## Vergleichende Analyse der Entwicklung von endokrinen Organen in Insm1-Null und -ΔSNAG mutanten Mäusen

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

Ulrich Koestner aus Ankum

März, 2015

Diese Arbeit wurde von Mai 2009 bis März 2015 unter der Betreuung von Prof. Dr. Carmen Birchmeier am Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin (MDC) in Berlin durchgeführt.

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

Disputation am: 26.05.2015

## Danksagung

Zuallererst bedanke ich mich herzlich bei Carmen Birchmeier für die Betreuung meiner Dissertation. Außerdem für die Gelegenheit in ihrer Forschungsgruppe arbeiten zu dürfen und dadurch viel zu lernen. Sie hat mich jederzeit nach Kräften unterstützt, mir mit Ratschlägen weitergeholfen und dadurch den Erfolg dieser Arbeit möglich gemacht.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die produktive Zusammenarbeit während der gemeinsam verbrachten Zeit. Besonders bedanke ich mich bei Jochen Welcker, der mich bei der Klonierung des *targeting* Vektors beraten hat, bei Hagen Wende und Maria Sheean, die mir bei den Partek-Analysen behilflich waren sowie bei Thomas Müller, der mir als mein "Bench-Nachbar" jederzeit mit seinem Rat beiseite stand.

Ein herzlicher Dank gebührt auch den technischen Assistenten Ivonne Schiffner und Bettina Brandt für ihre Arbeit in der ES-Zellkultur, Sven Buchert für seine Hilfe bei Southern Blots Experimenten und Petra Stallerow und Claudia Päseler für ihre unermüdliche und zuverlässige Arbeit im Tierstall.

Außerdem bedanke ich mich für die Zurverfügungstellung des ursprünglichen Insm2 Targeting Plasmids bei Robert Storm (Charité Berlin).

Bedanken möchte ich mich auch bei Michael Strehle, der die Korrektur der Dissertation übernommen hat.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie, besonders meinen Eltern und meiner Frau Julia bedanken, die mich in all der Zeit stetig unterstützt haben.

1. Einleitung	1
1.1. Differentielle Genexpression	1
1.2. Der Insm1 Zinkfinger-Transkriptionsfaktor	2
1.3. Das Insm2 Zinkfinger-Protein	6
1.4. Endokrine Organe	7
1.4.1. Die Hypophyse	7
1.4.1.1. Die Entwicklung der Hypophyse	8
1.4.1.2. Die Bildung endokriner Zellen in der Adenohypophse	9
1.4.2. Die Nebenniere	11
1.4.2.1. Entwicklung endokriner Zellen der Nebenniere	11
1.4.3. Die Lunge	12
1 4 3 1 Die Entwicklung der endokrinen Zellen der Lunge	12
1 4 4 Der Dünndarm	14
1 4 4 1 Die Entwicklung endokriner Zellen des Darms	14
1 4 5 Das Pankreas	16
1 4 5 1 Entwicklung des Dankreas	10
1 4 5 2 Die Rildung der endokrinen Zellen des Dankreas	17
	17
2. Material und Methoden	19
2.1. Material	19
2.1.1. Laboraustattung	19
2.1.2. DNA-Oligonukleotide	19
2.1.3. Plasmidvektoren	
2.1.4. BAC-Klone	
2 1 5 Antikörner	22
2 1 6. Bakterienstämme	23
217 Eukarvotische Zelllinien	23
2.1.8. Mausstämme	20
2.2. Methoden	24
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	20
2.2.1. Molekularbiologisene methoden	25
2.2.1.1. isolierung, Manipulation und Adreinigung von Desoxynbonukiensauren	25
2.2.1.1. b) Aufreinigung von Plasmid DNA und DNA Fragmenten	25
2.2.1.1. b) Auffeinigung von reasiniu-bita und Dita-Fragmenten	20
2.2.1.1. d) Postriktionsbydrolyso von DNA Ligation von DNA Fragmonton	20
2.2.1.1. d) Resultationshydrolyse von DNA, Ligation von DNA-Fragmenten	20 26
2.2.1.2. Delymerase Kettenreektion (DCD)	20
2.2.1.2. Pulymerase-Relience Richter DCP	Zr
2.2.1.3. Qualitative Real-Time FCR	20
2.2.1.4. Genomwelle Microanay-manskipulonsanaryse	29
2.2.1.4. a) RNA isolierung und Autreinigung	29
2.2.1.4. b) CDNA-Synthese, <i>In-Vitro</i> -Transkription und Biotinylierung der CRNA	30
2.2.1.4. c) Microarray-Hybridisierung	30
2.2.1.5. Southern Biot-Analyse	31
2.2.1.5. a) Semi-Dry Southern Blot Aufbau	31
2.2.1.5. D) Herstellung radioaktiv markierter DNA Sonden	32
2.2.1.5. c) Hybridisierung der Southern Blot Sonden	32
2.2.1.6. In-situ-Hybridisierung	33
2.2.1.6. a) In-vitro-Transkription zu Herstellung von DIG markierten RNA Sonden	33
2.2.1.6. b) In-situ-Hybridisierung auf Gefrierschnitten	34

2.2.2. Bakterien- und Zellkultur	35
2.2.2.1. Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> Zellen	35
2.2.2.2. Transformation elektrokompetenter <i>E. coli</i> Zellen	
2.2.2.3. Homologe Rekombination in Bakterien	
2.2.2.4. Kultur embryonaler Fibroblasten	
2.2.2.5. Kultur, Transfektion und Selektion von ES-Zellen	
2.2.2.5. a) Kultur von ES-Zellen	
2.2.2.5. b) Transfektion von ES-Zellen	40
2.2.2.5. c) Selektion von ES-Zellen	41
2.2.3. Histologische Methoden	42
2.2.3.1. Herstellung von Gefrierschnitten	42
2.2.3.2. Immunhistologie auf Gefrierschnitten	43
2.2.3.3. TUNEL-Färbung	43
2.2.3.4. Whole-mount X-Gal Färbung	43
2.2.4. Mauszucht und Präparation	44
2.2.4.1. Erzeugung von heterozygoten Insm2 <sup>GFP/+</sup> -Tieren	44
2.2.4.2. Präparation von Mausembryonen und Mausgewebe	45
2.2.5. Datenanalyse	46
2.2.5.1. Dokumentation histologischer Daten	46
2.2.5.1. a) Quantitative Analyse histologischer Daten	46
2.2.5.2. Expressionsanalyse	47
2.2.5.2. a) Expressionsanalyse in Microarray-Experimenten	47
2.2.5.2. b) Clustering von Genen basierend auf Datensätzen von	
Microarray-Analysen	48
2.2.5.2. c) Expressionsanalyse mittels quantitativer Real-Time PCR	49
zachnisso	50

3. Ergebnisse	50
3.1. Insm1 in der Entwicklung endokriner Zellen der Hypophyse	51
3.1.1. Die Genexpression in der Hypophyse ist in beiden Insm1 Mutanten in	
ähnlicher Weise dereguliert	51
3.2. Insm1 in der Entwicklung sympathoadrenaler Zellen	55
3.2.1. Hypoplasie der Nebennieren in Insm1 mutanten Tieren	56
3.2.2. Gestörte Katecholaminsynthese in Insm1 <sup>ΔSNAG</sup> mutanten Mäusen	57
3.3. Insm1 in endokrinen Zellen der Lunge	62
3.3.1. Reduzierte Zahl endokriner Zellen in neuroepithelialen Körperchen von	
Insm1 Mutanten	62
3.3.2. Gestörte Differenzierung von pulmonaren endokrinen Zellen in Insm1	
Mutanten	62
3.4. Insm1 in der Entwicklung enteroendokriner Zellen	63
3.4.1. Die Differenzierung von enteroendokrinen Zellen ist in Insm1 <sup>ΔSNAG</sup> mutanten	00
lieren gestort	
3.5. Insm1 in der Entwicklung endokriner Zellen des Pankreas	
3.5.1. Unterschiedliche Zahl von Hormon-produzierenden Zellen im Pankreas	66
2.5.2. Conomucita Transkriptioneenelvee dee Denkrees mittele	00
S.S.Z. Genomweite manskriptionsanalyse des Parikreas mittels Microarray-Analysen	69
3.6 Inem2 Expression in der Maus	
3.6.1 Insm2 Expression im peripheren Nervensystem	
3.6.2 Insm2 Expression im zentralen Nervensystem	75
2.6.2 Inom2 Expression in right neuronalon Zellon	

## 1. Einleitung

### 1.1. Differentielle Genexpression

Obwohl alle Zellen eines vielzelligen Organismus dieselbe genetische Information tragen, unterscheiden sich die Zellen der unterschiedlichen Gewebe maßgeblich voneinander. Diese Unterschiede begründen sich in der selektiven Nutzung des vorhandenen Erbguts, d.h. darin, welche genetische Information zu welchem Zeitpunkt in ein funktionelles Protein übertragen wird. So werden von den circa 20.000-25.000 kodierenden Genen, die in dem 2,8 x 10<sup>8</sup> Basenpaare fassenden menschlichen Erbgut vermutet werden, jeweils nur ein Bruchteil tatsächlich in den verschiedenen Zellen in mRNA transkribiert und in Protein translatiert (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004). Die regulierte Aktivität der genetischen Information ist daher der Schlüssel zum Verständnis der Entwicklung und Aufrechterhaltung eines Organismus.

Die Regulation der Genexpression findet in mehreren Ebenen statt. Transkriptionelle Kontrolle reguliert, welche DNA Abschnitte in RNA transkribiert werden und wie häufig dies geschieht (Chu *et al.*, 2002; Cirillo *et al.*, 2002; Core & Lis, 2008). Geneexpression wird aber auch posttranskriptionell reguliert, zum Beispiel durch Regulation des *Splicings* nukleärer RNA, d.h. durch Entfernung bestimmter Intron-Sequenzen, um die mRNA herzustellen die letztendlich den Kern verlässt (Black, 2003; Barash *et al.*, 2010). Außerdem wird die mRNA auch aktiv degradiert. Die Stabilität der mRNA Moleküle ist deshalb ein weiterer Regulationsschritt (Decker & Parker, 1994; Bartel, 2004; Bagga *et al.*, 2005). Letztlich werden die verschiedenen mRNAs mit unterschiedlicher Effizienz in Proteine translatiert (Kondrashov *et al.*, 2011; Gedamu & Dixon, 1978; Rosenthal *et al.*, 1980; Cho *et al.*, 2005).

Eine Gruppe von Proteinen, die maßgeblich an der Regulation der Expression beteiligt ist, bilden die Transkriptionsfaktoren. Diese haben eine hohe Bindungsaffinität für bestimmte DNA Sequenzen und können daher selektiv an diese binden. Sequenzen, die wichtig für die Regulation sind, werden in Enhancer-, Silenceroder Promotor-Regionen von Genen gefunden. Die Bindung eines Transkriptionsfaktors an solche regulatorische Sequenzen führt zu einer erhöhten oder ernied-

Einleitung

rigten Transkriptionsrate der assoziierten Gene. Typischerweise entfaltet sich die Funktion eines Transkriptionsfaktors erst im Zusammenspiel mit anderen Proteinen, die im jeweiligen Zelltyp exprimiert sind, wodurch dessen Funktion hochspezifisch für diesen Zelltyp werden kann (Andersen *et al.*, 1999a, b; Cvekl & Piatigorsky, 1996). So werden Enhancer oder Promotoren oft von mehreren Transkriptionsfaktoren gebunden, die synergistisch wirken. Die Transkriptionsfaktoren interagieren ihrerseits mit Komponenten der RNA Polymerasen, rekrutieren sie zu bestimmten Genen und fördern oder hemmen so die Transkription (Sauer *et al.*, 1995). Transkriptionsfaktoren können zudem mit Enzymen interagieren, die Histone im Chromatin modifizieren und auf diese Weise die Transkription beeinflussen (Ogryzko *et al.*, 1996; Price *et al.*, 1998).

Transkriptionsfaktoren werden auf Grund von Ähnlichkeiten funktioneller Domänen in verschiedene Familien eingeteilt. Eine dieser Familien bilden die Zinkfinger-Proteine. Diese sind charakterisiert durch eine Domäne, in der Cystein- und Histidin-Reste eine koordinative Bindung mit Zink Atomen eingehen, welches zu einer charakteristischen Konformation der Polypeptidkette führt, dem sogenannten Zinkfinger (Miller *et al.*, 1985). Zinkfinger können direkt an DNA binden. Das Zusammenwirken verschiedener Zinkfinger eines Transkriptionsfaktors ist verantwortlich für dessen sequenzspezifische DNA-Erkennung und Bindung.

