

Die Funktion des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors *Insm1* in der Entwicklung der Adenohypophyse

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

Jochen Ernst Welcker

aus Mechernich

August, 2010

1. Gutachter: Prof. Dr. Carmen Birchmeier
2. Gutachter: Prof. Dr. Fritz Rathjen

Disputation am 07.12.2010

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|--|----|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Die Hirnanhangdrüse | 1 |
| 1.2 | Die Morphogenese der Hirnanhangdrüse | 3 |
| 1.3 | Die Entwicklung der verschiedenen Zelltypen in der Adenohypophyse | 5 |
| 1.4 | Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor <i>Insm1</i> | 7 |
| 1.5 | Epigenetische Prozesse in der Hypophysenentwicklung | 10 |
| 1.6 | Zielsetzung dieser Arbeit | 11 |
| | | |
| 2 | Material und Methoden | 12 |
| 2.1 | Material | 12 |
| 2.1.1 | Laborausstattung | 12 |
| 2.1.2 | DNA-Oligonukleotide | 12 |
| 2.1.3 | siRNAs gegen das <i>Insm1</i> -Transkript | 14 |
| 2.1.4 | Plasmidvektoren | 14 |
| 2.1.5 | Bakterienstämme | 16 |
| 2.1.6 | Antikörper | 16 |
| 2.1.7 | Eukaryotische Zelllinien | 17 |
| 2.1.8 | Mausstämme | 17 |
| 2.2 | Methoden | 17 |
| 2.2.1 | Molekularbiologische Methoden | 17 |
| 2.2.1.1 | Isolierung, Manipulation und Aufreinigung von Desoxyribonukleinsäuren | 17 |
| 2.2.1.1.1 | Präparation von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten | 17 |
| 2.2.1.1.2 | Aufreinigung von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten | 18 |
| 2.2.1.1.3 | Isolierung genomischer DNA aus embryonalem Gewebe und Biopsien | 18 |
| 2.2.1.1.4 | Restriktionshydrolyse von DNA, Ligation von DNA- Fragmenten | 18 |
| 2.2.1.2 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 18 |
| 2.2.1.3 | „microarray“-Expressionsanalyse | 19 |
| 2.2.1.3.1 | RNA-Isolierung und -Aufreinigung | 19 |
| 2.2.1.3.2 | cDNA-Synthese, <i>in-vitro</i> -Transkription und Biotin- Markierung von cRNA | 20 |
| 2.2.1.3.3 | „microarray“-Hybridisierung | 20 |
| 2.2.2 | Bakterien- und Zellkultur | 21 |
| 2.2.2.1 | Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen | 21 |
| 2.2.2.2 | Bakterientransformation | 21 |
| 2.2.2.3 | Homologe Rekombination in Bakterien | 22 |
| 2.2.2.4 | Kultur, Transfektion und Selektion von AtT-20- und GH3-Zellen | 22 |
| 2.2.2.4.1 | Kultur der Zellen | 22 |
| 2.2.2.4.2 | Markierung des Zellproteoms mit stabilen Isotopen in Zellkultur durch Aminosäuren („stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC)“) | 23 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 2.2.2.4.3 | Transfektion der AtT-20-Zellen mit siRNAs | 23 |
| 2.2.2.4.4 | Expression FLAG-markierter <i>Insm1</i> -Varianten in AtT-20-Zellen | 24 |
| 2.2.2.4.4.1 | Herstellung der Viren | 24 |
| 2.2.2.4.4.2 | Transduktion der AtT-20-Zellen | 24 |
| 2.2.2.4.4.3 | Anreicherung GFP-positiver AtT-20-Zellen | 25 |
| 2.2.3 | Präparation von Mausembryonen und Mausgewebe | 25 |
| 2.2.4 | Histologische Methoden | 25 |
| 2.2.4.1 | Herstellung von Gefrierschnitten | 25 |
| 2.2.4.2 | Immunhistologie auf Gefrierschnitten | 26 |
| 2.2.4.3 | β -Galaktosidase-Färbung | 26 |
| 2.2.4.4 | <i>In-situ</i> -Hybridisierung | 26 |
| 2.2.4.4.1 | Synthese Digoxigenin-markierter <i>in-vitro</i> -Transkripte | 26 |
| 2.2.4.4.2 | <i>In-situ</i> -Hybridisierung auf Gefrierschnitten | 27 |
| 2.2.5 | Proteinbiochemische Methoden | 28 |
| 2.2.5.1 | Herstellung von Zelllysaten für Ko-Immunopräzipitationen | 28 |
| 2.2.5.2 | Quantifizierung der Proteine in Zelllysaten („Bradford-assay“) | 28 |
| 2.2.5.3 | Durchführung von Ko-Immunopräzipitationen | 28 |
| 2.2.5.3.1 | Kovalente Kopplung von Antikörpern an Magnetperlen | 28 |
| 2.2.5.3.2 | Ko-Immunopräzipitation | 29 |
| 2.2.5.4 | „Western Blot“-Analyse | 30 |
| 2.2.5.4.1 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 30 |
| 2.2.5.4.2 | Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen („Western Blot“) | 30 |
| 2.2.5.4.3 | Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen | 31 |
| 2.2.5.5 | Massenspektrometrische Analyse ko-immunopräzipitierter Proteine | 31 |
| 2.2.6 | Datenanalyse | 32 |
| 2.2.6.1 | Dokumentation histologischer Daten | 32 |
| 2.2.6.2 | Expressionsanalyse | 32 |
| 2.2.6.3 | Auswertung massenspektrometrischer Daten | 32 |
| 3 | Ergebnisse | 34 |
| 3.1 | <i>Insm1</i> -Expression in der Adenohypophyse | 34 |
| 3.1.1 | <i>Insm1</i> wird während der Morphogenese der Adenohypophyse exprimiert | 34 |
| 3.1.2 | Die Expression von <i>Insm1</i> bleibt in der adulten Adenohypophyse erhalten | 35 |
| 3.2 | <i>Insm1</i> ist essentiell für die Differenzierung der neuroendokrinen Zellen der Adenohypophyse | 36 |
| 3.2.1 | Neuroendokrine Zellen werden in homozygot mutanten <i>Insm1</i> ^{lacZ} -Tieren korrekt spezifiziert | 36 |
| 3.2.2 | Die Differenzierungsprogramme verschiedener Zelltypen der Adenohypophyse in homozygot mutanten <i>Insm1</i> ^{lacZ} -Tieren verlaufen nicht normal | 37 |

| | |
|---|----|
| 3.2.3 Die Differenzierung von hormonproduzierenden Zellen ist in homozygoten <i>Insm1</i> ^{lacZ} -Mäusen blockiert | 43 |
| 3.3 <i>Insm1</i> ist für die Expression von Genen der endokrinen Sekretionsmaschinerie essentiell | 45 |
| 3.3.1 Genomweite Expressionsanalyse mit „microarrays“ | 45 |
| 3.3.2 Deregulierung endokriner Gene in <i>Insm1</i> ^{lacZ/lacZ} -Tieren | 47 |
| 3.3.3 Verschiedene Gene werden in <i>Insm1</i> -mutanten Mäusen ektopisch ausgeprägt | 48 |
| 3.3.4 Verstärkte Aktivität des <i>Notch</i> -Signalwegs in der Hypophyse <i>Insm1</i> -mutanter Mäuse | 49 |
| 3.4 Identifikation von Interaktionspartnern von <i>Insm1</i> | 51 |
| 3.4.1 Proteomweite Analyse von Bindungspartnern für <i>Insm1</i> | 51 |
| 3.4.2 <i>Insm1</i> interagiert mit chromatinmodifizierenden Proteinen | 53 |
| 3.4.3 Die SNAG-Domäne vermittelt spezifische Interaktionen von <i>Insm1</i> | 54 |
| | |
| 4 Diskussion | 57 |
| 4.1 Die Expression von <i>Insm1</i> in der Adenohypophyse | 57 |
| 4.2 <i>Insm1</i> ist essentiell für die korrekte Differenzierung neuroendokriner Zellen der Adenohypophyse | 58 |
| 4.3 <i>Insm1</i> interagiert mit Proteinen, die die Chromatinstruktur beeinflussen | 62 |
| 4.4 Ausblick | 64 |
| | |
| 5 Literatur | 65 |
| | |
| 6 Zusammenfassung | 76 |
| | |
| Anhang | 78 |
| Abkürzungsverzeichnis | 78 |
| Verwendete Chemikalien und Enzyme | 80 |
| Verwendete Lösungen und Medien | 82 |
| Danksagung | 85 |
| Eidesstattliche Erklärung | 86 |

1 Einleitung

Das neuroendokrine System der Adenohypophyse ist für die Steuerung der Körperfunktionen verantwortlich. Diese Regulation erfolgt über die Ausschüttung chemischer Botenstoffe, der Hormone, die über den Blutkreislauf zu ihren Zielorganen gelangen und dort von spezifischen Rezeptoren erkannt werden. Produktion und Ausschüttung der Hormone werden durch hormonelle Regelkreise und durch neuronale Stimuli reguliert. Die Regulation des neuroendokrinen Systems ist hierarchisch organisiert. Auf der ersten Stufe stehen dabei Zellen des Zentralnervensystems. Diese sezernieren Steuerhormone für die zweite Stufe, die Adenohypophyse. Die Adenohypophyse wiederum reguliert über die Ausschüttung glandotroper Hormone die Funktion peripherer Hormondrüsen, die die dritte Stufe repräsentieren.

1.1 Die Hirnanhangdrüse

Die Hirnanhangdrüse oder Hypophyse fungiert als Schnittstelle zwischen dem zentralen Nervensystem und peripheren Zielorganen. Sie nimmt als wichtiges, übergeordnetes endokrines Organ eine Schlüsselstellung bei der Regulation hormonproduzierender Drüsen des gesamten Körpers ein. Sie steuert so diverse physiologische Funktionen wie Wachstum, Metabolismus, Fortpflanzung und Laktation, sowie die Reaktion auf Stress. Die Hypophyse besteht aus zwei anatomisch unabhängigen Gebilden, zum einen dem auch als Neurohypophyse bezeichneten Hypophysen-Hinterlappen, zum anderen der Adenohypophyse, die den Hypophysenvorder- und den Intermediärlappen umfasst (Abb. 1).

Im Hypothalamus, genauer in den Nuclei supraopticus und paraventricularis liegende magnozellularäre Neurone, projizieren auf die Neurohypophyse und synthetisieren die Peptidhormone Oxytozin und Vasopressin, die als Effektorhormone wirken. Verstreut im Hypothalamus liegende, peptiderge Neuronen projizieren auf den Hypophysenstiel und sezernieren Liberine und Statine als Steuerhormone für die Adenohypophyse (Blackwell und Guillemin, 1973). Diese Sekretion erfolgt innerhalb der Eminentia mediana, einem Pfortadersystem, über das die Faktoren auch in die Adenohypophyse gelangen.

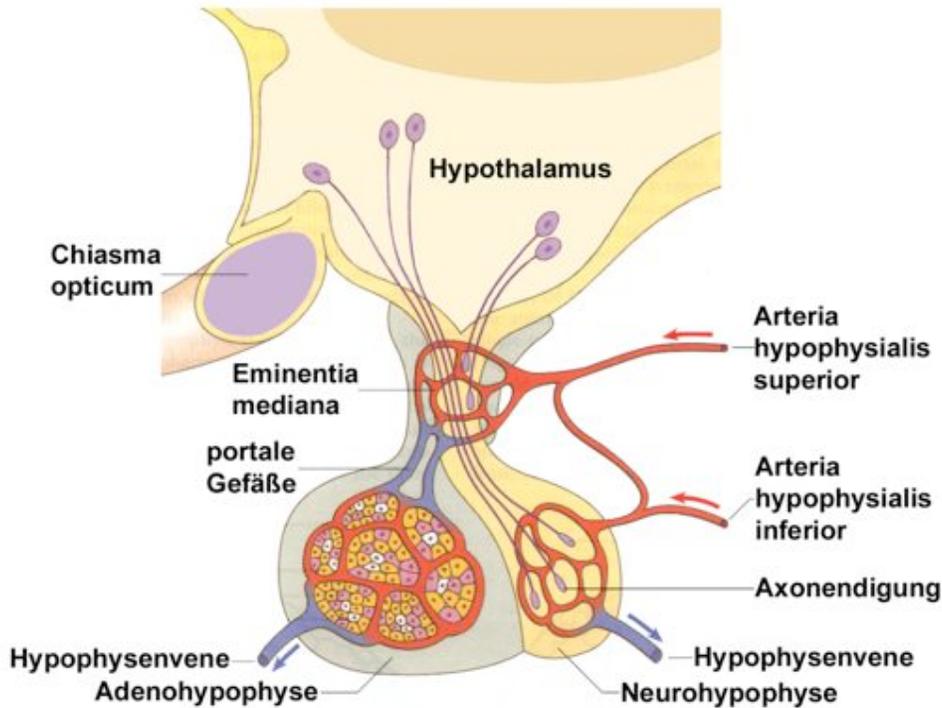


Abb. 1: Schematische Darstellung der Hypophyse. Die Hirnanhangdrüse gliedert sich in die Neuro- und die Adenohypophyse. Die Neurohypophyse beherbergt Endigungen im Hypothalamus liegender magnozellularer Neurone. Diese sezernieren Effektorhormone, welche direkt in den Blutkreislauf eingespeist werden. Andere Neurone produzieren Steuerhormone für die Adenohypophyse. Diese Liberine und Statine werden über die Eminentia mediana der Adenohypophyse zugeführt, wo sie die Freisetzung der entsprechenden Effektorhormone in die Blutzirkulation regulieren. (modifiziert nach Gray's Anatomy, 2008)

Im Vorder- und Intermediärlappen der Adenohypophyse finden sich sechs verschiedene Zelltypen, die über die von ihnen sezernierten Peptidhormone definiert werden. Somatotrope Zellen produzieren und sezernieren das Wachstumshormon Somatotropin („Growth Hormone“ = GH). Dieses wirkt generell anabol als Effektorhormon (Silberberg und Silberberg, 1942). Melanotrope Zellen sind durch die Sekretion von Melanotropin („Melanocyte Stimulating Hormone“ = MSH) gekennzeichnet, das die Melaninbildung in Melanocyten der Haut anregt. Weiterhin bilden sie α - und γ -Endorphine. Corticotrope Zellen sezernieren das adrenocorticotrope Hormon („Adrenocorticotrope Hormone“ = ACTH), welches in der Nebennierenrinde die Produktion von Androgenen sowie von Mineralo- und Glucocorticoiden stimuliert, und β -Endorphin. Endorphine spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei der Modulation der Schmerzempfindung (Stein und Lang, 2009). Die Thyroxin-, Trijodthyronin- und Kalzitoningproduktion in der Schilddrüse

wird durch Thyrotropin („Thyroid Stimulating Hormone“ = TSH) reguliert. Dieses wird in den thyrotropen Zellen der Adenohypophyse gebildet. Hier sind zwei unterschiedliche Populationen zu unterscheiden. Zum einen gibt es die sehr früh differenzierenden embryonalen thyrotropen Zellen in der rostralen Spitze der Adenohypophyse, diese gehen nach der Geburt verloren. Zum anderen bildet sich etwas später eine weitere Thyrotropin-positive Population, deren Zellen liegen weiter caudal. Das in laktotropen Zellen gebildete Prolaktin (Prl) wirkt bei weiblichen Säugetieren positiv auf die Milchdrüsen und über eine negative Rückkopplung auf den Hypothalamus, wo die Sekretion des Prolaktoliberins gehemmt wird. Bei männlichen Säugern wird durch Prolaktin über Rezeptoren auf den Leydig-Zellen die Testosteronbildung stimuliert. Der letzte Zelltyp, die gonadotropen Zellen, zeichnet sich durch die Expression von Follitropin („Follicle Stimulating Hormone“ = FSH) und Lutropin („Luteinizing Hormone“ = LH) aus. Beide Hormone wirken auf die Keimdrüsen und sind für die Fortpflanzung essentiell.

1.2 Die Morphogenese der Hirnanhangdrüse

Die beiden Einheiten der Hirnanhangdrüse, die Adeno- und die Neurohypophyse, interagieren nicht nur physiologisch sondern auch räumlich während der Morphogenese. Die Adenohypophyse leitet sich ontogenetisch von der Hypophysen-Plakode ab (Couly und Le Douarin, 1985). Diese entsteht am anterioren Ende der Neuralleiste und wandert im Verlauf der Morphogenese des Kopfs in das stomodeale Ektoderm am Dach der Mundhöhle. Die Neuronen des Hypothalamus, die mit ihren Projektionen die Neurohypophyse bilden, entstammen einem Bereich der Neuralplatte, der zu Beginn der Migration benachbart zur Hypophysen-Plakode liegt (Abb.: 2A).. Gleichzeitig zur Migration der Hypophysen-Plakode wandert der zukünftige Hypothalamus in das ventrale Diencephalon und hält so engen Kontakt mit ihr. Die eigentliche Morphogenese der Adenohypophyse beginnt dann mit einer Verdickung der Hypophysen-Plakode im Embryonastadium E8 der Maus (Abb.: 2B). Darauf folgt die Bildung von Rathke's Tasche, einer fingerartigen Einstülpung der Hypophysen-Plakode am Dach der Mundhöhle (E9,5). Gleichzeitig bildet das ventrale Diencephalon das Infundibulum, einen Auswuchs, der als Vorläufer der Neurohypophyse zu sehen ist. Rathke's Tasche dehnt sich dann dorsal aus, und um E12 schließt sich die Verbindung zur Mundhöhle. Im

weiteren Verlauf der Entwicklung expandiert Rathke's Tasche und bildet den Vorder- und Intermediärlappen, während das Infundibulum den Hypophysenhinterlappen bildet. Die Verdickung und Einstülpung der Hypophysen-Plakode ist abhängig von verschiedenen Signalmolekülen wie Bmp, Fgf, Wnt und Shh, welche ihren Ursprung sowohl im ventralen Diencephalon als auch im umgebenden Mesenchym haben (El Amraoui und Dubois, 1993).

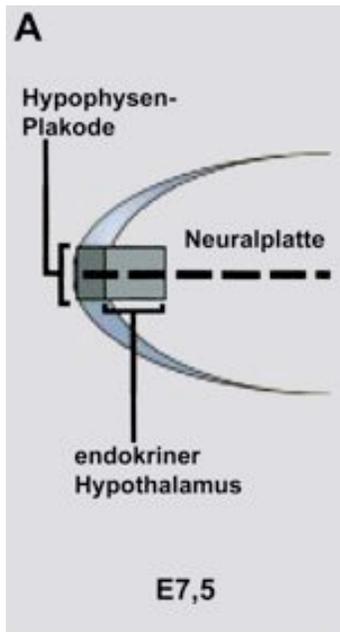
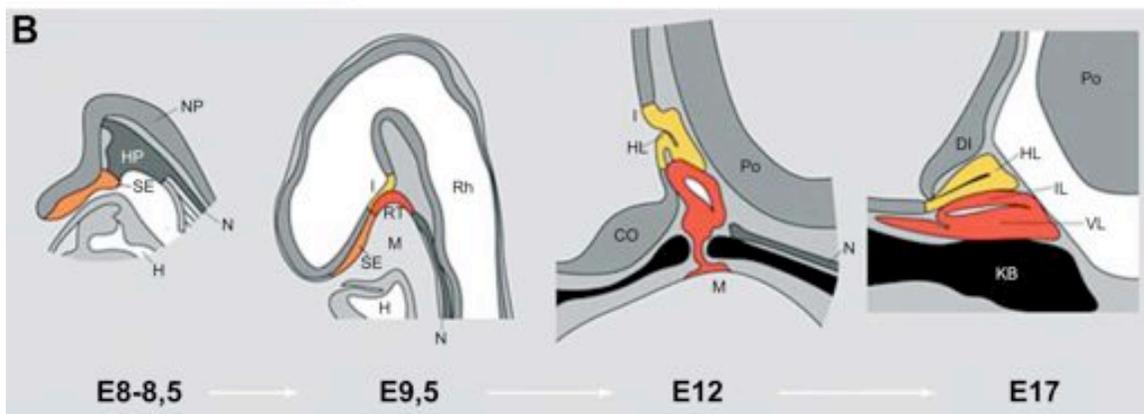


Abb. 2: Die Morphogenese der Hirnanhangdrüse. Schematische Darstellung der ontogenetischen Entwicklung der Hypophyse in der Maus. **(A)** Die Hypophysen-Plakode liegt am anterioren Ende der Neuralleiste. Die benachbarten Zellen der Neuralplatte bilden später den endokrinen Hypothalamus und den Hinterlappen der Hypophyse. Die Hypophysen-Plakode wandert zwischen E7,5 und E8,5 in das stomodale Ektoderm. **(B)** Im Embryonalstadium E8,5 hat die Hypophysen-Plakode ihre finale Position im stomodealen Ektoderm erreicht. E9,5 beginnt die Invagination von Rathke's Tasche sowie die Ausstülpung des Infundibulums. Im weiteren Verlauf dehnt sich Rathke's Tasche dorsal aus und das Infundibulum streckt sich ihr entgegen. E12 schließt sich die Verbindung zur Mundhöhle. Anschließend expandiert Rathke's Tasche und bildet den Vorder- und Intermediärlappen der Hypophyse. Aus dem Infundibulum geht der Hinterlappen hervor. CO = Chiasma opticum, DI = Diencephalon, H = Herz, HL = Hinterlappen, HP = Hypophysen-Plakode, I = Infundibulum, IL = Intermediärlappen, KB = Keilbein, M = Mundhöhle, N = Notochord, NP = Neuralplatte, Po = Pons, Rh = Rhombencephalon, RT = Rathke Tasche, SE = stomodeales Ektoderm, VL = Vorderlappen. (modifiziert nach Zhu et al., 2007 (A) und Kelberman et al.: 2009 (B))



1.3 Die Entwicklung der verschiedenen Zelltypen in der Adenohypophyse

Die Hypophysen-Plakode entstammt der anterioren Neuralleiste, wo aufgrund räumlicher Signale aus der anterior-posterior- und dorsal-ventral-Achsenbildung schon sehr früh eine Musterbildung erfolgt, die diese Plakode determiniert. Während der Invagination und Expansion von Rathke's Tasche entstehen durch induktive Interaktionen zwischen der Hypophysen-Plakode und dem ventralen Diencephalon sowie dem sie umgebenden Mesenchym dorsoventrale und ventrodorsale Gradienten aus Signalmolekülen. Diese überlappenden Gradienten dirigieren ihrerseits die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren. Vor allem ein dorsoventraler Gradient von Fgf8, das von Zellen des Infundibulums sezerniert wird, und ein ventrodorsaler Gradient aus Bmp2, das dem ventral gelegenen Mesenchym entstammt, sind für diese Musterbildungsprozesse wichtig (Ericson et al., 1998; Treier et al., 1998). Auf diese Weise werden spezialisierte räumliche und zeitliche Bereiche festgelegt, in denen später die verschiedenen endokrinen Zelltypen entstehen.

Die ersten Zellen, die während der Embryonalentwicklung differenzieren, sind embryonale thyrotrope Zellen. Die α -Untereinheit des Thyrotropins („ α -Glycoprotein Subunit“ = α GSU) kann erstmals E11,5 in Zellen der rostralen Spitze der Adenohypophyse nachgewiesen werden. Einen Tag später ist auch die β -Untereinheit TSH β nachweisbar (Pope et al., 2006). Es ist bisher nicht klar, welche Transkriptionsfaktoren die Differenzierung dieser frühen thyrotropen Zellen steuern, da deren Entwicklung sehr wenig untersucht wurde. Ebenfalls E12,5 können ventral des Lumens von Rathke's Tasche differenzierte corticotrope Zellen beobachtet werden. Diese Zellen exprimieren Proopiomelanocortin (POMC), das in ACTH und andere Peptide gespalten wird (Loh et al., 1982). Corticotrope Zellen sind für ihre Differenzierung von der Expression des Transkriptionsfaktors *Tbx19* abhängig (Pulichino et al., 2003). Die Zellen können durch die Expression von *NeuroD1* definiert werden (Abb.: 3) (Lamolet et al., 2004). Ab E14,5 ist POMC auch in Zellen dorsal des Lumens von Rathke's Tasche nachweisbar. In diesen melanotropen Zellen, die im

Intermediärlappen liegen, wird POMC zu MSH gespalten. Auch für die Differenzierung dieser melanotropen Zellen ist *Tbx19* essentiell. Die somatotropen, laktotropen und die späten thyrotropen Zellen sind für ihre korrekte Differenzierung alle auf die sequentielle Expression der Transkriptionsfaktoren *Prop1* und *Pit1* angewiesen (Wu et al., 1998; Camper et al., 1990). Sie werden deshalb auch als die „Pit-Lineage“ bezeichnet, und exprimieren ab E15,5 die entsprechenden Hormone GH, Prl, und TSH- β . Die spät differenzierende Population der thyrotropen Zellen ist außerdem durch die Expression von *Gata2* gekennzeichnet (Dasen et al., 1999). Gonadotrope Zellen differenzieren als letzter endokriner Zelltyp, und benötigen den Transkriptionsfaktor *SF1* (Parker und Schimmer, 1996; Zhao et al., 2001). Die Transkripte der entsprechenden Hormone, die β -Untereinheit des luteinisierenden Hormons (LH β) und die β -Untereinheit des Follitropins (FSH β), können erstmals E16,5 bzw. E17,5 nachgewiesen werden (Vesper et al., 2006).

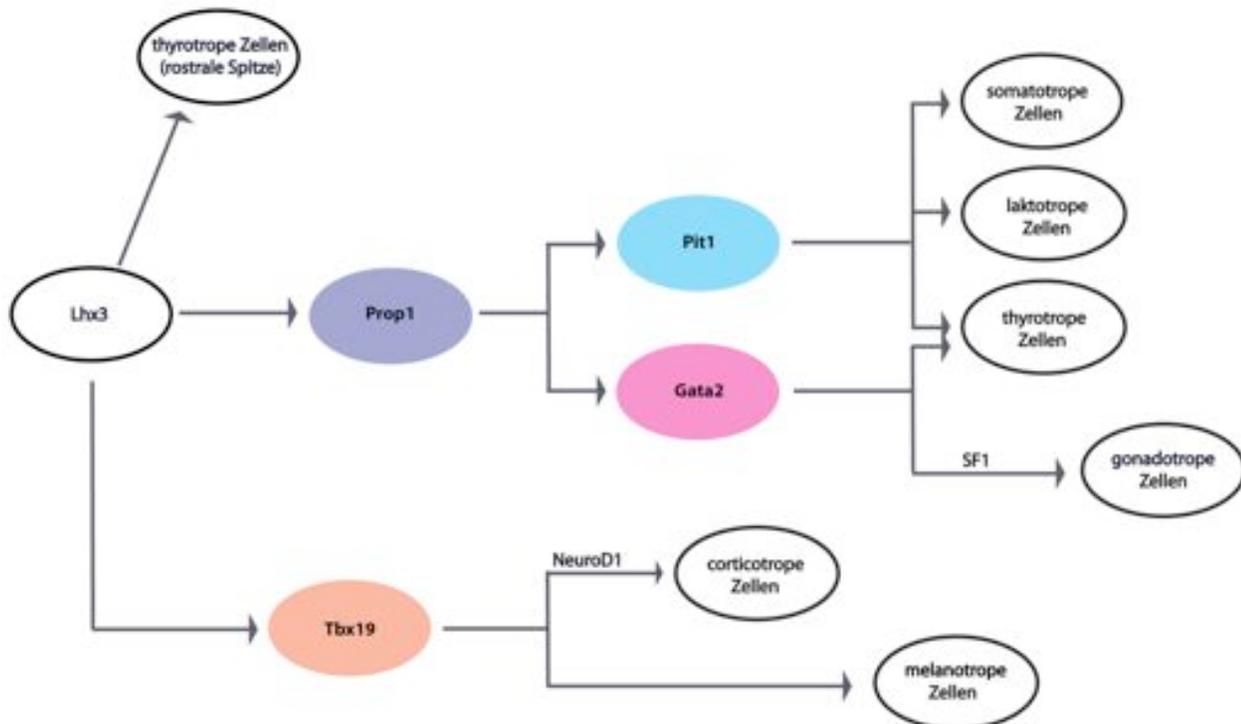


Abb. 3: Transkriptionsfaktoren in der Differenzierung der verschiedenen Zelltypen der Adenohypophyse. Schematische Darstellung der verschiedenen Differenzierungsprogramme innerhalb der Adenohypophyse mit der Expression der für die einzelnen Programme charakteristischen Transkriptionsfaktoren. (modifiziert nach Treier und Rosenfeld, 1996)

1.4 Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor *Insm1*

Das den Zinkfinger-Transkriptionsfaktor *Insm1* (*Insulinoma-associated 1*) kodierende Gen liegt auf dem Plusstrang des Chromosoms 2 der Maus. Es umfasst ein einzelnes Exon (Lan et al., 1994, Xie et al., 2002). Die erste cDNA des humanen Gens wurde aus einer Substraktions-Bibliothek isoliert, die aus Insulinoma- und Glucagonomageweben erstellt worden war (Goto et al., 1992). Darüber hinaus ließ sich die Transkription von *Insm1* auch in anderen Tumoren neuroendokrinen Ursprungs nachweisen, darunter in kleinzelligen Lungentumoren, in Tumoren der Hirnanhangdrüse und der Schilddrüse, in Medulloblastomen, Neuroblastomen, Retinoblastomen und Pheochromocytomen (Goto et al., 1992, Lan et al., 1993). Während der Embryogenese wird *Insm1* in verschiedenen neuroendokrinen Geweben exprimiert, so konnte das Transkript in endokrinem Pankreas, Thymus, Schilddrüse, Nebenniere und endokrinen Zellen des Gastrointestinaltrakts sowie der Lunge nachgewiesen werden. Im Zentralnervensystem wird *Insm1* transient in allen postmitotischen Neuronen, auch während der adulten Neurogenese, exprimiert (Breslin et al., 2002; Duggan et al., 2008; Mellitzer et al., 2006; Xie et al., 2002; Zhu et al., 2002).

