

**Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Insm1 (IA-1) ist essentiell  
für die Entwicklung von pankreatischen  $\beta$ -Zellen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Mathias S. Gierl**

geboren am 24.08.1973 in Nürnberg

Berlin, 2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Carmen Birchmeier

2. Gutachter: Prof. Dr. Fritz Rathjen

Disputation am 23.05.2007

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Diabetes mellitus .....	1
1.2	Das endokrine Pankreas.....	2
1.3	Die Morphogenese des Pankreas .....	3
1.4	Die Entwicklung der Pankreasanlage .....	4
1.5	Die Spezifizierung des endokrinen Kompartiments .....	6
1.6	Die Differenzierung der endokrinen Zellen .....	7
1.7	Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor <i>Insm1</i> (IA-1) .....	9
1.8	Zielsetzung dieser Arbeit.....	10
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>12</b>
2.1	Material .....	12
2.1.1	Laborausstattung .....	12
2.1.2	Oligonukleotide .....	12
2.1.3	Plasmidvektoren.....	13
2.1.4	Bakterienstämme .....	14
2.1.5	PAC-Klone und -Bibliotheken.....	14
2.1.6	Antikörper.....	14
2.1.7	Eukaryotische Zelllinien .....	15
2.1.8	Mausstämme .....	16
2.2	Methoden.....	16
2.2.1	Molekularbiologische Methoden .....	16
2.2.1.1	DNA-Isolierung und -Aufreinigung.....	16
2.2.1.1.1	Präparation von Plasmid-DNA, PAC-DNA und DNA-Fragmenten .....	16
2.2.1.1.2	Isolierung genomischer DNA aus embryonalem Gewebe und Biopsien .....	16
2.2.1.1.3	Isolierung und Restriktionshydrolyse genomischer DNA aus ES-Zellen .....	17
2.2.1.1.4	Aufreinigung von Plasmid-DNA, PAC-DNA und DNA-Fragmenten .....	18
2.2.1.2	PCR.....	18
2.2.1.3	Southern-Blot-Analyse .....	19
2.2.1.3.1	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden.....	19
2.2.1.3.2	Southern-Blotting.....	19
2.2.1.3.3	Southern-Hybridisierung.....	20
2.2.1.4	Microarray-Expressionsanalyse .....	20
2.2.1.4.1	RNA-Isolierung und -Aufreinigung .....	20
2.2.1.4.2	cDNA-Synthese .....	21
2.2.1.4.3	<i>In vitro</i> -Transkription und Biotin-Markierung von cRNA.....	22
2.2.1.4.4	Microarray-Hybridisierung .....	22
2.2.2	Bakterien- und Zellkultur.....	22
2.2.2.1	Bakterientransformation .....	22
2.2.2.2	Homologe Rekombination in Bakterien .....	23
2.2.2.3	Kultur embryonaler Fibroblasten.....	24
2.2.2.4	Kultur, Transfektion und Selektion von ES-Zellen.....	24
2.2.2.4.1	Kultur von ES-Zellen .....	24
2.2.2.4.2	Transfektion von ES-Zellen .....	25
2.2.2.4.3	Selektion von ES-Zellen .....	26
2.2.2.5	Kultur, Transfektion und Färbung von COS1-Zellen .....	27
2.2.3	Mauszucht und -präparation .....	27
2.2.3.1	Erzeugung von heterozygoten <i>Insm1<sup>lacZ</sup></i> -Tieren.....	27
2.2.3.2	Präparation von Mausembryonen und Mausgewebe .....	28
2.2.4	Histologische Methoden .....	29
2.2.4.1	Herstellung von Gewebeschnitten .....	29
2.2.4.1.1	Methacrylatschnitte.....	29
2.2.4.1.2	Vibratomschnitte.....	29
2.2.4.1.3	Paraffinschnitte .....	29
2.2.4.1.4	Gefrierschnitte.....	30
2.2.4.2	Hämatoxylin/Eosin-Färbung von Methacrylatschnitten .....	30