### 1.2. Der Insm1 Zinkfinger-Transkriptionsfaktor

Das *Insm1* Gen wurde erstmals in einer humanen cDNA Bibliothek, die aus mRNA einer Insulinoma-Zellinie hergestellt worden war, entdeckt (Goto *et al.*, 1992). Transkripte von *Insm1* konnten außerdem auch in kleinzelligen Lungentumoren des Menschen, Hypophysentumoren der Maus sowie Phäochromozytomen, medullären Karzinomen der Schilddrüse und Medullablastomen von Ratten detektiert werden (Goto *et al.*, 1992). Unser Labor identifizierte *Insm1* als differenziell exprimiertes Gen während der Entwicklung von Nervenzellen.

Während der Entwicklung des Nervensystems ist Insm1 transient in vielen, wenn nicht sogar allen, Neuronen exprimiert (Wildner *et al.*, 2008; Farkas *et al.*, 2008; Duggan *et al.*, 2008). Im rostralen migratorischen Strom des *Bulbus olfactorius*,

Einleitung

im *Gyrus dentatus* des Hippocampus und im lateralen Ventrikel des Neocortex persistiert die Expression von Insm1 bis in adulte Stadien (Farkas *et al.*, 2008; Duggan *et al.*, 2008; Rosenbaum *et al.*, 2011). In diesen Regionen findet Neurogenese auch im erwachsenen Gehirn statt, und Insm1 wird hier transient während der Generierung von Neuronen exprimiert (Kira Balueva, unpublizierte Daten). Im dorsalen Telencephalon und im olfaktorischen Epithelium spielt Insm1 eine Rolle in der Bildung basaler Vorläuferzellen (Farkas *et al.*, 2008; Rosenbaum *et al.*, 2011). In sympathischen Neuronen des peripheren Nervensystems reguliert Insm1 den korrekten Zeitpunkt der Differenzierung und die Proliferation der Vorläuferzellen (Wildner *et al.*, 2008).

Eine systematische Analyse der *Insm1* Genexpression zeigte außerdem, dass Insm1 in der Maus in verschiedenen endokrinen Geweben exprimiert wird. So konnte Insm1 in endokrinen Zellen von Nebennieremark, Pankreas, Darm, Hypophyse und Lunge während der Entwicklung und in adulten Stadien nachgewiesen werden. Durch eine Analyse von Mäusen, die eine Null-Mutation im *Insm1* Gen tragen, wurde gezeigt, dass Insm1 essentiell für die korrekte Differenzierung verschiedener endokriner Zellen ist (Mellitzer *et al.*, 2006; Pedersen *et al.*, 2006; Gierl *et al.*, 2006; Wildner *et al.*, 2008; Welcker *et al.*, 2013; Osipovich *et al.*, 2014).

Das *Insm1* Gen liegt auf Chromosoms 2 der Maus und kodiert in einem einzigen Exon für ein Protein von 521 Aminosäuren Länge (Lan *et al.*, 1994). Das Insm1 Protein besitzt fünf Zinkfinger des Cystein2 Histidin2 (C2H2) Typus am C-Terminus; C2H2 Zinkfinger können spezifische DNA Sequenzen binden (Abb. 1). Außerdem trägt Insm1 drei Abschnitte, die reich an Prolin sind. In den *Insm1* Orthologen *Egl-46* (*C. Elegans*) und *Nerfin* (*D. melanogaster*) sind die Zinkfinger zwei und drei evolutionär konserviert, weshalb diese Faktoren zusammen mit Insm1 in die EIN-Familie (Egl-46/Insm1/Nerfin) eingeordnet werden (Stivers *et al.*, 2000). Vor dem ersten Zinkfinger von Insm1 befindet sich eine Kernlokalisationssequenz, die in der EIN-Familie konserviert ist (Candal *et al.*, 2007). Direkt am N-Terminus von Insm1 befindet sich eine Domäne von sieben Aminosäuren, von denen sechs identisch zu einer Domäne sind, die bei den Transkriptionsfaktoren

Snail/Slug, Gfi1 und Gfi1b beschrieben wurde und die als SNAG-Domäne bezeichnet wird (Grimes *et al.*, 1996). Die Insm1 Orthologe der Wirbellosen besitzen diese SNAG-Domäne nicht (Wu *et al.*, 2001; Kuzin *et al.*, 2005). In Vertrebraten wird die SNAG-Domäne in den Transkriptionsfaktoren Snail, Scratch, Gfi, Ovol und Gsx gefunden (Abb. 2).



**Abb. 1. Schematische Darstellung des Insm1 Proteins.** N-Terminus und Carboxyl-Terminus sind angegeben. AS: Aminosäureposition, blaues Rechteck: SNAG-Domäne, graue Rechtecke: Prolin-reiche Sequenzen, grünes Rechteck: Kernlokalisationssequenz (KLS), rote Rechtecke: Zinkfinger 1-5. Abbildung modifiziert von Xie *et al.*, 2002.

In HEK293 Zellen wurde nachgewiesen, dass die SNAG-Domäne von Snail1 mit der Lysin-spezifischen DNA Methylase Kdm1a (Lsd1) interagiert und diese Interaktion wird durch CoREST verstärkt. In dieser Studie wurde zudem eine Ähnlichkeit der SNAG-Domäne und angrenzender Seguenzen mit N-terminalen Seguenzen von Histon H3 beobachtet. Diese "Mimikry" ist jedoch spezifisch für Snail1 und nicht in den anderen SNAG-Transkriptionsfaktoren zu finden (Lin et al., 2010). In Erythroleukämie Zellen und L8057 Megakaryoblasten bindet Gfi1b über die SNAG-Domäne den Multiproteinkomplex Kdm1a, Rcor und HDAC1/2 (Saleque et al., 2007). Ovol1 bindet ebenfalls HDAC1/2 (Nair et al., 2007). Auch die SNAG-Domäne von Insm1 bindet den Histon-modifizierende Faktore HDAC1/3 (Liu et al., 2006). Eine systematische Untersuchung der Interaktionspartner zeigte, dass Insm1 an die Chromatin-modifizierenden Faktoren Hdac1/2, Kdm1a, REST (Rcor1-3) und transkriptionellen Regulatoren Hmg20a/b und Gse1 bindet (Welcker et al., 2013). Wenn die SNAG-Domäne von Insm1 in Mäusen deletiert wird, zeigen diese einen ähnlichen Hypophysen-Phänotyp wie Insm1 Null-mutanten Mäuse (Welcker et al., 2013).

ChIP-Analysen zeigen, dass Insm1 zusammen mit NeuroD1 und Foxa2 an cis-regulatorische Elemente in pankreatischen β-Zellen bindet und so Gene reguliert (Shiqi Jia und Andranik Ivanov, unpublizierte Daten). Ob die SNAG-Domäne von Insm1 wichtig für die Interaktion mit NeuroD1 und Foxa2 ist, wurde bisher nicht untersucht.

Insm1	MPRGFLV	KRSKKSTPVSYRV
Insm1∆SNAG		MRSKKSTPVSYRV
Insm2	MPRGFLV	KRTKRSGSSYRAR
Gfi1	MPRSFLV	KSKKAHSYHQPRS
Gfi1b	MPRSFLV	KSKKAHTYHQPRA
Snai1	MPRSFLV	<b>RK-PSDPRRKPNY</b>
Snai2	MPRSFLV	<b>KK-HFNASKKPNY</b>
Snai3	MPRSFLV	<b>KT-HSS-HRVPNY</b>
Scrt1	MPRSFLV	<b>KKVKLDTFSSADL</b>
Scrt2	MPRSFLV	KKIKADGFQCSGV
Ovol1	MPRAFLV	<b>KKPCVSTCKRNWS</b>
Ovol2	MPKVFLV	KRRSPGVSVRSWD
Gsx1	MPRSFLV	DSLVLREASDKKA
	SNAG	

Abb. 2. Vergleich N-terminaler Aminosäuresequenzen in verschiedenen Transkriptionsfaktoren, die eine SNAG-Domäne tragen. Die Sequenz des Insm1 $\Delta$ SNAG Proteins ist ebenfalls aufgeführt. Rot dargestellte Aminosäuren sind identisch in allen verglichenen Proteinen. Abbildung adaptiert von Welcker *et al.*, 2013.

Ziel meiner Arbeit war es, neue Erkenntnisse zur Funktionsweise von Insm1 während der Entwicklung endokriner Zellen zu erlangen. Dazu nutzte ich zwei Mauslinien mit unterschiedlicher Mutation im *Insm1*-Lokus, welche zuvor in unserem Labor generiert worden waren (Gierl *et al.*, 2006; Welcker *et al.*, 2013). In der einen Mauslinie wurden durch zielgerichtete Mutation Insm1 kodierende Sequenzen durch  $\beta$ -Galactosidase ausgetauscht (Insm1<sup>LacZ/LacZ</sup>), in der zweiten Mutante wurde lediglich die SNAG-Domäne deletiert (Insm1<sup>ΔSNAG/ΔSNAG</sup>). Ich verglich in verschiedenen endokrinen Organen mit Hilfe von Microarray-Analysen systematisch die Effekte dieser beiden Mutationen auf die Genexpression. Die so identifizierten differenziell exprimierten Gene wurden weiter mittels quantitativer Real-Time PCR, Immunfärbungen oder *In-situ*-Hybridisierung verifiziert.

### 1.3. Das Insm2 Zinkfinger-Protein

*Insm2* (*MIt1*, *IA-6*) ist ein Paralog von *Insm1*, das in Vertebraten und Invertebraten konserviert ist. Es ist auf Chromosom 12 lokalisiert und wird von einem einzigen Exon kodiert. Das Insm2 Transkript hat eine Länge von 3102 Basenpaaren (bp) mit einem offenen Leserahmen von 1482 bp. *Insm2* kodiert für ein Protein von 493 Aminosäuren Länge mit einem Molekulargewicht von 60 kDa. Die generelle Struktur ist ähnlich wie Insm1, d.h. Insm2 besitzt eine SNAG-Domäne am N-Terminus und fünf C-terminale Zinkfinger des C2H2 Typs (Abb. 3). Die Insm2 Aminosäuressequenz ist es zu 51% identisch mit Insm1. Über die Funktion und auch die Expression von Insm2 in der Maus ist bislang nur wenig bekannt (Cai *et al.*, 2011). Um Insm2 in der Maus zu untersuchen generierte ich einen Mausstamm, in dem die kodierende Sequenzen von Insm2 durch die Sequenz für kernlokalisiertes GFP ersetzt wurde (2.2.4.1., Seite 44) und analysierte die Expression in verschiedenen Geweben mittels Immunfluoreszenzfärbung.



**Abb. 3. Schematische Darstellung des Insm2 Proteins.** N-Terminus und Carboxyl-Terminus sind angegeben. AS: Aminosäureposition, blaues Rechteck: SNAG-Domäne, graue Rechtecke: Prolin-reiche Sequenzen, rote Rechtecke: Zinkfinger 1-5. Abbildung modifiziert von Xie *et al.*, 2002.

### 1.4. Endokrine Organe

Endokrine Organe sind Drüsen, die Hormone produzieren. Hormone werden immer direkt in das Blut abgegeben und wirken dann in weiter entfernten Zielorganen. Damit unterscheiden sich endokrine von exokrinen Drüsenorganen, die Ihre Sekrete über einen Ausfuhrgang in einen Körperhohlraum oder auf die Hautoberfläche abgeben. Es gibt aber auch Organe, die sowohl endokrine als auch exokrine Funktionen wahrnehmen wie zum Beispiel das Pankreas, der Magen und der Darm. Dabei nehmen verschiedene Zelltypen endokrine und exokrine Aufgaben wahr.

Insm1 Expression kann in endokrinen Zellen verschiedener endokriner Organe beobachtet werden, d.h. den Langerhans'schen Inseln des Pankreas, der Adenohypophyse, enteroendokrinen Zellen des Darms und in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks (Gierl *et al.*, 2006; Wildner *et al.*, 2008; Welcker *et al.*, 2013). Insm1 wird auch in neuroepithelialen Körperchen (NEB, neuroepithelial bodies) der Lunge gefunden (Shiqui Jia, unpublizierte Daten). Die Funktion von Insm1 in der Entwicklung endokriner Zellen wurde in Mäusen mit einem *Insm1* Null-Allel untersucht. Eine gemeinsame Auffälligkeit hierbei war, dass Insm1 in allen bislang untersuchten endokrinen Zelltypen für die korrekte terminale Differenzierung benötigt wird. So werden in Pankreas und Hypophyse die endokrinen Zellen zu Beginn der Entwicklung korrekt spezifiziert, im weiteren Verlauf der Entwicklung ist die Differenzierung dann blockiert (Gierl *et al.*, 2006; Welcker *et al.*, 2013). Ich untersuchte die Funktion der SNAG-Domäne in mehreren endokrinen Organen, die ich im Folgenden einführe.