Die Analyse von *Insm1* mutanten Mäusen, die durch gezielte Mutagenese hergestellt worden waren, zeigte, daß *Insm1* für die Differenzierung verschiedener neuroendokriner Zellen essentiell ist: (i) chromaffine Zellen der Nebenniere differenzieren nicht und sind nicht in der Lage, Catecholamine zu synthetisieren (Wildner et al., 2008); (ii) endokrine Zellen im Pankreas werden zwar korrekt spezifiziert, differenzieren aber nicht korrekt und produzieren z.B. nur geringe Mengen Insulin; (iii) endokrine Zellen des Dünndarms differenzieren ebenfalls nicht, obwohl die Vorläuferzellen korrekt gebildet werden (Gierl et al., 2006). Darüber hinaus sind verschiedene neuronale Zelltypen in ihrer Differenzierung gestört, z.B. Neurone des sympathischen Nervensystems, monoaminerge Neuronen des Rhombencephalons, und corticale Neurone (Wildner et al., 2008; Jacob et al., 2009, Farkas et al., 2008). *Insm1* ist also ein wichtiger Faktor für endokrine und neuronale Differenzierung.

Das Insm1-Protein der Maus besteht aus 521 Aminosäuren. In der carboxyterminalen Hälfte finden sich fünf, in symmetrischen Abständen angeordnete Zinkfingerdomänen. Die Zinkfingerdomänen zwei und drei sind hoch konserviert und reihen Insm1 in die EIN-Familie (EIN = Egl-46/Insm1/Nerfin) der Zinkfingerfaktoren ein (Stivers et al., 2000). Neben Insm1 und Insm2 gehören die Homologen Egl-46 (*C. elegans*), Nerfin-1 und -2 (*D. melanogaster*) zu dieser Familie. In *C. elegans* führt ein Verlust von Egl-46 zur Störung neuronaler Zellmigration, axonalen Wachstums und der Neurotransmittersynthese (Wu et al., 2001; Yu et al., 2003). In *Drosophila* hat die Nullmutation von Nerfin-1 Störungen der axonalen Wegfindung im Zentralnervensystem zur Folge (Kuzin et al., 2005).

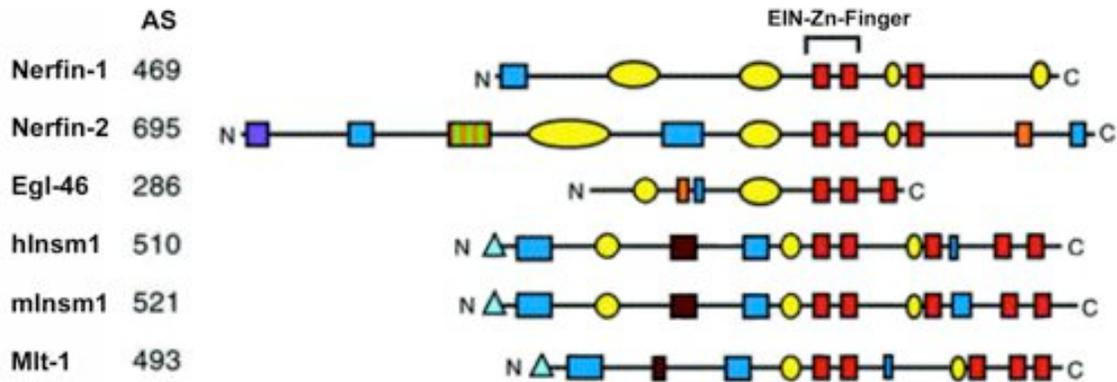


Abb. 4: Domänenstruktur des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors Insm1 und seiner Homologe aus anderen Organismen. Schematische Darstellung der Proteindomänen von Nerfin-1 und -2 (*D. melanogaster*), Egl-46 (*C. elegans*), Insm1 (*H. sapiens* und *M. musculus*), Insm2 und Mlt-1 (beide *M. musculus*). Die Ausrichtung der Primärstrukturen erfolgte an den hoch konservierten Zinkfinger-Domänen, welche die EIN-Familie definieren. Die farbige Markierung der einzelnen Domänen erschliesst sich wie folgt: hellblaue Dreiecke = SNAG-Repressordomänen; blaue Rechtecke = prolinreiche Sequenzen; gelbe Ovale = reich an geladenen Aminosäuren; rote Rechtecke = Zinkfinger-Motive; dunkelblaue Rechtecke = histidin-/prolinreiche Sequenzen; orange Rechtecke = glutaminreiche Sequenzen; orange-grün gestreifte Rechtecke = glutamin-/histidinreiche Sequenzen; braune Rechtecke = glyzinreiche Sequenzen. Die Länge der Aminosäureketten (AS) ist angegeben und Amino- (N) und Carboxy- (C) Termini sind eingezeichnet. (modifiziert nach Stivers et al., 2000)

Am aminoterminalen Ende besitzt Insm1 eine SNAG (Snail and Gfi)-Domäne (Grimes et al., 1996). Diese ist in Vertebraten in Snail-, Scratch-, Insm-, Gfi-, Ovol- und Gsh-Proteinen konserviert (Abb.: 5). Die SNAG-Domäne ist notwendig für die Interaktion der Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren mit ihren Ko-Repressoren. So konnte gezeigt werden, dass Snai1, Snai2 und Scrt1 über ihre SNAG-Domänen mit

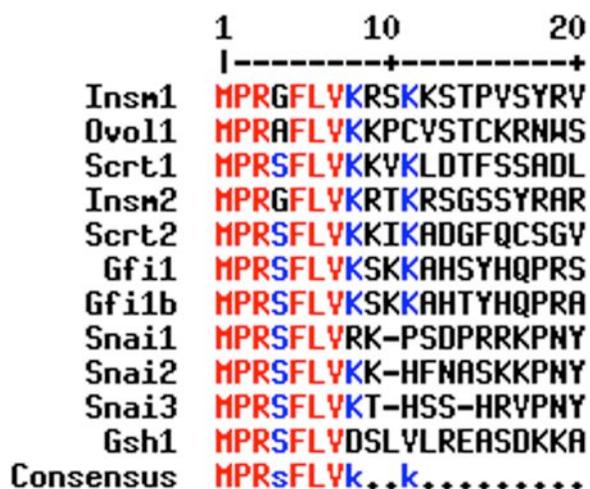


Abb. 5: Die SNAG-Domäne ist in verschiedenen Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren konserviert.

Darstellung der Peptidsequenzen der N-terminalen SNAG-Domänen verschiedener Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren.

Aminosäuren, die in allen dargestellten Proteinen identisch sind, sind in rot, solche die in mehr als der Hälfte der Proteine identisch sind, in blau gedruckt. Die Konsensus-Sequenz enthält Aminosäuren, die in allen (großer Buchstabe) oder in mehr als 50% (kleiner Buchstabe) der verglichenen Proteine identisch sind.

Proteinen der Ajuba/LIM-Familie interagieren, diese Komplexe reprimieren die Expression von E-Cadherin (Langer et al., 2008). Ebenfalls reprimierend auf den E-Cadherin-Promotor wirkt ein Komplex aus Snail, dem Korepressor mSin3A und den Histon-Deacetylasen HDAC1 und -2 (Peinado et al., 2004). Eine weitere Arbeit zeigte, dass Snail1 über seine SNAG-Domäne mit der lysin-spezifischen Demethylase Lsd1 und dem Ko-Repressor CoREST interagiert (Lin et al., 2010). Ovol1, ein weiterer Zinkfinger-Transkriptionsfaktor mit SNAG-Domäne, interagiert mit den Histon-Deacetylasen HDAC1, -2 und -3. Die Deletion der SNAG-Domäne verhindert diese Bindung (Nair et al., 2007). Die Punktmutation P2A in der SNAG-Domäne von Gfi1b beeinträchtigt ebenfalls die Bindung an seine Ko-Faktoren. Intaktes Gfi1b interagiert mit den CoREST-Ko-Repressoren Rcor1, -2 und -3, der lysin-spezifischen Histon-Demethylase Lsd1 sowie den Histon-Deacetylasen HDAC1 und -2 (Saleque et al., 2007).

Verschiedene biochemische Studien haben untersucht, welche Proteine mit Insm1 interagieren. So wurde gezeigt, dass Insm1 HDAC1 und -3, Cap (Cbl-Associated-Protein) und CyclinD1 binden kann (Liu et al., 2006; Xie et al., 2002; Zhang et al., 2009). In diesen Arbeiten wird vermutet, dass Insm1 mit den prolinreichen Sequenzen in seinem aminoterminalen Abschnitt an Cap und CyclinD1 bindet.

1.5 Epigenetische Prozesse in der Hypophysenentwicklung

Für die Differenzierung unterschiedlicher Zelltypen ist die Etablierung differenzieller Expressionsmuster essentiell. Bis auf wenige Ausnahmen besitzen alle Zellen eines Organismus eine identische genetische Ausstattung. Differenzielle Expressionsprogramme können somit nur durch die unterschiedliche Nutzung dieser Gene festgelegt werden. Die abweichende Expression in verschiedenen Zelltypen wird über die Regulation von Transkriptionsfaktoren und Chromatinstruktur erreicht (Harnicarova Horakova et al., 2010). Über verschiedene kovalente Modifikationen der DNA und der assoziierten Histone werden unterschiedliche Bereiche des Genoms in transkriptionell aktive Bereiche, das Euchromatin, und transkriptionell inaktive Bereiche, das Heterochromatin, gegliedert. Diese epigenetische Regulation wird von Chromatin-modifizierenden Enzymen ausgeführt (Ho und Crabtree, 2010).

Die wichtigste Modifikation der DNA ist die Methylierung von Cytosin-Resten, die repressiv auf die Genexpression wirkt, d.h. stark methylierte DNA-Bereiche werden nicht transkribiert (Meehan et al., 1992). Während die Stilllegung von Genen durch die Methylierung von DNA eher langfristiger Natur ist, ist die Regulation der Genaktivität über die Modifizierung von Histonen plastischer. Verschiedene Modifikationen an Histonen regulieren die Zugänglichkeit der DNA für die verschiedensten Proteinkomplexe, wie zum Beispiel die Transkriptionsmaschinerie. Bisher ist eine ganze Reihe verschiedener, reversibler Histonmodifikationen identifiziert worden. Histone können methyliert, acetyliert, phosphoryliert, ubiquitiniert, sumoyliert und ADP-ribosyliert werden (Bhaumik et al., 2007; Ito, 2007). Die verschiedenen Reste werden in den meisten Fällen auf die aminoterminalen Histonschwänze, die aus den Nukleosomen herausragen, übertragen. Dabei entscheiden die Art, Anzahl und Aminosäureposition der Modifikation darüber, ob eine Modifikation aktivierend oder repressiv auf die Transkription wirkt. Weiterhin entscheidet die Modifikationskombinatorik über die Rekrutierung von Proteinen, die wiederum darüber entscheiden, ob das Chromatin aktiv oder inaktiv ist (Hon et al., 2009). In Analogie zum genetischen Code werden diese komplexen Histonmodifikationen auch Histon-Code genannt.

Bisher ist nur eine Studie veröffentlicht, die sich mit der Bedeutung epigenetischer Mechanismen während der Organogenese der Hirnanhangdrüse beschäftigt. In dieser wurde eine organspezifische Nullmutation des *Lsd1*-Gens untersucht (Wang et al., 2007). *Lsd1* kodiert eine lysinspezifische Demethylase, die mono- und dimethylierte Lysinreste an den Positionen vier und neun von Histon3 (H3K4 und H3K9) demethyliert (Shi et al., 2004; Metzger et al., 2005). Der Verlust von *Lsd1* in der sich entwickelnden Adenohypophyse führt zu einer Störung der späten Zelltyp-Determinierung und zu einer Blockade der terminalen Differenzierung sämtlicher Zelltypen.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Insm1 spielt für die Entwicklung verschiedener endokriner Zelltypen der Maus eine Rolle und wird in verschiedenen transformierten Zelllinien, die aus Hypophysentumoren gewonnen wurden, exprimiert. Daher untersuchte ich, ob *Insm1* auch für die Organogenese der Adenohypophyse wichtig ist. Ich analysierte dazu die phänotypischen Veränderungen der Adenohypophyse in *Insm1* mutanten Mäusen. Ein weiteres Ziel war es, einen Einblick in die mechanistische Wirkungsweise dieses Zinkfinger-Transkriptionsfaktors zu erlangen. Dazu wurde ein proteomweites „screening“ nach Interaktionspartnern von *Insm1* in einer endokrinen Zelllinie, AtT-20, durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborausstattung

Die benutzten Chemikalien und Enzyme sind in Tab. A1 des Anhangs oder im Text jeweils mit der Angabe des Herstellers aufgeführt. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Medien findet sich in Tab. A2 des Anhangs. Sonstige Lösungen und Medien wurden gemäß Sambrook und Russell (2001) hergestellt. Benutzte Werkzeuge, Geräte, Labor- und verbrauchte Einmalware sind im Text mit der Angabe des Herstellers aufgeführt oder Standardausstattung von biologischen Laboren. Die Experimente dieser Arbeit wurden soweit nicht anders vermerkt im Labor von Prof. Dr. Carmen Birchmeier (C. B.) am Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin, Berlin (MDC) durchgeführt.

2.1.2 DNA-Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten DNA-Oligonukleotide (Tab. 1) wurden von MWG Eurofins, Ebersberg bezogen. Der Name, die DNA-Sequenz, die Art (PCR-Amplifikat, doppelsträngiger Adaptor) und der Verwendungszweck des Produkts sind aufgeführt.

Tab. 1: verwendete DNA-Oligonukleotide

| Name | Sequenz (5'-3') | Produkt / Zweck |
|-----------------------|--|--|
| Insm1-lacZ_wt.1 | CGTCGCCAGGCCTATCT | Genotypisierungsprimer |
| Insm1-lacZ_wt.2 | ACCGAGGGCGCACTCTA | |
| Insm1-lacZ_lacZ | GACCCGCATTGACCCTAA | |
| 3xFLAG_Nc oI_XbaI_up | catggactacaagaccatgacgggtgattataaagatcatgacatcgattacaaggatgacgatgacaagtaat | Adaptor / Einbringung des 3xFLAG-tags in die Insm1-Sequenz |
| 3xFLAG_Nc oI_XbaI_low | ctagattactgtcatcgtcatccttgaatgatgcatgatctttataatcaccgtcatggtctttgtagtc | |

| | | |
|-------------------------------|--|---|
| pZERO_Ins m1-2_wt | ACACGGGCGTGGACTTCTTGCTGCGCTTCACCA GAAACCCGCGGGGCATGGCGGCCGCGTGTTCAT AGCTGTTTCCTG | Amplifikation von pZErO-2 / Rekombination von Insm1 |
| pZERO_Ins m1_1 | CTGAGAATAGACAGGTGATCCTCCTTCAGGTG CCTGTGCGTCCGGCCTGCGCCATGGTCTAGACT GGCCGTCGTTTTAC | |
| pZERO_Ins m1- 2_SNAGdel | CGGTAGGACACGGGCGTGGACTTCTTGCTGCG CTTCACCAGAAACCCGCGGGcCATcGCGGCCGC GTGTCATAGCTGTTTCCTG | Amplifikation von pZErO-2 / Rekombination von Insm1 mit deletierter SNAG-Domäne |
| pZERO_Ins m1_1 | CTGAGAATAGACAGGTGATCCTCCTTCAGGTG CCTGTGCGTCCGGCCTGCGCCATGGTCTAGACT GGCCGTCGTTTTAC | |
| Gata2-up | AAGTCAGGGACCCTATTCGT | <i>in-situ-Sonde Gata2</i> |
| Gata2-lw | GGGCTCAGCAGTAGAGAGTA | |
| Prop1-up | GTCTGGTTCCAGAACCGCAG | <i>in-situ-Sonde Prop1</i> |
| Prop1-lw | CCCCACCCCCGTTTCTAGG | |
| Dll1-up | CTTCCCTCTGTGTCTTATC | <i>in-situ-Sonde Dll1</i> |
| Dll1-lw | GCAGGGCAGAGACCACGGC | |
| Ascl1-up | AGGGAACGTGGAAGGCGTAC | <i>in-situ-Sonde Ascl1</i> |
| Ascl1-lw | CTGCTGCGCGCTCTGAGCTG | |
| Hes1-up | TCTGGAGCTGGTGTGATAA | <i>in-situ-Sonde Hes1</i> |
| Hes1-lw | CGTCTTTGGTTTGTCCGGTG | |
| Tbx19-up | CCCTGCTGTCACTTCACCTC | <i>in-situ-Sonde Tbx19</i> |
| Tbx19-lw | CCTCAAACCATGCACCGACT | |
| Actc1-up | GACCTCGAGCACTGCTGAACGTGAAATTGTCC | <i>in-situ-Sonde Actc1</i> |
| Actc1-lw-T3 | AATTAACCCTCACTAAAGGGCGGCCGCTGCAA GTCCTGGTCTGGTTT | |
| Msc-up | GACCTCGAGCAGTGCAAACCTTCTGTAACCA | <i>in-situ-Sonde Msc</i> |
| Msc-lw-T3 | AATTAACCCTCACTAAAGGGCGGCCGCCCATG ATAGTGCAGCATTGCC | |
| Tnnt1-up | GACCTCGAGAGAAGAGCGCCCCAAACCC | <i>in-situ-Sonde Tnnt1</i> |
| Tnnt1-lw-T3 | AATTAACCCTCACTAAAGGGCGGCCGCGTCAT GTCCTGGCAGTCTCAC | |
| Sln-up | GACCTCGAGAGTTGTCCTCATCACCGTT | <i>in-situ-Sonde Sln</i> |
| Sln-lw-T3 | AATTAACCCTCACTAAAGGGCGGCCGCGGAAC AAAGCTAAGGCTCAC | |
| Myl1-up | GACCTCGAGCCCCAGCCAAACCTAAGGA | <i>in-situ-Sonde Myl1</i> |
| Myl1-lw-T3 | AATTAACCCTCACTAAAGGGCGGCCGCTCAAC TGTAGGCATGTTTGTG | |

2.1.3 siRNAs gegen das Insm1-Transkript

Die verwendeten siRNAs wurden von Dharmacon bezogen.

Tab. 2: Verwendete siRNAs

| Name | Zielsequenz in der Insm1-mRNA |
|-----------|-------------------------------|
| mInsm1-09 | GCAAGGAGGAGUACGCUGA |
| mInsm1-11 | UGAACUUCCCACACGAUUA |
| mInsm1-12 | CCACAAAGAGAGAGCGCCC |

2.1.4 Plasmidvektoren

Tab. 3 enthält die hier verwendeten Plasmidvektoren. Genannt sind Name und das enthaltene DNA-Fragment von Interesse („Insert“). Des Weiteren sind die Bezugsquelle und/oder eine Publikation mit der Beschreibung des Vektors genannt.

Tab. 3: Verwendete Plasmidvektoren

| Name | Insert | Bezugsquelle/Referenz |
|-------------------------|---|------------------------------------|
| pBluescript SK II (+) | - | Stratagene, Amsterdam, Niederlande |
| pGEM-T Easy | - | Promega, Mannheim |
| pBS-Insm1-synth.Klon | Insm1-ORF mit 5' FLAG-tag | Hagen Wende (Labor C.B.) |
| pHW106 (pMX-Derivat) | - | Hagen Wende (Labor C.B.) |
| pMX-Insm1-3xFLAG | Insm1-ORF mit 3' 3xFLAG-tag | diese Arbeit |
| pMX-Insm1SNAGdel-3xFLAG | Insm1-ORF mit deletierter SNAG-Domäne und 3' 3xFLAG-tag | diese Arbeit |
| pZErO-2 | - | Invitrogen |
| aGSU | Fragment aus aGSU-mRNA in pBS | Mathias Treier (Uni Köln) |
| GH | Fragment aus GH-mRNA in pBS | Mathias Treier (Uni Köln) |
| Pit1 | Fragment aus Pit1-mRNA in pBS | Mathias Treier (Uni Köln) |

| | | |
|-------------------|-------------------------------|----------------------------|
| POMC | Fragment aus POMC-mRNA in pBS | Mathias Treier (Uni Köln) |
| TSH | Fragment aus TSHb-mRNA in pBS | Mathias Treier (Uni Köln) |
| pBS-Dll1 | PCR-Fragment aus Dll1 | diese Arbeit |
| pBS-Actc1 | PCR-Fragment aus Actc1 | diese Arbeit |
| pBS-Myl1 | PCR-Fragment aus Myl1 | diese Arbeit |
| pBS-Msc | PCR-Fragment aus Msc | diese Arbeit |
| pBS-Tnnt1 | PCR-Fragment aus Tnnt1 | diese Arbeit |
| pBS-Sln | PCR-Fragment aus Sln | diese Arbeit |
| Hey1 | Teil der Hey1-cDNA | Hendrik Wildner (London) |
| pBS-Ascl1 | PCR-Fragment aus Ascl1 | diese Arbeit |
| pBS-Prop1 | PCR-Fragment aus Prop1 | diese Arbeit |
| pBS-Pitx1 | PCR-Fragment aus Pitx1 | diese Arbeit |
| pBS-Hes1 | PCR-Fragment aus Hes1 | diese Arbeit |
| pBS-Tbx19 | PCR-Fragment aus Tbx19 | diese Arbeit |
| pBS-Gata2 | PCR-Fragment aus Gata2 | diese Arbeit |
| SF-1 | Teil der SF1-cDNA | Mathias Gierl (Heidelberg) |
| Math3 | Teil der Math3-cDNA | Thomas Müller (Labor C.B.) |
| pBS-ChgA.1.2 | Teil der ChgA-cDNA | Mathias Gierl (Heidelberg) |
| pBS-ChgB.1.2 | Teil der ChgB-cDNA | Mathias Gierl (Heidelberg) |
| pBS-Scg2.1.2 | Teil der Scg2-cDNA | Mathias Gierl (Heidelberg) |
| pGEM-T-Scg3.1.2 | Teil der Scg3-cDNA | Mathias Gierl (Heidelberg) |
| IMAGp99812411933Q | Teil der Pcsk2-cDNA | Imagenes |
| Pcsk1 | Teil der Pcsk1-cDNA | Mathias Gierl (Heidelberg) |
| pBS-FSH | Teil der Fsh β -cDNA | diese Arbeit |
| pBS-LH | Teil der LH β -cDNA | diese Arbeit |
| pBS-Prl | Teil der Prl-cDNA | diese Arbeit |

2.1.5 Bakterienstämme

Name, Genotyp und Bezugsquelle (Referenz) der verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4: verwendete Bakterienstämme

| Name | Genotyp | Bezugsquelle/Referenz |
|----------------------------------|---|-----------------------|
| <i>Escherichia coli</i> DH10B | F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara, leu)7697 galU galK λ - rpsL nupG | Invitrogen |
| <i>Escherichia coli</i> DY380 | DH10B [lcl857 (cro-bioA) \diamond tet] | Lee et al. (2001) |

2.1.6 Antikörper

In Tab. 5 sind die verwendeten Primär-Antikörper aufgelistet, die die genannten murinen Antigene binden. Die für die verschiedenen Anwendungen verwendete Verdünnung und die Bezugsquelle des Antikörpers ist angegeben. Die benutzten Sekundär-Antikörper für Fluoreszenzimmunhistologie waren anti-Ziege- oder anti-Meerschweinchen-IgG-Antikörper, jeweils gekoppelt an Cy2 oder Cy3 (Dianova, Hamburg); sie wurden 1:500 eingesetzt. Für den immunologischen Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen wurden Sekundär-Antikörper, gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase (HRP) (Jackson ImmunoResearch, 1:3000 in PBS-T), eingesetzt.

Tab. 5: verwendete Primär-Antikörper

| Antigen | Wirtsspezies | Verdünnung | Blockierung bei Western Blot (in PBS-T) | Bezugsquelle |
|---------|-----------------|------------|---|-----------------|
| Insm1 | Meerschweinchen | 1:10000 | 5% BSA | Labor C.B. |
| NeuroD1 | Ziege | 1:500 | | Santa Cruz |
| MSH | Kaninchen | 1:1000 | | F. Quadri (MDC) |
| ACTH | Kaninchen | 1:500 | | Chemicon |
| FLAG | Maus | 1:1000 | 5% BSA | Sigma |
| Rcor1 | Kaninchen | 1:1000 | 5% BSA | Upstate |
| Lsd1 | Kaninchen | 1:1000 | 5% BSA | Cellsignal |
| HDAC1 | Kaninchen | 1:1000 | 5% BSA | Cellsignal |
| HDAC2 | Kaninchen | 1:2000 | 5% Milchpulver | Abcam |

2.1.7 Eukaryotische Zelllinien

Es wurden Phoenix-ECO-Zellen als Verpackungszelllinie zur Produktion replikationsdefizienter Retroviren verwendet (erhalten von Elior Peles, Rehovot, Israel). Des Weiteren wurden der adhären wachsende Subklon D16v-F2 der Zelllinie AtT-20 sowie die Zelllinie GH3 (beide über ATCC, USA bezogen) verwendet.

2.1.8 Mausstämme

Mäuse, die das *Insm1^{lacZ}*-Allel trugen, hatten einen gemischten CD1-129/Ola-C57BL/6-Hintergrund. *Insm1^{lacZ/+}*-Tiere wurden miteinander verpaart, um *Insm1^{lacZ/lacZ}*-Tiere zu erhalten.

2.2 Methoden

Im Folgenden sind die experimentellen Methoden beschrieben, welche bei der Anfertigung dieser Arbeit angewendet wurden. Standardmethoden waren von Sambrook (2001) abgeleitet und sind hier nicht näher behandelt. DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma MWG Eurofins, Ebersberg durchgeführt.

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Isolierung, Manipulation und Aufreinigung von Desoxyribonukleinsäuren

2.2.1.1.1 Präparation von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten

Plasmid-DNA wurde in kleinem Maßstab durch alkalische Lyse isoliert (Birnboim and Doly, 1979). Die so aus 2 ml Bakterienkultur gewonnene DNA wurde in 30 µl TE mit 0,2 µg/µl RNaseA gelöst und bei 4°C gelagert. In größerem Maßstab wurde die Isolierung mit dem Plasmid-Maxi-Präparations-Kit der Firma Invitrogen vorgenommen. Die Plasmid-DNA wurde dabei meist in 100-200 µl TE gelöst und bei -20°C gelagert. Die präparative Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des „NucleoSpin Extract II“-Kit (Macherey- Nagel; (Vogelstein and Gillespie, 1979)).

2.2.1.1.2 Aufreinigung von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten

Für die Transformation durch Elektroporation (s. 2.2.2.2) wurde die verwendete Plasmid-DNA oder der Ligationsansatz durch Mikrodialyse mit einer Nitrozellulosemembran (MF disc MCE phlic, Porengröße 0,025 µm, Durchmesser 25 mm; Millipore) entsalzt. Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Restriktionshydrolysen oder PCI-Extraktionen erfolgte durch Gelfiltration mit Sephadex G-50-Säulen. Solche Säulen wurden aus mit TE gesättigtem Sephadex G-50 in 1 ml Insulin-Spritzen angefertigt, diese wurden zuvor mit Fritten verschlossen. Überschüssiges TE wurde dann für 3 min mit 1800 rpm in einer Bodenzentrifuge (Heraeus Varifuge 3.0; Thermo, Langenselbold) abzentrifugiert. Dann wurde die aufzureinigende Probe auf diese Säule gegeben, erneut 3 min mit 1800 rpm zentrifugiert und die gereinigte Probe in einem Eppendorf-Gefäß aufgefangen.

2.2.1.1.3 Isolierung genomischer DNA aus embryonalem Gewebe und Biopsien

Für PCR-Analysen wurde genomische DNA aus embryonalen Gewebestücken frisch präparierter Embryonen oder Ohrloch- bzw. Schwanzbiopsien von Mäusen isoliert. Die Gewebestücke wurden über Nacht in 50µl Ohr-/Schwanz-Lyse-Puffer bei 55°C verdaut. Daraufhin wurde die ProteinaseK für 10 min bei 95°C inaktiviert. Nach Hinzufügen von 300µl H₂O wurde je 1µl dieser Lösung in PCR-Reaktionen für Genotypisierungen eingesetzt.

