder nur ein schwaches Signal zeigten. Es handelt sich um Sequenzen von Genen, die spezifisch und nur in wenigen/ kleinen Regionen exprimiert werden.[59] Die von mir genutzte Datenbank ist demnach eine Datenbank, welche im Hinblick darauf konstruiert wurde, auch unterrepräsentierte, also beispielsweise nur in einer kleinen Organanlage wie der Schilddrüse exprimierte Gene, zu identifizieren und deren Expressionsmuster darzustellen. Zu berücksichtigen ist, dass ubiquitär oder in mehreren Organen exprimierte Gene zum Teil durch die Selektionsmechanismen keinen Eingang in die genutzte Datenbank fanden und somit möglicherweise Gene, die außer in der Schilddrüse in verschiedenen anderen Organen eine wichtige Rolle spielen, nicht detektiert wurden. Zudem konnten beim Aufbau der Datenbank solche Gene nicht abgebildet werden, deren Expression unterhalb der Nachweisgrenze lag. Weiterhin können Fehler des von mir angewandten Screeningverfahrens nicht ausgeschlossen werden, da nur solche Signale beurteilt werden konnten, welche mit bloßem Auge gesehen wurden. Wie in Kapitel II.2.2 beschrieben, wurde das Expressionsmuster unter den etwa 2000 verfügbaren Bildern ausgewählt, ohne dass der Name des Gens bekannt war. Erst im Nachhinein wurde dem Bild die benutzte Sonde und damit das Gen zugeordnet. Die weiteren Gene, *Pax8*, *Foxe1*, *Nkx2.1* und *Nkx2.5*, deren Expression in der Schilddrüsenanlage zu dem Zeitpunkt E9.5 bekannt ist, fanden sich nicht unter den 10 ausgewählten Expressionsmustern. Eine gezielte Suche in der Datenbank nach Gennamen nach Abschluss der Auswahl ergab, dass die Datenbank keine Expressionsmuster dieser Gene enthielt. Es ist anzunehmen, dass diese Gene aufgrund der oben genannten Einschränkungen der Methode keinen Eingang in die Datenbank fanden. Es handelt sich also um eine Datenbank, welche keine vollständige Abbildung aller zum Zeitpunkt E9.5 exprimierten Gene enthält. Die Tatsache, dass *Hhex* das einzig in der Datenbank enthaltene bekannte Schilddrüsengen ist und dieses „blind“ identifiziert wurde, beweist allerdings die Sensitivität der angewandten Screeningmethode. *Hhex* kann als Positivkontrolle gelten.

IV.1.2 Identifikation zweier, in der frühen Schilddrüsenanlage exprimierter Gene

Durch das „Screening“ der “Whole-mount“-*in-situ*-Hybridisierungs-Datenbank mit Expressionsmustern von etwa 2000 Genen konnte außer der Positivkontrolle, *Hhex*, ein weiteres Gen, *Hiplr*, das in der frühen Schilddrüsenanlage exprimiert wird, identifiziert werden. Diese Expression war bisher nicht bekannt und konnte durch weitere Methoden (Re-Hybridisierung auf histologischen Schnitten und PCR/ Sequenzierung) verifiziert werden. In einer Arbeit mit ähnlicher

Zielsetzung wurden 79 Gene identifiziert, welche im frühen Urogenitaltrakt von Mausembryos exprimiert werden. [65] Es wurde Mausembryos an Tag E11.5 die Genitalleiste entnommen und aus diesem Gewebe eine cDNS Bibliothek erstellt. Diese wurde hybridisiert gegen cDNS aus 11.5 Tage alten Mausembryos, welchen man die Genitalleiste vorher entfernt hatte. Dadurch wurden solche Klone (nicht-hybridisierende) selektiert, die nur in Zellen des Urogenitaltraktes und nicht im gesamten Embryo vorkommen. Diese wurden für die folgenden "Whole-mount"-*in-situ*-Hybridisierungen auf Mausembryos an E9.5 eingesetzt. Gene, die im 9.5 Tage alten Mausembryo ein spezifisches Expressionsmuster oder gar keine Expression zeigten, wurden für weitere "Whole-mount"-*in-situ*-Hybridisierungen auf 11.5 und 14.5 Tage alten Mausembryos eingesetzt. Anhand der auf diese Weise erstellten Bilder wurden Gene mit spezifischen Expressionsmustern ausgewählt. In dieser Arbeit wurde also vor dem „Screening“ der *In-situ*-Hybridisierungsbilder, anders als in meiner Arbeit, bereits eine spezifische Auswahl an Genen getroffen. Eine derart konzentrierte Vorauswahl verspricht eine größere Ausbeute an spezifisch exprimierten Genen in der untersuchten Region. Bereits in der Arbeit von Neidhardt et. al. wird betont, dass die Wahrscheinlichkeit, spezifisch exprimierte Gene aufzuspüren, größer ist, wenn man eine gewebsspezifische cDNS-Bibliothek zu Grunde legt.[59] Aufgrund der geringen Größe der Schilddrüsenanlage, war es nicht umsetzbar, die Schilddrüsenzellen eines 9.5 oder auch 11.5 Tage alten Mausembryos makroskopisch zu entfernen. Mit Hilfe des Lasermikroskops wurden zwar Schilddrüsenvorläuferzellen und umgebendes Gewebe gewonnen. Das Isolieren einer ausreichenden Menge und Qualität an cDNS aus diesem Material zum Zweck der Erstellung einer cDNS Bibliothek war jedoch nicht möglich, so dass eine schilddrüsenspezifische Datenbank nicht erstellt werden konnte.

In der oben genannten Arbeit von Wertz et. al. wurden von 3840 cDNS Klonen insgesamt 828 Klone für die "Whole-mount"-*in-situ*-Hybridisierung auf 9.5 Tage alten Mausembryos ausgewählt. Davon zeigten 476 eine ubiquitäre Expression, 281 kein Signal und 71 eine spezifische Expression, davon wiederum 4 im urogenitalen Trakt. In der vorliegenden Arbeit wurden 2 Gene mit spezifischer Expression in Schilddrüsenvorläuferzellen erkannt. Abgesehen davon, dass in jener Arbeit eine gewebsspezifische Datenbank genutzt wurde, muss berücksichtigt werden, dass das zugrunde gelegte Gewebe, Urogenitaltrakt, Vorläuferzellen verschiedener Organanlagen enthält (Genitalleiste, Urniere, dorsale Aorta), wobei in dieser Arbeit ausschließlich die Schilddrüsenvorläuferzellen und nicht etwa das Endoderm des Vorderdarms einbezogen wurde und somit eine geringere Ausbeute an Genen zu erwarten war. Die Ausbeute zweier Gene, welche an Tag E9.5 in der Schilddrüse exprimiert sind, entspricht der erwarteten Größenordnung oder übersteigt diese vielleicht sogar, so dass mit der eingesetzten Methode wahrscheinlich nicht viele

Gene in der Datenbank übersehen wurden, welche exklusiv zu diesem Zeitpunkt in der Schilddrüse exprimiert werden.

Hinsichtlich der oben genannten 79 Gene, wurden auch solche berücksichtigt, welche an Tag E9.5 noch keine Expression zeigten, jedoch an Tag E11.5 oder E14.5. Es ist also wahrscheinlich, dass durch die Berücksichtigung späterer Stadien eine größere Zahl an Genen hätte erfasst werden können.

In der Arbeit von Neidhardt et. al. zeigten 5,7% von willkürlich gewählten Klonen einer cDNS Bibliothek aus 9,5 Tage alten Mausembryos eine spezifische Expression, mit Hilfe der in Kapitel IV.1.1 beschriebenen Selektionsmechanismen konnte dieser Anteil auf 17,8% erhöht werden. Eine große Zahl der Gene mit spezifischer Expression zeigte Signale im Neuralrohr und/ oder Gehirn, Expressionssignale im Darmrohr oder in der Chorda dorsalis waren selten (genaue Zahlen werden nicht angegeben). [59] Da die Schilddrüsenanlage ein kleiner Teil des primitiven Darmrohrs ist, war also ein sehr geringer Anteil der spezifischen Expressionssignale in der frühen Schilddrüsenanlage zu erwarten. Nach mündlichen Aussagen der Arbeitsgruppe Herrmann waren zum Zeitpunkt des Screenings der Datenbank etwa 2000 verschiedene Gene (nicht Klone) in der Datenbank enthalten. Der veröffentlichten Zahl von 17,8% nach Selektion spezifisch exprimierter Gene zufolge, müssten etwa 356 Gene in der Datenbank eine spezifische Expression zeigen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine schilddrüsen-spezifische Expression für 2 von 2000 vorselektierten Gene nachgewiesen, dies entspricht etwa 7% (2 von 356) der spezifisch exprimierten Gene. Diese Zahl geht einher mit der oben genannten Erwartung (auch im Vergleich mit der Arbeit von Wertz et. al.), auch wenn in der Arbeit von Neidhardt et. al. keine genauen Zahlen angegeben wurden. Die weiteren 4 bekannten Schilddrüsen-gene fanden allerdings gar keinen Eingang in die Vorauswahl der 2000 Gene. Es ist somit möglich, dass auch weitere unbekannte Schilddrüsen-gene erst gar nicht in der Selektion auftauchten. Wie viele Schilddrüsen-relevante Gene durch die in dieser Arbeit eingesetzte Methode nicht erfasst wurden, lässt sich letztendlich nicht sagen.

IV.2 Die Expression von *Hip1r* (“*Huntington interacting protein 1 related*“) in der frühen Schilddrüsenanlage der Maus

In dieser Arbeit wird zum ersten Mal die Expression von *Hip1r* in der frühen Schilddrüsenanlage der Maus zum Zeitpunkt E9.5 (Embryonaltag 9.5) beschrieben. Diese konnte mittels zweier un-

abhängiger Verfahren bestätigt werden. *Hip1r* ist ein aus der Erforschung der Huntington-Erkrankung bekanntes Gen.

IV.2.1 *Hip1r*

Hip1r ("Huntingtin interacting protein 1 related") ist ein Mitglied der "Huntingtin interacting protein 1" Familie. Zu dieser Familie gehört außer *Hip1r* noch ein weiteres Gen, *Hip1*. *Hip1* wurde 1997 im Zuge der Erforschung der Huntington-Erkrankung als Interaktionspartner von Huntingtin entdeckt.[66] Der hohen Homologie (56%) beider Proteine zufolge wurde danach *Hip1r* identifiziert.[67] Dieses bindet Huntingtin jedoch nicht.[68] Es existieren Homologe der *Hip1*-Familie in *Caenorhabditis elegans* [69] und in der Hefe als *Sla2p*, welches sowohl eine Rolle in der Endozytose als auch in der Polarisierung des Aktin-Zytoskeletts als Aktin-bindendes Protein spielt.[70-73]

In einem Abgleich der humanen *HIP1R*-Sequenz und der *Hip1r*-Sequenz der Maus zeigt sich eine 90%ige Übereinstimmung (s. Abb. III.1) *HIP1* kodiert für ein 116 kDa großes Protein, *HIP1R* für ein 99 kDa großes Protein.[67] *HIP1*- und *HIP1R*-Proteine sind sowohl in Plasmamembranen und am *trans*-Golgi-Netzwerk (häufiger *HIP1R*) als auch in intrazellulären Vesikeln lokalisiert.[74, 75] Für *Hip1r* zeigt sich eine über die Zelle verteilte Lokalisation, sowie eine Anreicherung im Zellkortex und in der perinukleären Region und eine Co-Lokalisation mit Clathrin, AP-2 und F-Aktin, sowie eine Anreicherung in Clathrin-ummantelten "pits" und Vesikeln und frühen endozytotischen Kompartimenten.[69] Verschiedene Arbeiten geben Hinweise auf die Expression der beiden Gene in unterschiedlichen adulten Organen, darunter auch Expressionsdaten für *HIP1R* in adultem humanem Schilddrüsengewebe (s. Abb.III.7).[25, 64] Legendre-Guillemain et.al. konnten am Beispiel von Ratten eine hauptsächliche Expression der Gene im Gehirn nachweisen, wobei *Hip1* am stärksten an den Tagen E13 und E16, *Hip1r* weniger während der Embryonalperiode als vielmehr vom 2. postnatalen Tag an exprimiert wird. [64, 76, 77] Auch humanes *HIP1* zeigt eine besonders starke Expression in Hirngewebe.[78] Während der Entwicklung der Maus lässt sich *Hip1r*-mRNS ab Tag 7 nachweisen. Die Gesamt-Expressionslevel verändern sich während der Embryonalzeit nicht nennenswert.[69]