## 1.4.1. Die Hypophyse

Die Hypophyse, auch Hirnanhangsdrüse genannt, steuert eine Vielzahl von Körperfunktionen: Wachstum, Metabolismus, Stress- und Schmerz-Reaktion, Fortpflanzung und Laktation. Dies geschieht über die Ausschüttung von Hormonen. Weil einige dieser Hormone weiter auf andere endokrine Organe wirken, nimmt die Hypophyse eine Schlüsselposition in der physiologischen Regulation des gesamten Organismus ein. Die Hirnanhangsdrüse wird in zwei morphologisch unabhängige Bereiche eingeteilt: Die Neurohypophyse (Hypophysenhinterlappen) und die Adenohypophyse, die weiter in Hypophysenvorder- und Hypophysenintermediärlappen unterteilt wird. Die Neurohypophyse entsteht aus der Anlage des Nervensystems, während die Adenohypophyse ein Derivat des Mund-Ektoderms ist.

Sechs verschiedene hormonproduzierende Zelltypen sind insgesamt in der Adenohypophyse zu finden (Tab. 1). Drei glandotrope (lat.: "auf Drüsen wirkend") Zelltypen, die auf andere endokrine Organe wirken: i) Thyreotrope Zellen sezernieren Thyreotropin (TSH), welches auf die Schilddrüse wirkt; ii) Corticotrope Zellen sezernieren adrenocorticotrophes Hormon (ACTH), welches auf die Nebennierenrinde wirkt; iii) Gonadotrope Zellen sezernieren Follitropin (FSH) und Lutropin (LH), die auf die Keimdrüsen wirken. Die anderen drei Zelltypen wirken direkt auf Erfolgsorgane: i) Somatotrope Zellen sezernieren das Wachstumshormon Somatotropin (GH, engl. growth hormone); ii) Laktotrope Zellen sezernieren Prolaktin (PrI); iii) Melanotrope Zellen sezernieren Melanotropin (MSH).

Symbol	Name	Zelltyp	Funktion
TSH	Thyreotropin	Thyreotrope	Regulation der Schilddrüse
ACTH	Adrenocorticotrophes Hormon	Corticotrope	Regulation der Nebennierenrinde
FSH LH	Follitropin Lutropin	Gonadotrope	Regulation der Keimdrüsen
GH	Somatotropin (growth hormone)	Somatotrope	Wachstum (anabol)
Prl	Prolaktin	Laktotrope	Laktation
MSH	Melanotropin	Melanotrope	Melaninsynthese

Tabelle 1. Die Hormone der Hypophyse

### 1.4.1.1. Die Entwicklung der Hypophyse

Neuro- und Adenohypophyse entstammen ontogenetisch zwei angrenzenden Bereichen der anterioren Neuralplatte. Im embryonalen Entwicklungsstadium 8 (E8) beginnt die Anlage der Adenohypophyse, die Hypophysen-Plakode, sich zu verdicken und wandert zum Apex der sich entwickelnden Mundhöhle (Abb. 4B, rot markierter Bereich). Unterdessen wandert die Anlage der Neurohypophyse ebenfalls, behält aber stets Kontakt mit der Hypophysen-Plakode und befindet sich schließlich direkt über dieser (Abb. 4B, gelb markierter Bereich). Die HypophysenPlakode stülpt sich dann fingerartig in das Dach der Mundhöhle ein (sog. Rathke'sche Tasche). Die Rathke'sche Tasche dehnt sich dorsal aus und die Verbindung mit der Mundhöhle wird geschlossen (Abb. 4C). Aus der Rathke'schen Tasche bildet sich die Adenohypophyse mit abgrenzbarem Intermediär- und Vorderlappen (Abb. 4D).



Abb. 4. Schematische Übersicht über die Entwicklung der Hypophyse in der Ratte. Das Entwicklungsstadium ist jeweils unten angegeben. Abkürzungen: SE stomodeales Ektoderm, M Mundhöhle, Np Neuralplatte, N Notochord, H Herz, RN Rostraler Neuroporus, I Infundibulum (späterer Hyphphysenstiel), RT Rathke Tasche, Rh Rombencephalon, HL Hinterlappen, CO Chiasma opticum, Po Pons, IL Intermediärlappen, VL Vorderlappen, Di Diencephalon, Kb Keilbein. Adaptiert von Schwind, 1928; Sheng & Westphal, 1999.

### 1.4.1.2. Die Bildung endokriner Zellen in der Adenohypophse

Die Bildung der Adenohypophyse wird von ex- und intrinsischen Signalen reguliert. In der frühen Entwicklung regulieren eine Reihe parakriner Signalmoleküle (Wnt5a, BMP-4 und FGF8/10/18, Shh) die Bildung der Rathke'schen Tasche. Das gemeinsame Wirken dieser Faktoren führt zur Expression des Transkriptionsfaktors Lhx3, der die Zellen als endokrine Vorläuferzellen der Adenohypophyse spezifiziert (Sheng *et al.*, 1997). In Mäusen mit einer Mutation in *Lhx3* fehlen daher jegliche endokrine Zellen (Sheng *et al.*, 1997). Die Bildung der verschiedenen endokrinen Zelltypen der Hypophyse wird durch die kombinierte Expression von verschiedenen Transkriptionsfaktoren reguliert (Abb. 5).

An der rostralen Spitze der Adenohypophyse entsteht der früheste endokrine Zelltyp, rostrale thyreotrope Zellen (E11,5). Einen Tag später sind corticotrope Zellen identifizierbar, die NeuroD1 und Tbx19 exprimieren (Lamolet *et al.*, 2004; Pulichino *et al.*, 2003). Danach folgen melanotrope Zellen, die ebenfalls durch eine Expression von Tbx19 charakterisiert sind (E14,5). Der größte Teil der endokrinen Zellen entstammt indes Vorläuferzellen, die Prop1 exprimieren. Eine Subpopulation dieser Zellen exprimiert Pit und bildet ab E15,5 somatotrope und lactrotrope Zellen (Wu *et al.*, 1998; Camper *et al.*, 1990). Eine zweite Subpopulation koexprimiert Pit und bildet die späten Thyreotrope Zellen (E15,5). Die dritte Subpopulation exprimiert GATA2 und SF1 und bildet gonatdotrope Zellen (E16,5) (Parker & Schimmer, 1996; Zhao *et al.*, 2001; Vesper *et al.*, 2006).

Insm1 wird in allen endokrinen Zellen der Hypophyse exprimiert und wird für deren Differenzierung benötigt (Welcker *et al.*, 2013). Der Verlust von Insm1 führt zu einer deutlichen Reduktion der Expression der Transkriptionsfaktoren, die endokrine Differenzierung steuern (Tbx19, Pit1, Gata2, Math3, SF1). Damit einhergehend findet keine Bildung von Hormonen statt bzw. ist stark beeinträchtigt. Die SNAG-Domäne von Insm1 ist für die Funktion in der Hypophyse essentiell: Eine Deletion der SNAG-Domäne und eine komplette Deletion des *Insm1*-Allels führen zu ähnlichen Phänotypen (Welcker *et al.*, 2013).



Abb. 5. Die kombinierte Expression von Transkriptionsfaktoren reguliert die Bildung endokriner Zellen in der Adenohypophyse. Überlappende Domänen von Transkriptionsfaktoren schränken das Zellschicksal einer anfangs multipotenten Population von Vorläuferzellen im Laufe der Entwicklung ein. Modifiziert von Scully & Rosenfeld, 2002.

### 1.4.2. Die Nebenniere

Die Nebenniere ist am anterioren Pol der Niere lokalisiert und umfassst zwei funktionelle Organe, die Nebennierenrinde und das Nebennierenmark. Die Nebennierenrinde produziert Aldosteron, Glucocorticoide und Androgene. Im Nebennierenmark befinden sich Zellen, die sich gut mit Chromsalzen anfärben lassen und daher als chromaffin bezeichnet werden. Diese endokrinen Zellen produzieren Enzyme für die Synthese von Adrenalin und Noradrenalin aus L-Tyrosin. Die Nebennierenrinde ist mesodermalen Ursprungs, die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks hingegen entstammen der Neuralleiste.

### 1.4.2.1. Entwicklung endokriner Zellen der Nebenniere

Delaminierende Zellen der Rumpf-Neuralleiste migrieren zur Anlage des Sympathikus und bilden dort die primäre sympathische Ganglienkette. Eine Subpopulation der Zellen in der primären Ganglienkette wandert erneut, um die Anlage der Nebenniere zu besiedeln.

Die Transkriptionsfaktoren Mash1 und Phox2b werden von sympathoadrenalen Vorläuferzellen exprimiert und haben wichtige Funktionen während der Differenzierung dieser Linie. In Mäusen mit einer Mutation in Mash1 oder Phox2b sind chromaffine Zellen zwar identifizierbar, sie sind aber in ihrer Anzahl reduziert und exprimieren nicht mehr das typische Spektrum chromaffiner Marker (Guillemot et al., 1993; Pattyn et al., 2000; Huber et al., 2002, 2005). Des Weiteren wird in Mash1<sup>-/-</sup> und Phox2b<sup>-/-</sup> Mutanten die Expression von Insm1 nicht korrekt induziert. Insm1 ist für die terminale Differenzierung von endokrinen Zellen des Nebennierenmarks essentiell. In Insm1 Null-Mutanten ist die Zahl chromaffiner Zellen auf Grund erhöhter Apoptose deutlich reduziert und die terminale Differenzierung unterbleibt. Dies äußert sich in einer reduzierten oder fehlenden Expression von Enzymen der Katecholaminsynthese, z.B. Tyrosin Hydroxlyase, Dopamin β-Hydroxylase und Phenylethanolamin N-methyltransferase. Dieser Phänotyp ähnelt dem von Mäusen mit einer Mutation in Mash1 (Guillemot et al., 1993). Mash1 ist in Insm1 Null Mäusen stärker als in normalen Mäusen exprimiert (Wildner et al., 2008). Die gestörte Katecholaminsynthese in Insm1 Mutanten führt zum Fehlen von Noradrenalin, welches für die Herzfunktion und das Überleben des Embryos benötigt wird (Thomas *et al.*, 1995). Daher ist eine Mutation in *Insm1* letal. Wenn Muttertieren, die mit mutanten Embryonen trächtig sind, L-DOPA, ein Zwischenprodukt der Katecholaminsynthese verabreicht wird oder alternativ ein Agonist des Noradrenalin-Rezeptors, überleben die homozygot *Insm1* mutanten Tiere bis zur Geburt (Wildner *et al.*, 2008).

### 1.4.3. Die Lunge

Die Lunge ist ein Organ für den Gasaustausch. Sie ermöglicht den Austausch von  $O_2$  aus der Atemluft und von  $CO_2$  aus dem Blut. Zu diesem Zweck ist die Lunge von einem Netzwerk von Tracheen abnehmender Größe durchzogen, die das Bronchialsystem bilden. Diese Tracheen sind mit Schleimhäuten und glatten Muskelzellen ausgekleidet. Die kleinsten Tracheen des Bronchialsystems bilden die Bronchiolen, die in die Lungenbläschen (Alveolen) münden.

### 1.4.3.1. Die Entwicklung der endokrinen Zellen der Lunge

Die Entwicklung der Lunge lässt sich in vier histologische Stadien einteilen. Das pseudoglanduläre Stadium (E10,5–16,5) ist durch einen starken Anstieg der Verzweigung von Bronchialästen gekennzeichnet. Das Epithelium differenziert dabei in sekretorische, endokrine und Flimmerepithelzellen. Im kanalikulären Stadium (E16,5–17,5) fahren die weiter distal gelegenen undifferenzierten Bereiche des Epithels fort, sich zu verzweigen und generieren dabei terminale bläschenförmige Strukturen. Diese sind die Vorläufer der Lungenbläschen. Ihre Anzahl nimmt im terminalen Bläschenstadium zu (E17,5–P5). Gleichzeitig beginnen Typ I und II Pneumozyten zu differenzieren. Im Alveolarstadiums (P5-30) reifen diese Strukturen schließlich zu funktionellen Alveolen aus (Cardoso & Lu, 2006).