2.2.1.1.4 Restriktionshydrolyse von DNA, Ligation von DNA-Fragmenten

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

2.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Klonierung plasmidbasierter DNA-Konstrukte und für die Genotypisierung von Mäusen eingesetzt.

Dafür wurden PCR-Standardmethoden (Sambrook and Russell, 2001) angewendet und PCR-Maschinen von Bio-Rad (München) und Biometra (Göttingen) benutzt. Verwendet wurden die folgenden Polymerasen mit den entsprechenden Puffern gemäß Herstellerangaben: Taq (Invitrogen), Pyrobest, LA-Taq (beide von Takara, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich; bezogen von Cambrex, Potsdam). Die Amplifikationsprodukte aus präparativen PCRs wurden entweder PCI-extrahiert oder elektrophoretisch aufgetrennt und dann isoliert.

Die Routine-Genotypisierung wurde mit DNA durchgeführt, die aus embryonalem Gewebe oder Biopsien extrahiert worden war (s. 2.2.1.1.3). Ein Reaktionsansatz enthielt:

- 1 µl des hitzeinaktivierten Lysats
- 2 µl dNTPs (2,5 mM je Nukleotid; Invitex, Berlin)
- 2 µl 10x Puffer (Invitrogen)
- 1,2 µl Primer 1 (5 µM *Insm1-lacZ_wt.2*)
- 1,2 µl Primer 2 (5 µM *Insm1-lacZ_wt.1* oder *Insm1-lacZ*)
- 1 µl DMSO, 0,8 µl 50 mM MgCl₂ (Invitrogen)
- 0,15 µl Taq
- MilliQ-H₂O ad 20 µl.

Das PCR Programm umfasste 5 min 94°C, 35x den Zyklus 30 s 95°C, 20 s 57°C und 1 min 72°C, schließlich folgte 4°C.

2.2.1.3 „microarray“-Expressionsanalyse

2.2.1.3.1 RNA-Isolierung und -Aufreinigung

Für die „microarray“-Expressionsanalyse, die die Identifizierung differentiell exprimierter Gene erlaubte, wurde Gesamt-RNA aus Hypophysen von Mausembryonen des Stadiums E17,5 isoliert. Die Hypophysen von hetero- und homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Embryonen wurden in eiskaltem PBS herauspräpariert, in 600 µl Trizol überführt, homogenisiert und für 5 min bei RT inkubiert. Diese Suspensionen wurden auf Trockeneis eingefroren und bei -70°C gelagert. Nach erfolgter Genotypisierung wurde jede verwendete Probe mit Trizol auf 1600 µl aufgefüllt. Es wurden 320 µl Chloroform

zugegeben und 15 s vermischt. Anschließend wurde 15 min mit 10000 x g in einer Tischkühlzentrifuge (Universal 32R; Hettich, Tuttlingen) bei 4°C zentrifugiert, die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 2 µl Polyacrylträger (MRC; Fermentas, St. Leon-Rot) zugegeben. Nun wurden 0,83 Volumen Isopropanol zugegeben, durchmischt und die Lösung dann 10 min bei RT inkubiert. Die präzipitierte RNA wurde durch Zentrifugation für 10 min mit 12000 x g in einer Tischkühlzentrifuge bei 4°C pelletiert. Das RNA-Pellet wurde mit 1,5 ml 75 % Ethanol gewaschen, 2 min mit 14000 rpm in einer Tischzentrifuge (Centrifuge 5417; Eppendorf) bei RT sedimentiert, luftgetrocknet und in 100 µl H₂O für die Säulenaufreinigung aufgenommen. Die Säulenaufreinigung der Gesamt-RNA erfolgte mit dem RNeasy MinElute Cleanup-Kit (Qiagen) gemäß Herstellerangaben. Die RNA wurde mit 11 µl H₂O eluiert und die Konzentration photometrisch bestimmt. Die RNA wurde nun für die cDNA-Synthese verwendet oder bei -70°C gelagert.

2.2.1.3.2 cDNA-Synthese, *in-vitro*-Transkription und Biotin-Markierung von cRNA

Die cDNA für die *in-vitro*-Transkription und Biotin-Markierung von cRNA wurde mit dem Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (Applied Biosystems) gemäß Herstellerangaben synthetisiert. Dazu wurden 250ng Gesamt-RNA je Probe eingesetzt. Die aufgereinigte cDNA wurde dann zur Herstellung Biotin-markierter cRNA verwendet. Die Biotin-markierte cRNA wurde danach mit dem RNeasy MinElute Cleanup-Kit (Qiagen) aufgereinigt und mit 14µl H₂O eluiert. Dann wurde die Konzentration der markierten cRNA photometrisch bestimmt und 1125 ng cRNA für die Hybridisierung von „microarrays“ eingesetzt.

2.2.1.3.3 „microarray“-Hybridisierung

Die Biotin-markierte cRNA wurde gemäß Herstellerangaben auf mouseRef-8 v2.0 „microarrays“ (Illumina) hybridisiert. Pro Genotyp wurden je sechs „microarrays“ verwendet. Die Hybridisierung der cRNA und die Dokumentation der Hybridisierungsergebnisse wurden als Dienstleistung von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Norbert Hübner (Experimentelle Genetik von Herz-Kreislaufkrankungen, MDC) durchgeführt. Die Expressionsrohdaten, bestehend aus den normalisierten Expressionsintensitäten, wurden im Rahmen dieser Arbeit weiter bearbeitet und analysiert (s. 2.2.6.2).

2.2.2 Bakterien- und Zellkultur

2.2.2.1 Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen

Bakterien der Stämme *E. coli* DH10B und *E. coli* DY380 wurden elektrokompent gemacht. Dazu wurden sie aus einer Glycerin-Dauerkultur in 5 ml LB-Medium mit den passenden Antibiotika angeimpft und üN bei 32°C kultiviert. Dann wurden 100 ml LB-Medium mit den passenden Antibiotika mit 1 ml dieser Vorkultur angeimpft und bei 32°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert. Die Kultur wurde dann auf 50 ml-Gefäße aufgeteilt, 10 min in Eiswasser gekühlt, 10 min bei 2500 rpm in einer Bodenkühlzentrifuge (Avanti J-20 XP; Beckman Coulter, Krefeld) bei 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 50 ml 10 % Glycerin in eiskaltem H₂O auf Eis resuspendiert, 10 min bei 4000 rpm bei 4°C sedimentiert, wieder in 50 ml 10 % Glycerin aufgenommen, erneut 10 min bei 6000 rpm bei 4°C pelletiert, nochmals in 50 ml 10 % Glycerin aufgenommen und zum Schluss für 10 min bei 8000 rpm bei 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in möglichst wenig 10 % Glycerin resuspendiert und in 26 µl-Aliquots aufgeteilt. Diese wurden entweder direkt für die Elektroporation eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Zur Induktion der homologen Rekombination in *E. coli* DY380-Zellen und anschließender Transformation waren die Zellen, sobald sie eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht hatten, für 15 min bei 42°C inkubiert worden. Anschließend wurden sie wie beschrieben für die Transformation vorbereitet.

2.2.2.2 Bakterientransformation

Bakterien wurden mit Plasmid-DNA oder Ligationsansätzen durch Elektroporation von elektro-kompetenten Zellen transformiert. Vor der Elektroporation wurde die DNA dialytisch aufgereinigt (2.2.1.1.2). Diese DNA wurde mit kalten, elektro-kompetenten Zellen der Bakterienstämme *E. coli* DH10B oder DY380 (s. 2.2.2.1) vermischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Gene Pulser Küvetten, Spaltgröße 0,1 cm; Bio-Rad) gegeben. Die Transformation erfolgte mit einem Elektroporator (MicroPulser; Bio-Rad) bei 1,80 kV, 25 µF und 200 Ω. Im Anschluss wurden die Zellen sofort in kaltem LB-Medium verdünnt und bis zu 1,5 h bei 32°C inkubiert. Danach wurden verschiedene Mengen auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Selektionsantibiotika ausplattiert und üN bei 32°C kultiviert.

2.2.2.3 Homologe Rekombination in Bakterien

Die homologe Rekombination in Bakterien ermöglicht die sequenzspezifische Integration beliebiger DNA Fragmente unabhängig von Restriktionsenzymen (Lee et al., 2001; Yu et al., 2000). Sie wurde zur Klonierung von DNA-Konstrukten verwendet, welche für die Expression von FLAG-markierten Insm1-Varianten dienen. Die homologe Rekombination wurde in elektrokompenten Zellen des Bakterienstammes *E. coli* DY380 durchgeführt. Dieser Stamm trägt die für die Rekombination notwendigen *red* Gene (*exo* und *pol*) unter der Kontrolle des temperatursensitiven λ Repressors, da die permanente Expression der *red* Gene letal für die Bakterien ist. Zuerst wurde ein pBluescript-SK II (+/-)-Vektor, der einen Insm1-ORF mit einem FLAG-Tag am 5'-Ende enthielt, in *E. coli* DY380 transformiert. Weiterhin wurde der Vektor pZerO-2 mit EcoRI linearisiert und anschließend in PCRs amplifiziert. Dabei kamen modifizierte M13(-20)fw- und M13rev-Primer zum Einsatz. Diese enthielten zusätzlich 40 bp zu Insm1 homologer Sequenzen sowie Sequenzen zur Deletion des Stop-Codons und in einem Fall der SNAG-Domäne. Die PCR-Ansätze wurden mit DpnI verdaut, welches methylierungsspezifisch DNA hydrolysiert, und somit die Matrizen abbaute. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden anschließend in einen Vektor-positiven DY380 Klon transformiert, welcher durch einen 15 minütigen Temperaturwechsel auf 42°C auch rekombinationskompetent gemacht worden war. Rekombinierte Klone wurden durch Selektion mit Kanamycin identifiziert. Anschließend wurden die Insm1-Konstrukte in den retroviralen Vektor pHW106 (pMX-Derivat) umklont und am 3'-Ende ein 3xFLAG-Tag einkloniert. Hinter den Insm1-Konstrukten enthielten diese Vektoren eine IRES-GFP-Sequenz, welche die Identifizierung transduzierter Zellen ermöglichte.

2.2.2.4 Kultur, Transfektion und Selektion von AtT-20- und GH3-Zellen

2.2.2.4.1 Kultur der Zellen

Um AtT-20- oder GH3-Zellen in Kultur zu nehmen, wurde ein Aliquot der Zellen schnell bei 37°C aufgetaut und mit 9 ml Kulturmedium bei RT gemischt. Die Zellen wurden 4 min mit 900 rpm in einer Bodenzentrifuge (Heraeus Varifuge 3.0; Thermo) pelletiert, in Medium aufgenommen, sorgfältig vereinzelt, auf einer Zellkulturschale ausplattiert und bei 37°C und 5 % (v/v) CO₂ in einem Inkubator (BB6220C4; Thermo) kultiviert. Das

Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt und die Zellen bis zu einer Konfluenz von ca. 80% kultiviert, bevor sie wieder passagiert wurden. Die Zellen wurden dazu mit PBS gespült, mit 1-3 ml Trypsin/EDTA abgelöst, bei 900 rpm pelletiert, in Medium aufgenommen und vor dem Ausplattieren auf neue Zellkulturschalen sorgfältig vereinzelt. Die Zellen wurden danach in 10-cm-Schalen wie oben in 10 ml Medium kultiviert. Das Medium wurde erneut jeden zweiten Tag gewechselt, die Zellen für 2-3 Tage kultiviert, bis sie subkonfluent gewachsen waren und eingefroren, für die Transfektion (s. 2.2.2.4.3) verwendet oder lysiert wurden. Zum Einfrieren wurden sie wie oben beschrieben abgelöst, pelletiert und in Einfriermedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und μ N bei -70°C eingefroren. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.2.4.2 Markierung des Zellproteoms mit stabilen Isotopen in Zellkultur durch Aminosäuren („stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC)“)

Für Markierungsexperimente wurden AtT-20 Zellen entweder in „schwerem“ oder „leichtem“ SILAC DMEM (4,5 g/l Glukose, PAA) mit 10% hitzeinaktiviertem, dialysiertem Kälberserum (Sigma), 4 mM Glutamax (Invitrogen) und Penicillin/Streptomycin auf mit poly-D-Lysin beschichteten Zellkulturschalen kultiviert. Den Medien wurde entweder 84 mg/l L-Arginin und 146 mg/l L-Lysin (Sigma) oder die mit schweren Isotopen markierten Analoge $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_4$ -L-Arginin und $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$ -L-Lysin (Isotec) in gleicher Konzentration zugesetzt. Um eine vollständige Markierung des Proteoms zu gewährleisten, wurden die Zellen mindestens vier Mal in einem Verhältnis von eins zu vier passagiert (Ong und Mann, 2006).

2.2.2.4.3 Transfektion der AtT-20-Zellen mit siRNAs

Um das Niveau der endogenen Insm1-Expression in AtT-20-Zellen transient zu verringern, wurden die Zellen mit einem Gemisch aus drei siRNAs (ON-TARGETplus, Dharmacon) transfiziert. Als Kontrolle wurde eine siRNA verwendet, für die im Mausgenom keine Zielsequenz zu finden ist. 24 h vor der Transfektion wurden die Zellen dünn auf poly-D-Lysin beschichteten Zellkulturschalen ausgesät ($4,5 \times 10^6$ Zellen/15 cm-Platte) und in Kulturmedium ohne Antibiotika kultiviert. Für die Transfektion wurde Lipofectamine2000 (Invitrogen) verwendet. Pro 15 cm-Platte wurden dazu 120 μ l siRNA

(finale Konzentration auf der Kulturschale 3,3 nM „each“) mit 4 ml serumfreiem DMEM gemischt und 160 µl Lipofectamine2000 wurden ebenfalls mit 4 ml serumfreiem DMEM gemischt. Die beiden Lösungen wurden vor ihrer Vereinigung 5 min, und anschließend noch einmal 20 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen einmal mit PBS gespült und mit 8 ml serumfreiem DMEM überschichtet. Nach 20 bis 24 h wurden die Zellen einmal mit PBS gespült und weiter mit 20 ml Kulturmedium inkubiert. Nach 72 h wurden die Zellen geerntet. Der Erfolg des Experiments wurde durch „Western Blot“-Analyse überwacht.

2.2.2.4.4 Expression FLAG-markierter Insm1-Varianten in AtT-20-Zellen

2.2.2.4.4.1 Herstellung der Viren

Zur stabilen Expression verschiedener Insm1-Varianten wurde ein ecotrophes, retrovirales System verwendet (<http://www.stanford.edu/group/nolan/>), welches für die Transduktion muriner Zellen geeignet ist. Die verwendeten Viren waren replikationsdefizient. Virenhaltige Kulturüberstände, die zur Transduktion von AtT-20-Zellen dienen sollten, wurden mittels der Verpackungszelllinie Phoenix-ECO hergestellt. Dazu wurden diese zur Vorbereitung der Kalzium-Phosphat-Transfektion von einer konfluenten Platte im Verhältnis 1:5 auf neue 15 cm-Platten passagiert und 24 h später einmal mit PBS gespült und mit frischem Kulturmedium überschichtet. Pro Platte wurden 30µg Plasmid-DNA (pMX-Derivate, s. 2.2.2.3) in 1350 µl H₂O verdünnt und mit 150 µl 2 M CaCl₂ versetzt. Anschließend wurden 1,5 ml 2x HBS unter gleichzeitigem vortexen tropfenweise zugegeben. Nach zweiminütiger Inkubationszeit wurde der Ansatz auf die Zellen gegeben. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt. Weitere 24 h später wurde der virenhaltige Kulturüberstand geerntet und bei -70°C gelagert.

2.2.2.4.4.2 Transduktion der AtT-20-Zellen

Für die Transduktion mit Viren, die verschiedene Insm1-Varianten enthielten, wurden AtT-20 Zellen in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/10 cm-Platte ausgesät. 24 h später wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml virenhaltigem Kulturüberstand überschichtet. Diesem wurde vorher Polybrene (1:100, Millipore) zugesetzt, um die Adhäsion der Viruspartikel an die Zellmembranen zu verbessern. Die Transduktion

erfolgte über drei Tage mit täglichem Wechsel des Kulturüberstandes. Anschließend wurden die Zellen passagiert und für drei Tage kultiviert. Der Erfolg der Transduktion wurde über die fluoreszenzmikroskopische Analyse der GFP-Expression überprüft.

2.2.2.4.4.3 Anreicherung GFP-positiver AtT-20-Zellen

Um transduzierte Zellen anzureichern, wurden diese abgelöst, vereinzelt und einer FACS-Sortierung an einem BD FACSAria (BD Biosciences) unterzogen. Die Zellsortierung wurde von Hans Peter Rahn (präparative Durchflusszytometrie, MDC) durchgeführt. Als GFP-positiv sortierte Zellen wurden wieder in Kultur genommen und expandiert. Nach einem zweiten Sortierungsdurchgang waren in der Kultur mikroskopisch so gut wie keine Zellen mehr zu erkennen, die nicht GFP exprimierten.

2.2.3. Präparation von Mausembryonen und Mausgewebe

Zur Abschätzung des Alters der Embryonen wurde am Tag des Vaginalpfropfens beim Weibchen 12:00 Uhr als 0,5 Tage nach Koitus/der Embryonalentwicklung (E0.5) angenommen. Schwangere Weibchen wurden durch zervikale Dislokation getötet, die Embryonen dem Uterus entnommen und schnell in eiskaltes PBS überführt. Die Embryonen wurden dekapitiert und präpariert. Vor der Präparation erfolgte eine genaue Bestimmung des Entwicklungsstadiums der Embryonen anhand der Größe und anatomischer Kriterien (Edinburgh Mouse Atlas Project; <http://genex.hgu.mrc.ac.uk>). Nur die Tiere eines Wurfs mit gleicher Größe und gleichem Entwicklungsstadium wurden verwendet. Adulten Mäusen wurde Gewebe nach gleicher Vorgehensweise nach erfolgter zervikaler Dislokation entnommen.

2.2.4 Histologische Methoden

2.2.4.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Embryonen wurden in PBS bei 4°C präpariert und gespült. Gewebe, das für *in-situ*-Hybridisierungen vorgesehen war, wurde direkt in Tissuetek (= „OCT-Compound“, Sakura) in einer Einbettform („Peel-A-Way“, Thermo Scientific) auf einer Alkohol/Trockeneis- Mischung eingebettet. Für immunhistologische Färbungen wurde das Gewebe nach dem Spülen in PBS in 4% PFA (in 100mM NaPO₄) für eine bis

maximal drei Stunden bei 4°C fixiert. Nach der Fixierung wurde das Gewebe dreimal für mindestens 30 min in PBS gewaschen. Vor der Einbettung wurde dieses Gewebe noch üN in 25% Saccharose in PBS inkubiert. In „Tissue-Tek“ eingebettetes Gewebe wurde bei -70°C gelagert. Das Gewebe im Kryostaten (Microm HM560, Walldorf) bei einer Blocktemperatur zwischen -10°C und -15°C geschnitten, die Schnittdicke betrug 12µm für die Immunhistologie und 16µm für *in-situ*-Hybridisierungen. Die Schnitte wurden auf Adhäsions-Objektträger (Histobond, Marienfeld) aufgenommen, auf einer Heizplatte bei 37°C getrocknet und dann feuchtigkeitsgeschützt bei -70°C eingefroren.

2.2.4.2 Immunhistologie auf Gefrierschnitten

Die Blockierung der Gefrierschnitte erfolgte für 1h bei RT in 1% Pferdeserum/PBX. Darauf erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in Blockierungslösung üN bei 4°C. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für je 10min mit PBX in einer Küvette gewaschen und dann für 2h mit dem sekundären Antikörper in Blockierungslösung bei RT inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in einer lichtgeschützten Küvette mit PBX wurden die Schnitte mit „Immunomount“ (Thermo Scientific) eingedeckelt.

2.2.4.3 β-Galaktosidase-Färbung

Die β-Galaktosidase-Aktivität wurde in Gewebepräparaten nachgewiesen. Das Gewebe wurde dazu in PBS/20mm MgCl₂ präpariert. Anschließend erfolgte die Fixierung in LacZ-Fixans für 30 min bei 4°C. Nach dreimaligem Spülen mit PBS/20mM MgCl₂ wurde das Gewebe in LacZ-Waschpuffer üN bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Färbung erfolgte lichtgeschützt für 2-3h bei RT in LacZ-Färbelösung. Nach abgeschlossener Färbung wurde das Gewebe mehrfach in PBS gewaschen, üN mit 4% PFA in PBS postfixiert und in PBS aufbewahrt.

2.2.4.4 *In-situ*-Hybridisierung

2.2.4.4.1 Synthese Digoxigenin-markierter *in-vitro*-Transkripte

Die Plasmid-Matrize wurde mittels Restriktionshydrolyse linearisiert und durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung aufgereinigt. Die *in-vitro*-Transkripte wurden in folgendem Ansatz für 2 h bei 37°C synthetisiert:

1µl linearisierte Plasmid-DNA (1 µg/µl)

2µl 10x Transkriptionspuffer (Roche)

2µl DIG-Labeling-Mix (Roche)

0,5µl RNase-Inhibitor (40U/µl, Invitrogen)

13,5µl H₂O

1µl RNA-Polymerase (20U/µl, Roche)

Das markierte Transkript wurde unter Verwendung des „RNeasy Cleanup“-Kits (Qiagen) aufgereinigt. Die Lagerung erfolgte in 50% Formamid/50% H₂O bei -70°C.

2.2.4.4.2 *In-situ*-Hybridisierung auf Gefrierschnitten

Die Gefrierschnitte wurden für 30 min. mit 4% PFA in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) bei RT fixiert. Anschließend dreimal mit PBS gewaschen und für 10 min in Acetylierungspuffer inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS erfolgte die Prähybridisierung in Hybridisierungspuffer für 2 h bei RT. Die DIG-markierte Sonde (siehe 2.2.4.4.1) wurde währenddessen für 5 min bei 80°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und auf etwa 100-200ng/150µl in Hybridisierungspuffer verdünnt. Deckgläser wurden mit „Sigmacote“ (Antihafsilan, Sigma) silanisiert, zweimal kurz in 100% Ethanol gespült und getrocknet. Die verdünnte Sonde wurde auf die vorhybridisierten Schnitte gegeben und das Gewebe mit den vorbereiteten Deckgläsern bedeckt. Die Hybridisierung erfolgte üN bei 70°C in einer Feuchtkammer mit einem Kammerpuffer aus 50% Formamid und 5x SSC. Anschließend wurden die Deckgläser durch Eintauchen in 5x SSC bei RT abgeschwemmt und die Präparate in 0,2x SSC bei 70°C für zweimal 30 min. gewaschen. Nach erneutem kurzem Waschen in 0,2x SSC bei RT wurden die Objektträger in B1-Puffer überführt und 5 min inkubiert. Daraufhin wurde mit 10% Ziegen Serum in B1-Puffer für 60 min blockiert. Die Inkubation mit dem anti-DIG-Antikörper (Roche, 1:2000 in Blockierungslösung) erfolgte üN bei 4°C. Danach wurden die Objektträger dreimal für je 10 min mit B1-Puffer gewaschen und kurz mit NTMT äquilibriert, bevor die Färbelösung auf die Objektträger gegeben wurde. Die Farbreaktion erfolgte abgedunkelt bei 4-37°C und wurde durch mehrmaliges Waschen in H₂O gestoppt. Anschließend wurden die Präparate getrocknet und mit Entellan eingedeckelt.

2.2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.2.5.1 Herstellung von Zelllysaten für Ko-Immunopräzipitationen

Vor der Herstellung der Lysate wurde von subkonfluenten AtT-20- und GH3-Zellen das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gespült. Anschließend wurden pro 15-cm-Zellkulturschale 2 ml eiskalter IP-Lysispuffer hinzugegeben und die Zellen abgeschabt. Das Lysat wurde in Einwegreaktionsgefäße überführt und zur vollständigen Lyse 20 min bei 4°C rotiert. Anschließend wurde das Lysat für 15 min bei 16000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde für Ko-Immunopräzipitationen eingesetzt. Die Konzentration der Proteine wurde über einen „Bradford-assay“ bestimmt.

2.2.5.2 Quantifizierung der Proteine in Zelllysaten („Bradford-assay“)

Die Proteinkonzentration der Lysate wurde mit dem modifizierten „Bradford-assay“ BioRad Protein Assay (Biorad) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden 2,5 µl des Lysats mit 997,5 µl des 1:4 mit H₂O verdünnten Reagenz vermischt, 2 min bei RT inkubiert und anschließend bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch vermessen. Eine Standardkurve aus BSA in IP-Lysispuffer wurde nach dem gleichen Verfahren erstellt. Anhand dieser wurde die für das Lysat gemessene Extinktion in eine Proteinkonzentration umgerechnet.

2.2.5.3 Durchführung von Ko-Immunopräzipitationen

2.2.5.3.1 Kovalente Kopplung von Antikörpern an Magnetperlen

Die für Ko-Immunopräzipitationen eingesetzten Antikörper wurden kovalent an ProteinA- oder ProteinG-beschichtete Magnetperlen gekoppelt, um zu verhindern, dass sie während der Elution von diesen dissoziierten. Dazu wurden die Magnetperlen erst dreimal für 10 min bei RT mit NaPO₄-Puffer gewaschen, dabei wurden sie jedes Mal mit einem Magneten (Dynal) sedimentiert. Anschließend wurden die Magnetperlen in 90 µl NaPO₄-Puffer pro 100 µl verwendeter Magnetperlen resuspendiert, die Antikörper (Menge Antikörper/100 µl Magnetperlen: Maus α-FLAG: 10 µl, Maus IgG-Kontrolle: 20 µl, alle anderen: 4µl) hinzugegeben und bei RT 1 h rotiert. Überschüssige Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit Kopplungspuffer entfernt. Anschließend wurden

die Magnetperlen mit gebundenen Antikörpern 1 h bei RT in 25mM Dimethylpimelimidat-dihydrochlorid (DMP) in Kopplungspuffer inkubiert. Es folgten zwei zehnmünütige Waschschrirte mit Kopplungspuffer. Überschüssige reaktive Gruppen des DMPs wurden durch eine zweistündige Inkubation in 0.2M Ethanolamin pH8.0 abgesättigt. Die kovalent gekoppelten Antikörper-Magnetperlen-Konjugate wurden dreimal mit NaPO₄-Puffer gewaschen und konnten in diesem mehrere Tage bei 4°C aufbewahrt werden.

2.2.5.3.2 Ko-Immunopräzipitation

Für Ko-Immunopräzipitationen wurden ausschließlich frisch hergestellte Lysate verwendet. Dabei wurden unterschiedliche Mengen an Protein eingesetzt, 1 mg für die anschließende „Western Blot“-Analyse präzipitierter Proteine, 3 mg bei anschließender massenspektrometrischer Analyse. Bei parallel durchgeführten Experimenten wurden die Volumina der verschiedenen Lysate angeglichen. Das Lysat wurde für die Ko-Immunopräzipitation für 3 h bei RT mit den vorbereiteten Antikörper-Magnetperlen-Konjugaten inkubiert, welche vorher mit IP-Lysispuffer gespült worden waren. Anschließend wurden die Antikörper-Magnetperlen-Konjugate dreimal für 10 min mit IP-Lysispuffer (ohne Protease- oder Phosphataseinhibitoren) gewaschen. Dazu wurden sie jedes Mal mit einem Magneten (Dyna) gesammelt. Sollten die präzipitierten Proteine massenspektrometrisch analysiert werden, waren die Magnetperlen aus korrespondierenden Ko-Immunopräzipitationen vereinigt worden, bevor mit dem Waschen mit IP-Lysispuffer begonnen wurde. Die Magnetperlen wurden nach dem Waschen mit IP-Lysispuffer noch zweimal für 5 min mit 150 mM NaCl, 10mM Tris (pH 7,5) gewaschen. Anschließend erfolgte die dreimalige Elution der Proteine mit je 100 µl 100 mM Glyzin (pH 2,5) bei 37 °C unter Schütteln für 10 min. Die Eluate wurden sofort auf Eis gekühlt, vereinigt und nach Zugabe von 1 µl Glycoblu, 80 µl 2,5 M Natriumacetat (pH 5,0) und 1,5 ml 100% Ethanol für mindestens 24 h bei RT inkubiert. Ausgefallene Proteine wurden durch Zentrifugation sedimentiert (1h, 4°C, 14000x g), das Pellet getrocknet und zur weiteren Analyse an Florian Paul übergeben. Sollten die präzipitierten Proteine einer „Western Blot“-Analyse unterzogen werden, wurden die an die Magnetperlen gebundenen Proteine mit 20 µl 1x SDS-PAGE-Ladepuffer für 5 min bei 95°C gleichzeitig eluiert und denaturiert. Die Magnetperlen wurden im Anschluss

entfernt. Der Überstand wurde dann bei -70°C gelagert oder direkt für die „Western Blot“-Analyse eingesetzt.