HIP1R	MNSIKNVPAR	VLSRRPQHSLS	EAREEQFDKT	QAISISKAIN	TQEAPVKEKH	ARRIILGTHH
Hip1r	S.....
Identity	*****	*****	*****	*****	*****	*****
Ptdfns(4,5) P2 binding site						
HIP1R	EKGAFTEWSY	AIGLPLPSSS	ILSWKFCHVL	HKVLRDGHFN	VLHDCQRYRS	NIREIGDLWG
Hip1rS.....Y.....
Identity	*****	*****	*****	*****	*****	*****
HIP1R	HLHDRYGQLV	NVYTKLLLTK	ISFHLKHPQF	PAGLEVTDDEV	LEKAAGTDVN	NIFQLTVEFM
Hip1r	.R.Q.H.	.I.....
Identity	**:*:**	*:*****	*****	*****	*****	*****
HIP1R	DYMDCELKLS	ESVFRQLNTA	IAVSQMSSGQ	CRLAPLIQVI	QDCSHLYHYT	VKLLFKLHSC
Hip1rM.....
Identity	*****	*****	*****	*****	*****	***:*****
HIP1R	LPADTLQGHR	DRFHEQFHSLS	RNFERRASDM	LYFKRLIQIP	RLPEGPPNPL	RASALAEHIK
Hip1r	K.....
Identity	*****	*****	:*****	*****	*****	*****
HIP1R	PVVVIPEEAP	EDEEENLIE	ISTGPPAGEP	VVVADLFDQT	FGPPNGSVKD	DRDLQIESLK
Hip1rE.....	.SA.....M.....N.....
Identity	*****	*:*****	*:*****	*****	*****	*****
HIP1R	REVEMLRSEL	EKIKLEAQRV	IAQLKSQVNA	LEGELEEQRK	QKQKALVDNE	QLRHELAQLR
Hip1r	.T.A.	.M.....	.S.G.G	.A.....	.S.....	.R.....K
Identity	**** *	*****	*:***	*:*****	*****	*****
HIP1R	AAQLEGRSQ	GLRBEAERKA	SATEARYNKL	KEKHSSELVHV	HAELLRKNAD	TAKQLTVTQQ
Hip1r	.L.A.NS.....INT
Identity	* **** *	*****	*****	*****	*****	*****
Leucine zipper						
HIP1R	SQEEVARVKE	QLAFQVEQVK	RESELLEEK	SDQLEKIKRE	LEAKAGELAR	AQEALSHTEQ
Hip1rM.A.M.M.QA.R.....R.....
Identity	*****	*****	*****	*****	*****	*****
HIP1R	SKSELSSRLD	TLSAEKDALS	GAVRQREADL	LAAQSLVRET	EAALSREQQR	SSQEQGELQG
Hip1r	.G.....	.N.E.....	.V.....E.....K	.E.Q.....K.R.
Identity	* **** *	** **** *	* **** *	*****	* **** *	***:***:
HIP1R	RLAERESQEQ	GLRQRLLDEQ	FAVLRGAAAE	AAGILQDAVS	KLDDEPLHLRC	TSSPDYLVSR
Hip1r	Q.K.....K.....	L.S.....	.EA.....
Identity	:***:***:	***:***:	:***:***:	* **** *	*****	*****
HIP1R	AQEALDAVST	LEEGHAQYLT	SLADASALVA	ALTRESHLAA	DTIINGGATS	HLAPTDPADR
Hip1r	.A.S.G	.Q.T.A	.SE.....V.A.
Identity	** ***:	** ***:	* **** *	*****	***:***:	*****
HIP1R	LIDTCRECGA	RALELMGQLQ	DQQALRHMQA	SLVRTPLQGI	LQLGQELKPK	SLDVRQEBLG
Hip1r	.M.....V.....	.TV.PRA.P	.M.A.....D.....
Identity	*:*****	*****	* * : *	*:*****	*****	*****
HIP1R	AVVDKEMAAT	SAAIEDAVRR	IEDMMNQARH	ASSGVKLEVN	ERILNSCTDL	MKAIRLLVTT
Hip1r	.M.....S.....	E.....M.....
Identity	*:*****	*****	*****	*****	*****	*****
HIP1R	STSLQKEIVE	SGRGAATQQE	FYAKNSRWTE	GLISASKAVG	WGATQLVEAA	DKVVLHTGKY
Hip1rS.....M.....
Identity	*****	*****	*****	*****	*****	*****
HIP1R	EELIVCSHEI	AASTAQLVAA	SKVKANKHSP	HLSRLQECSS	TVNERAANVV	ASTKSGQEQI
Hip1rN.....Y.....
Identity	*****	*****	*****	*****	*****	*****
HIP1R	EDRDTMDFSG	LSLIKLKKQE	METQVRVLEL	EKTLEAERMR	LGELRKQHYV	LAGASGSPGE
Hip1rV.....GM.T.S.
Identity	*****	*****	*****	*****	*****	*** . * : *
HIP1R	EVAIRPSTAP	RSVTTKKPPPL	AQKPSVAPRQ	DHQLDKKDG	YPAQLVNY	
Hip1r	.EPS.P.	.GA.....I.T	.N.....V	
Identity	* . ***:	** :*****	*****	*:*****	*****	

Abbildung IV.1: Abgleich (“Alignment“) der humanen *HIP1R*- und Maus-*Hip1r*- Aminosäuresequenzen (NCBI-Nummer: NM_003959, NM_145070), dargestellt mit Hilfe des Programms GENTle (Magnus Manske, Universität Köln). Es zeigt sich eine über 90%ige Homologie der konservierten Sequenzen. Fast vollständig überschneiden sich die Aminosäuresequenzen in den Bereichen der ANTH/ENTH-Domäne (NCBI-Version NM_145070.2: 33-144, ANTH_AP180_CALM, grün hinterlegt) und der TALIN-Homologie-Domäne (NCBI-Version

NM_145070.2: 819-1012, I_LWEQ, rot hinterlegt). Eine große Übereinstimmung findet sich auch in der "Coiled-coil"-Region (369-579 [79], blau hinterlegt). "Leucine-zipper"-Motiv eingezeichnet nach. [67]

Die Proteine der HIP1-Familie ähneln sich in ihrer Struktur und verfügen über drei gemeinsame spezifische Domänen, welche auf mögliche gemeinsame Funktionen schließen lassen. Über die ANTH ("AP180 N-terminal homology")-/ENTH ("Epsin-N-terminal homology")- Domäne binden HIP1 und HIP1R Phospholipide. [79-82] Über die TALIN- Homologie-Domäne (auch I/LWEQ- oder THATCH-Domäne genannt) bindet HIP1R an F-Aktin (Filament-Aktin). Die funktionelle Aufgabe besteht in der Verknüpfung von Aktin-Zytoskelett und zellulären Kompartimenten. [69, 83-85] Es befindet sich außerdem in der zentralen Region der HIP1-Proteinfamilie eine "Coiled-coil"-Domäne, welche einen "Leucine-Zipper" beinhaltet und Protein-Protein-Interaktionen vermittelt. Diese Motive finden sich hauptsächlich in Transkriptionsfaktoren und Proteinen, die am Vesikeltransport beteiligt sind. [86, 87] HIP1 und HIP1R fördern mittels dieser Domäne die Vernetzung von Clathrin.[88] Für zwei weitere Regionen sind "Coiled-coil"-Domänen prognostiziert. [84] Weitere Domänen sind die USH ("upstream helix")- Domäne, über diese kann die Aktin-Bindung inhibiert werden, sie kommt in allen Proteinen der HIP1-Familie vor.[89] Zudem die "proline-rich"- Domäne, welche nur in der HIP1R-Sequenz vorkommt und die Bindung an Cortactin (Src-"homology"-3-Domäne) vermittelt. [90]

Den Proteinen wird hauptsächlich eine Rolle im Clathrin-vermittelten Vesikeltransport (CMVT, "clathrin-mediated vesicular trafficking") an der Plasmamembran, sowie am *trans*-Golgi-Netzwerk zugeschrieben. Unter CMVT versteht man den selektiven Transport von Molekülen in Clathrin-ummantelten Vesikeln ("clathrin-coated vesicles") zwischen Plasmamembran und/ oder Membranen intrazellulärer Kompartimente, wie beispielsweise dem *trans*-Golgi-Netzwerk. An der Plasmamembran wird dies von vielen Zellen als Endozytosemechanismus genutzt, dann Clathrin-vermittelte Endozytose ("clathrin-mediated endocytosis") genannt. Da Clathrin nicht selbständig an Membranen und Frachtproteine binden kann, sind an der Bildung von "clathrin-coated vesicles" Adapter-Proteine beteiligt, die Phospholipide und Proteine binden können. Zu diesen gehören auch HIP1 und HIP1R. Zellen machen sich den CMVT beispielsweise für die Aufnahme von Nährstoffen [91, 92], das Recycling synaptischer Vesikel [93], sowie die Modulation der Signaltransduktion durch die Kontrolle des Oberflächenrezeptorlevels [94] zunutze. (s. auch Abb. IV.2) (für ein Review zu Funktionen HIP1/HIP1R siehe [95]) (Review zu Clathrin-vermittelte Endozytose siehe [75])

Durch die über die ENTH-Domäne vermittelte spezielle Bindungsaffinität zu PtdIns(3,4/3,5)P₂, welches in intrazellulären Vesikeln vorkommt, wird den HIP-Proteinen ein Einfluss auf das Zellwachstum und -überleben zugeschrieben. [79, 80] Hyun et. al. beobachteten am Beispiel des EGF-Rezeptors (“Epidermal growth factor receptor“) und des PDGF-Rezeptors (“Platelet-derived growth factor receptor“), dass die Überexpression von HIP1 und HIP1R die Degradierung von ligandengebundenen Rezeptor-Tyrosinkinasen in intrazellulären Vesikeln inhibiert. Es verlängert sich dadurch die Halbwertszeit der Signaltransduktion, welche bis zur Dissoziation des im Vesikel befindlichen Liganden-Rezeptor-Komplexes stattfindet. [79] Einen weiteren Hinweis auf den Einfluss, welchen die HIP-Familie möglicherweise auf Zellüberleben, Zellwachstum, Zellzyklus und Onkogenese hat, geben Zellen, die eine ENTH-Deletions-Mutante der HIP-Proteine exprimieren. In diesen Zellen können HIP-Proteine nicht mehr an intrazelluläre Vesikel binden, dadurch werden verstärkt GF-Rezeptoren abgebaut und es zeigt sich eine stark erhöhte Apoptoserate nach etwa 48h. [79]

Weiterhin kann HIP1 an den Androgen Rezeptor, welcher ein nuklearer Hormonrezeptor (Transkriptionsfaktor) ist, binden und diesen über ein C-Terminales “nuclear-localization signal“ aktivieren.[96] Zudem ist *HIP1* Teil einer t(5;7) chromosomalen Translokation, welche in der Expression eines Onkogens resultiert, *HIP1/PDGFRβR*. [97] In vielen epithelialen Tumoren, in Prostatatumoren und im Kolonkarzinom lässt sich eine Überexpression von *HIP1* feststellen. [98]