Die endokrinen Zellen der Lunge liegen zum einen einzeln verstreut als *pulmunary neuroendocrine cells* (PNECs) in der Schleimhaut des Bronchialsystems und als Zellhaufen von neuroepithelialen Körperchen (NEB, *neuroepithelial bodies*), die bevorzugt an Abzweigungen von Atemwegen gruppiert sind (Brouns *et al.*, 2006, 2009). Sie werden dem diffusen endokrinen System zugerechnet und entstammen dem Endoderm (Sorokin *et al.*, 1997). Sie bilden unter anderem Serotonin (5-HT), GRP (gastrin-releasing peptide), CGRP (calcitonin gene-related peptide), Calcitonin, Somatostatin, SubstanceP und Cholecystokinin. Es wird vermutet, dass diese Hormone den Tonus der bronchialen glatten Muskulatur, Immunreaktionen, sensorische Nervenfasern und Lungenwachstum und Entwicklung beeinflussen (Van Lommel, 2001; Cutz *et al.*, 2013). Die neuroepithelialen Körperchen der Lunge sollen außerdem ein Reservoir für epitheliale Stammzellen bilden, da sie der Ursprung kleinzelliger Lungentumore sind (Reynolds *et al.*, 2000).

Insm1 ist in NEBs der Lunge exprimiert. Die Funktion von Insm1 in der Entwicklung von endokrinen Zellen der Lunge ist bislang noch nicht genau verstanden. Das Zellschicksal von Vorläuferzellen des Lungenepithels wird unter anderem durch den Transkriptionsfaktor Mash1 und Komponenten des Notch-Signalwegs gesteuert. Der Transkriptionsfaktor Mash1 initiiert die Differenzierung von PNECs und NEBs. Eine Mutation in *Mash1* führt zum Verlust dieser Zellen und Delta like 1 ein Notch Ligand wird in diesen Tieren nicht mehr exprimiert (Borges *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 1990). Auch eine zielgerichtete Überexpression von Notch1 unter Kontrolle des Calcitonin-Promoters führt zu einem Verlust von PNECs (Post *et al.*, 2000). Dementsprechend führte eine verminderte Expression von Notch1 mittels RNA-Interferenz in *in-vitro* Experimenten zu einer erhöhten Zahl von PNECs (Shan *et al.*, 2007).

Nicht-endokrine Zellen exprimieren das Notch-Zielgen *Hes1*. Mutationen von *Hes1* führen zu einer reduzierten Expression von Notch1 im Lungenepithelium. Mash1 ist in diesen Mutanten breiter als normal exprimiert und die Zahl von PNECs ist erhöht. Diese PNECs differenzieren jedoch größtenteils nicht korrekt und exprimieren CC10, einen Marker für exokrine Clara-Zellen (Ito *et al.*, 2000).

13

### 1.4.4. Der Dünndarm

Der Dünndarm ist der Hauptort der Verdauung und in Zwölffingerdarm (*Duoden-um*), Leerdarm (*Jujenum*) und Krummdarm (*Ileum*) gegliedert. Das Darmepithel ist in Falten aufgeworfen. Diese Kerckring-Falten sind weiter mit Zotten besetzt, zwischen denen schlauchförmige Vertiefungen, die Lieberkühnschen Krypten, liegen. Auf diese Weise wird die Oberfläche des Darms stark vergrößert.

Symbol	Name	Funktion
GIP	Glucose-dependent insulinotropic peptide	Inkretine: Inusulinsekretion bei gleichzeitiger Sup-
GLP-1/2	Glucagon like peptide-1	presion von Glukagon
Gast	Gastrin	Sekretion von Magensäure, Pepsinogen, Sekretin. Erhöhte Peristaltik. Schleimhautwachstum
Skt	Sekretin	pH abhängige Sekretion von Wasser und HCO <sub>3</sub> - aus Pankreas
Sst	Somatostatin	Hemmt jegliche Sekretion
VIP	Vasoactive intestinal peptide	Reduzierte Peristaltik, Vasodilatation
Nts	Neurotensin	Erhöhte Peristaltik, Sekretion von Flüssigkeit aus Jejunum und Ileum
ССК	Cholecystokinin	Sekretion Verdauungsenzymen aus Pankreas und Gallenblase
Ser 5-HT	Serotonin	Vermutlich Pathophysiologisch: Entzündung, Übelkeit etc.
PYY	Peptide YY	Peristaltik und Absorbtion von Elektrolyten und Wasser; appetithemmend

#### Tabelle 2. Hormone und Neuropeptide des Dünndarms

Die endokrinen Zellen des Verdauungstraktes (enteroendokrine Zellen) liegen als einzelne Zellen vor. So befinden sich z.B. die endokrinen Zellen des Dünndarms verstreut in den Lieberkühnschen Krypten. Diese enteroendokrinen Zellen bilden eine Vielzahl von Hormonen und Neuropeptiden mit unterschiedlichen Funktionen, die nur teilweise verstanden sind (Tab. 2).

### 1.4.4.1. Die Entwicklung endokriner Zellen des Darms

Eine Population von Vorläuferzellen, die an der Basis der Lieberkühnschen Krypten liegen, generiert die Enterozyten und die drei sekretorischen Zelltypen: Paneth-, Becher- und endokrine Zellen (Aiken & Roth, 1992; Cheng & Leblond, 1974; Roth *et al.*, 1990). Der Notch-Signalweg steuert die Bildung von sekretorischen Zellen. Mutationen, die die Notch-Aktivität reduzieren, führen zu einer Überproduktion von endokrinen Zellen, Becher- und Paneth-Zellen (Fre *et al.*, 2005; Jensen *et al.*, 2000; van Es *et al.*, 2005). Eine konstitutiv aktive Mutation von *Notch1* im Dünndarm-Epithel führt zu einer Überexpression von Hes-1 und verminderter Expression von Math1 und Ngn3 (Fre *et al.*, 2005). Alle Vorläuferzellen der sekretorischen Zelltypen sind durch die Expression von Math1 gekennzeichnet und Mutationen in *Math1* führen zum Verlust dieser Zellen (Yang *et al.*, 2001).

Ngn3 hingegen wird spezifisch in enteroendokrinen Zellen exprimiert und ist für deren Entwicklung essentiell (Jenny *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002). Die Transkriptionsfaktoren NeuroD1, Pdx1, Pax4 und Pax6 definieren die verschiedene Subtypen endokriner Zellen (Mutoh *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2009; Larsson *et al.*, 1998). Das Spektrum der beteiligten Transkriptionsfaktoren offenbart dabei auffällige Gemeinsamkeiten mit der Entwicklung endokriner Zellen des Pankreas.

Auch Insm1 wird in enteroendokrinen Zellen exprimiert. Insm1+ Zellen im Darmepithel koexprimieren NeuroD1, Ngn3, Synaptophysin und Chromogranin A und sind deshalb endokrin, aber sie sind negativ für Mucin2 oder Lysozym, welches in Paneth-Zellen bzw. Becherzellen exprimiert wird. Außerdem wird Insm1 auch in den Neuronen des enterischen Nervensystems exprimiert. In *Insm1* Mutanten werden zwar endokrine Ngn3+ Zellen spezifiziert, diese differenzieren aber nicht korrekt und Synaptophysin, Neurotensin, SubstanzP, Cholecystokinin und Serotonin werden in diesen Zellen nicht in vollem Umfang exprimiert (Gierl *et al.*, 2006).

### 1.4.5. Das Pankreas

Die Bauchspeicheldrüse enthält endokrine und exokrine Zellen. Die exokrinen Azinuszellen synthetisieren die Zymogene des Verdauungssafts. Die endokrinen Zellen hingegen bilden Hormone, die vor allem die Glukosehomöostase regulieren.

Die endokrinen Zellen sind in Zellhaufen, den Langerhans'schen Inseln, angeordnet, die im exokrinen Geweben verteilt sind (Abb. 6).



Abb. 6. Morphologie des reifen Pankreas in der Maus. (A) Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Pankreasgewebe (Gittes, 2009). (B) Schematische Übersicht vom Aufbau des Pankreas: Blau Azinuszellen, grün Zellen der Ausfuhrgänge, violett Inselzellen, rot Blutgefäße.

Es gibt fünf verschiedene endokrine Zelltypen in den Langerhans'schen Inseln,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\epsilon$ - und PP-Zellen, welche Glucagon, Insulin, Somatostatin, Ghrelin und pankreatisches Polypeptid sezernieren. In der Maus befinden sich die  $\beta$ -Zellen im Inneren dieser Inseln und sind größtenteils von den anderen endokrinen Zelltypen umgeben (Slack, 1995). Eine wichtige Funktion des Pankreas ist die Regulation des Blutzuckers, also der Menge freier Glukose im Blut. Daher ist die Sezernierung der Pankreas-Hormone, besonders von Insulin und Glukagon, direkt an Mechanismen zur Erfassung der Blutglukosekonzentration gekoppelt. Insulin und Glukagon wirken antagonistisch und lenken den Glukosemetabolismus entweder in Richtung von Energiespeicherung und Glukoseaufnahme durch energiebedürftige Organe oder in Glukoneogenese und Freisetzung von Glukose aus den Glykogenspeichern.

### 1.4.5.1. Entwicklung des Pankreas

Das Pankreas als anatomisch abgrenzbares Organ entwickelt sich aus zwei endodermalen Ausstülpungen, der ventralen und dorsalen Pankreasknospe (Abb. 7A). Die Zellen beider Pankreas-Anlagen exprimieren dabei die Transkriptionsfaktoren Pdx1, Nkx6.1 sowie Nkx2.2 und können somit noch bevor die Pankreasknospen anatomisch abgrenzbar sind identifiziert werden (Pedersen *et al.*, 2005). Die dorsale und die ventrale Pankreasknospe verschmelzen dann, um das Pankreas zu bilden (Abb. 7B).



Abb. 7. Schematische Übersicht der Pankreas-Entwicklung in der Maus. A Anterior, P posterior, dP dorsaler Pankreas, vP ventraler Pankreas, Le Leber, Du Duodenum, Mg Magen. Grün markierte Bereiche markieren die Expression von Pdx1. Adaptiert von Jorgensen *et al.*, 2007.

## 1.4.5.2. Die Bildung der endokrinen Zellen des Pankreas

Nachdem die dorsale und ventrale Pankreas-Anlage etabliert sind, werden verschiedene Trankskriptionsfaktoren in den Vorläuferzellen des Pankreas exprimiert. Zu den frühesten Faktoren, die spezifisch in der Pankreas-Anlage exprimiert werden, gehören Pdx1, Ptf1a und Sox9 (Ahlgren *et al.*, 1996; Guz *et al.*, 1995; Kawaguchi *et al.*, 2002; Krapp *et al.*, 1998; Seymour *et al.*, 2007). Mäuse mit einer Null-Mutation in *Pdx1* bilden keinen Pankreas (Jonsson *et al.*, 1994; Ahlgren *et al.*, 1996; Offield *et al.*, 1996). In Mäusen, die eine heterzygote Mutation in *Pdx1* tragen, ist die Insulinsekretion beeinträchtig und heterzygote Mutationen in humanem *Pdx1* verursachen Diabetes (*Maturity Onset Diabetes of the Young*, MODY 4) (Brissova *et al.*, 2002; Stoffers *et al.*, 1997).

Die Expression einer Kombination von Transkriptionsfaktoren legen das weitere Schicksal endokriner Zellen fest (Abb. 8). Die Diffenzierung von  $\alpha$ -Zellen ist ab-

hängig von Arx, Pax6, Nkx6.1 und Pou3f4, β-Zellen benötigen Pdx1, Pax4, Nkx2.2, Nkx6.1, Foxa2 und MafA. Einige dieser Faktoren reprimieren sich gegenseitig, so z.B. Pax4 und Arx und der Verlust eines der beiden Faktoren verschiebt das Gleichgewicht zwischen  $\alpha$ - und β-Zellen, d. h. ein Zelltyp wird auf Kosten des anderen produziert (Sosa-Pineda *et al.*, 1997; Collombat *et al.*, 2003).