2.2.5.4 „Western Blot“-Analyse

2.2.5.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach Molekulargewichten wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese angewendet (Laemmli, 1970). Die dazu verwendeten Gele bestehen aus einem Sammelgel, in dem die Proteine fokussiert werden, und einem Trenngel zur Trennung der Proteine nach Molekulargewicht. Diese Gele (12% Trenngel, 1,5 mm Dicke) wurden vor Beginn des Experiments in einer Mini-Gel Apparatur (Protean 3, Biorad) hergestellt. Die aufzutrennenden Proteinlösungen wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 4xSDS-PAGE-Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 4°C in einer mit kaltem SDS-Laufpuffer gefüllten Elektrophorese -Kammer (Protean 3, Biorad) bei einer konstanten Spannung von 75 V. Sobald die Lauffront die Grenze zwischen Sammel- und Trenngel überschritten hatte, wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Als Größenstandard diente die „Protein Ladder Plus“ (Fermentas).

2.2.5.4.2 Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen („Western Blot“)

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das SDS-Polyacrylamid-Gel aus der Apparatur entnommen und für 5 min in 1 x Transferpuffer äquilibriert. Anschliessend erfolgte der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (Schleicher & Schuell) bei einer konstanten Spannung von 75 V für 1,5 h. Dazu wurde eine „Tank Blot“-Apparatur (Mini Trans-Blot electrophoretic Transfer Cell, Biorad) mit kaltem Transferpuffer verwendet, und die Apparatur wurde während des Experiments gekühlt. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran entnommen, zweimal kurz mit H_2O gespült und dann entweder getrocknet und aufbewahrt oder direkt für den immunologischen Nachweis von Proteinen eingesetzt.

2.2.5.4.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert. Getrocknete Membranen wurden dafür für 5 min in H₂O rehydriert. Danach wurde die Membran bei RT für 2 h in Blockierungslösung (5% Milchpulver oder 5 % BSA in PBS-T, s. Tab. 5) inkubiert. Nach zweimaligem Spülen mit PBS-T wurde die Membran mit 3 ml PBS-T, das die Primärantikörper enthielt (Verdünnung s. Tab. 5), in Plastikfolie eingeschweißt und üN bei 4°C rotiert. Nach drei einstündigen Waschschrritten mit PBS-T wurde die Membran mit in PBS-T verdünnten, HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 1 h mit PBS-T gewaschen und der Detektion der gebundenen Antikörper unterzogen. Dafür wurde das Enhanced Chemiluminescence-Kit (Amersham Pharmacia Biotech) laut Herstellerangaben verwendet. ECL-Signale wurden mithilfe des Chemismart 5100-Systems (Vilber Lourmat) aufgezeichnet. Sollten auf derselben Membran weitere Proteine nachgewiesen werden, so wurden die gebundenen Antikörper durch 30-minütige Inkubation mit Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific) entfernt. Anschließend wurde die Membran mehrfach ausgiebig mit PBS-T gewaschen. Vor dem immunologischen Nachweis weiterer Proteine wurden erneut unspezifische Bindungsstellen blockiert.

2.2.5.5 Massenspektrometrische Analyse ko-immunopräzipitierter Proteine (NanoLC-MS/MS, durchgeführt von Florian Paul, MDC)

Die Protein-Pellets wurden in Harnstoffpuffer (6 M Harnstoff und 2M Thioharnstoff in 10mmHepes pH 8,0) resuspendiert, mit 10 mM DTT reduziert und mit 55 mM Iodacetamid in 50 mM NH₄CO₃ alkyliert. Anschließend wurden die Proteine zuerst mit LysC (Wako) (0,5µg/1µl Lösung) und nach Verdünnung mit vier Volumina 50 mM NH₄CO₃ mit Trypsin (Promega) (0,5µg/50µg Protein) verdaut. Die Peptide wurden an einem nanoLC-1D-PLUS HPLC-System (Eksigent Technologies) aufgetrennt und mit einem 10–60 % Gradienten des Lösungsmittels B (80 % ACN, 0.5 % Essigsäure oder 0,1% Ameisensäure) eluiert, diese Elution erfolgte für 109 oder 183 min mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 200 nL/min. Die Peptide wurden mit dem „electrospray“-Verfahren ionisiert und mit einem LTQ-Orbitrap-Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) analysiert. Für die Peptiddetektion wurde eine dynamische

TOP 5 Aufzeichnungsmethode (Olsen et al., 2005) mit einer Auflösung von 60 000 bei $m/z = 400$ verwendet. MS Spektren wurden im Bereich ($m/z = 300-1700$) aufgezeichnet. Die Daten wurden mit der Xcalibur-software (Version 2.0 SR2) aufgezeichnet

2.2.6 Datenanalyse

2.2.6.1 Dokumentation histologischer Daten

Histologische Daten wurden mittels Licht- oder Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte an einem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 700 auf einem Axio Observer Z1 Mikroskop, Zeiss) mit der Zen-software (Zeiss). Die Lichtmikroskopie an mit *in-situ*-Hybridisierung gefärbten Schnitten erfolgte an einem inversen, digitalen Mikroskop (Keyence). Aufnahmen von Gewebepräparaten wurden an einem binokularen Stereomikroskop (Leica) durchgeführt, welches mit einer Kamera (AxioCam HRc, Zeiss) und der Axiovision AC-Software (Version 4.5, Zeiss) ausgestattet war.

2.2.6.2 Expressionsanalyse

Die Expressionsanalyse wurde zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene in den Hypophysen von hetero- und homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tieren genutzt. Die Daten der „microarray“-Hybridisierung (s. 2.2.1.3.3) wurden mit der Genomics Suite-Software (Version 6.3, Partek) ausgewertet. Hierzu wurden die normalisierten Expressionswerte importiert und die Qualität der Daten mittels einer “principal component“-Analyse untersucht. Anschließend wurden differentiell exprimierte Gene mithilfe einer Varianzanalyse (ANOVA) identifiziert. Gene, die eine hochsignifikant differentielle Expression zeigten (Benjamini Hochberg $FDR < 0,001$; Hochberg und Benjamini, 1990), wurden für die nachfolgenden Analysen ausgewählt.

2.2.6.3 Auswertung massenspektrometrischer Daten (durchgeführt von Florian Paul, MDC)

Die aufgezeichneten Rohdaten wurden mit dem MaxQuant-software Paket (Version 1.0.12.24 (Cox und Mann, 2008)) ausgewertet. Für die Identifizierung der Peptide wurde eine IPI-Maus-Datenbank (Version 3.43) inklusive invertierter Sequenzen aller Proteine

(„decoy“) mittels der Mascot-software (Version 2.2.2, Matrix Science) durchsucht. Die Carbamidomethylation von Zysteinresten wurde als unveränderlich angenommen während die N-terminale Acetylierung und Oxidation von Methioninresten als variable Modifikationen angenommen wurden. Die Toleranzschwelle umfasste zwei nicht genutzte Schnittstellen für tryptische Peptide, und eine Massentoleranz von 0,5 Da für MS/MS „peaks“ wurde zugelassen. Proteine mit einem einzigartigen Peptid wurden als identifiziert erachtet, Peptid- and Protein-Fehlerkennungsrate wurden auf 0,01 begrenzt. Verhältnismengen wurden für Proteine mit mindestens drei Peptidquantifizierungen berechnet und die Normalisierung erfolgte durch die Teilung durch den Mittelwert aller Protein-Verhältnismenge.

3 Ergebnisse

3.1 *Insm1*-Expression in der Adenohypophyse

3.1.1 *Insm1* wird während der Morphogenese der Adenohypophyse exprimiert

Ich untersuchte die Expression von *Insm1* während der frühen Morphogenese der Adenohypophyse der Maus. Mittels Antikörperfärbung konnte *Insm1* zuerst im Embryonalstadium E11,5 nachgewiesen werden. Dabei wurde es in epithelialen Zellen exprimiert, die das Lumen der sich schließenden Rathke-Tasche umgaben. Im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung breitete sich die Expression von *Insm1* in der Hypophyse weiter aus.

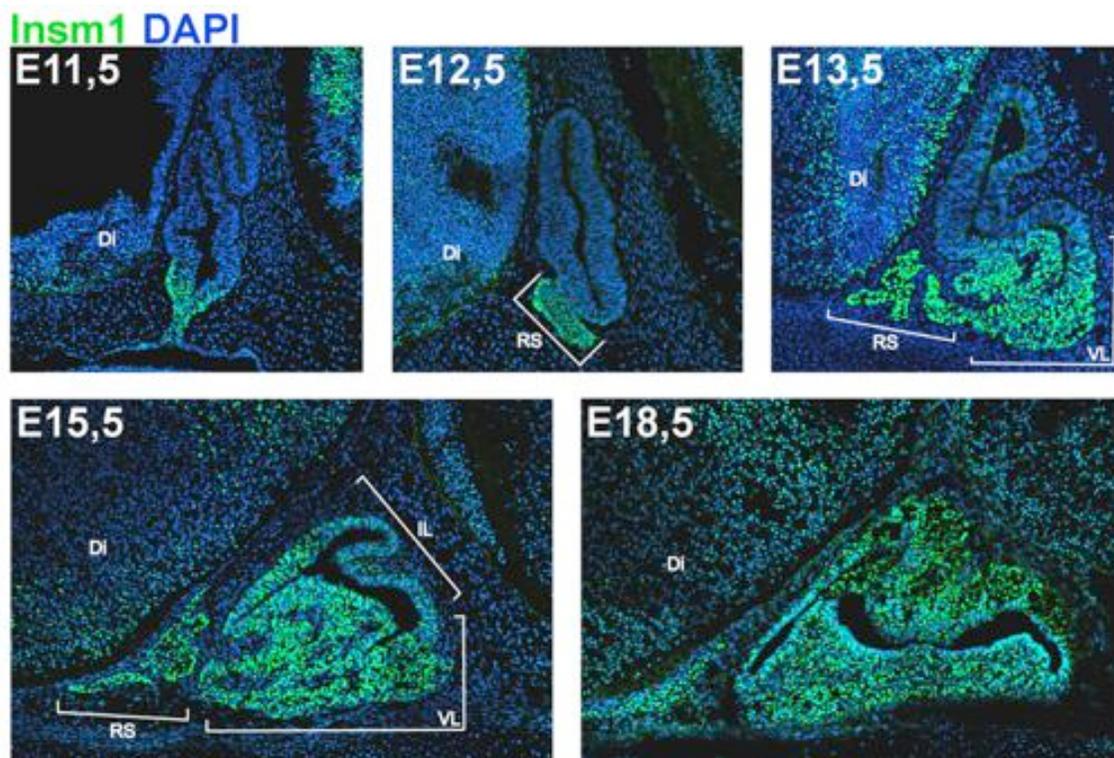


Abb. 6: *Insm1* wird während der Morphogenese in der Adenohypophyse exprimiert. Immunhistologische Analyse von *Insm1* (grün) mit DAPI-Kernfärbung (blau) auf sagittalen Schnitten durch die Hypophyse von Wildtyp-Mäusen verschiedener embryonaler Stadien. *Insm1* war ab dem Stadium E11,5 nachweisbar. Zuerst war es auf Zellen beschränkt, die die sich schließende Rathke-Tasche umgeben. Am Tag E12,5 war *Insm1* in der gesamten rostralen Spitze zu finden. Im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung breitete sich die Expression erst im ventralen Lappen der Adenohypophyse aus und war dann ab E15,5 auch im Intermediärlappen nachweisbar. Di = Diencephalon, RS = Rostrale Spitze, VL = Ventralen Lappen, IL = Intermediärlappen

Im Embryonalstadium E12,5 umfasste die Expression die gesamte rostrale Spitze der Adenohypophyse. Einen Tag später war *Insm1* im gesamten ventralen Lappen der Adenohypophyse nachweisbar. Ab Tag E15,5 wurde *Insm1* auch in Zellen des Intermediärlappens exprimiert, und somit in der gesamten Adenohypophyse. Dieses Expressionsmuster blieb bis zur Geburt erhalten (Abb.6).

3.1.2 Die Expression von *Insm1* bleibt in der adulten Adenohypophyse erhalten

Da *Insm1* perinatal in der Adenohypophyse stark exprimiert wurde, untersuchte ich, ob *Insm1* in der Hypophyse auch noch postnatal exprimiert wurde. Dazu untersuchte ich die Expression des *lacZ*-Reportergens in adulten *Insm1*^{+/*lacZ*}-Mäusen mittels LacZ-Färbung an ungeschnittenen Gewebepreparaten. Da das *lacZ*-Reportergen unter der regulatorischen Kontrolle des *Insm1*-Lokus steht, spiegelte seine Expression die des *Insm1*-Gens wieder (Gierl et al. 2006). Diese Färbungen zeigten, dass die Expression von *Insm1* in erwachsenen Mäusen in der gesamten Adenohypophyse persistierte (Abb. 7).

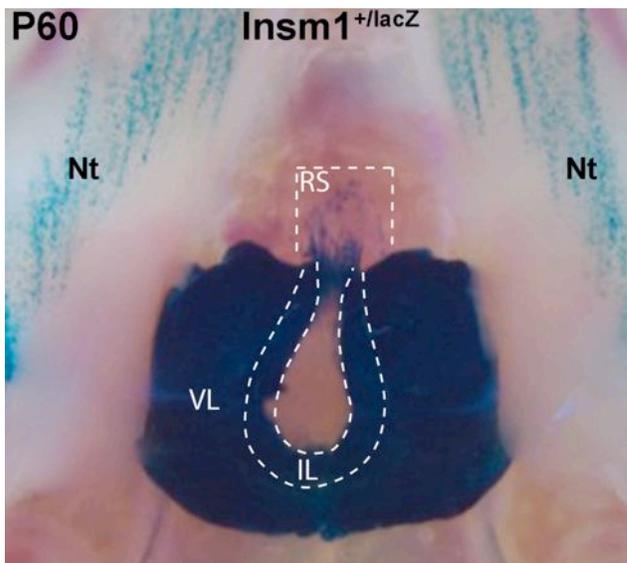


Abb. 7: *Insm1*-Expression persistierte in der Adenohypophyse erwachsener Mäuse. LacZ-Färbung an einem Gewebepreparat aus einer zwei Monate alten *Insm1*^{+/*lacZ*}-Maus. In der dorsalen Ansicht zeigte die Blaufärbung die Aktivität der β -Galaktosidase und somit die Expression von *Insm1* an. Diese war in adulten Mäusen in der gesamten Adenohypophyse nachweisbar. Nt = Nervus trigeminus, IL = Intermediärlappen, RS = rostrale Spitze, VL = Ventrallappen

3.2 *Insm1* ist essentiell für die Differenzierung der neuroendokrinen Zellen der Adenohypophyse

Um die Auswirkungen der Mutation von *Insm1* auf die Entwicklung der Adenohypophyse zu untersuchen, wurden heterozygote und homozygot mutante *Insm1^{lacZ}*-Mäuse in verschiedenen Entwicklungsstadien verglichen, wobei histologische Methoden eingesetzt wurden. Dabei wurde die Expression von Transkriptionsfaktoren und anderen Markern analysiert, die Aufschluss über Spezifizierung und Differenzierung der verschiedenen endokrinen Zelltypen gaben.

3.2.1 Neuroendokrine Zellen werden in homozygot mutanten *Insm1^{lacZ}*-Tieren korrekt spezifiziert

Verschiedene Signalmoleküle bilden in der frühen Anlage der Adenohypophyse morphogenetische Felder, die die zeitliche und räumliche Musterbildung regulieren. Zu diesen Signalmolekülen gehören beispielsweise Mitglieder der Fgf-, Bmp- Wnt- oder Notch-Familie. Die Aktivität der verschiedenen Morphogene resultiert in der Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren in der frühen Entwicklung. Um zu überprüfen, ob der Verlust der *Insm1*-Expression in der Adenohypophyse diese frühe Phase beeinträchtigt, analysierte ich das Expressionsmuster der Transkriptionsfaktoren *Pitx1*, *Prop1* und *Ascl1* im Embryonalstadium E12,5. *Pitx1* und *Prop1* zeigten in *Insm1^{lacZ/lacZ}*-Mäusen das gleiche Expressionsmuster wie in den Kontrolltieren, auch das Expressionsniveau war in den beiden Genotypen vergleichbar. *Ascl1* wurde im Stadium E12,5 lediglich im anterioventralen Bereich des Ventrallappens ausgeprägt. Dieses Muster fand sich auch in *Insm1*-mutanten Mäusen, und die beobachtete Signalintensität war vergleichbar (Abb. 8a). Weiterhin analysierte ich die Aktivität des *Notch*-Signalwegs. Sowohl der Ligand *Dll1*, als auch Zielgene *Hes1* und *Hey1* zeigten in *Insm1^{LacZ/lacZ}*-Mäusen keine Abweichung zu Kontrolltieren bezüglich Expressionsmuster oder -intensität (Abb. 8B).

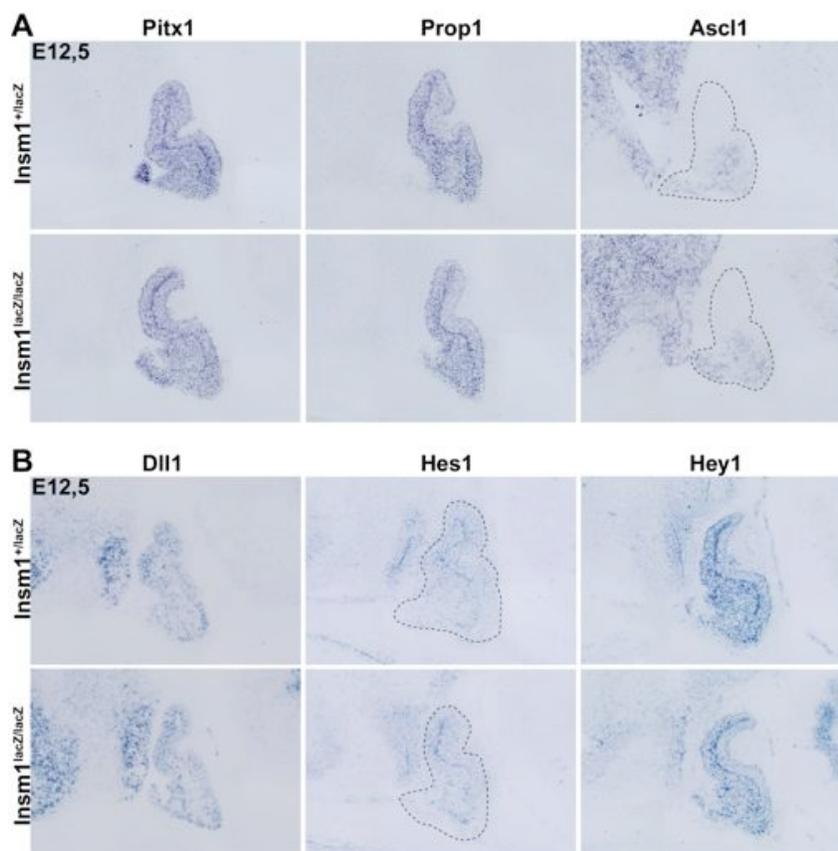


Abb. 8: Die frühe Entwicklung der Adenohypophyse verläuft in *Insm1*-mutanten Mäusen normal. *In-situ*-Hybridisierungen auf sagittalen Hypophysenschnitten des Stadiums E12,5. Die Expression der Transkriptionsfaktoren *Pitx1*, *Prop1* und *Ascl1* war in *Insm1*^{LacZ/lacZ}-Mäusen nicht verändert (A). Ebenfalls unverändert war die Aktivität des Notchsignalwegs, wie die Expression des Liganden *Dll1* und von Notch-Zielgenen zeigte (B).

3.2.2 Die Differenzierungsprogramme verschiedener Zelltypen der Adenohypophyse in homozygot mutanten *Insm1*^{lacZ}-Tieren verlaufen nicht normal

Bei den corticotropen Zellen handelt es sich um den ersten Zelltyp, der während der Embryogenese in der Hypophyse differenziert. Sie liegen vornehmlich im posteroventralen Teil des ventralen Lappens der Adenohypophyse. Die Differenzierung der Zellen ist von der korrekten Expression des Transkriptionsfaktors *Tbx19* abhängig und durch *NeuroD1*-Expression gekennzeichnet. Meine Analysen zeigten, dass *Tbx19*, das in Kontrolltieren ab E13,5 bis zur Geburt nachweisbar war, in *Insm1*^{lacZ/lacZ}-Mäusen verspätet ab E14,5 und in vermindertem Umfang exprimiert wurde (Abb. 9A).

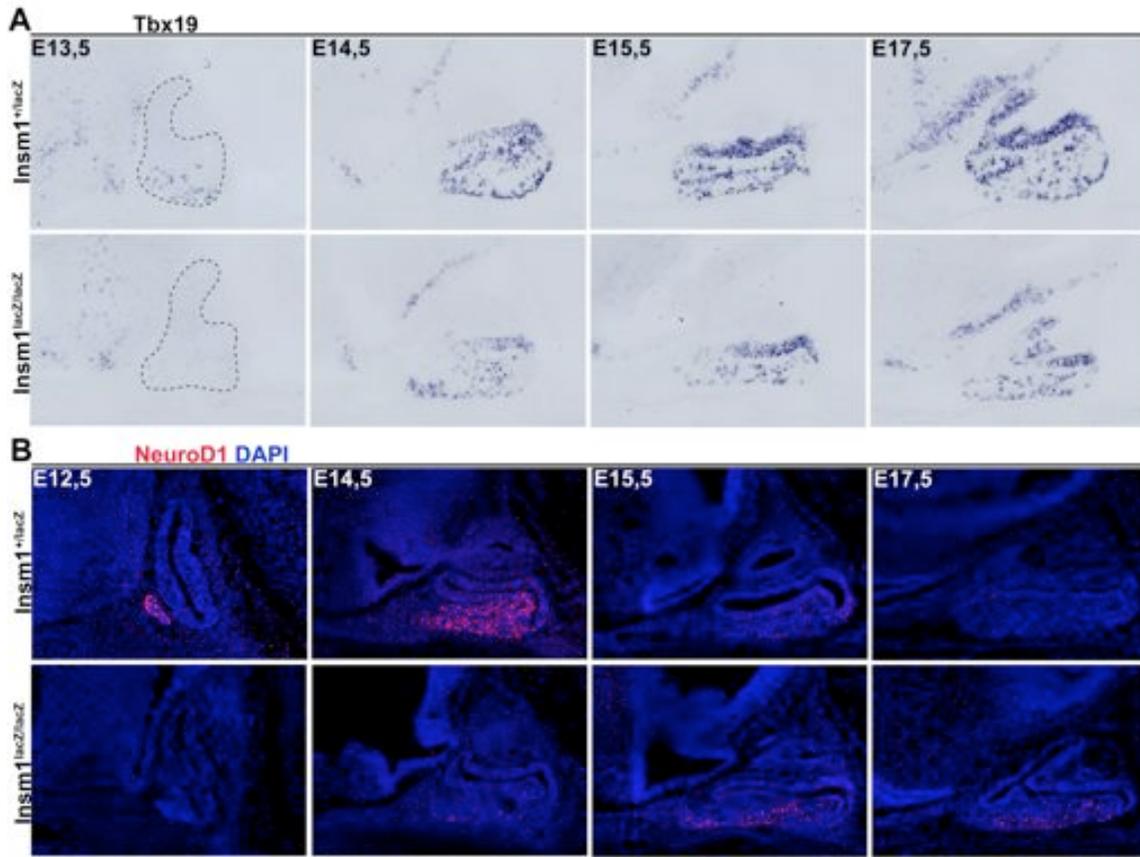


Abb. 9: Die Expression der Transkriptionsfaktoren *Tbx19* und *NeuroD1* war in *Insm1*-mutanten Mäusen verändert. Die *in-situ*-Hybridisierungen mit einer spezifischen Sonde gegen das *Tbx19*-Transkript auf sagittalen Schnitten durch die Hypophysen von Mäusen verschiedener Entwicklungsstadien zeigten, dass das für die Differenzierung von corticotropen und melanotropen Zellen wichtige Gen verzögert und zu einem geringeren Maß exprimiert wurde (A). Aus Immunfluoreszenzanalysen mit einem Antikörper gegen *NeuroD1* (rot) und einer DAPI-Kernfärbung (blau) wurde deutlich, dass auch dieses Gen verzögert exprimiert wurde. Zu E12,5 ist das Protein im Vergleich zu dem Kontrolltier in der Mutante noch nicht nachweisbar. Zwei Tage später war die Expression im ventralen Lappen der Adenohypophyse in *Insm1*^{lacZ/lacZ}-Mäusen auf wenige Zellen beschränkt, während sie in der Kontrolle ihren Höhepunkt erreichte. Ab E15,5 wurde *NeuroD1* in der Kontrolle deutlich schwächer exprimiert, während die Expression in der Mutante zunahm. Dieses Transkriptionsniveau persistierte bis zur Geburt (B).

Ebenfalls verändert war die normalerweise transiente Expression von *NeuroD1*. In Kontrolltieren ist das Protein bereits an Tag E12,5 in der rostralen Spitze und E14,5 auch im ventralen Lappen der Adenohypophyse nachweisbar, wo die Expression ab E15,5 rapide geringer wurde. In *Insm1*^{lacZ/lacZ}-Mäusen war die Expression E14,5 im ventralen Lappen wesentlich geringer. Dieses geringe Expressionsniveau blieb aber in mutanten Tieren bis zur Geburt erhalten (Abb. 9B).

Melanotrope Zellen sind ein weiterer Hypophysen-Zelltyp, der zu einem späteren Zeitpunkt im Intermediärlappen differenziert und ebenfalls von *Tbx19* abhängig ist. Auch im Intermediärlappen war die *Tbx19*-Expression vermindert. Somit scheint auch das Differenzierungsprogramm der melanotropen Zellen in *Insm1*-defizienten Mäusen beeinträchtigt zu sein (Abb. 9b).

Thyrotrope Zellen differenzieren als nächstes, und haben ihren Ursprung zusammen mit den somatotropen und lactotropen Zellen in *Pit1*-positiven Vorläuferzellen. Diese wiederum exprimieren vor *Pit1* bereits den Transkriptionsfaktor *Prop1*. Die Analyse der *Prop1*-Expression in der Adenohypophyse zeigte keine Veränderung (Abb. 10).

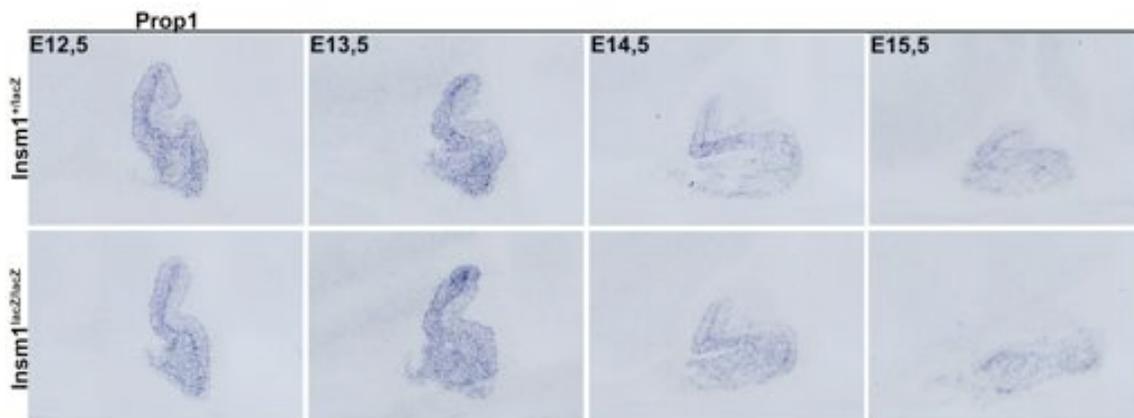


Abb. 10: *Prop1* wurde in *Insm1*^{lacZ/lacZ}-Mäusen unverändert ausgeprägt. *In-situ*-Hybridisierungen mit Sonden gegen die *Prop1*-mRNA auf sagittalen Hypophysenschnitten zeigten, dass das Gen vom Embryonalstadium E12,5 bis E15,5 in *Insm1*-mutanten und Kontrolltieren in gleicher Intensität und im gleichen Muster exprimiert wurde.

Die Expression von *Pit1* dagegen war in *Insm1*^{lacZ/lacZ}-Mäusen deutlich verzögert. In Kontrolltieren war *Pit1*-mRNA ab Tag E13,5 nachweisbar, danach nahm die Expression zu und blieb auf diesem hohen Niveau erhalten. In *Insm1*^{lacZ/lacZ}-Mäusen war die mRNA erst am Tag E14,5 nachweisbar. Die Expression nahm zwar auch in den mutanten Tieren bis zum Stadium E17,5 zu, blieb aber wesentlich hinter der in Kontrolltieren zurück (Abb. 11).