Im Rahmen der Endozytose erreicht HIP1R den “pit“ gleichzeitig mit Clathrin und spielt eine Rolle während der Vernetzung des Clathrin-Mantels als Co-Faktor sowohl an der Plasmamembran, als auch am *trans*-Golgi-Netzwerk.[95, 99] HIP1R steuert zudem das effiziente Abbinden der Vesikel, indem es an F-Aktin und Clathrin bindet und wachsende Mikrofilamente mit der Vesikeloberflächen verknüpft. [69, 99, 100] Die Bindung der leichten Ketten Clathrins scheint dabei einen regulierenden Einfluss auf die F-Aktin-Bindung zu haben, da eine Störung der Clathrin-Bindung zu einer Störung der Aktin-Verteilung in der Zelle führt.[84, 88] F-Aktin befindet sich an Zonen des *trans*-Golgi-Netzwerks, welche abgeschnürte Vesikel an Lysosomen adressieren. HIP1R-siRNS-“silencing“ führt zur Akkumulation des F-Aktin und der Clathrinummantelten Vesikelanlagen, zur Zerrüttung der Organisation des Golgi-Apparates und zur Proliferation von lysosomalen Kompartimenten. [74] Neuere Studien zeigen eine Assoziation von HIP1R mit Apoptosewegen durch Interaktion mit Mitgliedern der Bcl-2 “pro-apoptotic family“.[101] 2010 wurde in einer Arbeit von Sun Park beschrieben, dass Hip1r durch Bindung an Mikrotubuli, die korrekte Verteilung von Chromosomen während der Zellteilung reguliert.[102, 103]

Fasst man die bisher vorliegenden Daten zusammen, lassen sich gemeinsame, aber auch spezifische Funktionen von HIP1 und HIP1R im Rahmen der Endozytose und des intrazellulären Vesikeltransports eruieren. Eine Übersicht ist in Abbildung IV.2 dargestellt. Dennoch sind viele Fragen zur genauen Funktion beider Proteine bis heute offen.

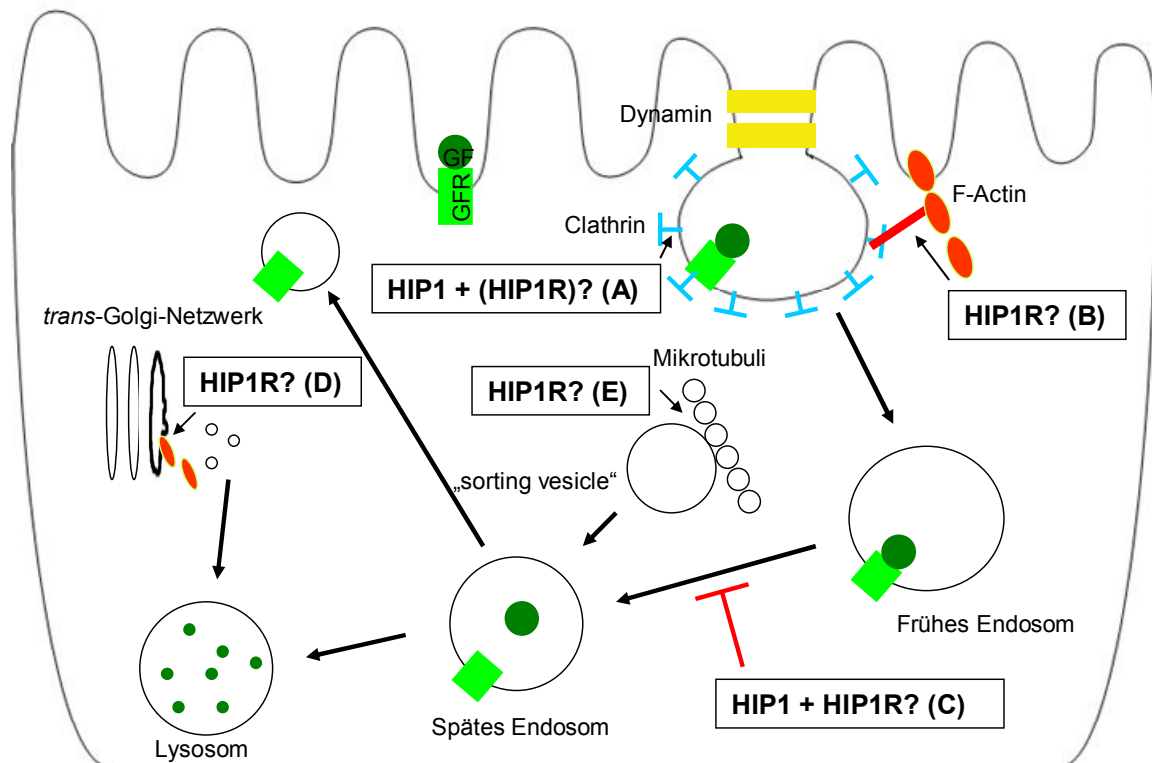


Abbildung IV.2: Übersicht über den Mechanismus der Clathrin-abhängigen Endozytose mit möglichen Funktionen von HIP1 und HIP1R. (A-E)

(A) Dargestellt ist die Funktion von HIP1 und HIP1R als Adapter-Protein. Über die „Coiled-coil“-Domäne binden die Proteine an Clathrin und unterstützen dessen Vernetzung und tragen möglicherweise zur Sortierung der Vesikel bei. Möglich ist auch die Funktion von HIP1 als frachtspezifischem Adapter durch weitere Bindungspartner (EGFR, NMDA-Rezeptor, Androgenrezeptor), außerdem als Stabilisator der Bindung zwischen Clathrin und AP-2 durch Bindungsmöglichkeit an beide. [66, 84, 104]

(B) Durch seine Bindung einerseits an Clathrin über die „Coiled-coil“-Domäne und andererseits an F-Aktin über die TALIN-„homology“-Domäne kann HIP1R wachsende Mikrofilamente mit der Vesikeloberfläche verknüpfen.[69, 90, 100]

(C) Über die ENTH-Domäne können beide Proteine an das in Endosomen vorkommende PtdIns (3,4/3,5)P₂ binden. Hyun et. al. vermuten, dass HIP1 und HIP1R über diese Bindung die Degradierung und Dissoziation der Liganden-Rezeptor-Komplexe aufhalten können. Dies würde zu einer Verlängerung der Signaltransduktion führen. Handelte es sich beispielsweise um “growth-factor“-Rezeptoren könnte die HIP-Familie über diesen Mechanismus Einfluss auf die Regulation von Zellwachstum nehmen. [79]

(D) Über die Bindung an Clathrin und F-Aktin ist HIP1R am *trans*-Golgi-Netzwerk für das effiziente Abbinden von Vesikeln von Bedeutung. [69]

(E) Regulation der Chromosomenverteilung durch HIP1R (HIP1?) über die nachgewiesene Bindungsmöglichkeit der ENTH-Domäne an Tubulin. [102, 103]

IV.3 Die Funktion von *Hip1r* (“*Huntington interacting protein 1 related*“) in der frühen Schilddrüsenanlage der Maus

Wie in Kapitel IV.2.1 beschrieben, konnte in verschiedenen Studien die wichtige Rolle von *Hip1r* während einzelner Schritte der Clathrin-abhängigen Transportwege wie der Clathrin-vermittelten Bildung von Vesikeln und der Bindung des Aktinzytoskeletts an Clathrin in Zellkulturen nachgewiesen werden.[79, 84, 99, 100, 105] Um die Funktion eines Gens *in vivo* zu erforschen, ist es sinnvoll, “Knockout“-Maus-Modelle zu untersuchen. Ein *Hip1r*-“Knockout“-Modell existiert bereits. Die Tiere des von Hyun et. al. gezüchteten Maus-Modells zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp.[64] Im Gegensatz zu den Ergebnissen der *in vitro* durchgeführten Versuche funktionieren Clathrin-vermittelte Transportwege ungestört in Fibroblasten, isoliert aus *Hip1r*- oder *Hip1*/*Hip1r*-defizienten Mäusen.[64, 106] Diese Ergebnisse lassen an dem Stellenwert, welchen *Hip1r* *in vivo* hat, zweifeln. Jain et. al. konnten jedoch zum ersten Mal eine wichtige Rolle von *Hip1r* *in vivo* nachweisen. Die Tiere zeigen eine Funktionsstörung der Parietalzellen im Magen, welche sich zurückführen lässt auf eine Störung der Clathrin-vermittelten Vesikelbildung.[107] Da der funktionelle Ausfall von *Hip1r* keine Auswirkungen auf Fibroblasten hat, wohl aber auf Parietalzellen, scheint die Notwendigkeit von *Hip1r* für den Clathrin-vermittelten Transport zellspezifisch zu sein. Demnach wäre es denkbar, dass *Hip1r* auch in der Schilddrüsenanlage eine zellspezifische Rolle spielt. Dem widerspricht die Tatsache, dass *Hip1r*-defiziente Tiere sich phänotypisch nicht von Ihren gesunden Geschwistern unterscheiden. Es wird angenommen, dass *Hip1r*-defiziente Mäuse eine derart geringe Beeinträchtigung sämtlicher Organsysteme zeigen, weil *Hip1*, welches, wie oben beschrieben, eine große Homologie zu

Hip1r aufweist, die ausgefallene *Hip1r*-Funktion in diesen Tieren kompensiert. [64] *Hip1r*-„Knockout“-Mäuse entwickeln Katarakte, Anomalitäten in der Hämatopoese, Männchen sind zum Teil infertil und die betroffenen Tiere bekommen eine ausgeprägte Kypholordose, aufgrund derer sie funktionelle Atemprobleme entwickeln. [77] Den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge ist die Expression von *Hip1* in Schilddrüsenvorläuferzellen zwar nicht spezifisch, die vermutete ubiquitäre Expression im vorderen Darmrohr des 9.5 Tage alten ganzen Mausembryos beinhaltet jedoch die Region der Schilddrüsenanlage. Somit kann eine Expression unter anderem in Schilddrüsenzellen nicht ausgeschlossen werden. Demnach könnte die Kompensation der *Hip1r*-Funktion durch *Hip1* auch in der Schilddrüse von Bedeutung sein.

Zur weiteren Untersuchung der genannten Kompensationshypothese wurde ein *Hip1*-/*Hip1r*-„Doppelknockout“-Mausmodell gezüchtet. Entsprechend der Hypothese entwickeln *Hip1*-/*Hip1r*-„Doppelknockout“-Mäuse (DKO) einen sehr schweren Phänotyp. Dieser ist dem Phänotyp der *Hip1*-„Knockout“-Maus ähnlich. *Hip1*-„Knockout“-Mäuse sind allerdings schwächer betroffen. Auch unterscheiden sich die Ausprägungen des Phänotyps in den drei Modellen, welche von verschiedenen Arbeitsgruppen bisher gezüchtet wurden und es werden weniger DKO-Tiere geboren, als zu erwarten wäre.[77, 106, 108, 109] DKO-Mäuse sind kleinwüchsig, entwickeln eine Mikroophthalmie, Katarakte, Anomalitäten in der Hämatopoese, zeigen kontinuierlich Gewichtsverluste, Männchen sind infertil und alle betroffenen Tiere bekommen eine ausgeprägte Kypholordose, aufgrund derer sie funktionelle Atemprobleme entwickeln. Die eingeschränkte Lungenfunktion führt zu einem frühen Versterben der Tiere. Untersuchte Organe (hierunter nicht die Schilddrüse) dieser Tiere sind leichter als die von gesunden Vergleichstieren und nehmen mit der Zeit an Gewicht ab. GH(growth hormone)-, IGF-1(insulin-like growth factor-1)- und auch TSH(thyroid-stimulating hormone)-Werte sind bei den betroffenen Tieren unauffällig.[106] Die DKO-Mäuse haben demnach keine primäre Hypothyreose. Bezüglich der *Hip1r*-Funktion in Schilddrüsenzellen lässt dies verschiedene Folgerungen zu:

1. *Hip1r* hat keine spezifische Funktion in der frühen Schilddrüsenanlage der Maus, die Expression in Schilddrüsenvorläuferzellen ist verzichtbar für eine unauffällige Entwicklung des Organs.
2. Trotz normaler TSH-Werte könnte eine primäre Hypothyreose vorliegen, falls begleitend eine zentrale Hypothyreose einen TSH-Anstieg verhindert.
3. *Hip1r* spielt eine Rolle für den Erhalt der Schilddrüse, *Hip1r*-defiziente Mäuse entwickeln erst im Laufe Ihres Lebens eine Hypothyreose.