**Abb. 8. Schematische Übersicht der Entwicklung endokriner Zellen des Pankreas.** Endokrine Zellen werden in zwei Wellen der Neurogenese generiert. Die Zellen der ersten Welle exprimieren hauptsächlich Glucagon. In einer zweiten Welle werden die Inselzellen aus endokrinen Vorläufern gebildet, die Ngn3 exprimieren. Ein komplexes genregulatorisches Netzwerk bestimmt die terminale Differenzierung.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

## 2.1.1. Laboraustattung

Die genutzten Chemikalien und Enzyme sind im Anhang oder direkt im Text jeweils mit der Angabe des Herstellers angegeben. Alle verwendeten Lösungen und Zellmedien sind in im Anhang (Seite 31) gelistet. Sonstige Lösungen und Medien wurden gemäß Sambrook *et al.*, 1989 angesetzt. Die genutzten Geräte und Materialien sind im Text mit der Angabe des Herstellers aufgeführt oder gehören zur Standardausstattung in biologischen Laboren. Alle Experimente dieser Arbeit wurden im Labor von Prof. Dr. Carmen Birchmeier am Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin, Berlin (MDC) durchgeführt.

### 2.1.2. DNA-Oligonukleotide

Name	Vorwärts Primer	Rückwärts Primer
Gcg	TTACTTTGTGGCTGGATTGCTT	AGTGGCGTTTGTCTTCATTCA
Insuylin I	CACTTCCTACCCCTGCTGG	ACCACAAAGATGCTGTTTGACA
Insulin II	GCTTCTTCTACACACCCATGTC	AGCACTGATCTACAATGCCAC
SST	ACCGGGAAACAGGAACTGG	TTGCTGGGTTCGAGTTGGC
Ghrl	TAAACTGCAGCCACGAGCTCT	CTCCTGACAGCTTGATGCCAAC
PYY	ACGGTCGCAATGCTGCTAAT	GCTGCGGGGACATCTCTTTT
PP	CAGGCGACTATGCGACACC	CAGGGAATCAAGCCAACTGG
Scg III	TGTCTCGGCATGCTAGACAC	GACGTGGGTTTATTTCCGTG
ChgA	ATCCTCTCTATCCTGCGACAC	GGGCTCTGGTTCTCAAACACT
ChgB	GCTCAGCTCCAGTGGATAACA	CAGGGGTGATCGTTGGAACAC
IAPP	CCACTTGAGAGCTACACCTGT	GAACCAAAAAGTTTGCCAGGC
PC2	ACCTTTGGCATCAGTATTAACAAC	CATCAGACTCAGGGGCATCA
MafA	AGGAGGAGGTCATCCGACTG	CTTCTCGCTCTCCAGAATGTG
MafB	TTCGACCTTCTCAAGTTCGACG	TCGAGATGGGTCTTCGGTTCA
Pdx1	CCCCAGTTTACAAGCTCGCT	CTCGGTTCCATTCGGGAAAGG
Nkx2.2	AAGCATTTCAAAACCGACGGA	CCTCAAATCCACAGATGACCAGA
Nkx6.1	CGCTTGGCCTATTCTCTGGG	CTGCGTGCTTCTTTCTCCA
Pax4	AGGGGGACTCTTTGTGAATGG	ACCTGTGCGGTAGTAGCGT
Pax6	TACCAGTGTCTACCAGCCAAT	TGCACGAGTATGAGGAGGTCT

### Tabelle 3. Verwendete DNA Oligonukleotide für qPCR (Pankreas)

Name	Vorwärts Primer	Rückwärts Primer
DBH	GAGGCGGCTTCCATGTACG	TCCAGGGGGATGTGGTAGG
TH	TCTCCTTGAGGGGTACAAAACC	ACCTCGAAGCGCACAAAGT
PNMT	CAGACCTGAAGCACGCTACAG	TAGTTGTTGCGGAGATAGGCG
Akr1c18	TCCCATCGTCCAGAGTTGGT	TCCATGCTCATCTTTAGGCAAA
ChgA	ATCCTCTCTATCCTGCGACAC	GGGCTCTGGTTCTCAAACACT
ChgB	GCTCAGCTCCAGTGGATAACA	CAGGGGTGATCGTTGGAACAC
Mash1	GCAACCGGGTCAAGTTGGT	GTCGTTGGAGTAGTTGGGGG
Phox2a	CTGGAGCTCTCCAATACAGTCC	GGAACTGCCGAGTAGGGTG
Gata2	CACCCCGCCGTATTGAAT	CCTGCGAGTCGAGATGGTTG
Gata3	CTCGGCCATTCGTACATGGAA	GGATACCTCTGCACCGTAGC
Hand2	TATGGCCCTGTCCTACAGCC	CGTCGGTCTTCTTGATCTCCG
Ebf1	GCAGCCACCATCTAGCCTG	CAGCAGTGAGTCTGCCTTGAT

### Tabelle 4. Verwendete DNA Oligonukleotide für qPCR (Nebenniere)

Tabelle J. Verwendete DNA Oligonukleotide für GR (Duillidanin)
--

Name	Vorwärts Primer	Rückwärts Primer
Tac1 (SubP)	TTTCTCGTTTCCACTCAACTGTT	GTCTTCGGGCGATTCTCTGC
Skt	AGACACTCAGACGGAATGTTC A	CTGGTCCTCTAAGGGCTTGGA
CCK	AAGAGCGGCGTATGTCTGTG	CATCCAGCCCATGTAGTCCC
Nts	GCAAGTCCTCCGTCTTGGAAA	TGCCAACAAGGTCGTCATCAT
Tph1	AACAAAGACCATTCCTCCGAAAG	TGTAACAGGCTCACATGATTCTC
Syp	CAGTTCCGGGTGGTCAAGG	ACTCTCCGTCTTGTTGGCAC
ChgA	ATCCTCTCTATCCTGCGACAC	GGGCTCTGGTTCTCAAACACT
NeuroD1	ATGACCAAATCATACAGCGAGAG	TCTGCCTCGTGTTCCTCGT

### Tabelle 6. Verwendete DNA Oligonukleotide für qPCR (Hypophyse)

Name	Vorwärts Primer	Rückwärts Primer
Myl1	CACATCATGTCTGTCTAAACGG	CTGGTGTTGACAGTTAGCCAT
Musc	GCTTTGTGGAACTTCCGCTT	AGGGCAAACCACACTTGTCT
DII1	GATACACACAGCAAACGTGACACC	TTCCATCTTACACCTCAGTCGCTA
Hes5	GCTCCGCTCGCTAATCGCCTCCAG	GTCCCGACGCATCTTCTCCACCAC
GH	ACGCGCTGCTCAAAAACTAT	CTGGTGAGTGGCTAGAAGGC
ΤՏΗβ	TCTACAGAACGGTGGAAATACCAG	CACACTTGCAGCTTATGGCGACAG
FSHβ	GTTCGCCCACCCTTGTCC	CCCTGGCACTCCTAGTCCT
Pomc1	GCAGGGGTCTTCTCATTCC	AGAGCCGACTGTGAAATCTG
PC2	ACCTTTGGCATCAGTATTAACAAC	CATCAGACTCAGGGGCATCA
Scgll	GCTAAGGCGTACCGACTTGG	TTCGGCTCCAGAGATGAGGAA

Name	Vorwärts Primer	Rückwärts Primer
Тbp	CCCCACAACTCTTCCATTCT	GCAGGAGTGATAGGGGTCAT
Ubc	GCAGATCTTTGTGAAGACCC	GAAGGTACGTCTGTCTTCCT
Hprt1	AGCTACTGTAATGATCAGTCAACG	AGAGGTCCTTTTCACCAGCA
b2m	ATTCACCCCCACTGAGACTG	TGCTATTTCTTTCTGCGTGC
Actg1	TGGATCTCTGTGAGCACCAC	AGGCAACTAACAACCGATGG
GAPDH	TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC	AAGATGGTGATGGGCTTCCCG
β-Actin	AGCAGTTGGTTGGAGCAAACATCC	ACAGAAGCAATGCTGTCACCTTCC
Ube2L3	GGTCTGTCTGCCAGTCATTAGTGC	GGGGTCATTCACCAGTGCTATGAG
GUSB	CCGATTATCCAGAGCGAGTATG	CTCAGCGGTGACTGGTTCG

#### Tabelle 7. Verwendete DNA Oligonukleotide für qPCR (Referenzgene)

### Tabelle 8. DNA Oligonukleotide für Genotypisierungen

Name	Primer Sequenz
Insm1 wt fw	CGTCGCCAGGCCTATCT
Insm1 wt rev	ACCGAGGGCGCACTCTA
Insm1 mut fw	CATATGGGGATTGGTGGCGACGAC
Insm1 mut rev	CACCGAAGCGAAGGGAAGAGGACA
Insm1 ∆SNAG2 fw	CCCAACCAGTGCGTCGCCCTT
Insm1 ∆SNAG2 rev	AGCAGCGCCCGGTCACTGTCC
Insm2 fw	TTTGCCAGCACGCACGAT
Insm2 wt rev	CCACTCGGCGTCGTCCT
Insm2 mt rev	CAGCTCCTCGCCCTTGCTCA

# Tabelle 9. DNA Oligonukleotide für die Klonierung von Sonden für *In-situ*-Hybridisierung

Name	Primer Sequenz
DbH_HindIII_fw	GCAAGCTTAGAACGCAGATCTCATCATGCTCT
DbH_rev	ATTTCTGTAGGAAGCCGTCGTCCAC
PNMT_Xhol_fw	GGAACTCGAGATGAACGGTGGCTCA
PNMT_rev	TCACACCTGCACCTCCATCTTCTGG

# Tabelle10.DNAOligonukleotidefür die Klonierung vonSonden für den Southern Blot mit Insm2 ES-Zell Klonen

Name	Primer Sequenz
5' probe fw	CCTTCTTCCAGCTAATAGGAC
5' probe rev	GGCTCTCAATTAAGTGTAGCAA
3' probe fw	GAATAACAACAGAAACGGAA
3' probe rev	CCACAGTAAACTACTTCTGAC

Tabelle 11. DNA Oligonukleotide für die Klonierung einer neuen	3'
Homologie im pDTA Vektor von Robert Storm	

Name	Primer Sequenz
3' Arm fw	GTGGCTTGTTTCACAGTT
3' Arm rev + Sacl	AAAA-GAGCT/C-GCACACGTAGCAGACACA

### 2.1.3. Plasmidvektoren

Tabelle 12.	Verwendete	Plasmidvektoren
-------------	------------	-----------------

Name	Insert	Bezugsquelle
pGEM-T Easy	-	Promega, Mannheim
pBluescript SK II (+)	) -	Stratagene, Amsterdam
pDTA-Insm2-re_st	Insm2 retrieval Vektor	Robert Storm
pDTA-Insm2-re	Insm2 retrieval Vektor mit neuer 3' Homologie	in dieser Arbeit kloniert
pDTA-Insm2-sc	Insm2 Subklon in pDTA	in dieser Arbeit kloniert
pBS-Insm2-tc	Insm2 targeting construct (mini targeting Vektor)	Robert Storm
pDTA-Insm2-tv	mutierter Insm2 Subklon in pDTA ( <i>targeting construct</i> )	in dieser Arbeit kloniert

### 2.1.4. BAC-Klone

In dieser Arbeit wurde ein BAC Klon (*bacterial artificial chromosome*) genutzt, der die genomische Sequenz des *Insm2* Lokus enthält (bMQ 98g23, Source BioScience, Nottingham). Er wurde für die Klonierung des *targeting* Vektors benutzt (2.2.2.3., Seite 36).

### 2.1.5. Antikörper

Die in dieser Arbeit genutzten Primär-Antikörper gegen murine Antigene sind in Tabelle 13 aufgelistet. Die jeweils verwendete Verdünnung für Immunfärbungen und die Bezugsquelle des Antikörpers ist angegeben. Die benutzten Sekundär-Antikörper für Fluoreszenzimmunhistologie waren anti-Ziege-, anti-Huhn, anti-Schaf, anti-Kaninchen oder anti-Meerschweinchen-IgG- Antikörper, jeweils gekoppelt an Cy2, Cy3 oder Cy5 (Dianova, Hamburg); sie wurden 1:500 verdünnt üN (über Nacht) eingesetzt.

Antigen	Wirt	Verdünnung	Bezugsquelle
ChgA	Kaninchen	1:800	Abcam
Ins	Kaninchen	1:1000	Immunostar
Ins	Meerschweinchen	1:500	Biozol (Biogenesis)
Gcg	Kaninchen	1:1000	Immunostar
SST	Ratte	1:200	Millipore
SST	Kaninchen	1:500	Dako
PP	Kaninchen	1:300	Millipore
Serotonin	Ziege	1:400	Abcam
Sekretin	Kaninchen	1:1000	Abcam
SubP	Kaninchen	1:3500	Novus Biologicals
Ghrl	Kaninchen	1:2000	Cathrine Tomasetto
PC2	Kaninchen	1:100	Chemicon (Millipore)
proCCK	Kaninchen	1:10000	Andrea Varro
IAPP	Kaninchen	1:600	Novus Biologicals
TH	Schaf	1:2000	Millipore
PNMT	Kaninchen	1:500	ImmunoStar
Insm1	Meerschweinchen	1:10000	Labor Carmen Birchmeier
PGP9.5	Kaninchen	1:4000	Dako
CGRP	Kaninchen	1:1000	Sigma

#### Tabelle 13. Primäre Antikörper

### 2.1.6. Bakterienstämme

Der Name, Genotyp und die Bezugsquelle der verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 14 aufgeführt.