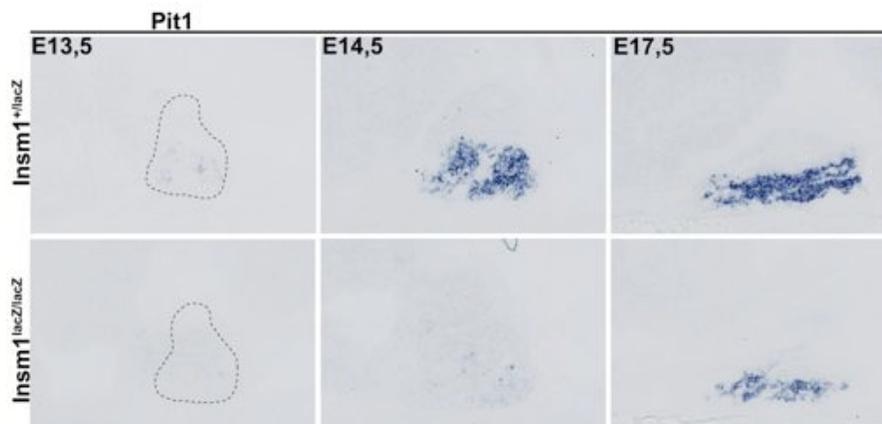


Abb. 11: *Insm1*^{lacZ/lacZ}-Mäuse exprimierten *Pit1* verzögert und in deutlich geringerem Maß. Gezeigt sind *in-situ*-Hybridisierungen mit einer Sonde, die die *Pit1*-mRNA erkennt, auf sagittalen Schnitten durch die Hypophysen verschiedener Entwicklungsstadien. Die in der Kontrolle an E13,5 beginnende Expression von *Pit1* war in *Insm1*-mutanten Mäusen um einen Tag verzögert und erst im Stadium E14,5 nachweisbar. Bis zur Geburt stieg das Expressionsniveau zwar an, war im Vergleich zu heterozygoten Tieren aber deutlich verringert.

Ich untersuchte weiterhin den Verlauf der Expression des Transkriptionsfaktors *Gata2*, der ebenfalls für die Differenzierung von thyrotropen Zellen notwendig ist und direkt die Expression des Thyrotropins (TSH) reguliert (Gordon et al., 1997). Ab Tag E13,5 war *Gata2* sowohl in Kontroll- als auch *Insm1*^{lacZ/lacZ}-Mäusen zum ersten Mal nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt war die Expression jedoch auf die bereits differenzierten, thyrotropen Zellen der rostralen Spitze der Adenohypophyse beschränkt. Im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung ab E14,5 war *Gata2*-mRNA in Kontrolltieren auch in den später differenzierenden, thyrotropen Zellen im ventralen Lappen zu finden, dort fehlte sie jedoch in *Insm1*^{lacZ/lacZ}-Mäusen (Abb. 12).

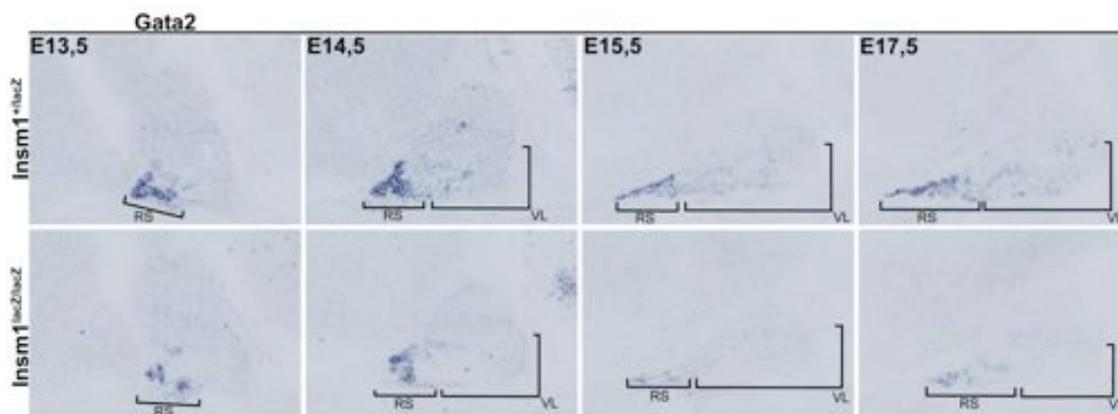


Abb. 12: *Gata2* wurde im ventralen Lappen der Adenohypophyse der *Insm1*^{lacZ/lacZ}-Mäusen nicht exprimiert. Die *in-situ*-Hybridisierung mit einer für die *Gata2*-mRNA spezifischen Sonde zeigte, dass *Gata2* in den Stadien E13,5 und E14,5 in der rostralen Spitze korrekt exprimiert wurde. Die in der Kontrolle ab E14,5 bis zur Geburt im ventralen Lappen zu findende Expression fehlte hingegen. Ausserdem war die Expression in der rostralen Spitze ab E15,5 geringer als in den Kontrollen. RS = rostrale Spitze, VL = ventraler Lappen

Die sich ebenfalls aus den *Pit1*-positiven Vorläuferzellen entwickelnden somatotropen und lactotropen Zellen sind während ihrer Differenzierung zusätzlich durch die Expression des Transkriptionsfaktors *Math3* charakterisiert, dessen Expression direkt durch *Pit1* reguliert wird. Ich untersuchte den Verlauf der Expression von *Math3* und konnte auch für diesen Faktor eine verzögerte und deutlich verminderte Expression feststellen (Abb. 13).

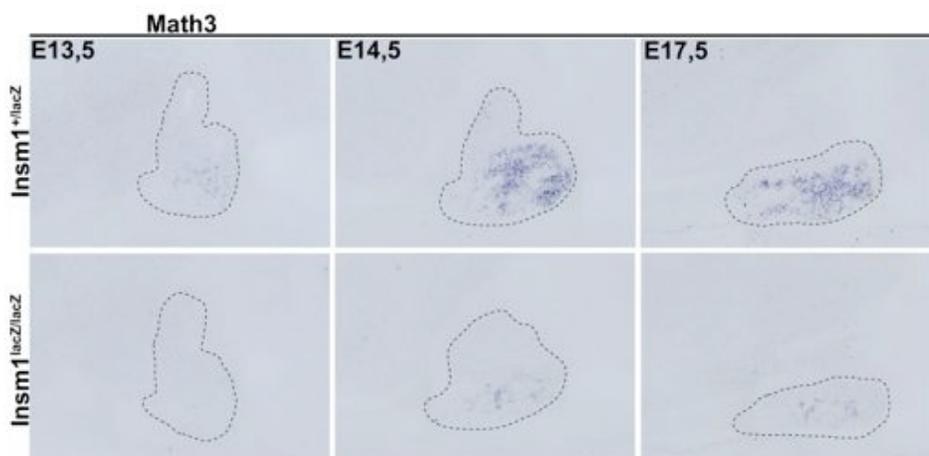


Abb. 13: Die Expression des Transkriptionsfaktors *Math3* ist in *Insm1*-mutanten Mäusen verändert. *In-situ*-Hybridisierungen zeigten, dass *Math3* Expression in Kontrolltieren zum embryonalen Zeitpunkt E13,5 in der Adenohypophyse erscheint. Diese im ventralen Lappen lokalisierte Expression fehlte in *Insm1*^{lacZ/lacZ}-Tieren. Ab E14,5 war das Transkript dann auch in Mutanten nachweisbar, das Expressionsniveau war jedoch deutlich reduziert. Im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung änderte sich diese nicht. In perinatalen Mäusen war die *Math3*-Expression ebenfalls gering und auf wenige Zellen beschränkt.

Der letzte Zelltyp der Adenohypophyse, der während der Entwicklung differenziert, ist der der gonadotropen Zellen. Die β -Untereinheiten der von ihnen sezernierten Hormone Lutropin (LH β) und Follitropin (FSH β) sind erst ab Tag E16,5 bzw. E17,5 nachweisbar. Für ihre korrekte Differenzierung sind gonadotrope Zellen, wie auch die oben erwähnten thyrotropen Zellen, von dem Transkriptionsfaktor *Gata2* abhängig. *Gata2* Transkripte waren im ventralen Lappen der Adenohypophyse in *Insm1*^{lacZ/lacZ}-Mäusen nicht nachweisbar (Abb. 12). Ein weiterer Faktor, der während der Differenzierung der gonadotropen Zellen eine Rolle spielt, ist der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor *SF1*. *SF1*-mRNA war wie die von *Gata2* im ventralen Lappen der Hypophysen mutanter Tiere nicht nachweisbar (Abb. 14).

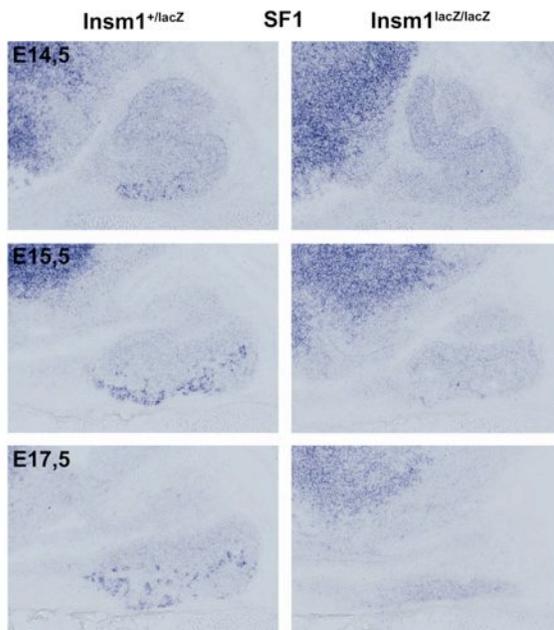


Abb. 14: Fehlende Expression des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors *SF1*.

In-situ-Hybridisierungen zum Nachweis des *SF1*-Transkripts auf sagittalen Schnitten durch die Hypophyse. Die Expression von *SF1* war in Kontrolltieren (E14,5) im ventralen Lappen nachweisbar. Sie nahm in E15,5 Tieren noch zu, und die Expression persistierte bis zur Geburt. In keinem der untersuchten Stadien konnte *SF1* in homozygoten *Insm1*^{lacZ}-Mäusen nachgewiesen werden.

3.2.3 Die Differenzierung von hormonproduzierenden Zellen war in homozygoten *Insm1*^{lacZ/lacZ}-Mäusen blockiert

Das charakteristischste Merkmal für die terminale Differenzierung aller sechs Zelltypen der Adenohypophyse ist die Expression der von ihnen sezernierten Hormone. Da ich bei einigen, für die Differenzierung essentiellen Transkriptionsfaktoren eine verminderte, fehlende oder verzögerte Expression festgestellt hatte, untersuchte ich im Folgenden, ob in *Insm1*^{lacZ/lacZ}-Mäuse Hypophysenhormone synthetisiert wurden. Die Analyse von Zellen, die von gemeinsamen *Pit1*-positiven Vorläuferzellen abstammten, zeigte hier eine klare Defizienz. So war die in somatotropen Zellen von Kontrolltieren stark exprimierte mRNA des Wachstumshormons (GH) in *Insm1*-mutanten Mäusen E17,5 kaum nachweisbar (Abb. 15). Das zu diesem Zeitpunkt in lactotropen Zellen nachweisbare Prolaktin (Prl) war in *Insm1*^{lacZ/lacZ}-Tieren ebenfalls nicht nachweisbar (Abb. 15). Ähnliches galt für die von thyrotropen Zellen ausgeprägten mRNAs der β - und α -Untereinheiten des Thyrotropins, TSH β und α GSU (Abb. 15).

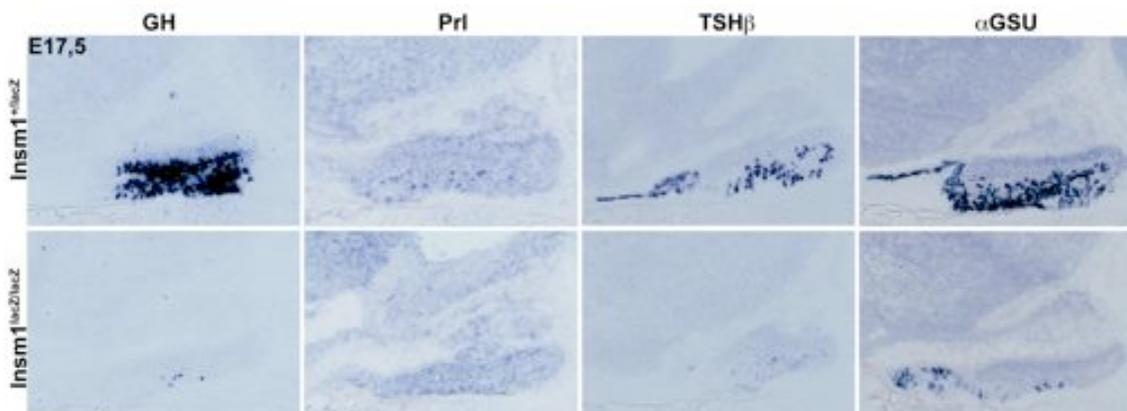


Abb. 15: In *Insm1*-mutanten Mäusen waren alle drei von *Pit1*-positiven Vorläuferzellen abstammenden Zelltypen nicht in der Lage, Hormone zu exprimieren. Die *in-situ*-Hybridisierung gegen das Transkript des Somatotropin-Gens (GH) auf sagittalen Hypophysenschnitten des Entwicklungsstadiums E17,5 zeigte, dass in der Mutante nur einige wenige Zellen das Hormon exprimieren. Das in lactotropen Zellen der Kontrolle nachweisbare Prolaktin-Transkript (Prl) fehlte in der Mutante gänzlich. Genauso verhielt sich die Expression der β -Untereinheit des Thyrotropins (TSH β). Die Expression der α -Untereinheit (α GSU) war deutlich verringert.

Die während ihrer Differenzierung von *Gata2* und *SF1* abhängigen gonadotropen Zellen wurden auf die korrekte Expression der β -Untereinheiten von Follitropin (FSH β) und Lutropin (LH β) überprüft. Beide Transkripte waren in *Insm1*^{lacZ/lacZ}-Mäusen nicht nachweisbar (Abb. 16). Auch die Expression der für diesen Zelltyp charakteristischen α -Untereinheit der Glykoproteine, α GSU, war stark reduziert (Abb. 15).

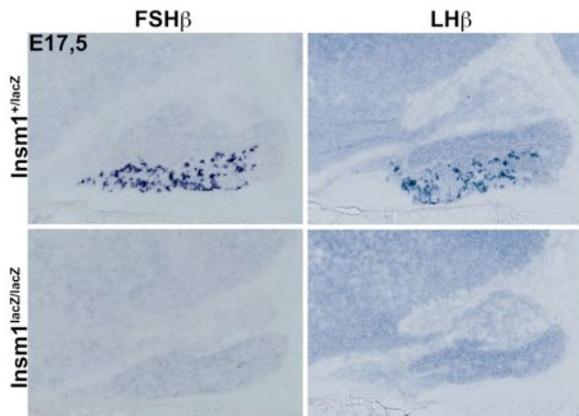


Abb. 16: *Insm1*-mutante Mäuse exprimierten keine gonadotropen Hormone. *In-situ*-Hybridisierungen mit Sonden gegen die Transkripte von Follitropin (FSH β) bzw. Lutropin (LH β) auf sagittalen Hypophysenschnitten zeigten, dass diese Hormone in *Insm1*^{lacZ/lacZ}-Mäusen im Embryonalstadium E17,5 nicht ausgeprägt wurden.

Das von corticotropen Zellen sezernierte Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) und das von melanotropen Zellen sezernierte Melanotropin (MSH) werden aus dem gemeinsamen Vorläuferprotein Proopiomelanocortin (POMC) gebildet. Das dieses Vorläuferprotein kodierende Transkript war in *Insm1*-mutanten Mäusen in einer normalen Verteilung, wenn auch im Vergleich zu Kontrolltieren in verminderter Menge nachweisbar (Abb. 17A). Um zu überprüfen, ob dieses Vorläuferprotein in *Insm1*^{lacZ/lacZ}-Mäusen in reife Hormone gespalten wird, führte ich Immunfluoreszenzanalysen mit spezifischen Antikörpern gegen ACTH und MSH durch. Diese Analysen zeigten in corticotropen Zellen des Ventrallappens eine deutlich verminderte Synthese von ACTH (Abb. 17B). ACTH sollte im Intermediärlappen nicht vorhanden sein, wird aber auch in Kontrolltieren im Intermediärlappen mit diesem Antikörper detektiert. Das Signal im Intermediärlappen könnte auf eine Kreuzreaktivität des eingesetzten Antikörpers zurückzuführen sein, der andere Spaltprodukte oder das Vorläuferprotein POMC nachweisen könnte. Die im Intermediärlappen sitzenden melanotropen Zellen zeigten in *Insm1*-mutanten Mäusen eine drastisch verminderte Immunreaktivität für MSH (Abb. 17C).

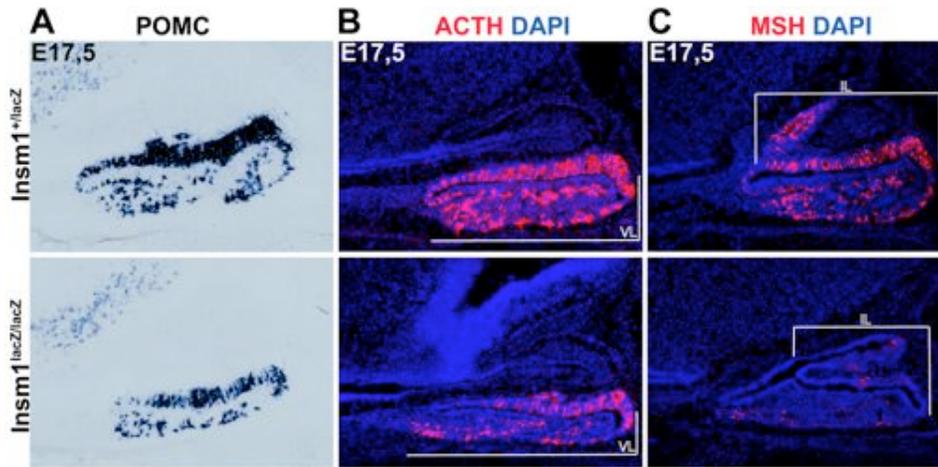


Abb. 17: Hormonexpression in corticotropen und melanotropen Zellen. Die Analyse der Expression des gemeinsamen Vorläufers für die Hormonprodukte der corticotropen und melanotropen Zellen, POMC, mittels in-situ-Hybridisierung zeigte eine verminderte Expression im Entwicklungsstadium E17,5 (A). Das prozessierte Adrenocorticotrope Hormon (ACTH, rot) wurde immunhistologisch mit einem Antikörper nachgewiesen. Die Immunreaktivität war in *Insm1*^{lacZ/lacZ}-Mäusen deutlich reduziert (B). Das prozessierte Melanotropin wurde ebenfalls mittels Antikörperfärbung (MSH, rot) untersucht. Im Intermediärlappen fanden sich in der Mutante nur vereinzelte MSH-positive Zellen (C). VL = Ventralloben, IL = Intermediärlappen

3.3 *Insm1* ist für die Expression von Genen der endokrinen Sekretionsmaschinerie essentiell

3.3.1 Genomweite Expressionsanalyse mit „microarrays“

Um weitere Unterschiede zwischen den Adenohypophysen von *Insm1*^{lacZ/lacZ}-Mäusen und von heterozygoten Kontrolltieren zu finden, führte ich eine genomweite Transkriptionsanalyse durch. Dazu isolierte ich Gesamt-RNA aus den Hypophysen von Embryonen des Stadiums E17,5 und prozessierte sie für die Hybridisierung auf Illumina MouseRef-8 „microarrays“. Die Hybridisierung und das Lesen der „arrays“ wurde von Frau Gabriele Born, einer Mitarbeiterin von Prof. Norbert Hübner (Experimentelle Genetik von Herz-Keislaferkrankungen, MDC) ausgeführt. Meine Analyse dieser Daten ergab eine Liste von Genen, deren Expressionsniveau in der Hypophyse von *Insm1*-mutanten Mäusen signifikant verändert war (Tab. 6).

| Gen | FV | p |
|---|--------|-----------|
| Hormone | | |
| Gh | -85.47 | 0.0000001 |
| Prl | -3.18 | 0.0000216 |
| Tsh β | -18.45 | 0.0000000 |
| Lh β | -4.78 | 0.0001164 |
| Fsh β | -1.78 | 0.0221871 |
| α GSU | -7.62 | 0.0000001 |
| POMC | -2.29 | 0.0001036 |
| Hormonprozessierung und -sekretion | | |
| Chga | -5.84 | 0.0000092 |
| Chgb | -19.00 | 0.0000000 |
| Pcsk1 | -5.75 | 0.0000007 |
| Pcsk2 | -8.89 | 0.0000117 |
| Scg2 | -5.51 | 0.0000054 |
| Scg3 | -6.52 | 0.0000007 |
| Scgn | -2.76 | 0.0000041 |
| muskelspezifische Gene | | |
| Myl1 | 26.23 | 0.0000000 |
| Actc1 | 13.72 | 0.0000000 |
| Sln | 8.33 | 0.0000000 |
| Msc | 6.13 | 0.0000000 |
| Thsd7b | 4.34 | 0.0000000 |
| Myh8 | 4.11 | 0.0000002 |
| Tnnt1 | 3.58 | 0.0000000 |
| Mustn1 | 3.24 | 0.0000000 |
| Mylpf | 2.87 | 0.0000012 |
| Notch-Signalweg | | |
| Dll1 | 1.92 | 0.0000062 |
| Hes1 | 1.33 | 0.0005266 |
| Hes5 | 1.18 | 0.0000729 |
| Hes6 | 1.40 | 0.0002596 |

Tab. 6: In der Adenohypophyse im Entwicklungsstadium E17,5 in *Insm1^{lacZ/lacZ}*-Mäusen differenziell exprimierte Gene.

Negative Werte für den Faktor der Veränderung der Genexpression (FV) repräsentieren eine geringere Expression der Gene in mutanten Tieren, positive Werte eine stärkere Expression.

FV=Faktor der Veränderung der Genexpression, p=p-value

3.3.2 Deregulierung endokriner Gene in *Insm1*^{lacZ/lacZ}-Tieren

Zum einen lieferte die genomweite Transkriptionsanalyse die quantitative Bestätigung meiner Beobachtungen bezüglich der Hormonexpression, zum anderen zeigte sie, dass das Expressionsniveau weiterer charakteristischer Gene signifikant verändert war. So war eine Gruppe von Genen, die für die Hormonprozessierung und -sekretion wichtig sind, in *Insm1*-mutanten Mäusen dereguliert. Zu nennen sind hier die Prohormonkonvertasen *Pcsk1* und *Pcsk2*, zwei Proteasen die Prohormone in ihre aktiven Derivate spalten. *Pcsk2* wird spezifisch in melanotropen Zellen exprimiert (Marcinkiewicz, 1993). Die reduzierte Expression war neben der verminderten MSH-Immunoreaktivität melanotroper Zellen (Abb. 17C) ein weiterer Hinweis auf deren gestörte Differenzierung.

Exemplarisch untersuchte ich einige Faktoren des Sekretionsapparates sowie Prohormonkonvertasen (Abb. 18). Diese *in-situ*-Hybridisierungsexperimente bestätigten, dass in *Insm1*-mutanten Mäusen die Expression verschiedener Gene, deren Genprodukte für Prozessierung und Sekretion der Hormone wichtig sind, reduziert war.

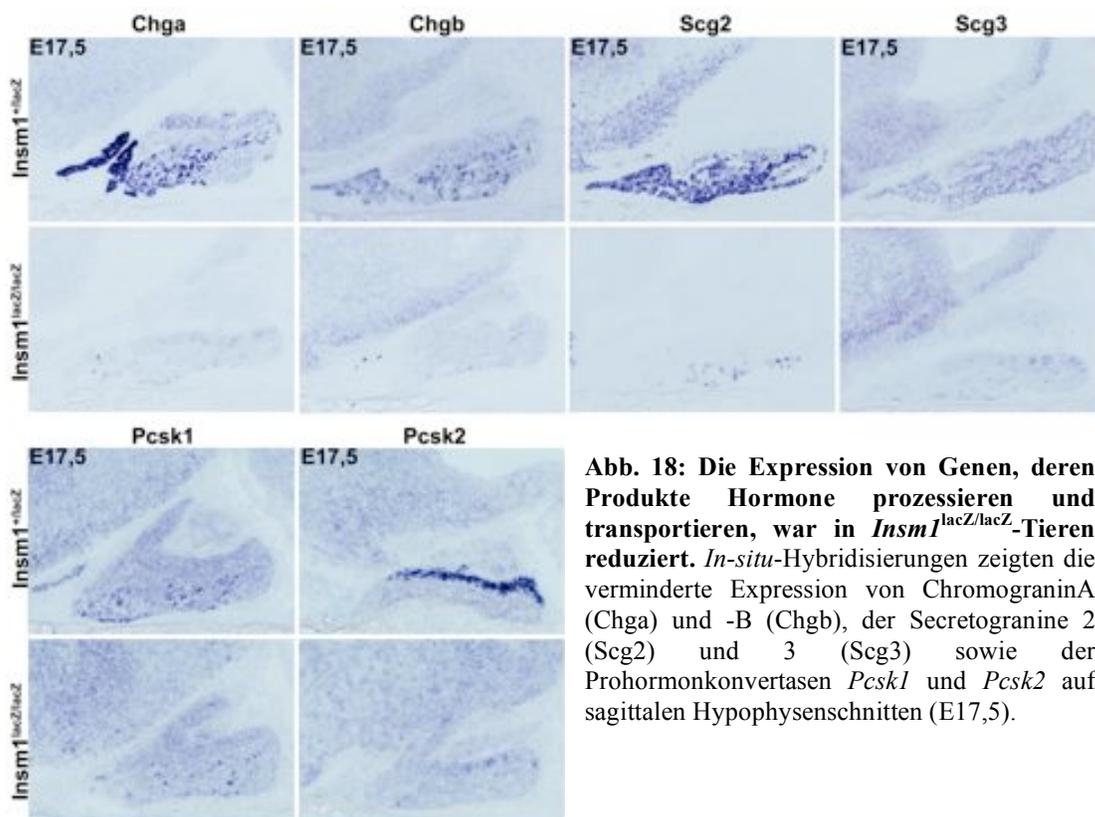


Abb. 18: Die Expression von Genen, deren Produkte Hormone prozessieren und transportieren, war in *Insm1*^{lacZ/lacZ}-Tieren reduziert. *In-situ*-Hybridisierungen zeigten die verminderte Expression von ChromograninA (Chga) und -B (Chgb), der Secretogranine 2 (Scg2) und 3 (Scg3) sowie der Prohormonkonvertasen *Pcsk1* und *Pcsk2* auf sagittalen Hypophysenschnitten (E17,5).

3.3.3 Verschiedene Gene wurden in *Insm1*-mutanten Mäusen ektopisch ausgeprägt

Weiterhin war auffällig, dass unter den in den Hypophysen von *Insm1*^{lacZ/lacZ}-Mäusen am stärksten ektopisch exprimierten Genen fast ausschließlich Gene zu finden waren, die typischerweise in gestreifter Muskulatur exprimiert werden.

Die Analyse durch *in-situ*-Hybridisierung bestätigte, dass der Verlust von *Insm1* zu einer Überexpression von *Actc1* (Actin, α cardiac muscle1), *Myl1* (Myosin, light chain 1), *Msc* (Musculin), *Tnnt1* (Troponin T1) und *Sln* (Sarcolipin) vor allem im ventralen Lappen der Adenohypophyse führte (Abb. 19). Während der Differenzierung der Adenohypophyse war *Insm1* also direkt oder indirekt für die Repression von Genen beteiligt, die eigentlich spezifisch für andere Zelltypen sind.

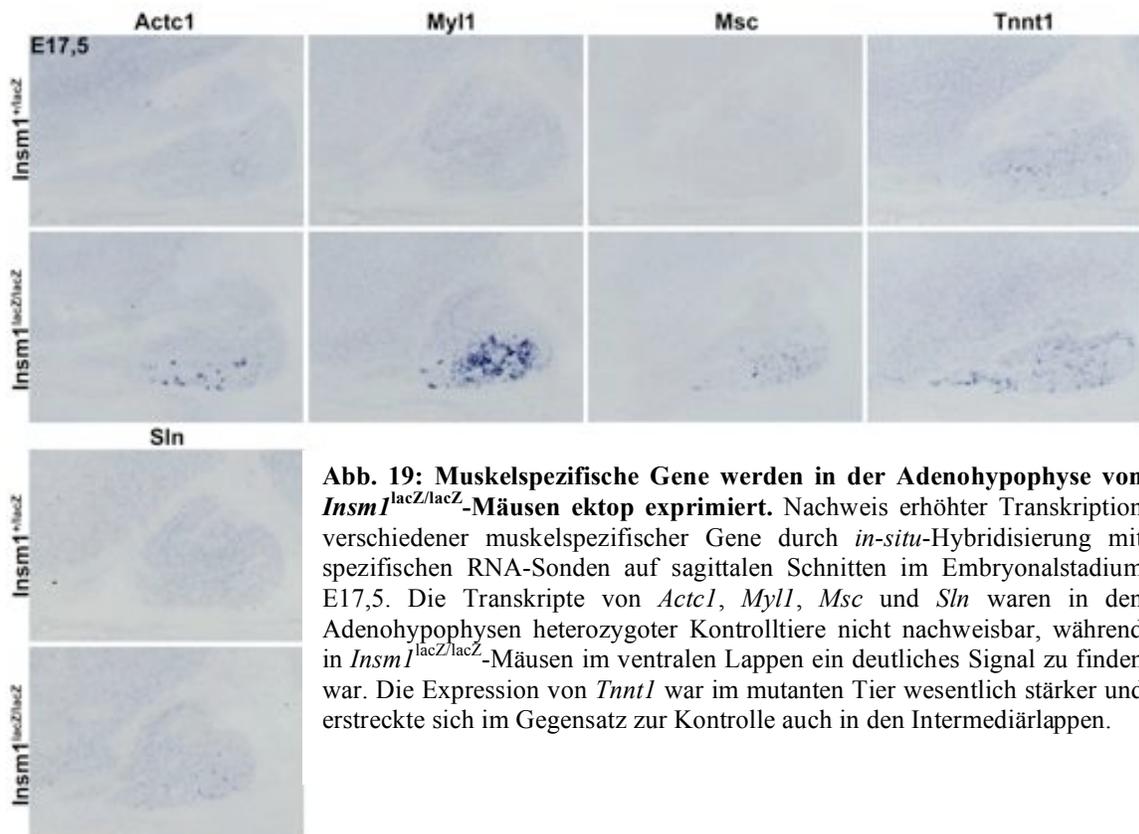


Abb. 19: Muskelspezifische Gene werden in der Adenohypophyse von *Insm1*^{lacZ/lacZ}-Mäusen ektop exprimiert. Nachweis erhöhter Transkription verschiedener muskelspezifischer Gene durch *in-situ*-Hybridisierung mit spezifischen RNA-Sonden auf sagittalen Schnitten im Embryonalstadium E17,5. Die Transkripte von *Actc1*, *Myl1*, *Msc* und *Sln* waren in den Adenohypophysen heterozygoter Kontrolltiere nicht nachweisbar, während in *Insm1*^{lacZ/lacZ}-Mäusen im ventralen Lappen ein deutliches Signal zu finden war. Die Expression von *Tnnt1* war im mutanten Tier wesentlich stärker und erstreckte sich im Gegensatz zur Kontrolle auch in den Intermediärlappen.