4. *Hip1r* spielt eine Rolle in der morphologischen Entwicklung des Organs, *Hip1r*-defiziente Mäuse haben eine heterotope Schilddrüse oder eine nicht regelrecht geformte Schilddrüse bei normaler Funktion.
5. Es liegt eine variable Expressivität des Phänotyps vor (unauffällige Schilddrüsenentwicklung der pränatal verstorbenen Tiere? TSH-Wert nur bei drei Tieren bestimmt).

IV.3.1 (K)eine spezifische Funktion von *Hip1r* in der frühen Schilddrüsenanlage der Maus?

Der unauffällige Phänotyp der *Hip1r*-“Knockout“-Maus und der unauffällige TSH-Wert der Doppel-“Knockout“-Mäuse sprechen für die erste der genannten Folgerungen, auch wenn die in dieser Arbeit beschriebenen Expressionsdaten und unterschiedlichen “Splice“-Varianten (s.IV.3.1.2) etwas anderes vermuten lassen. Entgegenzusetzen ist dem jedoch, dass ein unauffälliger TSH-Wert nur dann Ausdruck einer euthyreoten Stoffwechsellage ist, wenn die Rückkopplungsmechanismen intakt sind und die Hypophyse selbst, welche TSH produziert, eine ungestörte Funktion aufweist (Folgerung Nr. 2). Die Schilddrüsenhormone der Doppel-“Knockout“-Mäuse wurden nicht untersucht, auch wurde die Schilddrüse selbst nicht untersucht. Theoretisch wäre eine Funktion von *Hip1r* in Zusammenhang mit dem Mechanismus der Clathrin-vermittelten Endozytose (CME) denkbar. Die CME spielt in Schilddrüsenzellen eine Rolle in der Aufnahme von jodiertem Thyreoglobulin aus dem Lumen der Schilddrüsenvesikel [110], als Mikropinozytose bezeichnet, sowie bei der Aufnahme des TSH(Thyreotropin)-TSHR(Thyreotropin-Rezeptor)-Komplexes.[111] Zur Aufnahme von Thyreoglobulin existiert noch ein weiterer Mechanismus, die sogenannte Makropinozytose.[110] Makropinozytose ist ein Clathrin-unabhängiger Aufnahmemechanismus, Mikropinozytose Clathrin-abhängig und damit möglicherweise abhängig von Hip-Proteinen.[112] Da es zwei Wege der Aufnahme von Thyreoglobulin in die Schilddrüsenzelle gibt, wäre es möglich, dass bei einem Ausfall der *Hip1r*-Funktion und damit gestörter Clathrin-vermittelter Endozytose, der andere, *Hip1r*-unabhängige Weg von der Schilddrüse genutzt wird. Käme es dann zu keiner Veränderung der T3 und T4-Werte, entspräche dies dem normalen TSH-Wert der DKO-Mäuse. Diese Theorie ist jedoch weniger wahrscheinlich, da die Mikropinozytose als Hauptaufnahmeweg für Thyreoglobulin beschrieben wird.[110] Während des Clathrin-vermittelten Transports des TSH/TSHR-Komplexes könnte die Rolle von *Hip1r* in der Stabilisierung des frühen Endosoms liegen. In *Hip1r*-defizienten Tieren würde dann TSH schneller abgebaut, jedoch TSH-Rezeptoren auch schneller “recycelt“, so dass es möglich ist, dass sich beide Effekte ausgleichen und es bei einem normalen

TSH-Wert im Blut bleibt. Ob die Clathrin-vermittelten Transportwege in Schilddrüsenzellen allerdings tatsächlich von *Hip1r* abhängig sind oder nicht, bleibt in weiteren Experimenten zu belegen.

Weiterhin ist es vorstellbar, dass *Hip1r*-defiziente Mäuse, gemäß der beschriebenen Organerhaltenden Funktion der *Hip1*-Familie, erst im späteren Alter eine Hypothyreose entwickeln (Folgerung Nr. 3). Wie auch für Neugeborene (besonders mit einem niedrigen Geburtsgewicht) beschrieben, könnte auch bei den DKO-Mäusen so etwas wie ein verspäteter TSH-Anstieg vorliegen.[113, 114] Zu welchem Zeitpunkt die TSH-Werte der drei untersuchten DKO-Tiere gemessen wurden, wird nicht berichtet.[106]

Di Lauro et al diskutieren, ob für die genaue Abstimmung der einzelnen Schritte der Schilddrüsenentwicklung ein Zeit- oder ein Ort-abhängiges Signal verantwortlich ist. Da Personen mit sublingualer Schilddrüse eine normale Hormonproduktion aufweisen können [115], vermuten Di Lauro et al zeitabhängige Signale für den Start der funktionellen Differenzierung. Damit einhergehend kann angenommen werden, dass es Signale gibt, welche die morphologische Entwicklung der Schilddrüse steuern, ohne die funktionelle Entwicklung des Organs zu beeinflussen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei *Hip1r* auch um ein solches Signal handelt, da die Schilddrüsenmorphologie weder bei den "Knockout"-Mäusen, noch bei den Doppel-"Knockout"-Tieren untersucht wurde. Das in dieser Arbeit beschriebene spezifische Expressionsmuster von *Hip1r* im zeitlichen Verlauf der Organentwicklung könnte ein Hinweis darauf sein (Folgerung Nr. 4).

Foxe1-"Knockout"- Mäuse zeigen unterschiedliche Phänotypen. Nur bei 50% der betroffenen Mäuse fehlt die Schilddrüse komplett. Bei anderen Tieren sind nicht migrierte Schilddrüsenüberreste in der Lage Thyreoglobulin zu produzieren. [16] Auch bei *Hip1-Hip1r*-DKO-Mäusen ist die Ausprägung des Phänotyps unterschiedlich, da nur weniger DKO-Tiere geboren werden, als zu erwarten wäre.[106] Es scheint also betroffene Tiere zu geben, welche schon im Mutterleib versterben. Es wäre möglich, dass in diesen Tieren die Schilddrüsenentwicklung gestört ist (Folgerung Nr. 5).

IV.3.2 *Hip1r*-Expression im Verlauf der Embryonalstadien

Das in dieser Arbeit beschriebene alternierende Expressionsmuster von *Hip1r* im Schilddrüsengewebe während der einzelnen Stadien der Organentwicklung kommt in dieser Form bei keinem der bekannten Schilddrüsen-gene vor. *Nkx2.1*, *Pax8*, *Foxe1* und *Hhex* werden alle von Tag E8.5 an kontinuierlich in Schilddrüsen-vorläuferzellen exprimiert.[16] Da Farbsignale als Zeichen ei-

ner *Hip1r*-Expression an weiter aboral gelegenen Endodermanteilen des 10.5 Tage alten Embryos detektiert werden konnten, jedoch nicht in der Schilddrüsenregion, wird angenommen, dass es sich nicht lediglich um eine schlechte Hybridisierung handelt. Für das Stadium 11.5 kann dies nicht sicher ausgeschlossen werden. Ausgehend von der Annahme, dass es sich um ein echtes Negativ-Signal handelt, könnte das alternierende Expressionsmuster von *Hip1r* ein Hinweis auf eine spezielle Funktion des Gens in der Schilddrüsenentwicklung sein. Die morphologische Entwicklung der Schilddrüse der Maus beginnt an Tag E8.5 (Embryonaltag 8.5) und endet etwa an Tag E17.5. Während dieses Zeitraums konnte die Expression von *Hip1r* in Zellen der Schilddrüsenanlage an Tag E9.5, E12.5, E15.5, jedoch nicht an Tag E10.5 und E11.5 nachgewiesen werden. Wie in Kapitel I.3 beschrieben, läuft die Schilddrüsenentwicklung in verschiedenen Stadien ab, beginnend mit dem sogenannten "Budding", was die Formation einer ersten sichtbaren Anlage im Endoderm des Zungenmunds beschreibt. Das Endoderm verdickt sich deutlich, wobei die Größenzunahme der Anlage nicht durch Proliferation der Vorläuferzellen zustande kommt, sondern durch Rekrutierung benachbarter Zellen. Die Fähigkeit zu Proliferation durch mitotische Teilung erhalten die Zellen erst später, etwa ab Tag E11.5.[42] Die Faktoren, die dieses ungewöhnliche Verhalten der Schilddrüsenvorläuferzellen steuern, sind bisher nicht bekannt. Es könnte vermutet werden, dass *Hip1r* einer der gesuchten Faktoren ist, zumal *Hip1r* (wie in Kapitel IV.2.1 beschrieben) eine regulierende Rolle der Chromosomenverteilung in sich teilenden Zellen zugeschrieben wird. Es lässt sich jedoch kein zeitlicher Zusammenhang zwischen den Änderungen der Expression von *Hip1r* und Veränderungen im Proliferationsverhalten der sich entwickelnden Schilddrüse entdecken.

In Abbildung IV.3 sind markante Entwicklungsschritte der Schilddrüsenanlage, welche womöglich von einem diskontinuierlich exprimierten Faktor, wie *Hip1r*, koordiniert werden, dargestellt. Ab Tag E9.5-E10.5 beginnt die Migration der Schilddrüsenanlage entlang der Halsgefäße bis an ihre Zielposition ventral der Trachea, die sie an Tag E13.5 erreicht.[16] Die Wanderung der Schilddrüse findet also nur an ausgewählten Tagen der gesamten Entwicklungszeit statt, die Promotoren dieses Vorgangs sollten demnach während der Tage E9.5-E13.5 aktiv sein. Auch die Fähigkeit der Schilddrüsenzellen zur Migration scheint nicht abhängig von *Hip1r* sein, da das Gen während dieses Vorgangs an einigen Tagen an- und an anderen Tagen abgeschaltet ist. Es ist allerdings noch nicht geklärt, welcher Mechanismus die Migration der Schilddrüse reguliert und ob *Hip1r* an Teilschritten der Migration beteiligt ist. Womöglich handelt es sich nicht um aktive Migration [116], sondern um ein passives Vorschieben der Drüse, durch Proliferation von umgebendem Gewebe [117], oder um einen durch Gefäßendothel aktivierten Vorgang.[43] Alt et al, beschreiben die Wanderung der Schilddrüsenanlage entlang der sich entwickelnden Karoti-