### Tabelle 14. Verwendete Bakterienstämme

Name	Insert	Bezugsquelle
Escherichia coli DH10B	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK $\lambda$ - rpsL nupG	Invitrogen
Escherichia coli DY380	DH10B [lcl857 (cro-bioA) <> tet]	(Lee <i>et al.</i> , 2001)

### 2.1.7. Eukaryotische Zelllinien

Für die Herstellung von Mäusen wurden Stammzellen genutzt, die heterozygot für das *Insm2GFPNeo*-Allel waren. Diese wurden auf Neomycin-resistenten Fibroblasten kultiviert. Hierzu nutze ich embryonale Fibroblasten, die im Labor von Carmen Birchmeier aus Mäusen des Stamms rosex (Sonnenberg-Riethmacher *et al.*, 1996) *ex-vivo* isoliert wurden. Für die Kultur und Transfektion von ES-Zellen zur Herstellung transgener Mäuse wurde die embryonale Stammzellinie R1/E (Trans-

genic Core Facility, Dresden) verwendet. In dieser Arbeit wurde ein Aliquot wenig passagierter ES-Zellen benutzt.

### 2.1.8. Mausstämme

Mäuse, die das Insm1 *LacZ*-Allel trugen, hatten einen gemischten CD1-129/Ola-C57BL/6-Hintergrund. Insm1<sup>LacZ/+</sup>-Tiere wurden miteinander verpaart, um Insm1<sup>LacZ/LacZ</sup>-Tiere zu erhalten.

Mäuse, die das *Insm1*ΔSNAG-Allel trugen hatten einen gemischten R1/E-C57BL/ 6- Hintergrund. Heterozygote Insm1<sup>ΔSNAG/+</sup>-Tiere wurden untereinander verpaart, um homozygote Insm1<sup>ΔSNAG/ΔSNAG</sup>-Tiere zu erhalten.

Mäuse, die das *Insm2GFP*-Allel trugen, hatten einen gemischten R1/E-C57BL/6-Hintergrund. Heterozygote Insm1<sup>LacZ/+</sup>-Tiere wurden mit Insm2<sup>GFP/GFP</sup>- Tieren verpaart, um Insm1<sup>LacZ/+</sup>/Insm2<sup>GFP/+</sup>-Tiere zu erhalten.

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Molekularbiologische Methoden

Alle Standardmethoden, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind von Sambrook *et al.*, 1989 adaptiert und werden hier nicht im Detail beschrieben.

# 2.2.1.1. Isolierung, Manipulation und Aufreinigung von Desoxyribonukleinsäuren

### a) Präparation von Plasmid-DNA und DNA Fragmenten

Kleinere Mengen Plasmid DNA wurden aus 1,5 mL Zellkultur nach der *boiling* Methode aufgereinigt (Sambrook *et al.*, 1989) und in 50  $\mu$ L TE mit 0,2  $\mu$ g/ $\mu$ L RNaseA gelöst und bei -20°C gelagert. Für größere Mengen DNA wurde ein Plasmid-Maxi-Präparations-Kit verwendet (Invitrogen). Ausgehend von 200 mL *E. coli* üN (über Nacht) Kulturen wurde die DNA anschließend an die alkalische Lyse zusätzlich über eine Säule aufgereinigt . Die DNA wurde je nach Effizienz der Aufreinigung in 100-200  $\mu$ L TE gelöst und bei -20°C gelagert.

Um DNA Fragmente aus Agarosegelen zu isolieren wurde das NeucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel; Vogelstein & Gillespie, 1979) verwendet. Alternativ wurden in einigen Fällen ausgeschnittene Gel Fragmente durch eine Fritte zentrifugiert und die DNA Fragmente auf diese Weise wieder in Lösung überführt.

### b) Aufreinigung von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten

Für die Transformation in elektrokompetente *E. coli* -Zellen wurde die verwendete Plasmid-DNA oder der Ligationsansatz mittels PCI-Extraktion (Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkohol, Roth) von Proteinen befreit und dann mit einer selektiv permeablen Nitrocellulose Membran (MF disc MCE philic, Porengröße 0,025 µm, Durchmesser 25 mm; Millipore) entsalzt.

Um DNA-Fragmente nach Restriktionshydrolysen für anschließende sensible Reaktionen aufzureinigen, wurden selbst hergestellte Sephadex G-50 Säulen verwendet. Hierzu wurden 1 mL Insulinspritzen an der Spitze mit einem porösen Stopfen verschlossen und mit in TE gesättigtem Sephadex G-50 aufgefüllt. Ungebundenes TE wurde anschließend in einer Bodenzentrifuge (Heraeus Varifuge 3.0; Thermo, Langenselbold) bei 1800 rpm (*revolutions per minute*) für 3 min. abzentrifugiert. Die so vorbereitete Säule wurde dann mit der Probe beladen und erneut zentrifugiert, um die Probe in ein Eppendorf-Gefäß zu eluieren.

### c) Isolierung von genomischer DNA für Genotypisierungen

Um den Genotyp von Mäusen in experimentellen Kreuzungen und in der Stammhaltung zu identifizieren wurden Biopsien von Ohrlochmarkierungen von adulten Mäusen oder Schwanzspitzen-Gewebe von Embryonalstadien in 30  $\mu$ L Proteinase K Biopsielysepuffer bei 55°C üN im Schüttler verdaut. Die Proteinase K wurde dann durch 10 minütiges Erhitzen auf 100°C deaktiviert und die Proben mit MilliQ-H<sub>2</sub>O Wasser auf 300  $\mu$ L aufgefüllt. Für die anschließende Polymerase-Kettenreaktion wurde jeweils 1  $\mu$ L dieser DNA pro Reaktion eingesetzt.

## d) Restriktionshydrolyse von DNA, Ligation von DNA-Fragmenten

Restriktionshydrolysen von Plasmid-DNA wurden mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen gemäß Standardmethoden (Kimmel & Berger, 1987; Sander *et al.*, 1997) durchgeführt . Bei der Ligation von DNA-Fragmenten wurden in der Regel 50ng Vektor-DNA und ein etwa dreifacher molarer Überschuss an Fragment-DNA eingesetzt.

## e) Aufreinigung von genomischer DNA aus ES-Zellen

DNA aus ES-Zellen von zuvor isolierten ES-Zell Klonen aus der Transfektion von ES-Zellen mit dem Insm2 targeting construct (2.2.2.5. b), Seite 40) wurden in 96-Kammer Platten verdaut. Hierzu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann zusammen mit 50 µL ES-Zelllysepuffer bei 55 °C üN in einer mit feuchten Papiertüchern ausgekleideten Plastikkiste in einem Schüttler mit 60 rpm geschüttelt. Nach erfolgtem Verdau wurde die DNA direkt in den 96-Kammer Platten mit 140 µl Ethanol-Natriumacetat-Mix pro Kammer üN bei 4°C gefällt. Am nächsten Tag wurden alle Kammern dreimal mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen

Methoden

und die Platten anschließend über Kopf auf Papiertüchern ausgeklopft. Die Platten wurden dann zum Trocken mit geöffneten Deckeln für einige Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Sobald die Platten gut getrocknet waren wurden diese mit Autoklavierband versiegelt und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Um die genomische DNA der ES-Zellen mit einer Southern Blot-Analyse auf homologe Rekombination zu testen wurde diese zuvor je nach Verwendung der 5'- oder der 3'-RNASonde mit Spel beziehungsweise BstXI/Ncol verdaut. Hierzu wurde ein Reaktionsmix mit Puffer, Restriktionsenzym und RNAseA angesetzt: 45 µL Volumen mit 10 U Enzym sowie 50 µg/mL RNaseA . Die Platten wurden mit Parafilm versiegelt, die Deckel mit Autoklavierband gesichert und die Platten in eine mit nassen Papiertüchern ausgekleidete Plastikkiste verbracht. Diese Kiste wurde mit 50 rpm bei 37°C bewegt.

Die so verdaute DNA wurde für Gelektrophorese mit DNA Ladepuffer versetzt und komplett eingesetzt. Im Southern Blot positiv getestete Klone wurden für eine erneute Analyse in 6-Kammer Platten kultiviert und für die Analyse mit PBS gewaschen, mit 0,5 mL ES-Zelllysepuffer pro Kammer versetzt, vom Boden abgeschabt, in ein Reaktionsgefäß überführt und üN bei 55°C verdaut. Die DNA wurde dann mit 25:24:1 Phenol:Choroform:Isoamylalkohol (PCI) extrahiert, mit Ethanol gefällt und in einem passenden Volumen TE (0,2-1 mL) gelöst. Danach folgte die Restriktionshydrolyse für die Southern Blot-Analyse (2.2.1.5., Seite 31) mit einer größeren Menge DNA (10-15 µg) pro Ansatz.

## 2.2.1.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde zur spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten aus genetischem Material eingesetzt. Sie fand Anwendung in der Klonierung von DNA-Fragmente in Plasmid-DNA und der Analyse des Genotyps in der Maus (Genotypisierung). Die PCRs wurden unter Standard Bedingungen (Sambrook *et al.*, 1989) unter Nutzung von Bio-Rad- (München) und Biometra- (Göttingen) PCR Maschinen durchgeführt. Die Taq Polymerase und die dazugehörigen Puffer wurden von Invitrogen bezogen. Präparative PCRs wurden je nach Anwendung entweder durch Restriktionshydrolyse verdaut und anschließend auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und dann aus dem Gel aufgereinigt oder direkt durch PCI Extraktion aufgereinigt.

Der Reaktionsansatz für die am häufigsten durchgeführte Genotypisierungs PCR enthielt:

- 1 µL des hitzeinaktivierten Lysats
- 2 µL dNTPs (2,5 mM je Nukleotid; Invitek, Berlin)
- 2 µL 10x Puffer (Invitrogen)
- 1,2 µL Primer 1 (5 µM Primer 1, z.B. Insm1 fw.)
- 1,2 µL Primer 2 (5 µM Primer 2, z.B. Insm1 wt rev. oder Insm1 mt rev.)
- 1 µL DMSO, 0,8 µL 50 mM MgCl2 (Invitrogen)
- 0,15 µL Taq
- MilliQ-H<sub>2</sub>O ad 20  $\mu$ L.

Das PCR Programm begann mit 5 min. 94°C Denaturierung, umfasste 35 Mal den Zyklus 30 sek. 95°C Denaturierung, 20 sek. 57°C Annealing, 1 min. 72°C Elongation und endete mit 5 min. Elongation bei anschließender Erhaltungstemperatur 4°C.

Die Annealing Temperatur und die Zeiten für Annealing und Elongation wurden jeweils an an die Länge, des zu amplifizierenden Fragments sowie die Annealing Temperaturen der veschiedenen genutzten Oligonukleotide angepasst.

### 2.2.1.3. Quantitative Real-Time PCR

Pankreas Gewebe von Mäusen im Stadium E18,5 wurde in eiskaltem 1 x PBS präpariert und sofort in 600  $\mu$ L Trizol aufgenommen und homogenisiert (IKA T10 basic Ultra Turrax). Zwischen den Präparationen wurde die 1 x PBS Lösung jeweils gewechselt, um ein Verschleppen von Pankreasen, RNAsen etc. zu vermeiden. Das homogenisierte Gewebe wurde bei -80°C aufbewahrt. Zur Probenaufbereitung wurde die RNA mit Hilfe einer Phenol-Chloroform Extraktion aufgereinigt und das Pellet in 10  $\mu$ L nukleasefreiem Wasser gelöst. Genomische DNA wurde anschließend mit RNAse freier DNAsel (Invitrogen) unter Zugabe von RNAseOut (Invitrogen) verdaut. Die RNA wurde in mit saurem Phenol-Chloroform Isoamylalkohol (pH 5,2) isoliert und das Pellet zweimal mit 75% Ethanol gewaschen. Nach kurzeitigem Trocknen (ca. 5 min) wurde das Pellet in 10  $\mu$ L nuklea-

sefreiem Wasser gelöst. Die RNA Konzentration wurde mit einem Spektrophotometer (Nanodrop;ThermoFisher Scientific, Waltham USA) bestimmt und 1 µg RNA für die Reverse Transkriptase Reaktion eingesetzt (SuperscriptIII, Invitrogen). Nach der Erststrangsynthese wurde verbliebene RNA mit RNAseH verdaut.