3.3.4 Verstärkte Aktivität des Notch-Signalwegs in der Hypophyse *Insm1*-mutanter Mäuse

Ein anderer Befund der genomweiten Transkriptionsanalyse war, dass verschiedene Komponenten des Notch-Signalweges in *Insm1*^{lacZ/lacZ}-Mäusen verstärkt exprimiert wurden (Tab. 6). Ein Ligand der Notch-Rezeptoren, *Delta-like-1* (*Dll1*) war laut Microarray-Analyse 1,92-fach stärker ausgeprägt. Die *in-situ*-Hybridisierungsanalyse bestätigte den Befund und zeigte, dass *Dll1* ist sowohl im ventralen als auch im Intermediärlappen überexprimiert wurde (E17,5). *Hes*- und *Hey*-Gene sind wichtige Zielgene des Notch-Weges und somit gute Indikatoren für eine Aktivierung der Signalkaskade. *In-situ*-Hybridisierungen zeigten, dass sowohl *Hes1* als auch *Hey1* in homozygoten *Insm1*^{lacZ}-Mäusen deutlich stärker als in den Kontrollen exprimiert waren. Die *Hes1*-Überexpression fand sich vorwiegend im Intermediärlappen, während *Hey1* im ventralen Lappen stärker ausgeprägt war (Abb. 20B).

Die Analyse an früheren Stadien zeigte, dass *Dll1* bereits im Stadium E14,5 im ventralen Lappen in *Insm1*-mutanten Mäusen deutlich stärker exprimiert wurde als in Kontrolltieren. Für die Zielgene des Notch-Weges ist der Befund nicht so eindeutig. Die *in-situ*-Hybridisierung zeigte nur eine marginal verstärkte Expression von *Hes1*, während *Hey1* im ventralen Lappen an E14,5 deutlich stärker exprimiert wurde (Abb. 20A).

Insgesamt kann man also den Schluss ziehen, dass mit *Dll1* nicht nur ein Ligand des Notch-Signalweges in der Adenohypophyse *Insm1*-mutanter Mäuse verstärkt exprimiert wurde, sondern dass dies während der Differenzierungsphase auch für einige Notch-Zielgene galt.

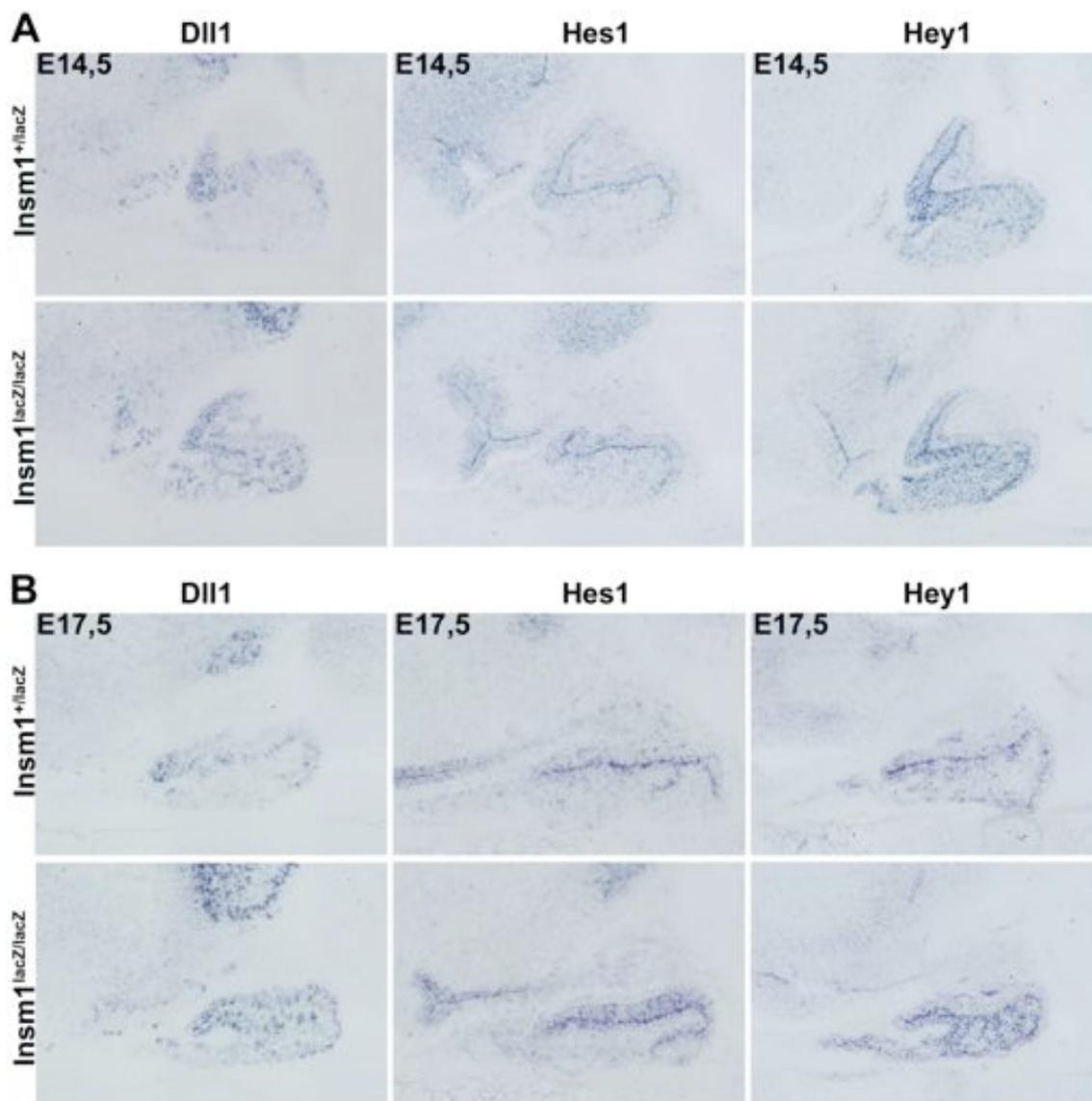


Abb. 20: In der Hypophyse *Insm1*-mutanter Mäuse war der *Notch*-Signalweg überaktiv. *In-situ*-Hybridisierungen mit spezifischen Sonden gegen *Dll1*, *Hes1* und *Hey1* auf sagittalen E14,5 (**A**) und E17,5 (**B**) Hypophysenschnitten. Alle drei Gene waren in *Insm1*-mutanten Mäusen deutlich stärker exprimiert als in den entsprechenden Kontrollen. Die *Dll1*-Überexpression war homogen über die Adenohypophyse verteilt, während sich das *Hes1*-Transkript verstärkt im Intermediärlappen und die *Hey1*-mRNA im ventralen Lappen fand.

3.4 Identifikation von Interaktionspartnern von *Insm1*

Ein weiteres Ziel meiner Arbeit war, einen Einblick in die molekulare Wirkungsweise von *Insm1* zu erhalten, und somit einen Erklärungsansatz für den beobachteten Phänotyp zu erlangen. Dazu sollte untersucht werden, mit welchen Proteinen *Insm1* interagiert. Um dies herauszufinden, führte ich Ko-Immunopräzipitationen durch und ließ die präzipitierten Proteine quantitativ mittels Tandem-Massenspektrometrie analysieren. Die Massenspektrometrie-Analysen wurden von Herrn Florian Paul (AG Mathias Selbach, MDC) durchgeführt.

3.4.1 Proteomweite Analyse von Bindungspartnern für *Insm1*

Für diese Experimente wählte ich den adhärent wachsenden Subklon D16v-F2 der Zelllinie AtT-20, der *Insm1* endogen exprimiert (Gumbiner and Kelly, 1981). Diese corticotrope Zelllinie wurde durch alternatives in Zellkultur und in vivo Passagieren eines Adenohypophysentumors aus *Mus musculus* gewonnen (Furth et al., 1953; Buonassisi et al., 1962). Ich unterschied die Proteome zweier Zell-Chargen, indem ich die Zellen in Medien kultivierte, die normale oder mit schweren Isotopen markierte Aminosäuren enthielten (SILAC). Diese Markierung erlaubt die Unterscheidung von Peptiden aus beiden Proben anhand ihrer Massendifferenz. Aus dem Verhältnis der Signalintensitäten solcher Peptidpaare konnte exakt das Mengenverhältnis der entsprechenden Proteine ermittelt werden.

Um interagierende Proteine aus den beiden unterschiedlich markierten Zellpopulationen differentiell ko-immunopräzipitieren zu können, wählte ich zwei verschiedene Ansätze. Zum einen reduzierte ich die Menge an *Insm1* in einer der beiden Populationen mittels RNAi, während die andere mit Kontroll-siRNAs transfiziert wurde. In diesem Fall wurde die Immunopräzipitation beider Chargen mit einem Anti-*Insm1* Antikörper durchgeführt (SILAC-Quick) (Selbach und Mann, 2006). Für den anderen Versuchsansatz exprimierte ich in einer der verwendeten Chargen *Insm1* mit einem 3xFLAG-tag; für dieses Experiment verwendete ich einen anti-FLAG-Antikörper. Aus den Auswertungen der massenspektrometrischen Daten ergaben sich Listen spezifisch angereicherter,

potentieller Interaktionspartner von Insm1. Durch den Vergleich zwischen Experimenten mit vertauschten Markierungen, Wiederholungsexperimenten und zwischen den beiden experimentellen Ansätzen ergaben sich einige Proteine, die ich weiter untersuchte, da sie reproduzierbar als Bindungspartner identifiziert werden konnten (Abb. 21; Tab. 7).

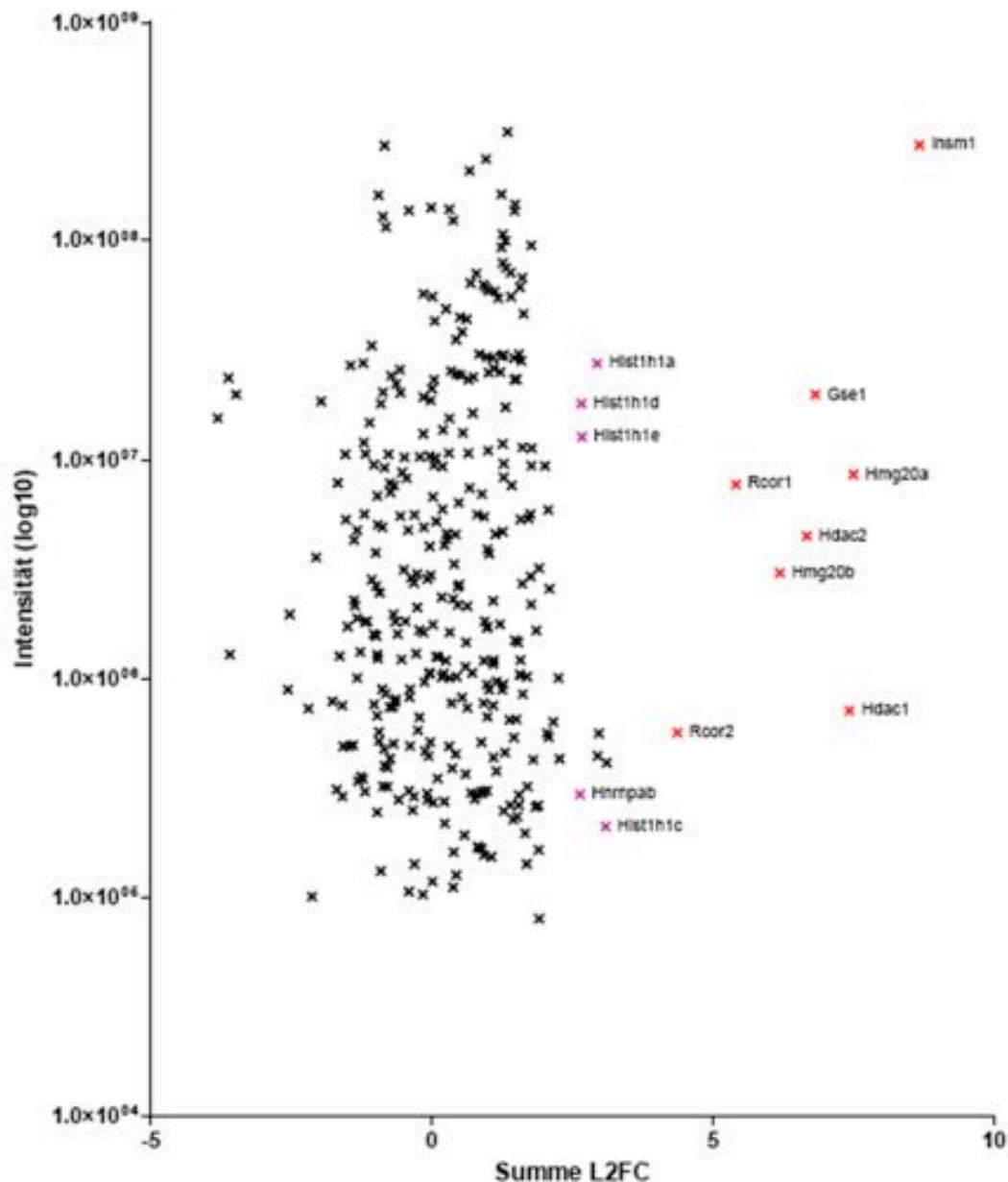


Abb. 21: Potentielle Interaktionspartner von Insm1, identifiziert durch Ko-Immunopräzipitation mit anschließender LC-MS/MS. Beispiel eines Ko-Immunopräzipitations-Experiments mit AtT-20-Zellen. Jeweils eine der beiden verwendeten Zellpopulationen exprimierte mit 3xFLAG markiertes Insm1. Die Immunopräzipitation wurde mit einem Antikörper gegen FLAG durchgeführt. Für dieses Streudiagramm wurden die logarithmierten Verhältnisse „schwerer“ zu „leichter“ bzw. „leichter“ zu „schwerer“ Peptide aus den beiden Subexperimenten mit vertauschten Markierungen summiert (Summe L2FC) und gegen die logarithmierte Signalintensität, welche ein Maß für die Abundanz eines Peptids in der Probe ist, aufgetragen.

| | |
|--------|------------------------------------|
| Lsd1 | lysine (K)-specific demethylase 1A |
| Rcor1 | REST corepressor 1 |
| Rcor2 | REST corepressor 2 |
| Rcor3 | REST corepressor 3 |
| HDAC1 | histon deacetylase 1 |
| HDAC2 | histon deacetylase 2 |
| Gse1 | Genetic suppressor element 1 |
| Hmg20a | high mobility group 20A |
| Hmg20b | high mobility group 20B |

Tab. 7: Bindungspartner von Insm1. Liste potenzieller Interaktionspartner von Insm1 in AtT-20-Zellen, die mittels der proteomweiten Analyse identifiziert wurden.

3.4.2 Insm1 interagiert mit chromatinmodifizierenden Proteinen

Um die Interaktion von Insm1 mit den Kandidaten zu bestätigen, führte ich erneut Koimmunopräzipitationen durch. Dazu wählte ich wieder AtT-20 Zellen sowie die Zelllinie GH3, die ebenfalls endogen Insm1 exprimiert; sie wurde aus *Rattus norvegicus* gewonnen. GH3 Zellen sezernieren in Kultur sowohl Wachstumshormon als auch Prolaktin und gehören somit einem anderen Hypophysenzelltyp als AtT-20 Zellen an (Tashjian et al., 1968; Tashjian et al., 1970). Endogenes Insm1 wurde aus Zelllysaten präzipitiert, und das Präzipitat wurde einer SDS-Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot unterzogen. Dabei konnte ich die Interaktion von Insm1 mit Lsd1, Rcor1, HDAC1 und HDAC2 in beiden Zelllinien bestätigen (Abb. 22). Insm1 bildete demzufolge einen Komplex mit verschiedenen Proteinen, die an der Modifikation von Histonen beteiligt sind, dieser Komplex konnte in corticotropen und somatotropen Zellen nachgewiesen werden.

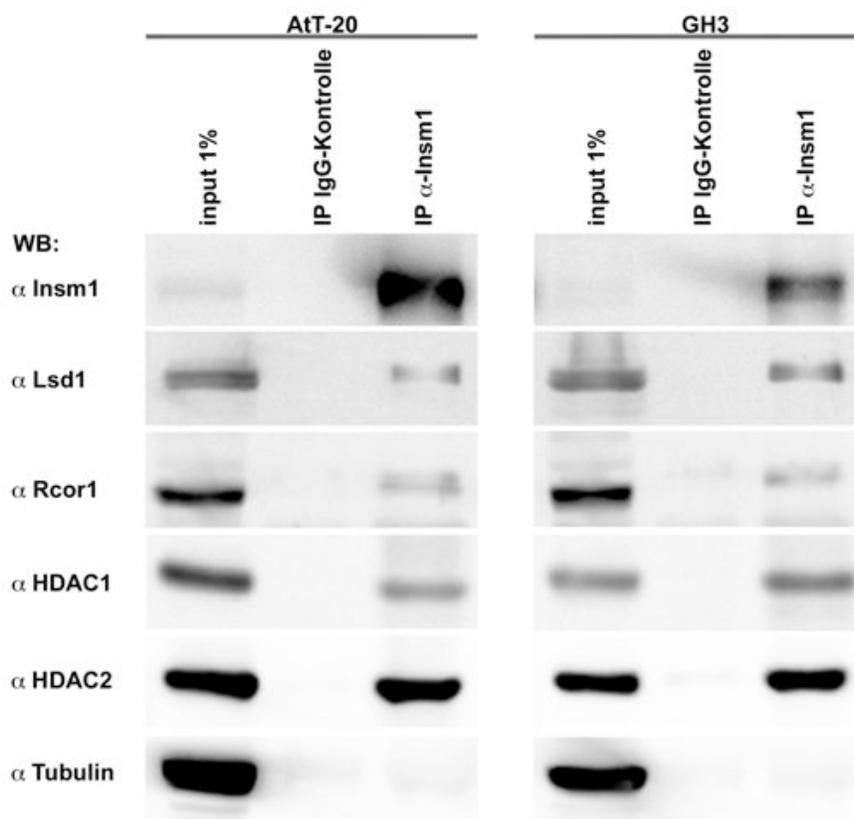


Abb. 22: Insm1 interagiert mit chromatinmodifizierenden Proteinen. Koimmunopräzipitationen an Lysaten von AtT-20- bzw. GH3-Zellen mit Anti-Insm1 Antikörpern. Präzipitate wurden einer Western Blot-Analyse mit den indizierten Antikörpern unterzogen. Input = 1% des für die IP verwendeten Lysats, IP IgG-Kontrolle = Immunopräzipitation mit nicht spezifischem Antiserum, IP α -Insm1 = Immunopräzipitation mit polyklonalen Antikörpern gegen Insm1, WB = Western Blot

3.4.3 Die SNAG-Domäne vermittelt spezifische Interaktionen von Insm1

Gfi-1, ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, enthält wie Insm1 eine SNAG-Domäne, und eine Punktmutation in dieser Domäne interferiert mit der Bindung von Gfi-1 an Chromatin-modifizierende Proteine (Saleque, 2007). Um herauszufinden, ob diese Domäne auch bei Insm1 essentiell für die Komplexbildung ist, generierte ich eine mutierte Variante, der die ersten acht Aminosäuren der SNAG-Domäne fehlen. Dieses mutierte und mit einem 3xFLAG-tag versehene Protein exprimierte ich wiederum in AtT-20 Zellen (Abb. 23).

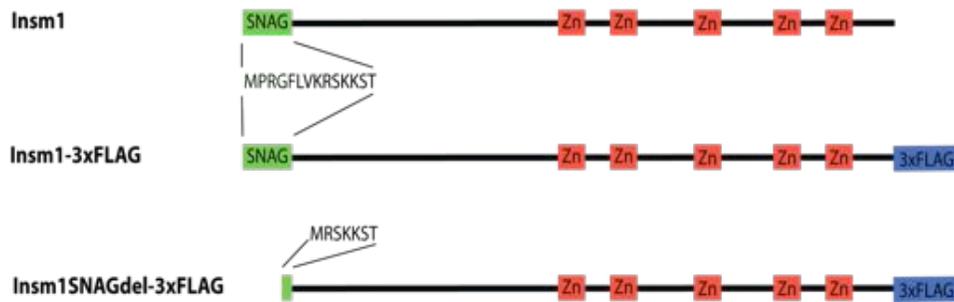


Abb. 23: Domänenstruktur des *Insm1*-Proteins. Darstellung der funktionellen Domänen von *Insm1* im Wildtyp-Protein sowie in den verwendeten Varianten. Zum einen einer am C-Terminus mit 3xFLAG markierten Wildtyp-Version (*Insm1*-3xFLAG), zum anderen einer ebenfalls markierten Version mit trunzierter SNAG-Domäne (*Insm1*SNAGdel-3xFLAG).

Ko-Immunopräzipitationen zeigten, dass die verkürzte Variante von *Insm1* nicht mit *Lsd1*, *Rcor1*, *HDAC1* oder *HDAC2* interagierte (Abb. 24).

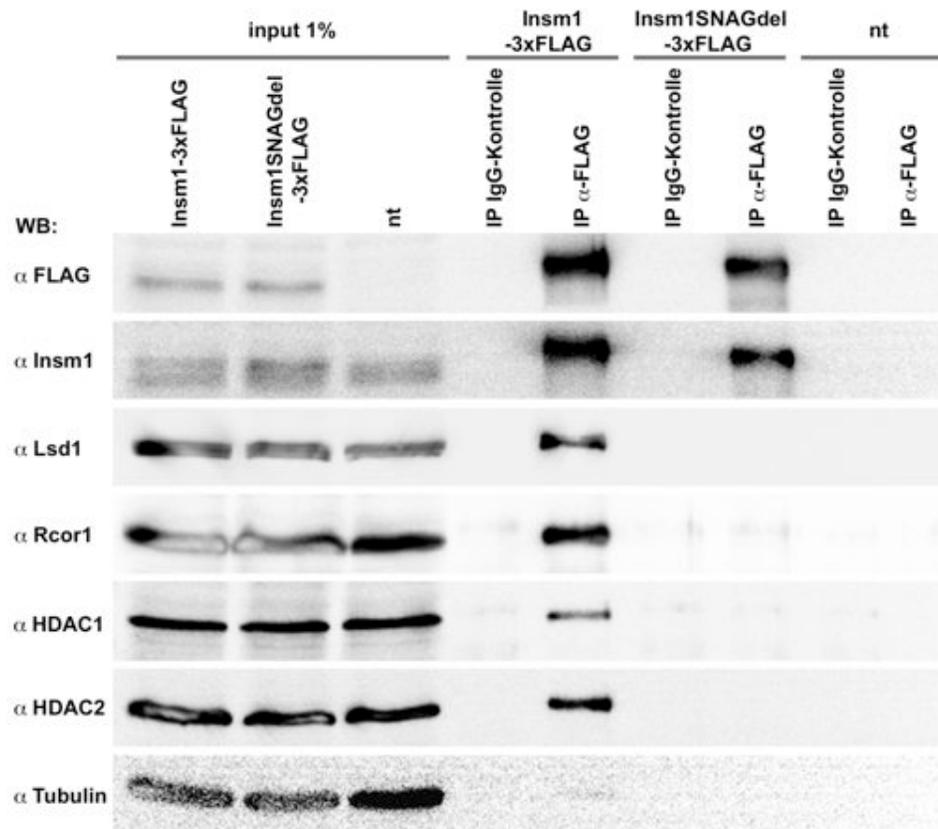


Abb. 24: Die SNAG-Domäne war für die Bindung von *Insm1* an Chromatin-modifizierende Proteine verantwortlich. Koimmunopräzipitationen von Lysaten transduzierter AtT-20Zellen. Präzipitate wurden einer Western Blot-Analyse mit den angegebenen Antikörpern unterzogen. Input = 1% des für die Immunopräzipitationen verwendeten Lysats, IP IgG-Kontrolle = IP mit nicht spezifischen Antikörpern, IP α -FLAG = IP mit monoklonalen Antikörpern gegen FLAG, nt = nicht transduziert, WB = Western Blot

Als weiteres Kontrollexperiment führte ich Ko-Immunopräzipitationen gegen Lsd1, Rcor1 und HDAC1 durch und analysierte sie mittels Western Blot Analysen. Hierbei bestätigte sich erneut die Interaktion von Lsd1, Rcor1 und HDAC1 mit Insm1. Die mutierte Variante von Insm1 mit deletierter SNAG-Domäne konnte dagegen nicht ko-präzipitiert werden (Abb. 25). Die SNAG-Domäne schien demzufolge die direkte oder indirekte Bindung von Insm1 an Proteine zu vermitteln, die ihrerseits für die Demethylierung und Deacetylierung von Histonen verantwortlich sind.

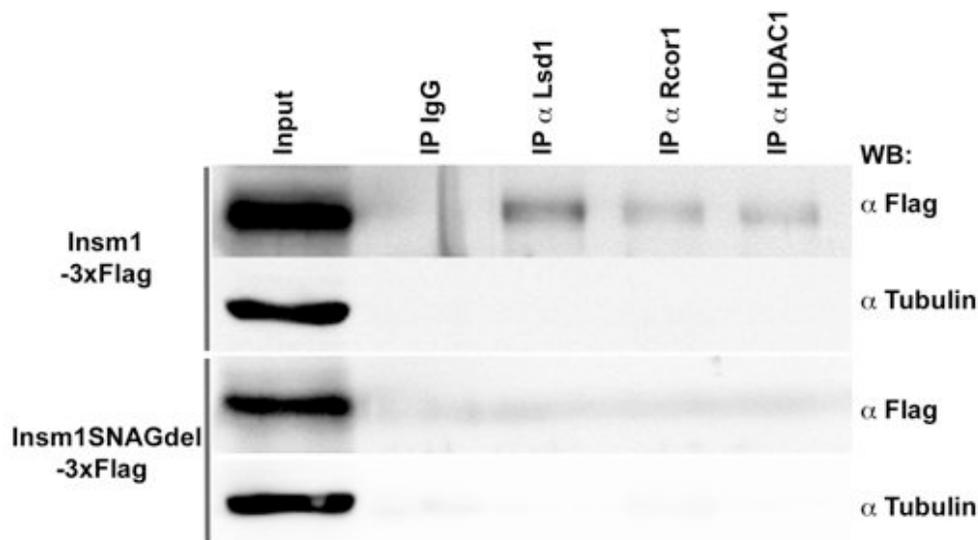


Abb. 25: Die SNAG-Domäne war für die Bindung von *Insm1* an Interaktionspartner essentiell. Ko-Immunopräzipitationen an Lysaten von transduzierten AtT-20Zellen mit Antikörpern gegen Lsd1, Rcor1 und HDAC1. Präzipitate wurden einer Western Blot-Analyse mit α-FLAG-Antikörpern unterzogen.

Input = 1% des für die IP verwendeten Lysats, IP IgG = Immunopräzipitation mit nicht spezifischem Antiserum, IP α-Lsd1 = Immunopräzipitation mit polyklonalen Antikörpern gegen Lsd1, IP α-Rcor1 = Immunopräzipitation mit polyklonalen Antikörpern gegen Rcor1, IP α-HDAC1 = Immunopräzipitation mit polyklonalen Antikörpern gegen HDAC1, WB = Western Blot

4 Diskussion

Über das endokrine System wird die Homöostase im Organismus koordiniert und reguliert. Die Hirnanhangdrüse ist dabei die übergeordnete Instanz. Daher ist es von wissenschaftlichem Interesse, die Entwicklung und Physiologie dieses wichtigen neuroendokrinen Organs zu verstehen. In dieser Arbeit habe ich die ontogenetische Rolle des Zinkfinger-Transkriptionsfingers *Insm1* für die Adenohypophyse *in vivo* an *Insm1*-mutanten Mäusen untersucht. Darüber hinaus habe ich an Zelllinien aus Adenohypophysentumoren untersucht, mit welchen Proteinen *Insm1* interagiert.