den, welche als Leitschiene fungieren. In mutanten Tieren mit asymmetrischer Aortenbogenanlage entwickelt sich auch eine asymmetrische Schilddrüse. Es scheint also eine Kommunikation zwischen Schilddrüsenvorläuferzellen und Zellen des Gefäßendothels zu bestehen, wie sie auch während der Entwicklung des Pankreas beschrieben ist. [44, 118] Die Tage während der Entwicklung, an denen die Schilddrüsenanlage dem Gefäßendothel direkt anliegt, an denen also wahrscheinlich eine Kommunikation stattfindet, stehen wiederum nicht mit dem Expressionsmuster von *Hip1r* in Zusammenhang. Das An- oder Abschalten von *Hip1r* scheint also keinen Einfluss auf die Möglichkeit der Schilddrüsenzelle, Signale des Gefäßendothels zu empfangen, zu haben. Auch Mesenchymzellen stehen zu verschiedenen Zeitpunkten der Schilddrüsenentwicklung in einem engen räumlichen Zusammenhang mit der Schilddrüsenanlage. Während der Entwicklung des pharyngealen Endoderms ist der Einfluss von Fgfs ("Fibroblast growth factors") aus Mesenchymzellen bekannt. So können Fgfs in der frühen Lungenanlage beispielsweise die *Nkx2.1*-Expression induzieren. [39, 41, 119] In der Lunge ist die Interaktion von Fgf10 und seinem Rezeptor Fgfr2 zudem für das "Budding" selbst wichtig [120, 121], in anderen Organen wie der Hypophyse und dem Pankreas ist die Aktivierung von Fgfr2 durch Fgf10 essentiell für die Initiierung der Migration. [122, 123] Hilfer et. al. konnten an Hühnern zeigen, dass auch die Schilddrüse während ihrer Entwicklung auf Signale aus ihrer Umgebung angewiesen ist. Ohne die Fibroblasten der Schilddrüsenkapsel entwickelt sich die Schilddrüse nicht richtig.[124] Außerdem zerstören Mutationen in Genen der Umgebung der Schilddrüse die korrekte Organogenese.[125, 126] Es wäre also möglich, dass *Hip1r* eine Rolle in der Kommunikation zwischen Mesenchymzellen und Schilddrüsenvorläuferzellen spielt, zumal von Hyun et al. *in vitro* ein Effekt von Hip-Proteinen auf das Zellüberleben und die verlängernde Wirkung der Proteine auf die Halbwertszeit der Signaltransduktion von "Growth-factor"-Rezeptoren, welche durch Clathrin-vermittelte Endozytose aufgenommen werden, nachgewiesen werden konnte.[79] Der in Schilddrüsenvorläuferzellen vorkommende "Growth-factor"-Rezeptor F(ibroblast)gfr2 (III-b-Isoform) kann ab Tag E11.5 nachgewiesen werden.[16] Er wird durch Fgf1, 3, 7 und 10 aktiviert und kann durch Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert werden.[127, 128] Fgfr2 und Fgf10 spielen eine wichtige Rolle in der Schilddrüsenentwicklung, was sich an Fgfr2- und Fgf10-defizienten Mäusen zeigt, welche an Tag E13 keine Schilddrüse mehr aufweisen (wann genau die Organanlage verschwindet, ist nicht beschrieben)[129, 130] In der Schilddrüse beginnt der Einfluss von "Growth factors" aus dem umgebenden Mesenchym auf dem beschriebenen Weg an Tag E11.5, da ab diesem Zeitpunkt erst *Fgfr2* exprimiert wird. Der Einfluss von *Hip1r* auf die Signaltransduktion von Fgf wäre also erst ab Tag E12.5 denkbar, wenn *Hip1r* und *Fgfr2* parallel exprimiert werden, somit zum Ende der Migration. Selbst wenn die Signaltransduktion

der ‘‘Growth factors‘‘ auch ohne den Einfluss von Hip1r abläuft, was dem normalen TSH-Wert der *Hip1-/Hip1r*-Doppel-‘‘Knockout‘‘-Mäuse (DKO) zufolge wahrscheinlich ist, könnte *Hip1r* später den Erhalt der sich gebildeten Schilddrüse durch die Stabilisierung von Fgf/Fgfr2-Komplexen unterstützen. Eine organstabilisierende Wirkung von Hip-Proteinen wurde bereits von Bradley et al. vermutet, die einen kontinuierlichen Gewichtsverlust mehrerer Organe, darunter Lunge und Leber, in DKO-Tieren beobachteten. Die Schilddrüse wurde in dieser Studie nicht untersucht. [106] Es wäre also sinnvoll, die betroffenen Tiere im weiteren Verlauf ihres Lebens zu beobachten.

Tag der Entwicklung	Morphogenese Schilddrüse	Funktionelle Entwicklung	Nkx2.1, Foxe1, Pax8, Hhex	Hip1r Expression
E 8- 8.5	Erste sichtbare Anlage im primitiven Darmrohr		+	Nicht getestet
E 9.5	Migration der Anlage beginnt		+	+
E 10.5			+	-
E 11.5	Ductus thyreoglossus verschwindet		+	-
E 12.5			+	++
E 13.5	Migration ist abgeschlossen		+	
E 14.5	Fusion mit den ‘‘ultimobranchial bodies‘‘	Tg, TPO, TSH	+	Nicht getestet
E 15.5	Beginn der Fullikulogenese	NIS	+	++
E 16.5		T4 kann detektiert werden	+	Nicht getestet

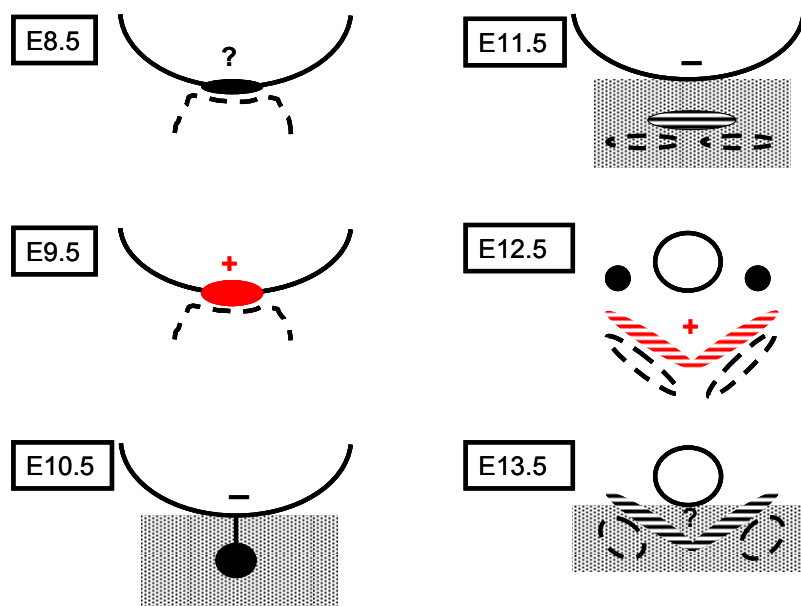


Abbildung IV.3: Schematische Darstellung der Schilddrüsenentwicklung im Zusammenhang mit der *Hip1r*-Expression. (oben) Tabelle über den Zusammenhang zwischen funktioneller und morphologischer Entwicklung der Schilddrüse und den exprimierten Genen.

(unten) Erklärung der Zeichen: E8.5-E10.5 gefüllte Flächen und E11.5-E13.5 schraffierte Flächen, Schilddrüsenanlage, durchgezogene Linie, Endoderm (frühe Trachea), gestrichelte Linien, arterielle Gefäße, gepunktete Fläche, Mesenchym, gefüllte Flächen E12.5 “ultimobranchial bodies“, Rot und +, Expression von *Hip1r* vorhanden, Schwarz und – keine Expression vorhanden, ? keine Experimente durchgeführt. Es lässt sich kein zeitlicher Zusammenhang zwischen den verschiedenen Aspekten der Schilddrüsenentwicklung und dem An- und Abschalten der *Hip1r*-Expression in der Schilddrüsenanlage erkennen. Die berücksichtigten Aspekte sind die Proliferationsaktivität der Schilddrüsenvorläuferzellen (gefüllte Flächen, keine Proliferationsaktivität, gestrichelte Flächen, Proliferation), der Einfluss von Gefäßendothel oder Mesenchymzellen auf die Organanlage (dargestellt durch räumliche Nähe der Anlage zu den Strukturen) und der Migrationsfortschritt der Drüse.

IV.3.3 Bedeutung der unterschiedlichen “Splice“-Varianten

Schilddrüsenvorläuferzellen werden aus dem ventralen Endoderm rekrutiert und lassen sich ab Tag E8.5 (Embryonaltag 8.5) durch die gemeinsame Expression von *Nkx2.1*, *Foxe1*, *Pax8* und *Hhex* identifizieren. *Foxe1* wird sowohl in der Schilddrüsenanlage als auch im umgebenden Gewebe exprimiert. [19] Die Organanlage hebt sich durch seine Umgebung also nicht nur durch die Grenze von Expression und Nicht-Expression wichtiger Faktoren ab, sondern durch das Auftreten der Ko-Expression mehrerer Faktoren. An Tag E9.5 unterscheiden sie sich meinen Ergebnissen zufolge zusätzlich von dem sie umgebenden Gewebe durch die Expression einer anderen *Hip1r*- “Splice“-Variante. Die Sequenzierung von Exon10-Exon16 der durch die *Hip1r*-PCR nachgewiesenen cDNA-Produkte ergab eine neue Splicevariante, welche sich durch das Fehlen des Exons 14 in dem die Schilddrüse umgebenden Endoderm auszeichnet. Der „Reading Frame“ verändert sich durch den Stückverlust nicht. Exon 14 kodiert für einen Teil der Aminosäuresequenz, welche das “Coiled-coil“-Motiv bildet (s. Abb. IV.1). Dieses Doppelwendel-Motiv vermittelt Protein-Protein-Interaktionen. Im Falle von *Hip1r* die Bindung an die leichten Ketten Clathrins. [76, 84] Alternatives “Splicing“, also das Einfügen verschiedener Exons in mRNA, führt zur Generierung eines großen Protein-Pools. Gewebespezifisch oder auch Entwicklungsstadien-spezifisch wird alternatives “Splicing“ eingesetzt. [131] Es wurden bereits verschiedene ESTs (“Expressed sequence tags“) von *Hip1r* sequenziert und sind im USCS Genome Browser aufgelistet. Eine Sequenz wie die hier beschriebene ist allerdings bisher nicht bekannt, auch wurden bisher keine ESTs von *Hip1r* aus Schilddrüsenzellen oder Endoderm beschrieben. Ob die hier beschriebene Splicevariante von *Hip1r* tatsächlich in eine Protein-Sequenz übersetzt

wird und welche Auswirkung die Veränderung der Primärstruktur des Proteins auf die Bildung von Sekundär- Tertiär- und Quartärstruktur, sowie auf die Funktion hat, müsste Gegenstand weiterer Arbeiten sein.

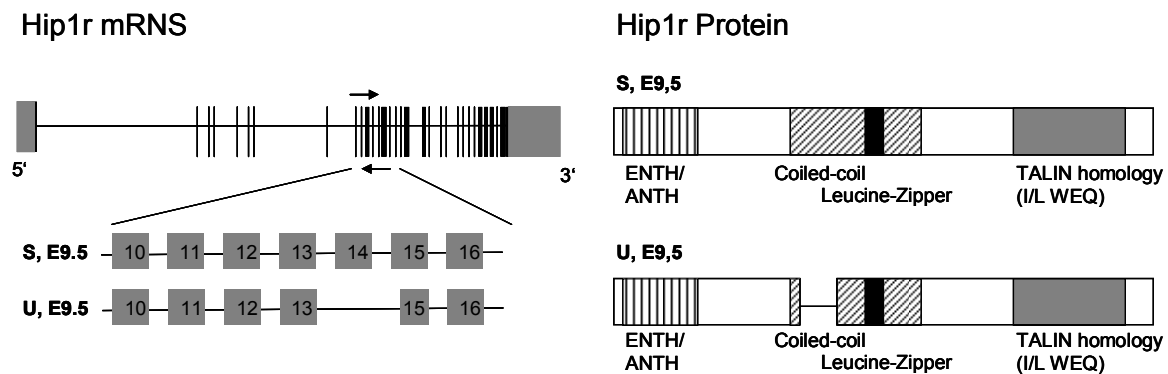


Abbildung IV.4: Darstellung der Splicavarianten von *Hip1r* und der voraussichtlichen Proteine. Der mRNA des umgebenden Gewebes fehlt Exon 14, welches für einen Teil der zentralen “Coiled-coil“-Domäne kodiert. (S)Schilddrüse, (U) umgebendes Gewebe.