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden so gewählt, dass sie eine durchschnittliche Annealing Termperatur von 60°C aufweisen und einen ähnlichen GC Gehalt besitzen. Die Größe der amplifizierten Fragmente variierte je nach Oligonukleotidpaar zwischen 100-200 Basenpaaren. Die Oligonukleotide wurden dabei so konstruiert, dass sie ein Intron flankieren, um zu verhindern, dass eventuell verbliebene genomische DNA der Reaktion als Matrize dienen konnte. Die einzige Ausnahme bildeten hierbei die Oligonukleotide für InsulinI cDNA, da das *Insulin I* Gen in einem einzigen Exon kodiert ist. Die Primerpaare der zu untersuchenden Gene wurden für jeweils eine Reaktion zu einer Konzentration von 2  $\mu$ M je Oligonukleotid verdünnt und 5  $\mu$ L dieser Lösung mit 10  $\mu$ L SYBR Green q PCR Mix (Thermo Scientific) versetzt. 15  $\mu$ L dieses Mastermixes wurden je Reaktion in das Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 5  $\mu$ L Template cDNA (1:10 verdünnt) vereint. Die verwendeten Oligonukleotide sind in 2.1.2., Seite 19 aufgelistet.

Alle Proben wurden mit mindestens einem technischen Replikat analysiert. Für jedes Experiment wurden außerdem die C(t)-Werte von mindestens zwei Referenzgenen analysiert, die in der statistischen Analyse (2.2.5.2. c), Seite 49) zur Normalisierung verwendet wurden. Die Oligonukleotide der verschiedenen Referenzgene sind in 2.1.2., Seite 19 aufgelistet.

## 2.2.1.4. Genomweite Microarray-Transkriptionsanalyse

### a) RNA Isolierung und Aufreinigung

Frisches Gewebe wurde in eiskaltem 1 x PBS präpariert, sofort in 2 mL Eppendorf Gefäße mit 600 µL Trizol überführt und anschließend mit einem IKA T10 basic Ultra Turrax homogenisiert. Zwischen den einzelnen Präparationsschritten wurde das PBS gewechselt, um Verunreinigungen der Proben aus vorherigen Präparationen zu minimieren. Alle Proben wurden auf Trockeneis gefroren und bis zur anschließenden RNA Extraktion bei -80°C aufbewahrt. Biopsien aus Schwanzspitzen-DNA wurde für die Genotypsierung erfolgter verwendet. Nach Genotypisierung wurde die Gesamt-RNA aufgereinigt, indem die Probem mit 1 mL Trizol aufgefüllt und zusammen mit 2 µL Polyacrylcarrier (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati) für 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Anschließen wurden die Proben mit 320 µL Chloroform versetzt und gründlich gevortext, 15 min. mit 10000 x g in einer Tischkühlzentrifuge (Universal 32R; Hettich, Tuttlingen) bei 4°C zentrifugiert, die wässrigen Überstände in neue Eppendorf Gefäße überführt und die RNA mit 830 µL Isopropanol gefällt. Das Pellet wurde mit 75% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 100 µL nukleasefreiem Wasser gelöst. Die so isolierte RNA der Proben wurde dann mit dem Quiagen MinElute-Kit nach Herstellerangaben weiter aufgereinigt und in einem Volumen von 12 µL nukleasefreiem Wasser eluiert.

### b) cDNA-Synthese, in-vitro-Transkription und Biotinylierung der cRNA

Sowohl die Synthese des cDNA Erst- und Zweitstranges, als auch die *in-vitro*-Transkription in biotinylierte cRNA wurde mit Hilfe des Illumina TotalPrep RNA Amplifikation Kits (Applied Biosystems) durchgeführt. Hierbei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Pro Probe wurden 250ng Gesamt-RNA im ersten Syntheseschritt eingesetzt. Die Konzentration der resultierenden biotinylierten Sonden cRNA wurde mit einem Nanodrop 1000 (ThermoFisher Scientific, Waltham USA) gemessen und die Proben auf eine Konzentration von 225 ng/µL in einem Volumen von 6 µL verdünnt. 1 µL dieser Verdünnung wurde zu Kontrollzwecken auf einem 0.8% Agarosegel getestet. Die verbliebenen 5 µL cRNA wurden für eine Hybridisierung mit Illumina mouseref 8 v2.0 Chips verwendet.

### c) Microarray-Hybridisierung

Die biotinylierten cRNA Sonden wurde gemäß Herstellerangaben auf mouseRef-8 v2.0 Microarrays (Illumina) hybridisiert. Pro Genotyp wurden zwischen sechs und acht 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-Kreislauferkra-
nkungen, MDC) durchgeführt. Die Expressionsrohdaten, bestehend aus den normalisierten Expressionsintensitäten, wurden im Rahmen dieser Arbeit weiter bearbeitet und analysiert.

#### 2.2.1.5. Southern Blot-Analyse

#### a) Semi-Dry Southern Blot Aufbau

Die verdaute genomische ES-Zell DNA wurde auf einem 0,8% Agarosegel üN mit einer Spannung von 25 V aufgetrennt. Die Gele wurden für 10 min. in Vollentsalztem (VE) Wasser mit Ethidiumbromid inkubiert und dann zusammen mit einem unter UV-Licht fluoreszierendem Lineal für die Dokumentation abgelichtet. Anschließend wurde die DNA für genau 8 min. schwenkend in Depurinierungspuffer inkubiert. Nachdem die Gele kurz mit VE Wasser gespült wurden, wurden diese in Denturierungspuffer überführt und in diesem für 15 min. schwenkend inkubiert. Danach wurde der Puffer durch frischen Denaturierungspuffer ersetzt und erneut für 20 min. inkubiert. Zuletzt wurde das Gel gründlich mit VE Wasser gespült und für 5 min. in 20 x SSC inkubiert. In der Zwischenzeit wurden Whatman Papier und Nitrocellulose Membran (N+, GE Healthcare) in der Größe der Gele zurechtgeschnitten und in 10 x SSC angefeuchtet. Die Gele wurden nun mit den Taschenöffnungen nach unten zeigend auf einem Elektrophoreseschlitten platziert. Danach wurde die angefeuchtete Nitrozellulosemembran auf dem Gel aufgelegt und mit einer Glaspipette verbliebene Luftblasen durch vorsichtiges Rollen entfernt. Die Membran wurde dann mit 3 Lagen nassem Whatman Papier und einem halben Stapel Papierhandtücher überschichtet, so dass die gesamte Fläche der Membran abgedeckt war. Auf diesen Aufbau kam ein Elektrophoreseschlitten. Der fertige Aufbau wurde umgedreht, so dass das Gel wieder mit den Taschenöffnungen nach oben zeigte. Der Aufbau wurde dann mit einigen schweren Glasflaschen gegen Verrutschen gesichert und mit einer kleineren Glasflasche beschwert, um den nötigen Andruck für Blot-Vorgang zu gewährleisten. Der Semi-Dry Blot wurden üN stehen gelassen und am nächten Tag abgebaut. Die Membran wurden dann auf einem Stück Whatman Papier zum trocknen ausgelegt, um die gebundene DNA zu fixieren und nach erfolgtem Trocken in Frischhaltefolie eingeschlagen.

#### b) Herstellung radioaktiv markierter DNA Sonden

Sequenzen für DNA-Sonden wurden in pGEM-Teasy kloniert und über Verdau mit Notl freigesetzt und mittels des NeucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel; Vogelstein & Gillespie, 1979) nach erfolgter Gelelektrophorese aufgereinigt. 20-50 ng dieser DNA wurden nach Herstellerangaben als Matrize mit dem Prime-It RmT Random Primer Labelin-Kit (Stratagene, La Jolla) verwendet und mit 5µL  $\alpha$ -<sup>32</sup>PdCTP (EasyTides 25 µL ≈ 9,25 MBq; PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim) transkribiert. Die fertige Sonde wurde dann mit selbstgefertigten G-50 Säulen aufgereinigt (2.2.1.1. b), Seite 25) und in 1 mL Church Puffer aufgenommen. Die so herstestellte Sonden-DNA war ausreichend für die Hybridisierung zweier großer Membranen (20 x 25 cm).

#### c) Hybridisierung der Southern Blot Sonden

Die gelektrophoretisch aufgetrennte und auf eine Nitrocellulosemembran übertragene (2.2.1.5. a), Seite 31) genomische ES-Zell DNA wurde in diesem Schritt mit radioaktiv markierten DNA-Sonden hybridisiert, um die unterschiedlich großen Fragmente von ES-Zell DNA zu identifizieren, die aus dem homologen Rekombinations-Ereignis resultieren. Im Falle des von mir genutzten targeting constructs werden durch den Ersatz des *Insm2* Lokus mit dem *Insm2GFPNeo*-Allel eine Restriktionsstelle von Spel und Ncol eingeführt, die in der Restriktionshydrolyse mit Spel oder Ncol/BstXI zu Fragmenten führen, die mehrere Kilobasen kürzer sind als im Wildtyp-Allel (Abb. 9, Seite 45).

Für die Hybridisierung wurden die Nitrocellulose Membranen einmal kurz in 2 x SSC gefolgt von VE Wasser gewaschen und anschließend mit einer Glaspipette aufgerollt und in Glaszylinder überführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Membranseite mit der gebundenen DNA vom Glas abgewandt war. Anschließend wurden die Zylinder mit 10 mL auf 65°C erhitztem Church Puffer aufgefüllt und fest verschlossen. Die Zylinder wurden dann in einem Hybridisierungsofen mit

Rotationsvorrichtung (PerfectBlot, Peqlab, Erlangen) eingespannt und langsam rotiert. Diese Prähybridisierung wurde mindestens für eine Stunde vorgenommen.

Nach der Prähybridisierung wurde die Sonde für 10 min. denaturiert und auf die Glaszylinder verteilt. Die Hybridisierung erfolgte üN bei 65°C und langsamer Rotation. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung vorsichtig abgenommen. Die Membranen wurden sodann mit fünf Waschlösungen mit abnehmender SSC und SDS Konzentration gespült:

- 1. 1x SSC / 1% SDS
- 2. 1x SSC / 0,1% SDS
- 3. 0,5x SSC / 0,1% SDS
- 4. 0,2x SSC / 0,1% SDS
- 5. 0,1x SSC / 0,1% SDS

Gewaschen wurde mit einer Temperatur von 68°C. Die ersten beiden Waschschritte erfolgten in den Glaszylindern, die folgenden in einer Plastikwanne unter Schwenken in einem erhitzten Wasserbad. Der Erfolg des Waschvorgangs wurde mit einem Geigerzähler überprüft. Es wurde gewaschen, bis die Strahlung einen Wert < 1Bq/cm<sup>2</sup> aufwies. Die gewaschenen Membranen wurden dann feucht mit der DNA gebundenen Seite nach unten auf eine Frischhaltefolie gelegt und mit einer Overhead Projektor Folie gefolgt von einer Pappe überschichtet um diese zu stabilisieren und in der Frischhaltefolie einschlagen zu können. Die Folie verhinderte dabei ein Austrocknen der Membran, eine Maßnahme die es erlaubt, die markierte Sonde im Bedarfsfall wieder entfernen zu können ("Membran strippen"). Das radioaktive Signal der DNA-Sonden auf der Membran wurde anschließend in einem Phosphoimager (Typhoon 9500, GE Healthcare) ausgelesen.

#### 2.2.1.6. In-situ-Hybridisierung

# a) *In-vitro*-Transkription zu Herstellung von DIG markierten RNA Sonden

Für die *in-vitro*-Transkription wurden 1  $\mu$ g linearisierte und aufgereinigte DNA als Matrize eingesetzt. Ein Reaktionsansatz enthielt 2  $\mu$ l 10x Transkriptionspuffer, 2  $\mu$ l DIG-Labeling-Mix, 1  $\mu$ l RNase-Inhibitor (RNaseOUT; Invitrogen), 1  $\mu$ l der passenden Polymerase (T7, T3, SP6) und wurde auf 20  $\mu$ l mit RNase freiem H<sub>2</sub>O aufgefüllt, für 2 h bei 37°C inkubiert und auf Eis abgestoppt. Die Säulenaufreinigung der DIG-markierten RNA-Sonde erfolgte mit dem RNeasy MinElute Cleanup-Kit (Qiagen, Hilden) gemäß Herstellerangaben. Die DIG-markierte RNA-Sonde wurde zweimal mit je 25  $\mu$ l RNase freiem H<sub>2</sub>O eluiert, mit 50  $\mu$ l Formamid aufgefüllt und direkt für die *In-situ*-Hybridisierung eingesetzt oder bei -70°C gelagert.