4.1 Die Expression von *Insm1* in der Adenohypophyse

Ich konnte das *Insm1*-Protein ab E11,5 in der sich entwickelnden Adenohypophyse nachweisen. Diese Expression beschränkte sich dabei anfangs auf wenige Zellen. Diese Zellen lagen in einem bestimmten Bereich von Rathke's Tasche, in dem sich zu diesem Zeitpunkt die Verbindung zur Mundhöhle schließt, und der im weiteren Verlauf die rostrale Spitze der Adenohypophyse bildet. Im Stadium E12,5 beschränkte sich die Expression von *Insm1* meist noch auf die rostrale Spitze, und zusätzlich wurde *Insm1* in sehr wenigen Zellen im Ventrallappen beobachtet. In caudalen Bereichen der expandierenden Adenohypophyse war das Protein noch nicht nachweisbar. Für die frühen thyrotropen Zellen ist die Expression der terminalen Differenzierungsmarker α GSU ab E11,5 und TSH β ab E12,5 beschrieben. Das Expressionsmuster von *Insm1* in diesen Stadien lässt den Schluss zu, dass *Insm1* während der Differenzierung neuroendokriner Zellen, in diesem Fall thyrotroper Zellen, exprimiert wurde. Zellen, die noch nicht differenzierten, exprimierten *Insm1* nicht. E13,5 war *Insm1* im ventrocaudalen Bereich des Ventrallappens nachweisbar. E15,5 umfasste die Expression den gesamten Ventrallappen und Zellen des Intermediärlappens. Dieses sich ausbreitende Expressionsmuster fällt mit der Differenzierung der anderen neuroendokrinen Zelltypen in der Adenohypophyse zusammen. Also scheint *Insm1* auch hier während der Differenzierung der neuroendokrinen Zellen exprimiert zu werden. E18,5 fand sich *Insm1* in der gesamten Adenohypophyse. Diese breite Expression persistierte in adulten

Mäusen. Da alle neuroendokrinen Zelltypen der Adenohypophyse bis zum Stadium E17,5 ausdifferenziert sind, lässt die Aufrechterhaltung der *Insm1* Expression Funktionen nicht nur in der Differenzierung, sondern auch in der Aufrechterhaltung des differenzierten Zellstatus zu. Der Vergleich der *Insm1* Expression während der Ontogenese der Adenohypophyse mit der Expression in anderen neuroendokrinen Geweben zeigt Parallelen. So ist *Insm1* auch im sich entwickelnden Pankreas in allen endokrinen Zelltypen nachweisbar. Das Protein findet sich hier in Vorläuferzellen, sich entwickelnden, postmitotischen und in terminal differenzierten Zellen im adulten Organismus. Auch in entero-endokrinen Zellen des Dünndarms wird *Insm1* während der Differenzierung exprimiert und persistiert in adulten Mäusen (Gierl, et al., 2005). Meine Kollegen, Hendrik Wildner und Jia Shiqi, haben dies auch in neuroendokrinen Zellen der Lunge beobachtet.

4.2 *Insm1* ist essentiell für die korrekte Differenzierung neuroendokriner Zellen der Adenohypophyse

Im weiteren Verlauf der Arbeit verglich ich die Entwicklung endokriner Zellen der Adenohypophyse von *Insm1* mutanten Mäusen mit Kontrolltieren. Dabei zeigte sich, dass die Expression aller für endokrine Zellen der Adenohypophyse charakteristischen Hormone E17,5 stark reduziert war. *In-situ*-Hybridisierungen ergaben, dass die β -Untereinheiten des Thyrotropins (TSH β), des Lutropins (LH β) und des Follitropins (FSH β) überhaupt nicht transkribiert wurden. Das Gen der gemeinsamen α -Untereinheit dieser Hormone (α -GSU) wurde in *Insm1*-mutanten Mäusen zwar exprimiert, diese Expression war aber schwächer und auf weniger Zellen beschränkt. Die meisten der α -GSU-positiven Zellen in den Mutanten lagen im Bereich der rostralen Spitze und entsprachen somit der frühen Population thyrotroper Zellen. Die genomweite Transkriptionsanalyse mittels „microarrays“ bestätigte die *in-situ*-Hybridisierungsergebnisse. So war die Expression von TSH β um den Faktor 18 reduziert, die Transkripte von LH β , FSH β und α -GSU waren 4,8-fach, 1,8-fach bzw. 7,6-fach verringert. Ein anderes Hormon, das Wachstumshormon (GH) der somatotrophen Zellen, war mittels *in-situ*-Hybridisierung in *Insm1*-mutanten Mäusen nur in sehr wenigen Zellen

nachweisbar. Laut Analyse der „microarray“-Daten war diese Expression um den Faktor 85 verringert. Die ebenfalls der „Pit-Lineage“ angehörenden laktotropen Zellen wurden auf die Expression des Prolaktins (Prl) untersucht. Das Signal der *in-situ*-Hybridisierung für Prl war im Vergleich mit anderen Hormonen auch in Kontrolltieren relativ schwach. Dies ist auf das geringe Expressionsniveau im Stadium E17,5 zurückzuführen, da die Expression von Prl erst während der Adoleszenz ihre volle Intensität erreicht. Trotz des geringen Expressionsniveaus ließ sich bei der „microarray“-Analyse eine um den Faktor 3,2 geringere Expression nachweisen. Eine *in-situ*-Hybridisierung, die das Transkript von Proopiomelanocortin (POMC) nachweist, zeigte in *Insm1^{lacZ/lacZ}*-Mäusen eine normale Verteilung. Das Expressionsniveau war jedoch um den Faktor 2,3 geringer. POMC ist das gemeinsame Vorläufermolekül von Adrenocorticotropin (ACTH) und Melanotropin (MSH). Um die Prozessierung von POMC in corticotropen Zellen und melanotropen Zellen zu untersuchen, führte ich Immunfluoreszenzanalysen für die Prozessierungsprodukte, ACTH und MSH, durch. In beiden Fällen war eine deutlich reduzierte Immunreaktivität zu beobachten. Allerdings waren die Signale für ACTH und MSH nicht auf die Bereiche der Adenohypophyse beschränkt, in der die korrespondierenden Zelltypen liegen. So war ACTH im Intermediär- und MSH im Ventrallappen nachweisbar. Da beide Spaltprodukte überlappende Aminosäuresequenzen haben, ist diese Beobachtung vermutlich auf eine Kreuzreaktivität der eingesetzten Antikörper zurückzuführen. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass in *Insm1*-mutanten Mäusen keiner der sechs endokrinen Zelltypen der Adenohypophyse die charakteristischen Hormone in normaler Intensität exprimiert.

Aus den „microarray“-Daten ergaben sich noch weitere Hinweise auf die gestörte Differenzierung. So war ihnen zu entnehmen, dass andere charakteristische Gene neuroendokriner Zellen in deutlich reduziertem Maß exprimiert wurden. Zu diesen gehören die Granine, welche für die korrekte physiologische Funktion endokriner Zellen essentiell sind. Sie sind an der Verpackung der Hormone in sekretorische Vesikel, ihrem Transport sowie der Prozessierung und Sekretion beteiligt (Karlsson, 2001; Taupenot et al., 2003). Die Transkripte von Chromogranin A und -B waren in *Insm1^{lacZ/lacZ}*-Mäusen um den Faktor 5,8 bzw. 19 verringert. Ebenfalls in geringerem Umfang wurden die Secretogranine Scg2, Scg3 und Scgn exprimiert. Die Prozessierung von Prohormonen

wird in der Adenohypophyse von den Prohormonkonvertasen *Pcsk1* und -2 übernommen (Day et al., 1992). Die Expression beider Enzyme war in *Insm1*-mutanten Mäusen ebenfalls deutlich geringer. Die verminderte Expression dieser Gene konnte mit *in-situ*-Hybridisierungen bestätigt werden.

Da die terminale Differenzierung der endokrinen Zellen in der Adenohypophyse offensichtlich gestört war, untersuchte ich, ob die Spezifizierung dieser Zellen in *Insm1*-mutanten Mäusen korrekt verlief, und ob die für die normale Differenzierung benötigten Transkriptionsfaktoren richtig exprimiert wurden. Spezifizierung untersuchte ich, in dem ich die Expression der Transkriptionsfaktoren *Pitx1*, *Prop1* und *Ascl1* untersuchte, die in der frühen Entwicklungsphase der endokrinen Zellen exprimiert werden. Die Spezifizierung der endokrinen Zellen schien dabei korrekt zu verlaufen da die Expression dieser Faktoren im Stadium E12,5 nicht verändert war. Ebenso war die in dieser Phase sehr wichtige Aktivität des Notch-Signalwegs in *Insm1^{lacZ/lacZ}*-Mäusen unverändert, wie die Expressionsanalyse von *Dll1*, *Hes1* und *Hey1* zeigte. Betrachtete ich jedoch die terminalen Differenzierungsprogramme der einzelnen endokrinen Zelltypen, die durch die Expression charakteristischer Transkriptionsfaktoren eingeleitet werden, so stellte ich erhebliche Abweichungen in *Insm1*-mutanten Mäusen fest. Die für die terminale Differenzierung in der Adenohypophyse essentiellen Transkriptionsfaktoren *Tbx19*, *Pit1*, *Gata2*, *Math3* und *SF1* wurden entweder überhaupt nicht oder nur verzögert und in deutlich geringerem Maß exprimiert. Die terminalen Differenzierungsprogramme aller endokrinen Zelltypen der Adenohypophyse verlaufen also nicht normal.

Möglicherweise ist die erhöhte Aktivität des Notch-Signalwegs während der terminalen Differenzierung mit verantwortlich für diese Blockade. Laut „microarray“-Daten waren sowohl der Ligand *Dll1* als auch verschiedene typische Notch-Zielgene der *Hairy/Enhancer-of-split-(Hes)*-Familie in *Insm1*-mutanten Mäusen des Stadiums E17,5 verstärkt exprimiert, was ich mittels *in-situ*-Hybridisierungen bestätigen konnte. Für die Differenzierung der endokrinen Zellen der Adenohypophyse jedoch ist die Abschwächung der Notch-Signale ab dem Stadium E13,5 notwendig. Genetische Studien haben gezeigt, dass eine Überexpression konstitutiv aktiver Notch-Rezeptoren die terminale Differenzierung der Zellen blockiert (Raetzman et al., 2006; Zhu et al., 2006).

Eine Veränderung in der Aktivität des Notch-Signalwegs wurde jedoch in anderen neuroendokrinen Geweben *Insm1*-mutanter Mäuse bisher nicht beobachtet. Da auch in diesen Geweben eine Blockade der terminalen Differenzierung zu beobachten ist, vermute ich, dass der hier beobachtete Phänotyp nicht alleine auf die gestörte Notch-Signalübertragung zurückzuführen ist.

Eine weitere Auffälligkeit in den „microarray“-Daten war, dass unter den zehn in *Insm1*-mutanten Mäusen am stärksten überexprimierten Genen acht zu einer Gruppe gehörten, deren Expression eigentlich für differenzierte Muskelzellen typisch ist. Durch *in-situ*-Hybridisierungen konnte dies für einige der Gene verifiziert werden. So waren die Transkripte von *Actc1* (Actin, α cardiac muscle1), *Myll* (Myosin, light chain 1), *Msc* (Musculin) und *Sln* (Sarcolipin) in unterschiedlicher Stärke vorwiegend im Ventralappen, *Tnnt1* (Troponin T1) dagegen in der gesamten Adenohypophyse, inklusive Intermediärlappen und rostraler Spitze, nachzuweisen. Muskelzellen werden vom Mesoderm gebildet, während die Hypophyse aus dem Ektoderm entsteht. Damit exprimierte also ein ektodermales Derivat in *Insm1*-mutanten Mäusen Gene, die normalerweise im differenzierten Mesoderm vorkommen. Oft wird in mutierten Geweben beobachtet, dass Gene ektopisch exprimiert werden; meist sind dies jedoch Gene, die in der normalen Entwicklung typisch für ontogenetisch sehr nahe verwandte Zelltypen sind. Die ektopische Expression mesodermaler Genen in Ektodermderivaten ist also sehr ungewöhnlich. Allerdings sollte darauf hingewiesen werden, dass die Zellen in der veränderte Hypophyse nicht zu Muskelzellen transdifferenziert waren, da sie noch immer hypophysenspezifische Gene wie *aGSU*, *POMC*, *Pit1*, *Tbx19* und *NeuroDI*, wenn auch in geringen Mengen, exprimierten und darüber hinaus nur einige Gene des Muskelprogramms ausprägten. Stattdessen interpretiere ich meine Beobachtung so, daß Gene, die normalerweise im Ektoderm reprimiert werden, in der *Insm1*-mutanten Hypophyse teilweise de-reprimiert waren.

Außer der Blockade in der Differenzierung beobachtete ich keine weiteren klaren Veränderungen in der Hypophyse; Morphologie und Größe des Organs waren unverändert. Generell ähneln sich die Phänotypen, die in neuroendokrinen Geweben *Insm1*-mutanter Mäuse beobachtet werden. So ist die Differenzierung endokriner Zellen

im Pankreas und Darm blockiert, die Zellen sind aber vorhanden (Gierl, et al., 2005). Mein Kollege Jia Shiqi und ich haben neuroendokrine Zellen in den Lungen *Insm1*-mutanter Mäuse untersucht und festgestellt, dass diese ebenfalls vorhanden, aber in ihrer Differenzierung blockiert sind (nicht publizierte Daten). Zusammen zeigen diese Analysen, dass *Insm1* für ein generelles neuroendokrines Differenzierungsprogramm essentiell ist.

4.3 Insm1 interagiert mit Proteinen, die die Chromatinstruktur beeinflussen

Um einen Einblick in die molekulare Wirkungsweise von *Insm1* zu erlangen, führte ich massenspektrometrische Analysen der Interaktionspartner durch, und setzte dazu SILAC-QUICK-Experimente an der Zelllinie AtT-20 ein. *Insm1* enthaltende Komplexe wurden mittels Ko-Immunopräzipitation aufgereinigt und anschließend von Herrn Florian Paul mittels Tandem-Massenspektrometrie analysiert. Durch mehrfache Kontrollexperimente konnte eine Gruppe von Proteinen identifiziert werden, die höchst wahrscheinlich mit *Insm1* einen Komplex bilden. Dazu gehören *Lsd1*, *Rcor1*, -2 und -3, HDAC1 und -2, sowie *Hmg20a* und -b. Allen diesen Proteinen wird in der Literatur eine Funktion in der Transkriptionskontrolle zugewiesen. Weiterhin konnte *Gse1* als potenzieller Interaktionspartner identifiziert werden. Die Interaktion von *Insm1* mit *Lsd1*, *Rcor1* sowie HDAC1 und -2 konnte ich mittels Ko-Immunopräzipitation und anschließendem Western Blot in AtT-20- und GH3-Zellen bestätigen. In weiteren Experimenten konnte ich zeigen, dass die SNAG-Domäne von *Insm1* für diese Bindungen essentiell ist.

Lsd1 ist eine Lysin-spezifische Demethylase, die mono- und dimethylierte Lysinreste an den Positionen vier und neun von Histon3 demethyliert. Somit entfernt sie die Transkription aktivierende Modifikationen von Histon3 und hat eine reprimierende Funktion. Weiterhin scheint *Lsd1* über die Demethylierung der DNA-Methyltransferase *Dnmt1* deren Stabilität und somit indirekt die DNA-Methylierung zu beeinflussen (Wang et al., 2009). Die Histondeacetylasen HDAC1 und -2 wirken wie *Lsd1* ebenfalls reprimierend auf die Genexpression (Wade, 2001). Zusammen mit den Ko-Repressoren *Rcor1*, -2 und -3 bilden *Lsd1* sowie HDAC1 und -2 einen Kernkomplex, der von

verschiedenen DNA-bindenden Proteinen rekrutiert werden kann. So basiert beispielsweise die Funktion des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors REST/Nrsf in der Suppression neuronaler Gene in nicht neuronalen Zellen auf der Rekrutierung dieses Komplexes (Lee et al., 2005). Auch die mit *Insm1* verwandten Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren Gfi-1 und Gfi-1b interagieren über ihre SNAG-Domänen mit Lsd1, Rcor1, -2 und -3 sowie HDAC1 und -2. Gfi-1 und Gfi-1b sind für die Differenzierung bestimmter Zelltypen während der Hämatopoiese essentiell. So treiben sie in myeloiden Vorläuferzellen die Differenzierung zu Granulozyten voran und supprimieren die Entwicklung von Makrophagen (Saleque et al., 2007). Hier lassen sich gewisse Parallelen zu *Insm1* erkennen: i) sowohl *Insm1* als auch Gfi-1 bzw. -1b sind essentiell für bestimmte Differenzierungsprogramme; ii) die Proteine verwenden die gleichen Kofaktoren für die Kontrolle ihrer Zielgene; iii) die SNAG-Domäne ist für die Rekrutierung dieser Kofaktoren notwendig. Möglicherweise handelt es sich hier also um ein Beispiel für die evolutionäre Konservierung eines Mechanismus zwischen verwandten Genen. Diese Gene sind in den Geweben, in denen sie exprimiert werden für die Repression von Zielgenen verantwortlich und erlauben eine zelltypspezifische Differenzierung.

Weiterhin von Interesse ist der Vergleich des hier beobachteten Phänotyps mit dem einer Mauslinie, in der *Lsd1* spezifisch in der Adenohypophyse eliminiert wurde. Der Verlust von *Lsd1* oder *Insm1* führt zu sehr ähnlichen Veränderungen der Adenohypophyse (Wang et al., 2007): i) die frühe Entwicklung der Adenohypophyse ist nicht gestört; ii) die abnormale Expression der Transkriptionsfaktoren, die die Differenzierung der endokrinen Zelltypen kontrollieren, ist in beiden Mutanten sehr ähnlich; iii) die terminale Differenzierung der endokrinen Zellen ist blockiert; iiiii) das Notch-Zielgen *Hey1* ist in *Lsd1*-mutanten Mäusen deutlich überexprimiert. Der in dieser Arbeit vorgeschlagene Wirkmechanismus bezieht jedoch *Insm1* nicht ein, sondern beschränkt sich auf die Rolle anderer Transkriptionsfaktoren. Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten bezüglich der Protein-Protein-Interaktionen und aufgrund der auffälligen Parallelen in den Phänotypen schlage ich vor, *Insm1* als einen zentralen Transkriptionsfaktor zu sehen, der den Lsd1 Komplex an regulatorische Sequenzen rekrutiert.

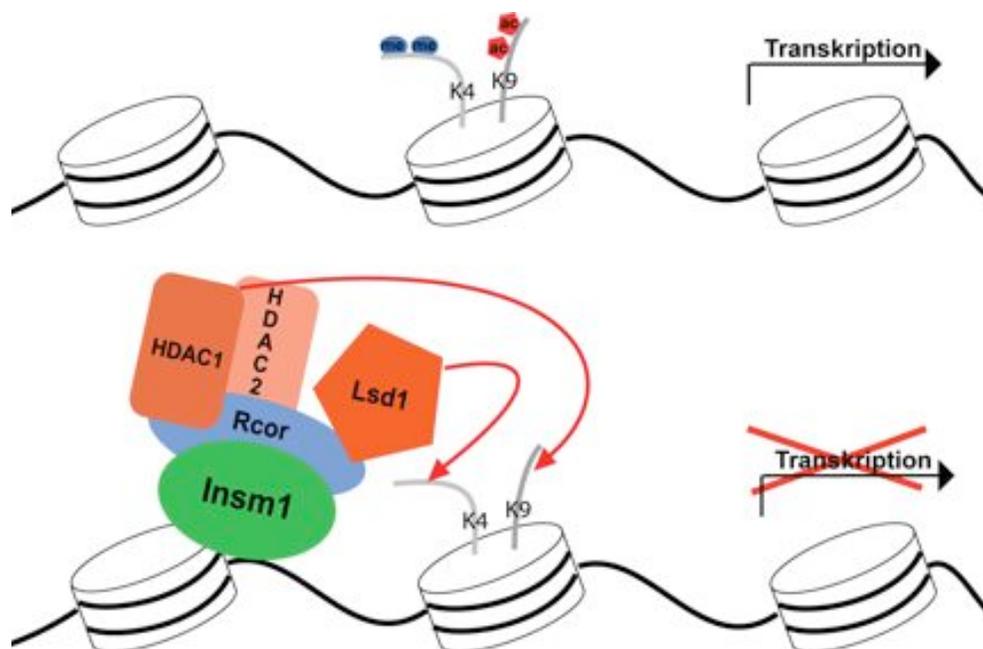


Abb. 26: Hypothetisches Modell zur Wirkungsweise von Insm1.

Insm1 könnte in sequenz-spezifischer Weise an regulatorische Sequenzen von Zielgenen binden und den Rcor-Lsd1-HDAC-Komplex an diese Sequenzen rekrutieren. Dieser Komplex würde infolge aktivierende Methyl- und Acetylreste von Histonen entfernen, und damit repressiv wirken. Insm1 fungierte also als Repressor.

4.4 Ausblick

In dieser Arbeit habe ich gezeigt, dass alle endokrinen Zelltypen der Adenohypophyse während und nach ihrer Differenzierung *Insm1* exprimieren, und dass diese Expression in adulten Mäusen persistiert. Die Analyse *Insm1*-mutanter Mäuse zeigte, dass *Insm1* für die Differenzierung dieser Zellen von entscheidender Bedeutung ist. Meine Interaktionsstudien in verschiedenen Zelllinien ergaben, dass Insm1 Proteine bindet, denen eine Repressorfunktion zugeschrieben wird. Offen bleibt jedoch die Frage, an welche regulatorischen DNA-Sequenzen Insm1 bindet. Um direkte Zielgene von Insm1 zu finden, wird es nötig sein, CHIP-Seq-Analysen durchzuführen. Diese Ergebnisse in Kombination mit weiteren Expressionsanalysen an früheren Stadien *Insm1*-mutanter Mäuse werden es erlauben, den molekularen Wirkmechanismus von Insm1 während der Differenzierung genau zu verstehen.

5 Literatur

Bhaumik S. R., Smith E., Shilatifard A..

(2007). Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol.* **14(11)** :1008-16

Birnboim H. C., Doly J.

(1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-23.

Blackwell R. E., Guillemin R.

(1973). Hypothalamic control of adenohipophysial secretions. *Annu Rev Physiol.* **1973**;35:357-90

Breslin, M. B., Zhu, M., Notkins, A. L. and Lan, M. S.

(2002). Neuroendocrine differentiation factor, IA-1, is a transcriptional repressor and contains a specific DNAbinding domain: identification of consensus IA-1 binding sequence. *Nucleic Acids Res.* **30**, 1038-45.

Buonassisi V., Sato G., Cohen A. I.

(1962). Hormone-producing cultures of adrenal and pituitary tumor origin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **15**;48:1184-90

Camper S. A., Saunders T. L., Katz R. W., Reeves R. H.

(1990). The Pit-1 transcription factor gene is a candidate for the murine Snell dwarf mutation. *Genomics.* **8(3)**:586-90.

Couly G. F, Le Douarin N. M.

(1985). Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. I. Developmental relationships between placodes, facial ectoderm, and prosencephalon. *Dev Biol.* **110**:422-39.

Cox J., Mann M.

(2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol.* **26**:1367-72.

Dasen JS, O'Connell SM, Flynn SE, Treier M, Gleiberman AS, Szeto DP, Hooshmand F, Aggarwal AK, Rosenfeld MG.

(1999). Reciprocal interactions of Pit1 and GATA2 mediate signaling gradient-induced determination of pituitary cell types. *Cell.* **97(5)**:587-98.

Day, R., Schafer, M. K., Watson, S. J., Chre'tien, M., Seidah, N. G.

(1992). Distribution and regulation of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the rat pituitary. *Mol Endocrinol.* **6**: 485-497.

Duggan, A., Madathany, T., De Castro, S. C. P., Gerelli, D., Gudatti, K., Garcia-anoveros, J.

(2008). Transient expression of the conserved zinc finger gene INSM1 in progenitors and nascent neurons throughout embryonic and adult neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* **507**, 1497-1520

El Amraoui A, Dubois PM.

(1993). Experimental evidence for an early commitment of gonadotropin-releasing hormone neurons, with special regard to their origin from the ectoderm of nasal cavity presumptive territory. *Neuroendocrinology.* **57**:991-1002.

Ericson J., Norlin S., Jessell T. M., Edlund T.

(1998). Integrated FGF and BMP signaling controls the progression of progenitor cell differentiation and the emergence of pattern in the embryonic anterior pituitary. *Development.* **125(6)**:1005-15.

Farkas L.M., Haffner C., Giger T., Khaitovich P., Nowick K., Birchmeier C., Pääbo S., Huttner W. B.

(2008). Insulinoma-associated 1 has a panneurogenic role and promotes the generation and expansion of basal progenitors in the developing mouse neocortex. *Neuron*. **60**:40-55.

Furth J., Gadsen E. L., Upton A. C.

(1953). ACTH secreting transplantable pituitary tumors. *Proc Soc Exp Biol Med*. **84**:253-4.

Gierl M. S., Karoulias N., Wende H., Strehle M., Birchmeier C.

(2006). The zinc-finger factor *Insm1* (IA-1) is essential for the development of pancreatic beta cells and intestinal endocrine cells. *Genes Dev*. **20**(17), 2465-78.

Gordon D. F., Lewis S. R., Haugen B. R., James R. A., McDermott M. T., Wood W. M., Ridgway E. C.

(1997). Pit-1 and GATA-2 interact and functionally cooperate to activate the thyrotropin beta-subunit promoter. *J Biol Chem*. **272**(39):24339-47

Goto, Y., De Silva, M. G., Toscani, A., Prabhakar, B. S., Notkins, A. L. and Lan, M. S.

(1992). A novel human insulinoma-associated cDNA, IA-1, encodes a protein with "zinc-finger" DNA-binding motifs. *J. Biol. Chem*. **267**: 15252-7.

Gray's Anatomy: *The Anatomical Basis of Clinical Practice*, 40th edition (2008), 1576 pages, Churchill-Livingstone, Elsevier. ISBN 978-0-443-06684-9

Grimes, H. L., Chan, T. O., Zweidler-McKay, P. A., Tong, B. and Tschlis, P. N.

(1996). The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal. *Mol. Cell. Biol*. **16**: 6263-72.

Gumbiner und Kelly,

(1981). Secretory granules of an anterior pituitary cell line, AtT-20, contain only mature forms of corticotropin and beta-lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*. **78(1)**: 318-22

Harnicarová Horáková A., Bártová E., Kozubek S.

(2010). Chromatin structure with respect to histone signature changes during cell differentiation. *Cell Struct Funct*. **35(1)**:31-44

Ho L., Crabtree G. R.

(2010). Chromatin remodelling during development. *Nature*. **463(7280)**:474-84.

Hochberg Y., Benjamini Y.

(1990). More powerful procedures for multiple significance testing. *Stat Med*. **9(7)**: 811-8.

Hon GC, Hawkins RD, Ren B.

(2009). Predictive chromatin signatures in the mammalian genome. *Hum Mol Genet*. **18(R2)**:R195-201

Ito T.

(2007). Role of histone modification in chromatin dynamics. *J Biochem*. **141(5)**:609-14

Jacob J., Storm R., Castro D. S., Milton C., Pla P., Guillemot F., Birchmeier C., Briscoe J.

(2009). Insm1 (IA-1) is an essential component of the regulatory network that specifies monoaminergic neuronal phenotypes in the vertebrate hindbrain. *Development*. **136(14)**: 2477-85.

Karlsson, E.

(2001). The role of pancreatic chromogranins in islet physiology. *Curr. Mol. Med*. **1**: 727-32.

Kelberman D., Rizzoti K., Lovell-Badge R., Robinson I. C., Dattani M. T.

(2009). Genetic regulation of pituitary gland development in human and mouse. *Endocr Rev.* **30(7)**:790-829.

Kimmel A. R., Berger S. L.

(1987). Preparation of cDNA and the generation of cDNA libraries: overview *Methods Enzymol.* **152**: 307-16.

Kuzin, A., Brody, T., Moore, A. W. and Odenwald, W. F.

(2005). Nerfin-1 is required for early axon guidance decisions in the developing *Drosophila* CNS. *Dev. Biol.* **277**: 347-65.

Laemmli, U. K.

(1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227(5259)**: 680-5

Lamolet B., Poulin G., Chu K., Guillemot F., Tsai M.J., Drouin J.

(2004). Tpit-independent function of NeuroD1(BETA2) in pituitary corticotroph differentiation. *Mol Endocrinol.* **18(4)** 995-1003

Lan, M. S., Li, Q., Lu, J., Modi, W. S. and Notkins, A. L.