Mit Hilfe des Programms COILS (www.ch.embnet.org), welches anhand der Aminosäuresequenz eines Proteins die Wahrscheinlichkeit der Bildung von “Coiled-coil“-Motiven vorhersagt, wurden die hier beschriebenen *Hip1r*-Varianten analysiert (s. Abb.IV.5). Auch ohne die von Exon 14 kodierte Aminosäuresequenz bildet sich laut der Vorhersage des Programms eine “Coiled-coil“-Struktur in der zentralen Region des Proteins. Ob sich die Bindungsfähigkeit der *Hip1r*-Variante über die vorhergesagte “Coiled-coil“-Domäne an Clathrin jedoch verändert, ist nicht vorauszusagen, wäre aber durchaus möglich. Blanz et. al. beschreiben, dass eine Mutation in der Region des *LIMP-2*-Gens, welche für eine “Coiled-coil“-Domäne kodiert, die Bindung an β -Glukocerebrosidase zerstört.[132]

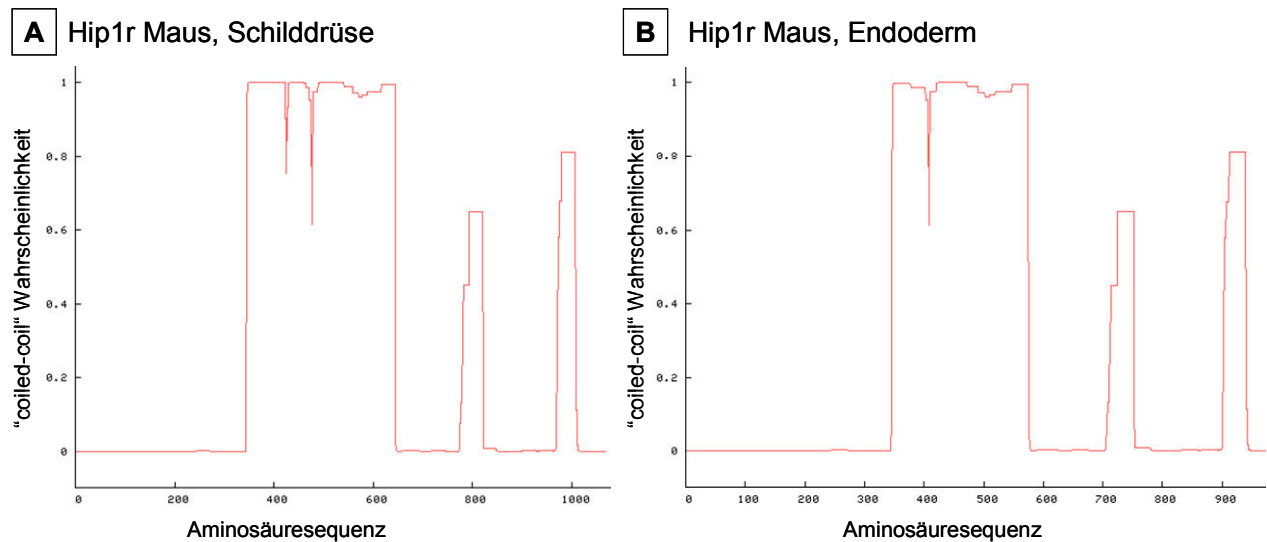


Abbildung IV.5: Vorhersage über die Wahrscheinlichkeit der Bildung von “Coiled-coil“-Motiven des Hip1r-Proteins. Die Grafik wurde mit Hilfe des Programm COILS erstellt. In Abbildung (A) ist die Aminosäuresequenz des in Schilddrüsenzellen vorkommenden Hip1r-Proteins mit der bekannten Verteilung voraussichtlicher “Coiled-coil“-Domänen dargestellt. Die Vorhersage einer “Coiled-coil“- Domäne in der zentralen Region des Proteins verändert sich nicht durch das Fehlen der von Exon 14 kodierten Aminosäuresequenz (B).

Davon ausgehend, dass die Bindungsfähigkeit von Hip1r an die leichten Ketten Clathrins durch das Wegfallen des Exons 14 gestört ist, käme es möglicherweise in diesem Protein zu keiner funktionell bedeutenden Bindung mehr, da die Bindung von Hip1r an die schweren Ketten Clathrins im Vergleich zu Hip1 sowieso sehr schwach ist. [84] Damit hätte Hip1r in Endodermzellen möglicherweise eine völlig andere Funktion als in Schilddrüsenzellen.

Es könnte also sein, dass die Schilddrüsenzellen durch die Expression des kompletten *Hip1r*-Gens Funktionen erhalten, die sie von den Nachbarzellen unterscheiden, indem diese Funktionen dort durch Expression einer anderen Variante unterdrückt werden. Hyun et al. konnten zeigen, dass *Hip1r*-Mutanten, welchen die ENTH-Domäne fehlt, *in vitro* die Apoptose von Zellen induzieren können.[79] Es wäre möglich, dass die *Hip1r*-Variante des Endoderms eine Rolle in der Stabilisierung von Zellen spielt, welche über die wahrscheinlich intakte ENTH-Domäne vermittelt wird, dass aber eine andere, über die komplette “Coiled-coil“-Region vermittelte Funktion fehlt.

IV.3 *Hip1r* - ein neues Kandidatengen der angeborenen Hypothyreose?

Das Ziel dieser Arbeit war es, neue Kandidatengene für die kongenitale Hypothyreose zu identifizieren. Aufgrund der beschriebenen “Knockout“-Mausmodelle ist es unwahrscheinlich, dass *Hip1r* ein solches Kandidatengen darstellt. Die in den vorherigen Kapiteln diskutierten Hypothesen möglicher Funktionen von *Hip1r* in Schilddrüsenvorläuferzellen lassen sich letztendlich nur durch verschiedene weitere Untersuchungen der Schilddrüsen der DKO-Tiere klären. Die Morphologie und Funktion des Organs müsste dafür in den verschiedenen Stufen der embryonalen und postnatalen Entwicklung der DKO-Tiere betrachtet werden. Auch funktionelle Experimente mit Schilddrüsenzellen der betroffenen Mäuse könnten zu einer Klärung beitragen.

Trotz der großen Homologie zwischen *Hip1r* in Maus und Mensch, spielt *HIP1R* gegebenenfalls eine wichtigere Rolle in der menschlichen Schilddrüsenentwicklung als in der der Maus. *Pax8*-Mutationen führen beispielsweise in heterozygotem Zustand bei der Maus zu keinem veränderten Phänotyp, bei Menschen kann eine solche Mutation jedoch eine kongenitale Hypothyreose verursachen.[28] Ein unauffälliger Phänotyp in “Knockout“-Mäusen schließt also eine Funktion von *HIP1R* in menschlichen Schilddrüsenzellen nicht letztendlich aus. Dies könnte durch Mutationsanalysen bei Personen mit angeborener Hypothyreose untersucht werden. Bisher sind *HIP1R*-Mutationen im Zusammenhang mit Hypothyrosen beim Menschen nicht beschrieben. “Low-risk“-Sequenzvarianten von *HIP1R* sind kürzlich bei Patienten mit Parkinson-Erkrankungen festgestellt worden.[133, 134] Auch ist *Hip1r* überexprimiert in Trisomie-12-Zellpopulationen von CLL-Patienten. [135]

Literaturverzeichnis

1. Gruters, A., H. Krude, and H. Biebermann, Molecular genetic defects in congenital hypothyroidism. *Eur J Endocrinol*, 2004. **151 Suppl 3**: p. U39-44.
2. Gruters, A., et al., Screening for mutations of the human thyroid peroxidase gene in patients with congenital hypothyroidism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 1996. **104 Suppl 4**: p. 121-3.
3. Silbernagel, S., Despopoulos, A., Taschenatlas der Physiologie. 6. Auflage ed. 2003: Georg Thieme Verlag.
4. Krude, H., et al., Molecular pathogenesis of neonatal hypothyroidism. *Horm Res*, 2000. **53 Suppl 1**: p. 12-8.
5. Grasberger, H. and S. Refetoff, Genetic causes of congenital hypothyroidism due to dysmorphogenesis. *Curr Opin Pediatr*. **23**(4): p. 421-8.
6. Narumi, S., et al., Molecular basis of thyroid dysmorphogenesis: genetic screening in population-based Japanese patients. *J Clin Endocrinol Metab*. **96**(11): p. E1838-42.
7. LaFranchi, S.H., Increasing incidence of congenital hypothyroidism: some answers, more questions. *J Clin Endocrinol Metab*. **96**(8): p. 2395-7.
8. Deladoey, J., G. Vassart, and G. Van Vliet, Possible non-Mendelian mechanisms of thyroid dysmorphogenesis. *Endocr Dev*, 2007. **10**: p. 29-42.
9. Vassart, G. and J.E. Dumont, Thyroid dysmorphogenesis: multigenic or epigenetic ... or both? *Endocrinology*, 2005. **146**(12): p. 5035-7.
10. Van Vliet, G., Development of the thyroid gland: lessons from congenitally hypothyroid mice and men. *Clin Genet*, 2003. **63**(6): p. 445-55.
11. Castanet, M., et al., Nineteen years of national screening for congenital hypothyroidism: familial cases with thyroid dysmorphogenesis suggest the involvement of genetic factors. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. **86**(5): p. 2009-14.
12. Leger, J., et al., Thyroid developmental anomalies in first degree relatives of children with congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. **87**(2): p. 575-80.
13. Castanet, M., M. Polak, and J. Leger, Familial forms of thyroid dysmorphogenesis. *Endocr Dev*, 2007. **10**: p. 15-28.
14. Stoll, C., et al., Congenital anomalies associated with congenital hypothyroidism. *Ann Genet*, 1999. **42**(1): p. 17-20.

15. Olivieri, A., et al., A population-based study on the frequency of additional congenital malformations in infants with congenital hypothyroidism: data from the Italian Registry for Congenital Hypothyroidism (1991-1998). *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. **87**(2): p. 557-62.
16. De Felice, M. and R. Di Lauro, Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms. *Endocr Rev*, 2004. **25**(5): p. 722-46.
17. Dentice, M., et al., Missense mutation in the transcription factor NKX2-5: a novel molecular event in the pathogenesis of thyroid dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. **91**(4): p. 1428-33.
18. Lazzaro, D., et al., The transcription factor TTF-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development*, 1991. **113**(4): p. 1093-104.
19. Zannini, M., et al., TTF-2, a new forkhead protein, shows a temporal expression in the developing thyroid which is consistent with a role in controlling the onset of differentiation. *EMBO J*, 1997. **16**(11): p. 3185-97.
20. Plachov, D., et al., Pax8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland. *Development*, 1990. **110**(2): p. 643-51.
21. Thomas, P.Q., A. Brown, and R.S. Beddington, Hex: a homeobox gene revealing peri-implantation asymmetry in the mouse embryo and an early transient marker of endothelial cell precursors. *Development*, 1998. **125**(1): p. 85-94.
22. Kimura, S., et al., The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes Dev*, 1996. **10**(1): p. 60-9.
23. Kimura, S., J.M. Ward, and P. Minoo, Thyroid-specific enhancer-binding protein/thyroid transcription factor 1 is not required for the initial specification of the thyroid and lung primordia. *Biochimie*, 1999. **81**(4): p. 321-7.
24. Devriendt, K., et al., Deletion of thyroid transcription factor-1 gene in an infant with neonatal thyroid dysfunction and respiratory failure. *N Engl J Med*, 1998. **338**(18): p. 1317-8.
25. Breedveld, G.J., et al., Mutations in TITF-1 are associated with benign hereditary chorea. *Hum Mol Genet*, 2002. **11**(8): p. 971-9.
26. Krude, H., et al., Choreoathetosis, hypothyroidism, and pulmonary alterations due to human NKX2-1 haploinsufficiency. *J Clin Invest*, 2002. **109**(4): p. 475-80.
27. Meeus, L., et al., Characterization of a novel loss of function mutation of PAX8 in a familial case of congenital hypothyroidism with in-place, normal-sized thyroid. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(9): p. 4285-91.