2.2.4.3	<i>In situ</i> -Hybridisierungsmethoden.....	31
2.2.4.3.1	<i>In vitro</i> -Transkription und DIG-Markierung von RNA-Sonden .....	31
2.2.4.3.2	Herstellung von Embryopulver .....	32
2.2.4.3.3	Whole mount <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	32
2.2.4.3.4	<i>In situ</i> -Hybridisierung auf Paraffinschnitten.....	33
2.2.4.3.5	<i>In situ</i> -Hybridisierung auf Gefrierschnitten .....	35
2.2.4.4	Immunhistologie .....	35
2.2.5	Datenanalyse.....	36
2.2.5.1	Dokumentation histologischer Daten.....	36
2.2.5.2	Zellzahlen .....	36
2.2.5.3	Statistik und Expressionsanalyse .....	37
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>38</b>
3.1	Homozygote <i>Insm1<sup>lacZ</sup></i> -Tiere sterben während der Embryogenese.....	38
3.1.1	Mutagenese des <i>Insm1</i> -Lokus in ES-Zellen.....	38
3.1.2	Erzeugung des <i>Insm1<sup>lacZ/+</sup></i> -Mausstamms .....	39
3.1.3	<i>Insm1</i> -Promoter reguliert das <i>lacZ</i> -Reportergen.....	41
3.1.4	<i>Insm1<sup>lacZ</sup></i> -Mutation ist homozygot letal.....	41
3.2	<i>Insm1</i> -Expression im Pankreas.....	42
3.2.1	<i>Insm1</i> wird während der Morphogenese im Pankreas ausgeprägt .....	42
3.2.2	Expression von <i>Insm1</i> persistiert im adulten Pankreas .....	44
3.2.3	<i>Insm1</i> -Expression ist im Pankreas auf die endokrinen Zellen beschränkt .....	45
3.3	<i>Insm1</i> ist essentiell für die Differenzierung endokriner Zellen.....	46
3.3.1	Endokrine Zellen werden in homozygoten <i>Insm1<sup>lacZ</sup></i> -Tieren korrekt spezifiziert .....	46
3.3.2	Reduzierte Zahl Insulin <sup>+</sup> und Glukagon <sup>+</sup> Zellen in <i>Insm1</i> -mutanten Mäusen.....	48
3.3.3	Abnorme Differenzierung von $\alpha$ - und $\beta$ -Zellen in <i>Insm1<sup>lacZ</sup>/Insm1<sup>lacZ</sup></i> -Tieren .....	50
3.3.4	Entwicklung von $\beta$ -Zellvorläufern in homozygoten <i>Insm1<sup>lacZ</sup></i> -Mäusen blockiert.....	53
3.4	<i>Insm1</i> reguliert Gene der endokrinen Sekretionsmaschinerie.....	56
3.4.1	Genomweite Expressionsanalyse mit Microarrays .....	56
3.4.2	Deregulierung endokriner Gene in <i>Insm1<sup>lacZ</sup>/Insm1<sup>lacZ</sup></i> -Tieren .....	56
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>60</b>
4.1	<i>Insm1</i> -Expression in endokrinen Zellen des Pankreas.....	60
4.2	<i>Insm1</i> ist essentiell für die Entwicklung von $\beta$ -Zellen .....	61
4.3	<i>Insm1</i> reguliert die Differenzierung von $\alpha$ -Zellen.....	62
4.4	<i>Insm1</i> steuert die Expression genereller endokriner Proteine .....	63
4.5	Ausblick.....	64
<b>5</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>75</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>77</b>	<b>77</b>
Abkürzungsverzeichnis.....		77
Verwendete Chemikalien und Enzyme.....		78
Verwendete Lösungen und Medien .....		79
Lebenslauf .....		83
Danksagung .....		84
Eidesstattliche Erklärung.....		85