(1994). Genomic organization, 5'-upstream sequence, and chromosomal localization of an insulinoma-associated intronless gene, IA-1. *J. Biol. Chem.* **269**: 14170-4.

Lan, M. S., Russell, E. K., Lu, J., Johnson, B. E. and Notkins, A. L.

(1993). IA-1, a new marker for neuroendocrine differentiation in human lung cancer cell lines. *Cancer Res.* **53**: 4169-71.

Langer E. M., Feng Y., Zhaoyuan H., Rauscher F. J. 3rd, Kroll K. L., Longmore G. D.

(2008). Ajuba LIM proteins are snail/slug corepressors required for neural crest development in *Xenopus*. *Dev Cell.* **14(3)**: 424-36.

Lee, E.C., Yu D., Martinez de Velasco J., Tessarollo L., Swing D. A., Court D.L.,

Jenkins N. A., and Copeland N. G.

(2001). A highly efficient Escherichia coli based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics* **73**: 56-65.

Lin, Y., Wu, Y., Li, J., Dong, C., Ye, X., Chi, Y. I., Evers, B. M., Zhou, B. P.

(2010) The SNAG domain of Snail1 functions as a molecular hook for recruiting lysine-specific demethylase 1. *EMBO J.* **29(11)**: 1803-16

Liu, W.-D., Wang, H.-W., Muguira, M., Breslin, M. B., Lan, M. S.

(2006). INSM1 functions as a transcriptional repressor of the neuroD/ β 2 gene through the recruitment of cyclin D1 and histone deacetylases. *Biochem. J.* **397**: 169–177

Loh Y.P., Gritsch H.A., Chang T.L.

(1982). Pro-opiocortin processing in the pituitary: a model for neuropeptide biosynthesis. *Peptides.* **3(3)** :397-404.

Marcinkiewicz, M., Day, R., Seidah, N.G., Chretien, M.

(1993). Ontogeny of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the mouse hypophysis and their colocalization with corticotropin and alpha-melanotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**: 4922–4926

Meehan R., Lewis J., Cross S., Nan X., Jeppesen P., Bird A.

(1992). Transcriptional repression by methylation of CpG. *J Cell Sci Suppl.* **16**: 9-14.

Mellitzer, G., Bonne, S., Luco, R. F., Van De Castele, M., Lenne-Samuel, N.,**Collombat, P., Mansouri, A., Lee, J., Lan, M., Pipeleers, D. et al.**

(2006). IA1 is NGN3-dependent and essential for differentiation of the endocrine pancreas. *EMBO J.* **25**: 1344-52.

- Metzger E., Wissmann M., Yin N., Müller J. M., Schneider R., Peters A. H., Günther T., Buettner R., Schüle R.**
(2005). LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature*. **7057**: 436-9.
- Nair M., Bilanchone V., Ortt K., Sinha S., Dai X.**
(2007). Ovoll1 represses its own transcription by competing with transcription activator c-Myb and by recruiting histone deacetylase activity. *Nucleic Acids Res.* **35(5)**: 1687-97
- Olsen, J. V., L. M. de Godoy, et al.**
(2005). "Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap." *Mol Cell Proteomics* **4(12)**: 2010-21.
- Ong S. E., Mann M.**
(2006). A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat Protoc.* **1(6)**: 2650-60.
- Parker KL, Schimmer BP.**
(1996). The roles of the nuclear receptor steroidogenic factor 1 in endocrine differentiation and development. *Trends Endocrinol Metab.* **7(6)**:203-7.
- Peinado H., Ballestar E., Esteller M., Cano A.**
(2004). Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Mol. Cell Biol.* **24(1)**: 306-1
- Pope C., McNeilly J. R., Coutts S., Millar M., Anderson R. A., McNeilly A. S.** (2006). Gonadotrope and thyrotrope development in the human and mouse anterior pituitary gland. *Dev Biol.* **297(1)**:172-81
- Pulichino A. M., Vallette-Kasic S., Tsai J.P., Couture C., Gauthier Y., Drouin J.**
(2003). Tpit determines alternate fates during pituitary cell differentiation. *Genes Dev.* **17(6)** :738-47.

Raetzman L. T., Wheeler B. S., Ross S. A., Thomas P.Q., Camper S.A.

(2008). Persistent expression of Notch2 delays gonadotrope differentiation. *Mol Endocrinol* **20**: 2898–2908, 2006.

Saleque S., Kim J., Rooke H. M., Orkin S. H.

(2007). Epigenetic regulation of hematopoietic differentiation by Gfi-1 and Gfi-1b is mediated by the cofactors CoREST and Lsd1. *Mol Cell*. **27(4)**: 562-72.

Sambrook, J. and Russell, D. W.

(2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Selbach M., Mann M.

(2006). Protein interaction screening by quantitative immunoprecipitation combined with knockdown (QUICK). *Nat. Methods*. **3(12)**: 981-3.

Shi Y., Lan F., Matson C., Mulligan P., Whetstine J. R., Cole P. A., Casero R. A., Shi Y.

(2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*. **119(7)**: 941-53.

Silberberg, M., Silberberg, R.

(1942). Effects of the „Growth Hormone“ of the Anterior Hypophysis (Antuitrin G) on the Skeleton of Mice and Guinea Pigs. *Am J Pathol*. **18(6)**: 1141-57

Stein C., Lang L. J.

(2009) Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Curr Opin Pharmacol*. **9(1)**: 3-8

Stivers C., Brody T., Kuzin A., Odenwald W. F.

(2000). Nerfin-1 and -2, novel Drosophila Zn-finger transcription factor genes expressed in the developing nervous system. *Mech. Dev*. **97(1-2)**: 205-10.

Tashjian A. H. Jr, Yasumura Y., Levine L., Sato G. H., Parker M. L.

(1968). Establishment of clonal strains of rat pituitary tumor cells that secrete growth hormone. *Endocrinology*. **82(2)**: 342-52.

Tashjian A. H. Jr., Bancroft F. C., Levine L.

(1970). Production of both prolactin and growth hormone by clonal strains of rat pituitary tumor cells. Differential effects of hydrocortisone and tissue extracts. *J Cell Biol.* **47(1)**: 61-70.

Taupenot, L., Harper, K. L. and O'Connor, D. T.

(2003). The chromograninsecretogranin family. *N. Engl. J. Med.* **348**: 1134-49.

Treier, M., Rosenfeld, M. G.

(1996). The hypothalamic-pituitary axis: co-development of two organs. *Curr Opin Cell Biol.* **8(6)**: 833-43

Treier M., Gleiberman A. S., O'Connell S. M., Szeto D. P., McMahon J. A., McMahon A. P., Rosenfeld M. G.

(1998). Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev.* **12(11)** :1691-704

Vesper A. H., Raetzman L. T., Camper S. A.

(2006). Role of prophet of Pit1 (PROP1) in gonadotrope differentiation and puberty. *Endocrinology*. **147(4)** :1654-63

Vogelstein B., Gillespie D.

(1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **76(2)**: 615-9.

Wade P. A.

(2001) Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. *Hum Mol Genet.* **10(7)**:693-8

Wang J., Scully K., Zhu X., Cai L., Zhang J., Prefontaine G. G., Kronen A., Ohgi K. A., Zhu P., Garcia-Bassets I., Liu F., Taylor H., Lozach J., Jayes F. L., Korach K. S., Glass C. K., Fu X. D., Rosenfeld M. G.

(2007). Opposing LSD1 complexes function in developmental gene activation and repression programmes. *Nature*. **446(7138)**: 882-7.

Wildner H., Gierl M. S., Strehle M., Pla P., Birchmeier C.

(2008). Insm1 (IA-1) is a crucial component of the transcriptional network that controls differentiation of the sympatho-adrenal lineage. *Development* **135(3)**: 473-81

Wu J., Duggan A., Chalfie M.

(2001). Inhibition of touch cell fate by egl-44 and egl-46 in *C. elegans*. *Genes Dev.* **15(6)**: 789-802.

Wu W, Cogan JD, Pfäffle RW, Dasen JS, Frisch H, O'Connell SM, Flynn SE, Brown MR, Mullis PE, Parks JS, Phillips JA 3rd, Rosenfeld MG.

(1998) Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. *Nat Genet.* **18(2)**:147-9.

Xie, J., Cai, T., Zhang, H., Lan, M. S. and Notkins, A. L.

(2002). The Zinc-Finger Transcription Factor INSM1 Is Expressed during Embryo Development and Interacts with the Cbl-Associated Protein. *Genomics* **80**: 54-61.

Yu, D., Ellis, H. M., Lee, E. C., Jenkins, N. A., Copeland, N. G. and Court, D. L.

(2000). An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 5978-83.

Yu, H., Pretot, R. F., Burglin, T. R. and Sternberg, P. W.

(2003). Distinct roles of transcription factors EGL-46 and DAF-19 in specifying the functionality of a polycystin-expressing sensory neuron necessary for *C. elegans* male vulva location behavior. *Development* **130**: 5217-27.

Zhang, T., Liu, W. D., Saunee, N. E., Breslin, M. B., Lan, M. S.

(2009) Zinc finger transcription factor INSM1 interrupts cyclin D1 and CDK4 binding and induces cell cycle arrest. *J Biol Chem* **184(9)**: 5574-81

Zhao L, Bakke M, Krimkevich Y, Cushman LJ, Parlow AF, Camper SA, Parker KL.

(2001). Steroidogenic factor 1 (SF1) is essential for pituitary gonadotrope function. *Development*. **128(2)** :147-54.

Zhu, X., Gleiberman, A. S., Rosenfeld, M. G.

(2007). Molecular Physiology of Pituitary Development: Signaling and Transcriptional Networks. *Physiol Rev* **87**: 933–963

Zhu X, Zhang J, Tollkuhn J, Ohsawa R, Bresnick EH, Guillemot F, Kageyama R, Rosenfeld MG.

(2006) Sustained Notch signaling in progenitors is required for sequential emergence of distinct cell lineages during organogenesis. *Genes Dev* **20**: 2739–2753.

6 Zusammenfassung

Die Adenohypophyse ist das zentrale Organ des neuroendokrinen Systems. Über die Ausschüttung von Hormonen steuert sie physiologische Funktionen wie Wachstum, Metabolismus, Fortpflanzung und Laktation, und die Reaktion auf Stress. Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktors *Insm1* wird während der Entwicklung der endokrinen Zellen der Hypophyse ausgeprägt. Um die Bedeutung von *Insm1* in den endokrinen Zellen dieses Organs zu untersuchen, analysierte ich *Insm1*-mutante Mäuse. Dabei zeigte sich, dass die verschiedenen endokrinen Zellen der Adenohypophyse zwar spezifiziert wurden, dass deren terminale Differenzierung jedoch blockiert war. Meine weiteren Analysen ergaben, dass die Expression wichtiger Transkriptionsfaktoren, die die Differenzierung steuern, in den Mutanten beeinträchtigt war. Außerdem wurden für die Adenohypophyse charakteristische Hormone und weitere, für endokrine Zellen typische Gene, wie Granine und Prohormonkonvertasen, in *Insm1*-mutanten Mäusen nicht oder nur schwach ausgeprägt. Eine genomweite Expressionsanalyse zeigte auch, dass in der Adenohypophyse *Insm1*-mutanter Mäuse verschiedene Muskel-spezifische Gene ektopisch exprimiert wurden. Somit erschienen Gene, deren Expression normalerweise typisch für mesodermale Strukturen ist, in diesen Tieren in einem ektodermalen Derivat. Zusammengefasst zeigten meine Analysen also, dass *Insm1* für terminale endokrine Differenzierungsprogramme essentiell ist und gleichzeitig Gene fremder Differenzierungsprogramme supprimiert. Weiterhin konnte ich in Protein-Protein-Interaktionsstudien nachweisen, dass *Insm1* Proteine bindet, die die Chromatinstruktur beeinflussen. So interagiert *Insm1* mit *Lsd1*, einer Lysin-spezifischen Demethylase, mit den Histondeacetylasen HDAC1 und -2 sowie den Ko-Repressoren *Rcor1-3*. Dieser Komplex katalysiert die Entfernung von Histonmodifikationen wie z.B. H3K4me2 und H3K9me2, welche die Transkription fördern. *Insm1* wirkt also als epigenetischer Regulator der Genexpression. Damit kommt *Insm1* eine Schlüsselrolle bei der Differenzierung endokriner Zellen der Adenohypophyse zu.

Abstract

The pituitary gland plays a central role in the endocrine system. Via hormone secretion it regulates many physiological functions like growth, metabolism, reproduction and lactation, and the response to stress. The zincfinger transcription factor *Insm1* is expressed in the pituitary gland during development. To assess *Insm1* functions in the generation of the endocrine cells of this organ, I analyzed *Insm1*-mutant mice. In such mutant mice, the endocrine cells of the anterior pituitary gland were specified, but they did not terminally differentiate. In particular, the expression of key transcription factors, which regulate endocrine differentiation, was deregulated in the mutants. Moreover, the hormones characteristic of the pituitary gland and other proteins typically expressed in endocrine cells, such as granins and prohormoneconvertases, were either absent or expressed at low levels in *Insm1*-mutant mice. A genome-wide analysis of gene expression also showed that several muscle-specific genes were expressed ectopically in the anterior pituitary glands of *Insm1*-mutant mice. Thus, in *Insm1* mutant mice mesodermal genes were ectopically activated in an ectodermal derivative. My analysis showed that *Insm1* is essential for programs of terminal differentiation in endocrine cells and that it concomitantly suppresses the inappropriate activation of other gene expression programs. Furthermore, my protein-protein interaction studies demonstrated that *Insm1* binds to proteins that regulate chromatin structure. *Insm1* forms complexes with *Lsd1*, a lysine-specific demethylase, with the histone deacetylases HDAC1 and -2 as well as with the corepressors *Rcor1-3*. These complexes catalyze the removal of activating histone modifications including H3K4me2 und H3K9me2. Hence *Insm1* acts as an epigenetic regulator of gene expression and plays a pivotal role in endocrine differentiation in the anterior pituitary gland.

Anhang

Im Anhang befinden sich das Abkürzungsverzeichnis, eine Liste mit den Namen und Herstellern der verwendeten Chemikalien und Enzyme (Tab. A1), eine Liste mit der Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Medien (Tab. A2), meine Danksagung und die eidesstattliche Erklärung über die eigenständige Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| ACTH | (engl.: adrenocorticotrope hormone) Adrenocorticotropin |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| α GSU | (engl.: α -Glycoprotein Subunit) α -Untereinheit der Glykoproteine |
| AS | Aminosäuren |
| BCIP | 5-Bromo-4-Chlor-3-Indolylphosphat |
| bp | Basenpaare |
| BSA | (engl.: bovine serum albumin) Rinderserumalbumin |
| C. B. | Prof. Dr. Carmen Birchmeier |
| cDNA | (engl.: complementary DNA) komplementäre DNA |
| cRNA | (engl.: complementary RNA) komplementäre RNA |
| Cy2 | Cyanin |
| Cy3 | Indocarbocyanin |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| del | deletiert |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DIG | Digoxigenin |
| DMEM | (engl.: Dulbecco's Modified Eagle Medium) |
| DMP | Dimethyl-pimelimidat-dihydrochlorid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | (engl.: desoxyribonucleic acid) Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Deoxynukleotidtriphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| E | Embryonalstadium (Tag der Embryonalentwicklung nach Vaginalpfropfen) |
| EDTA | (engl.: ethylenendinitrilotetraacetic acid) Ethylendinitrilotetraessigsäure |
| EIN | Egl-46/IA-1/Nerfin |
| FC | (engl.: fold change) Faktor der Veränderung |
| FCS | (engl.: fetal calf serum) fötales Kälberserum |
| FLAG | Octapeptid: N-DYKDDDDK-C |

| | |
|-------------------------|--|
| FSH β | (engl.: follicle stimulating hormone, β -subunit) β -Untereinheit des Follitropins |
| g | relative Erdschwerebeschleunigung |
| β -gal | β -Galaktosidase |
| GH | (engl.: growth hormone) Wachstumshormon |
| h | (engl.: hour) Stunde |
| HPLC | (engl.: high performance liquid chromatography) Hochleistungsflüssigkeitschromatographie |
| HRP | (engl.: horseradish peroxidase) Meerrettichperoxidase |
| IP | Immunopräzipitation |
| kb | Kilobasenpaare |
| LB | Luria Broth |
| LC | (engl.: liquid chromatography) Flüssigkeitschromatographie |
| LH β | (engl.: luteinizing hormone, β -subunit) β -Untereinheit des Lutropins |
| MDC | Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin, Berlin-Buch |
| MilliQ-H ₂ O | Wasser aus Ultrafiltrationsanlage (Milli-Q UF Plus; Millipore) |
| min | Minute |
| mRNA | (engl. messenger RNA) Boten-Ribonukleinsäure |
| MS | Massenspektrometrie |
| MSH | (engl.: melanocyte stimulating hormone) Melanotropin |
| NBT | Nitroblautetrazoliumchlorid |
| OD | optische Dichte |
| ORF | (engl.: open reading frame) offenes Leseraster |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| P2A | Punktmutation Prolin nach Alanin an Position 2 der AS-Kette |
| PBS | (engl.: phosphate buffered saline) phosphatgepufferte Salzlösung |
| PCI | Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol |
| PCR | (engl. polymerase chain reaction) Polymerase-Ketten-Reaktion |
| PFA | Paraformaldehyd |
| POMC | Proopiomelanocortin |
| Prl | Prolaktin |
| PVA | Polyvinylalkohol |
| RNA | (engl.: ribonucleic acid) Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| rpm | (engl.: revolutions per minute) Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| RZPD | Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung (Berlin) |
| SDS | (engl.: sodium dodecylsulfate) Natriumdodecylsulfat |
| SILAC | (engl.: stable isotope labeling by amino acids in cell culture) |
| siRNA | (engl.: small interfering RNA) kleine interferierende RNA |
| SNAG | Snail and Gfi |
| Tab. | Tabelle |
| TE | Tris-EDTA |
| Tris | 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol |

| | |
|-------------|---|
| tRNA | (engl.: transfer RNA) Transfer-Ribonukleinsäure |
| TSH β | (engl.: thyroid stimulating hormone, β -subunit) β -Untereinheit des Thyrotropins |
| U | (engl.: unit) Einheit der Enzymaktivität |
| üN | über Nacht |
| v/v | (engl.: volume/volume) Volumen/Volumen |
| v/w | (engl.: volume/weight) Volumen/Gewicht |
| X-Gal | 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-D-Galaktopyranosid |

Tab. A1: Verwendete Chemikalien und Enzyme

| Name | Hersteller |
|------------------------------------|-------------------|
| Aceton | Roth |
| Acrylamid-bisAcrylamid-Stammlösung | Roche |
| Ammoniumacetat | Roth |
| Ampicillin | Roth |
| Bacto Pepton | BD, Heidelberg |
| BCIP | Roche, Mannheim |
| BSA | Roth |
| Chloroform | Merck, Darmstadt |
| Complete-Proteaseinhibitor | Roche |
| DAPI | Roche |
| DEPC | Roth |
| Dextransulfat (Na-Salz) | GE Healthcare |
| DMP | Sigma-Aldrich |
| DMSO | Merck |
| DMEM | Invitrogen |
| DMEM (SILAC) | PAA Laboratories |
| EDTA | Roth |
| Entellan | Merck |
| Essigsäureanhydrid | Merck |
| Ethanol | Roth |
| Ethanolamin | Sigma-Aldrich |
| FCS | Sigma-Aldrich |
| FCS, dialysiert | Sigma-Aldrich |
| Ficoll | Sigma-Aldrich |
| Formamid | Roth |
| Formamid (ultrarein, deionisiert) | Roth |
| GlycoBlue | Ambion |
| Glyzerin | Roth |
| Glyzin | Sigma-Aldrich |
| HCl | Roth |
| Hefe-Extrakt | Roth |

| | |
|--|------------------------|
| Immunomount | Thermo |
| Isopropanol | Roth |
| Kaliumferrizyanid | Sigma-Aldrich |
| Kaliumferrozyanid | Sigma-Aldrich |
| Kanamycin | Sigma-Aldrich |
| KCl | Merck |
| Lachsspermien-DNA | Sigma-Aldrich |
| Magnetperlen (ProtA- oder ProtG-beschichtet) | Invitrogen |
| β -Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich |
| Methanol | Roth |
| MgCl ₂ (Hexahydrat) | Merck |
| Na ₂ HPO ₄ (Dihydrat) | Roth |
| NaCl | Roth |
| NaH ₂ PO ₄ (Dihydrat) | Roth |
| NaOH | Roth |
| Natriumacetat | Merck |
| NBT | Roche |
| PBS (10x) | Invitrogen |
| Penicillin/Streptomycin-Lösung | Invitrogen |
| PFA | Merck |
| Pferdeserum | PAN Biotech |
| Phenol | Roth |
| Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol | Ambion, Huntingdon, UK |
| Phosphatse-Inhibitor-Cocktail 1 und 2 | Sigma-Aldrich |
| Polyacrylträger | Fermentas |
| Polyvinylpyrrolidon | Sigma-Aldrich |
| Proteinase K | Sigma-Aldrich |
| PVA | Sigma-Aldrich |
| RNase A | Roche |
| D(+)-Saccharose | Roth |
| SDS | Serva, Heidelberg |
| Sephadex G-50 (coarse) | GE Healthcare |
| Sigmacote | Sigma-Aldrich |
| SP6 Polymerase | Roche |
| T3 Polymerase | Roche |
| T7 Polymerase | Roche |
| Triethnolamin | Sigma-Aldrich |
| tri-Natriumcitrat (Dihydrat) | Roth |
| Tris base | Roth |
| Triton-X 100 | Sigma-Aldrich |
| Trizol | Invitrogen |
| tRNA (Hefe) | Invitrogen |

| | |
|---------------------|-------------|
| Trypsin-EDTA-Lösung | PAN Biotech |
| Tween 20 | Roth |
| X-Gal | Roth |
| Ziegenserum | Bio-Rad |

Tab. A2: Verwendete Lösungen und Medien

Alle Lösungen und Medien wurden mit MilliQ-H₂O angesetzt, falls nicht anders angegeben. Die Lösungen wurden meist autoklaviert oder sterilfiltriert.

| Name | Zusammensetzung |
|---|---|
| Acetylierungspuffer | 4 ml Triethanolamin 0,5 ml HCl 0,75 ml Essigsäureanhydrid ad 300 ml H ₂ O |
| AP-Puffer | 25 ml 1 M Tris·HCl, pH 9,5 12,5 ml 1 M MgCl ₂ 5 ml 5 M NaCl 375 µl Tween 20 ad 250 ml H ₂ O _{DEPC} |
| B1-Puffer | 0,1 M Tris·HCl, pH 7,5 0,15 M NaCl |
| Blockierungslösung (Immunhistologie) | 1 % (v/v) Pferdeserum 0,1 % (v/v) Triton-X 100 in PBS |
| Blockierungslösung (<i>in-situ</i> -Hybridisierung) | 1 % (v/v) Ziegenserum in B1-Puffer |
| Blockierungslösung (Western Blot) | 5% Milchpulver oder 5 % BSA in PBS-T |
| Denhardt's Lösung (50x) | 5 g Ficoll 5 g Polyvinylpyrrolidon 5 g BSA ad 500 ml H ₂ O |
| EDTA | 0,5 M EDTA pH 8,0 mit NaOH |
| Einfriermedium | 10 % (v/v) DMSO 20 % (v/v) FCS in Kulturmedium |
| Ethanol-Natriumacetat-Mix | 0,15 M Natriumacetat, pH 5,2 in Ethanol |

| | |
|---|--|
| Färbelösung (in-situ-Hybridisierung) | 1µl NBT 1µl BCIP in 1ml 50% NTMT/50% PVA |
| 2 x HBS | 280 mM NaCl 10 mM KCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ 15mM D-Glukose 50 mM HEPES pH 7,05 |
| H ₂ O _{DEPC} | MilliQ-H ₂ O, DEPC-behandelt |
| Hybridisierungslösung (in-situ-Hybridisierung auf Gefrierschnitten) | 50 ml ultrareines, deionisiertes Formamid 25 ml 20x SSC 10 ml 50x Denhardt's Lösung 0,5 ml 50 mg/ml tRNA (10 min bei 95°C denaturiert) 5 ml 10 mg/ml Lachsspermien-DNA (10 min bei 95°C denaturiert) 13,75 ml H ₂ O _{DEPC} |
| IP-Lysispuffer | 150 mM NaCl 50 mM Tris (pH 7,4) 1% Triton X-100 1 mM DTT Complete-Proteaseinhibitoren (Roche) Phosphataseinhibitoren (Sigma-Aldrich) |
| Kopplungspuffer | 0,2 M Natriumborat (pH 9,0) |
| Kulturmedium | 500 ml Dulbecco's MEM mit Glutamax-I (4,5 g Glukose/l) 55 ml hitzeinaktiviertes FCS 5,5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung |
| lacZ-Färbelösung | 20 mM MgCl ₂ 0,5 mg/ml X-Gal 5 mM Kaliumferrozyanid 5 mM Kaliumferrizyanid in PBS |
| LacZ-Fixans | 2% PFA, 0,1M Phosphat-Puffer pH 7,3, 20mM MgCl ₂ , 5mM EGTA |
| LacZ-Waschpuffer | 0,1M Phosphat-Puffer pH 7,3, 20mM MgCl ₂ , 0,01% Natriumdesoxycholat, 0,02% Nonidet P-40) |
| LB-Medium | 1 % (w/v) Bacto-Trypton 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt 1 % (w/v) NaCl pH 7,5 mit NaOH |
| Natriumacetat | 3 M Natriumactat pH 5,2 mit Essigsäure |
| NaPO ₄ -Puffer | 0,1 M NaPO ₄ (pH 8,0) 0,01% Tween-20 |

| | |
|-----------------------------|--|
| NTMT | 100 mM NaCl 100 mM Tris·HCl pH 9,5 50 mM MgCl ₂ 0,1 % (v/v) Tween 20 |
| PBS-T | PBS 0,1% Tween 20 |
| PBX | PBS 1% TritonX-100 |
| Phosphatpuffer | 0,2 M NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ pH 7,4 |
| Ohr-/Schwanz-Lyse-Puffer | 200 mM NaCl 100 mM Tris·HCl, pH 8,0 5 mM EDTA, pH 8,0 0,2% SDS 100 µg/ml ProteinaseK |
| Sammelgelpuffer | 0,5 M Tris-Base 0,4% SDS pH 6,7 |
| SDS-Laufpuffer | 0,2 M Glyzin 25 mM Tris-Base 3,5 mM SDS |
| SDS-PAGE-Ladepuffer (4x) | 0,2 M Tris pH 6,8 8% SDS 40 % Glyzerin 0,4 % Bromphenol-blau 20% b-Mercaptoethanol |
| SSC (20x) | 3 M NaCl 0,3 M tri-Natriumcitrat pH 7,0 mit HCl |
| TE | 10 mM Tris base 1 mM EDTA, pH 8,0 pH 8,0 mit HCl |
| Transferpuffer | 38 mM Glyzin 47 mM Tris-Base 0,03% [v/w] SDS 20% [v/v] Methanol |
| Trenngelpuffer | 1,5 M Tris-Base 0,4% SDS pH 8,8 mit NaOH |
| Tris·HCl | 1 M Tris base pH 7,4, 7,5, 8,0, 9,5 mit HCl |

Danksagung

Ich möchte Carmen Birchmeier herzlich für die Betreuung dieser Arbeit und ihre hilfreichen Ratschläge danken. Sie hat mich jederzeit in allen Belangen tatkräftig unterstützt und damit diese Arbeit ermöglicht.

Bei Fritz Rathjen bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Des Weiteren möchte ich allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern des Labors für die Zusammenarbeit und die tolle gemeinsame Zeit danken. Besonders hervorheben möchte ich Alistair Garrat, Dominique Bröhl, Hagen Wende, Mathias Gierl und Thomas Müller, die in fast allen Lebenslagen gute Ratschläge für mich hatten.

Außerdem möchte ich mich besonders bei Florian Paul und Matthias Selbach für die hervorragende Kooperation bei der Identifikation von Insm1-Interaktionspartnern bedanken. Hans Peter Rahn und Gabriele Born gilt mein Dank für die Sortierung meiner Zellen bzw. das Hybridisieren und Auslesen der „microarrays“.

Ein herzlicher Dank geht auch an Petra Stallerow, Claudia Päseler, Linda Balzuweit und Karin Gottschling für die exzellente technische Assistenz.

Mathias Treier (Zentrum für Molekulare Medizin der Universität zu Köln) danke ich für die Überlassung verschiedener Plasmide zur Herstellung von Sonden für *in-situ*-Hybridisierungen (α GSU, GH, Pit1, POMC, TSH β).

Schließlich möchte ich mich bei Dominique Bröhl und Thomas Müller für die Korrektur dieser Dissertation bedanken. Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die stetige Unterstützung.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den Schriften wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Außerdem erkläre ich, dass diese Promotion noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegt oder veröffentlicht wurde und dass ich solche Veröffentlichungen vor Abschluss der Promotion nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt.

Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Carmen Birchmeier betreut worden.

Berlin, den 30.08.2010

Jochen Welcker