28. Macchia, P.E., et al., PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. *Nat Genet*, 1998. **19**(1): p. 83-6.
29. Bamforth, J.S., et al., Congenital hypothyroidism, spiky hair, and cleft palate. *J Med Genet*, 1989. **26**(1): p. 49-51.
30. Buntinckx, I.M., et al., Syndromic association of cleft palate, bilateral choanal atresia, curly hair, and congenital hypothyroidism. *J Med Genet*, 1993. **30**(5): p. 427-8.
31. Clifton-Bligh, R.J., et al., Mutation of the gene encoding human TTF-2 associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia. *Nat Genet*, 1998. **19**(4): p. 399-401.
32. Castanet, M., et al., A novel loss-of-function mutation in TTF-2 is associated with congenital hypothyroidism, thyroid agenesis and cleft palate. *Hum Mol Genet*, 2002. **11**(17): p. 2051-9.
33. Baris, I., et al., A novel missense mutation in human TTF-2 (FKHL15) gene associated with congenital hypothyroidism but not athyreosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. **91**(10): p. 4183-7.
34. Al Taji, E., et al., Screening for mutations in transcription factors in a Czech cohort of 170 patients with congenital and early-onset hypothyroidism: identification of a novel PAX8 mutation in dominantly inherited early-onset non-autoimmune hypothyroidism. *Eur J Endocrinol*, 2007. **156**(5): p. 521-9.
35. Wells, J.M. and D.A. Melton, Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. *Development*, 2000. **127**(8): p. 1563-72.
36. Fukuda, K. and Y. Kikuchi, Endoderm development in vertebrates: fate mapping, induction and regional specification. *Dev Growth Differ*, 2005. **47**(6): p. 343-55.
37. Wildi-Runge, S., et al., A High Prevalence of Dual Thyroid Ectopy in Congenital Hypothyroidism: Evidence for Insufficient Signaling Gradients during Embryonic Thyroid Migration or for the Polyclonal Nature of the Thyroid Gland? *J Clin Endocrinol Metab*.
38. Fagman, H. and M. Nilsson, Morphogenesis of the thyroid gland. *Mol Cell Endocrinol*. **323**(1): p. 35-54.
39. Fagman, H. and M. Nilsson, Morphogenetics of early thyroid development. *J Mol Endocrinol*. **46**(1): p. R33-42.
40. Grapin-Botton, A. and D.A. Melton, Endoderm development: from patterning to organogenesis. *Trends Genet*, 2000. **16**(3): p. 124-30.
41. Shannon, J.M. and B.A. Hyatt, Epithelial-mesenchymal interactions in the developing lung. *Annu Rev Physiol*, 2004. **66**: p. 625-45.

42. Fagman, H., L. Andersson, and M. Nilsson, The developing mouse thyroid: embryonic vessel contacts and parenchymal growth pattern during specification, budding, migration, and lobulation. *Dev Dyn*, 2006. **235**(2): p. 444-55.
43. Alt, B., et al., Arteries define the position of the thyroid gland during its developmental relocalisation. *Development*, 2006. **133**(19): p. 3797-804.
44. Lammert, E., O. Cleaver, and D. Melton, Role of endothelial cells in early pancreas and liver development. *Mech Dev*, 2003. **120**(1): p. 59-64.
45. Yoshitomi, H. and K.S. Zaret, Endothelial cell interactions initiate dorsal pancreas development by selectively inducing the transcription factor *Ptfla*. *Development*, 2004. **131**(4): p. 807-17.
46. Matsumoto, K., et al., Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science*, 2001. **294**(5542): p. 559-63.
47. Postiglione, M.P., et al., Role of the thyroid-stimulating hormone receptor signaling in development and differentiation of the thyroid gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(24): p. 15462-7.
48. Lorenz Neidhardt, S.G., Karin Wertz, Franz Obermayr, Susanne Worpenberg, and B.G.H. Hans Lehrach, Large-scale screen for genes controlling mammalian embryogenesis, using high-throughput gene expression analysis in mouse embryos. *Mechanisms of development*, 2000. **98**: p. 77-93.
49. van den Brink, G.R., Hedgehog signaling in development and homeostasis of the gastrointestinal tract. *Physiol Rev*, 2007. **87**(4): p. 1343-75.
50. Ratzka, A., S. Mundlos, and A. Vortkamp, Expression patterns of sulfatase genes in the developing mouse embryo. *Dev Dyn*. **239**(6): p. 1779-88.
51. Scheidl, S.J., et al., mRNA expression profiling of laser microbeam microdissected cells from slender embryonic structures. *Am J Pathol*, 2002. **160**(3): p. 801-13.
52. Walter, M.A., et al., Extraction of high-integrity RNA suitable for microarray gene expression analysis from long-term stored human thyroid tissues. *Pathology*, 2006. **38**(3): p. 249-53.
53. Goldsworthy, S.M., et al., Effects of fixation on RNA extraction and amplification from laser capture microdissected tissue. *Mol Carcinog*, 1999. **25**(2): p. 86-91.
54. Gillespie, J.W., et al., Evaluation of non-formalin tissue fixation for molecular profiling studies. *Am J Pathol*, 2002. **160**(2): p. 449-57.

55. Morales, A.R., et al., Continuous-specimen-flow, high-throughput, 1-hour tissue processing. A system for rapid diagnostic tissue preparation. *Arch Pathol Lab Med*, 2002. **126**(5): p. 583-90.
56. Duggan, D.J., et al., Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet*, 1999. **21**(1 Suppl): p. 10-4.
57. Cox, M.L., et al., Assessment of fixatives, fixation, and tissue processing on morphology and RNA integrity. *Exp Mol Pathol*, 2006. **80**(2): p. 183-91.
58. Erlich, H.A., Polymerase chain reaction. *J Clin Immunol*, 1989. **9**(6): p. 437-47.
59. Neidhardt, L., et al., Large-scale screen for genes controlling mammalian embryogenesis, using high-throughput gene expression analysis in mouse embryos. *Mech Dev*, 2000. **98**(1-2): p. 77-94.
60. Odilo Mueller, S.L., Andreas Schroeder. RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control. 2004 [cited].
61. Ilan A. Kerman, B.J.B., Simon J. Evans, Huda Akil, Stanley J. Watson, Combining laser capture microdissection with quantitative real-time PCR: Effects of tissue manipulation on RNA quality and gene expression. *Journal of Neuroscience methods*, 2006. **153**: p. 71-85.
62. Szakaacs JG, L.S., mRNA in-situ hybridization using biotinylated oligonucleotide probes: implications for the diagnostic laboratory. *Annals of clinical and laboratory science*, 1994. **24**(4): p. 324-38.
63. Kaufman, M.H., The atlas of mouse development. 1992, London, United Kingdom Academic Press, Ltd.
64. Hyun, T.S., et al., Hip1-related mutant mice grow and develop normally but have accelerated spinal abnormalities and dwarfism in the absence of HIP1. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(10): p. 4329-40.
65. Wertz, K. and B.G. Herrmann, Large-scale screen for genes involved in gonad development. *Mech Dev*, 2000. **98**(1-2): p. 51-70.
66. Wanker, E.E., et al., HIP-I: a huntingtin interacting protein isolated by the yeast two-hybrid system. *Hum Mol Genet*, 1997. **6**(3): p. 487-95.
67. Seki, N., et al., Cloning, expression analysis, and chromosomal localization of HIP1R, an isolog of huntingtin interacting protein (HIP1). *J Hum Genet*, 1998. **43**(4): p. 268-71.
68. Chopra, V.S., et al., HIP12 is a non-proapoptotic member of a gene family including HIP1, an interacting protein with huntingtin. *Mamm Genome*, 2000. **11**(11): p. 1006-15.

69. Engqvist-Goldstein, A.E., et al., An actin-binding protein of the Sla2/Huntingtin interacting protein 1 family is a novel component of clathrin-coated pits and vesicles. *J Cell Biol*, 1999. **147**(7): p. 1503-18.
70. Holtzman, D.A., S. Yang, and D.G. Drubin, Synthetic-lethal interactions identify two novel genes, SLA1 and SLA2, that control membrane cytoskeleton assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 1993. **122**(3): p. 635-44.
71. Raths, S., et al., end3 and end4: two mutants defective in receptor-mediated and fluid-phase endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 1993. **120**(1): p. 55-65.
72. Wesp, A., et al., End4p/Sla2p interacts with actin-associated proteins for endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 1997. **8**(11): p. 2291-306.
73. Yang, S., M.J. Cope, and D.G. Drubin, Sla2p is associated with the yeast cortical actin cytoskeleton via redundant localization signals. *Mol Biol Cell*, 1999. **10**(7): p. 2265-83.
74. Carreno, S., et al., Actin dynamics coupled to clathrin-coated vesicle formation at the trans-Golgi network. *J Cell Biol*, 2004. **165**(6): p. 781-8.
75. Traub, L.M., Common principles in clathrin-mediated sorting at the Golgi and the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta*, 2005. **1744**(3): p. 415-37.
76. Brodsky, C.C.-Y.a.F.M., Huntingtin-interacting Protein 1 (Hip1) and Hip1-related Protein (Hip1R) Bind the Conserved Sequence of Clathrin Light Chains and Thereby Influence Clathrin Assembly in Vitro and Actin Distribution in Vivo. *The journal of biological chemistry*, 2005. **280**(7): p. 6109-6117.
77. Oravec-Wilson, K.I., et al., Huntingtin Interacting Protein 1 mutations lead to abnormal hematopoiesis, spinal defects and cataracts. *Hum Mol Genet*, 2004. **13**(8): p. 851-67.
78. Kalchman, M.A., et al., HIP1, a human homologue of *S. cerevisiae* Sla2p, interacts with membrane-associated huntingtin in the brain. *Nat Genet*, 1997. **16**(1): p. 44-53.
79. Hyun, T.S., et al., HIP1 and HIP1r stabilize receptor tyrosine kinases and bind 3-phosphoinositides via epsin N-terminal homology domains. *J Biol Chem*, 2004. **279**(14): p. 14294-306.
80. Itoh, T., et al., Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis. *Science*, 2001. **291**(5506): p. 1047-51.
81. Ford, M.G., et al., Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P₂ and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. *Science*, 2001. **291**(5506): p. 1051-5.
82. Lemmon, M.A., Phosphoinositide recognition domains. *Traffic*, 2003. **4**(4): p. 201-13.
83. Brett, T.J., et al., Structural definition of the F-actin-binding THATCH domain from HIP1R. *Nat Struct Mol Biol*, 2006. **13**(2): p. 121-30.

84. Legendre-Guillemain Valerie, M.M., Martine Charbonneau, Lu Gan, Vikramjit Chopra, Jacynthe Philie, Michael R. Hayden, and Peter S. McPherson, HIP1 and HIP12 Display Differential Binding to F-actin, AP2, and Clathrin. *The journal of biological chemistry*, 2002. **277**(22): p. 19897-19904.
85. Wilbur, J.D., et al., Actin binding by Hip1 (huntingtin-interacting protein 1) and Hip1R (Hip1-related protein) is regulated by clathrin light chain. *J Biol Chem*, 2008. **283**(47): p. 32870-9.
86. Gillingham, A.K. and S. Munro, Long coiled-coil proteins and membrane traffic. *Biochim Biophys Acta*, 2003. **1641**(2-3): p. 71-85.
87. Yu, Y.B., Coiled-coils: stability, specificity, and drug delivery potential. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002. **54**(8): p. 1113-29.
88. Chen, C.Y. and F.M. Brodsky, Huntingtin-interacting protein 1 (Hip1) and Hip1-related protein (Hip1R) bind the conserved sequence of clathrin light chains and thereby influence clathrin assembly in vitro and actin distribution in vivo. *J Biol Chem*, 2005. **280**(7): p. 6109-17.
89. Senetar, M.A., S.J. Foster, and R.O. McCann, Intrasteric inhibition mediates the interaction of the I/LWEQ module proteins Talin1, Talin2, Hip1, and Hip12 with actin. *Biochemistry*, 2004. **43**(49): p. 15418-28.
90. Le Clainche, C., et al., A Hip1R-cortactin complex negatively regulates actin assembly associated with endocytosis. *EMBO J*, 2007. **26**(5): p. 1199-210.
91. Jones, A.L., et al., Uptake and processing of remnants of chylomicrons and very low density lipoproteins by rat liver. *J Lipid Res*, 1984. **25**(11): p. 1151-8.
92. Pearse, B.M., Coated vesicles from human placenta carry ferritin, transferrin, and immunoglobulin G. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982. **79**(2): p. 451-5.
93. Galli, T. and V. Haucke, Cycling of synaptic vesicles: how far? How fast! *Sci STKE*, 2004. **2004**(264): p. re19.
94. Huang, Z., et al., Mutational analysis of the cytoplasmic tail of the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein: effects on receptor expression and signaling. *Mol Endocrinol*, 1995. **9**(9): p. 1240-9.
95. Gottfried, I., M. Ehrlich, and U. Ashery, The Sla2p/HIP1/HIP1R family: similar structure, similar function in endocytosis? *Biochem Soc Trans*, 2010. **38**(Pt 1): p. 187-91.
96. Mills, I.G., et al., Huntingtin interacting protein 1 modulates the transcriptional activity of nuclear hormone receptors. *J Cell Biol*, 2005. **170**(2): p. 191-200.

97. Ross, T.S., et al., Fusion of Huntingtin interacting protein 1 to platelet-derived growth factor beta receptor (PDGFbetaR) in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;7)(q33;q11.2). *Blood*, 1998. **91**(12): p. 4419-26.
98. Rao, D.S., et al., Huntingtin-interacting protein 1 is overexpressed in prostate and colon cancer and is critical for cellular survival. *J Clin Invest*, 2002. **110**(3): p. 351-60.
99. Engqvist-Goldstein, A.E., et al., The actin-binding protein Hip1R associates with clathrin during early stages of endocytosis and promotes clathrin assembly in vitro. *J Cell Biol*, 2001. **154**(6): p. 1209-23.
100. Engqvist-Goldstein, A.E., et al., RNAi-mediated Hip1R silencing results in stable association between the endocytic machinery and the actin assembly machinery. *Mol Biol Cell*, 2004. **15**(4): p. 1666-79.
101. Kim, J.H., et al., HIP1R interacts with a member of Bcl-2 family, BCL2L10, and induces BAK-dependent cell death. *Cell Physiol Biochem*, 2009. **23**(1-3): p. 43-52.
102. Hussain, N.K., et al., A role for epsin N-terminal homology/AP180 N-terminal homology (ENTH/ANTH) domains in tubulin binding. *J Biol Chem*, 2003. **278**(31): p. 28823-30.
103. Park, S.J., Huntingtin-interacting protein 1-related is required for accurate congression and segregation of chromosomes. *BMB Rep*. **43**(12): p. 795-800.
104. Metzler, M., et al., HIP1 functions in clathrin-mediated endocytosis through binding to clathrin and adaptor protein 2. *J Biol Chem*, 2001. **276**(42): p. 39271-6.
105. Legendre-Guillemain, V., et al., ENTH/ANTH proteins and clathrin-mediated membrane budding. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 1): p. 9-18.
106. Bradley, S.V., et al., Degenerative phenotypes caused by the combined deficiency of murine HIP1 and HIP1r are rescued by human HIP1. *Hum Mol Genet*, 2007. **16**(11): p. 1279-92.
107. Jain, R.N., et al., Hip1r is expressed in gastric parietal cells and is required for tubulovesicle formation and cell survival in mice. *J Clin Invest*, 2008. **118**(7): p. 2459-70.
108. Metzler, M., et al., Disruption of the endocytic protein HIP1 results in neurological deficits and decreased AMPA receptor trafficking. *EMBO J*, 2003. **22**(13): p. 3254-66.
109. Rao, D.S., et al., Huntingtin interacting protein 1 Is a clathrin coat binding protein required for differentiation of late spermatogenic progenitors. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(22): p. 7796-806.
110. Bernier-Valentin, F., et al., Coated vesicles from thyroid cells carry iodinated thyroglobulin molecules. First indication for an internalization of the thyroid prohormone via a mechanism of receptor-mediated endocytosis. *J Biol Chem*, 1990. **265**(28): p. 17373-80.

111. Baratti-Elbaz, C., et al., Internalization and recycling pathways of the thyrotropin receptor. *Mol Endocrinol*, 1999. **13**(10): p. 1751-65.
112. Doherty, G.J. and H.T. McMahon, Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem*, 2009. **78**: p. 857-902.
113. Woo, H.C., et al., Congenital hypothyroidism with a delayed thyroid-stimulating hormone elevation in very premature infants: incidence and growth and developmental outcomes. *J Pediatr*. **158**(4): p. 538-42.
114. Lafranchi, S.H., Congenital hypothyroidism: delayed detection after birth and monitoring treatment in the first year of life. *J Pediatr*. **158**(4): p. 525-7.
115. Hartzband, P.I., et al., Histological characterization of a lingual mass using thyroglobulin immunoperoxidase staining. *J Endocrinol Invest*, 1984. **7**(3): p. 221-3.
116. Fagman, H., et al., Expression of classical cadherins in thyroid development: maintenance of an epithelial phenotype throughout organogenesis. *Endocrinology*, 2003. **144**(8): p. 3618-24.
117. Knospe, C., V. Seichert, and Z. Rychter, The topogenesis of the thyroid in chick embryos. *Eur J Morphol*, 1991. **29**(4): p. 291-6.
118. Lammert, E., O. Cleaver, and D. Melton, Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science*, 2001. **294**(5542): p. 564-7.
119. Serls, A.E., et al., Different thresholds of fibroblast growth factors pattern the ventral foregut into liver and lung. *Development*, 2005. **132**(1): p. 35-47.
120. Min, H., et al., Fgf-10 is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to *Drosophila* branchless. *Genes Dev*, 1998. **12**(20): p. 3156-61.
121. Sakiyama, J., A. Yamagishi, and A. Kuroiwa, Tbx4-Fgf10 system controls lung bud formation during chicken embryonic development. *Development*, 2003. **130**(7): p. 1225-34.
122. Treier, M., et al., Hedgehog signaling is required for pituitary gland development. *Development*, 2001. **128**(3): p. 377-86.
123. Pulkkinen, M.A., et al., The IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 is required for proper growth and branching of pancreatic ductal epithelium but not for differentiation of exocrine or endocrine cells. *Mech Dev*, 2003. **120**(2): p. 167-75.
124. Hilfer, S.R. and M. Stern, Instability of the epithelial-mesenchymal interaction in the eight-day embryonic chick thyroid. *J Exp Zool*, 1971. **178**(3): p. 293-305.
125. Xu, P.X., et al., Eya1 is required for the morphogenesis of mammalian thymus, parathyroid and thyroid. *Development*, 2002. **129**(13): p. 3033-44.

126. Kurihara, Y., et al., Impaired development of the thyroid and thymus in endothelin-1 knockout mice. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1995. **26 Suppl 3**: p. S13-6.
127. De Moerlooze, L., et al., An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis. *Development*, 2000. **127**(3): p. 483-92.
128. Wiedlocha, A. and V. Sorensen, Signaling, internalization, and intracellular activity of fibroblast growth factor. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2004. **286**: p. 45-79.
129. Ohuchi, H., et al., FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **277**(3): p. 643-9.
130. Revest, J.M., et al., Fibroblast growth factor receptor 2-IIIb acts upstream of Shh and Fgf4 and is required for limb bud maintenance but not for the induction of Fgf8, Fgf10, Msx1, or Bmp4. *Dev Biol*, 2001. **231**(1): p. 47-62.
131. Keren, H., G. Lev-Maor, and G. Ast, Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nat Rev Genet*, 2010. **11**(5): p. 345-55.
132. Blanz, J., et al., Disease-causing mutations within the lysosomal integral membrane protein type 2 (LIMP-2) reveal the nature of binding to its ligand beta-glucocerebrosidase. *Hum Mol Genet*, 2010. **19**(4): p. 563-72.
133. Zimprich, A., Genetics of Parkinson's disease and essential tremor. *Curr Opin Neurol*. **24**(4): p. 318-23.
134. Lill, C.M., et al., Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: The PDGene database. *PLoS Genet*. **8**(3): p. e1002548.
135. Porpaczy, E., et al., Gene expression signature of chronic lymphocytic leukaemia with Trisomy 12. *Eur J Clin Invest*, 2009. **39**(7): p. 568-75.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Caroline Scholz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Analyse der Genexpression der frühen embryonalen Schilddrüsenanlage im Mausmodell“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Hannover, den 14.12.2012

Unterschrift

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Heiko Krude bedanken, welcher mir den Weg nach Berlin an das Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie eröffnet hat, mich mit ansteckender Begeisterung in das Thema eingearbeitet, die Fragestellung zur Verfügung gestellt und mich in allen Belangen unterstützt hat. Für die Ermöglichung der Durchführung des Projekts danke ich auch Frau Prof. Annette Grüters-Kieslich.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Pamela Schrumpf für die großartige Betreuung der Arbeit vom ersten Tag an, das Einweisen in die Methoden und die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe. Frau PD Heike Biebermann danke ich insbesondere für die Beratung in methodischen Fragestellungen und für die kritische Durchsicht des Methodenteils. Allen Mitarbeitern der Abteilung danke ich für das exzellente Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft.

Weiterhin gilt mein Dank den Herren Professores Bernhard Herrmann und Stefan Mundlos, Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin. Herrn Professor Herrmann danke ich für den Zugriff zu seiner Datenbank und die großzügig zur Verfügung gestellten Mäuse und Sonden. Herrn Professor Mundlos danke ich dafür, dass ich uneingeschränkt die Labore und Geräte seiner Gruppe nutzen durfte. Den Mitarbeitern beider Gruppen möchte ich für die große Hilfsbereitschaft, die zur Verfügung gestellten Protokolle und die geduldige Beantwortung aller Fragen danken.

Meinem Onkel, Prof. Christoph Hübner, möchte ich für wertvolle Diskussionen über die gesamte Arbeit bei unzähligen „Rumpsteaks an Pfeffersoße“ und „Eis mit Sahne“ im Dollinger danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, welche mir eine sorgenfreie Studien- und Promotionszeit ermöglicht und mich in allen Vorhaben unterstützt haben. Für die liebevolle Unterstützung möchte ich mich insbesondere auch bei meinem Mann bedanken.