#### b) In-situ-Hybridisierung auf Gefrierschnitten

Zuerst wurden die Gefrierschnitte auf den Objektträgern mit einem Wachsstift (Dako Pen, Agilent Technologies, Santa Clara USA) umrandet, gefolgt von 30 min. Fixierung in 4% PFA und dreimaligem Waschen für 5 min. in 1 x PBS. Darauf wurde das Gewebe in Glasküvetten für 10 min. in Acetylierungspuffer inkubiert, um positiv geladene Aminosäurereste zu neutralisieren. Nach erneutem dreimaligen Waschen für 5 min. in 1 x PBS wurden die Schnitte in Hybridisierungslösung für eine Stunde bei RT Prähybridisiert. Hierzu wurden die Objektträger mit 700 µL Hybridisierungslösung in einer Feuchtkammer vorsichtig auf einem Schwenktisch bewegt. Danach wurde die Hybridisierungslösung getauscht mit 150 µL frischer Hybridisierungslösung + 2 µL DIG-RNA Sonde/100 µL Hybridisierungslösung. Die Objektträger wurden zusätzlich mit Deckgläschen abgedeckt und die Kammer mit Tüchern ausgekleidet, die mit einer Formamidlösung gegen Austrocknung angefeuchtet wurden (50% Formamid 5 x SSC). Die Hybridisierung erfolgte üN bei 70°C. Am nächsten Tag wurden die Objektträger vorsichtig in Glasküvetten mit 5 x SSC überführt und für 5 min. inkubiert, so dass die Deckgläschen sich von den Objektträgern lösten. Danach wurde zweimal mit 70°C heißem 0,2 x SSC in Glasküvetten für 30 min. in einem schwenkenden Wasserbad gewaschen. Die Schnitte wurden dann in eine Glasküvette mit 0,2 x SSC bei RT überführt und für 5 min. abgekühlt. Danach wurden die Objektträger in B1-Puffer transferiert und für 5 min. in diesem gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte wieder in Feuchtkammern transferiert und mit 1 mL B1-Puffer mit 10% Ziegen Serum für 30 min. blockiert. 500 µL dieser Lösung wurden mit verdünntem anti-DIG-Antikörper (1:2500) pro Objektträger auf die Schnitte gegeben und üN bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal für 5 min. in B1-Puffer in Glasküvetten gewaschen. Dann wurden diese für 5 min. in NTMT in Glasküvetten umgepuffert. 100 mL dieser Lösung wurde mit 20  $\mu$ L NBT und 20  $\mu$ L BCIP gemischt, um die Färbungslösung anzusetzen in der die Schnitte lichtgeschützt bei Raumtemperatur bis zur gewünschten Färbungsintensität gefärbt wurden. Die Reaktion wurde dann mit H<sub>2</sub>O gestoppt und die Schnitte entweder mit Entellan (Merck, Darmstadt) oder Immu-Mount (Thermo Fisher Scientific, Waltham USA) eingedeckelt.

#### 2.2.2. Bakterien- und Zellkultur

#### 2.2.2.1. Herstellung elektrokompetenter E. coli Zellen

Um Bakterien der Stämme E. coli DH10B und E. coli DY380 Elektrokompetenz zu verleihen, wurde eine 5 mL LB Vorkultur mit passendem Antibiotikum mit Zellen aus einer Glyzerin-Dauerkultur angeimpft und üN bei 32°C kultiviert. Anschließend wurden 1 mL dieser Vorkultur genutzt, um 100 mL LB- Medium anzuimpfen und erneut bei 32°C bis zu einer OD600 von 0,6 zu kultivieren. Die Kultur wurde dann auf 50 mL Falcon-Gefäße aufgeteilt, für 10 min. in Eiswasser gekühlt, darauf für 10 min. bei 2500 rpm in einer Kühlzentrifuge (Avanti J-20 XP; Beckman Coulter, Krefeld) bei 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Um die Zellen gänzlich vom LB Medium zu befreien wurde das Pellet in 50 mL 10% Glyzerin in eiskaltem H<sub>2</sub>O auf Eis resuspendiert, 10 min. bei 4000 rpm bei 4°C sedimentiert, wieder in 50 mL 10% Glyzerin aufgenommen, erneut 10 min. bei 6000 rpm bei 4°C pelletiert, nochmals in 50 mL 10% Glyzerin aufgenommen und zum Schluss für 10 min. bei 8000 rpm bei 4°C abzentrifugiert. Durch das schrittweise Erhöhen der Zentrifugationskraft wurde das Pellet so weit verdichtet wie möglich und restliches LB mit Glycerin ersetzt. Anschließend wurden die Zellen mit genau soviel 10% Glyzerin resuspendiert, dass die Lösung eine Viskosität bekam mit der man diese gerade noch pipettieren kann. Diese Suspension wurde in 26 µL-Aliquots in Eppendorf Gefäßen mit Flüssigstickstoff 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. Transformation elektrokompetenter E. coli Zellen

Elektrokompetente *E. coli* DH10B und *E. coli* DY380 Zellen wurden durch Elektorporation mit Plasmid-DNA transformiert. Hierzu wurde Plasmid-DNA aus Ligationansätzen zuvor aufgereinigt (2.2.1.1. b), Seite 25). 2-5  $\mu$ L dieser DNA wurden mit 30  $\mu$ L frisch aufgetauten DH10B Zellen versetzt und blasenfrei in eisgekühlte Elektroporationsküvetten (Gene Pulser Küvetten, Spaltgröße 0,1 cm; Bio-Rad) überführt. In diesen wurden sie mit einem kurzen Puls von 1,80 kV, 25  $\mu$ F und 200  $\Omega$  mit einem Elektroporator (MicroPulser; Bio-Rad) elektroporiert. Direkt nach der Elektroporation wurden die Zellen in 1 mL eiskaltem LB Medium aufgenommen, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und für 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Danach wurden die Zellen in einer Tischzentrifuge herunterzentrifugiert und 800  $\mu$ L LB abgenommen und verworfen, während, die Zellen vorsichtig im verbliebenen LB resuspendiert wurden. 50  $\mu$ L, 100  $\mu$ L und 150  $\mu$ L dieser Zellsuspension wurden dann auf LB-Platten mit einem plasmidspezifischen Selektionsantibiotikum plattiert und üN bei 37°C in einem Brutschrank kultiviert.

#### 2.2.2.3. Homologe Rekombination in Bakterien

Die homologe Rekombination ermöglicht die Klonierung von DNA Fragmenten, die auf Grund ihrer Größe und damit einhergehenden Vielzahl an potentiellen Schnittstellen nicht mehr mit Hilfe von Restriktionsenzymen kloniert werden können (Yu *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001). Die homologe Rekombination wurde in elektrokompetenten Zellen des Bakterienstammes *E. coli* DY380 durchgeführt (2.2.2.2., Seite 36). Dieser Stamm trägt die für die Rekombination notwendigen red Gene (*exo* und *pol*) unter der Kontrolle des temperatursensitiven  $\lambda$  Repressors, da eine permanente Expression der *red* Gene letal für die Bakterien ist.

Ich nutzte die homologe Rekombination, um das Insm2GFP targeting construct zu generieren. Robert Storm hatte bereits zuvor im Labor von Carmen Birchmeier ein Insm2GFP targeting construct generiert. Dieses trug jedoch einen 3' Homolo-

Methoden

giearm, der sich als zu kurz erwiesen hat, um effizient in embryonalen Stammzellen zu rekombinieren. Deshalb nutzte ich eine Reihe Zwischenvektoren (2.1.3., Tab. 12, Seite 22), die noch von der Klonierung des ursprünglichen Insm2GFP targeting constructs vorhanden waren, für die Generierung des in dieser Arbeit genutzten Insm2GFP targeting constructs. Ich tauschte die kurze 3' Homologie des *retrieval* Vektors (ein pDTA Derivat), mit einer Homologie aus, die weiter 3' des *Insm2*-Lokus gelegenen war und rekombinierte anschließend den linearisierten *retrieval* Vektor mittels gap repair mit einem BAC-Klon (Insm2: bMQ 98g23; Source BioScience, Nottingham), der den *Insm2*-Lokus enthielt. Dieser 15,7 kb große Subklon beinhaltete die vollständige Sequenz von *Insm2* sowie große Teile genomischer, *Insm2* flankierende Sequenzen (5' Homologiearm 4,2 kb; 3' Homologiearm 10 kb).

Der Subklon wurde anschließend mit einem mini targeting Vektor rekombiniert, der unverändert von Robert Storm übernommen werden konnte. Der mini targeting Vektor trug kurze Homologien mit direkt flankierenden Sequenzen von Insm2 und inserierte auf diese Weise in Übereinstimmung mit dem Leserahmen des Insm2 Promoters die Sequenz für kernlokalisiertes GFP an das 3' Ende des Insm2 Promoters. Im fertigen targeting construct war deshalb die komplette kodierende Sequenz von Insm2 deletiert. Die Umgebung des Startkodons wurde für eine effiziente Initiierung der Translation optimiert (Kozak, 1987). Des Weiteren inserierte der mini targeting Vektor eine selbstausschneidende Cre-Neo/Kan-Resistenzkassette (Bunting et al., 1999) und eine Selektionskassette, die für das Fragment A des MC1- Diphterietoxins kodiert (DTA) und zur Negativ-Selektion genutzt wurde (Yagi et al., 1993). Die DTA-Selektionskassette lag außerhalb der flankierenden Homologiearme des targeting constructs und wird daher bei einer fehlerfreien homologen Rekombination nicht in das Genom der ES-Zellen integriert. Das fertige targeting construct wurde genutzt um ES-Zellen zu transfizieren (2.2.2.5. b), Seite 40). ES-Zellen, die das targeting construct in ihr Genom integriert hatten wurden dann für die Generierung heterozygoter Insm2<sup>GFP/+</sup> Mutanten benutzt (2.2.4.1., Seite 44).

37

## 2.2.2.4. Kultur embryonaler Fibroblasten

Um Fibroblastenzellen für die spätere Kultur von embryonalen Stammzellen (ES) in Kultur zu nehmen, wurde ein Aliquot der Zellen bei 37°C aufgetaut und in 9 mL Fibroblastenmedium bei RT resuspendiert. Nach 3 min. Zentrifugation mit 1100 rpm in einer Bodenzentrifuge (Heraeus Varifuge 3.0; Thermo) wurden die Zellen pelletiert, in Medium resuspendiert und danach in 15 cm Zellkulturschalen in 15 mL Medium ausgesät und bei 37°C und 7,5% (v/v) CO<sub>2</sub> in einem Inkubator (BB6220C4; Thermo) kultiviert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt, bis die Zellen konfluent waren. Anschließend wurden die Zellen geteilt, eingefroren oder teilungsinaktiviert.

Zum Aufteilen der Zellen wurden sie mit PBS gewaschen, 2-5 min. mit 3 mL Trypsin- EDTA bei 37°C abgelöst und in 5 mL Medium aufgenommen. Die Zellen wurden sodann 3 min. mit 1100 rpm bei RT sedimentiert, in Medium aufgenommen und in 15 cm-Schalen ausgesät.

Vor dem Einfrieren der Zellen wurden sie wie oben trypsiniert und pelletiert, zum Schluss in 0,5 mL Medium pro Kryo-Gefäß resuspendiert und auf unter 4°C gekühlt. Dann wurden langsam 0,5 mL eiskaltes Einfriermedium pro Kryo-Gefäß zugegeben, üN bei -70°C eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Teilungsinaktivierung der Zellen wurde das Medium in einer konfluent bewachsenen 15 cm Schale bis auf 10 mL abgenommen und 1:100 mit Mitomycin-Lösung versetzt und die Zellen darin für 2 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Medium entfernt, zweimal gründlich mit PBS gewaschen und neues Medium zugegeben oder die Zellen wurden trypsiniert und neu ausgesät.

## 2.2.2.5. Kultur, Transfektion und Selektion von ES-Zellen a) Kultur von ES-Zellen

Um ES-Zellen für die Mutagenese des *Insm2*-Lokus in Kultur zu nehmen, wurde ein Aliquot der Zellen schnell bei 37°C aufgetaut und mit 9 mL ES-Zellmedium bei RT resuspendiert. Die Zellen wurden 3 min. mit 900 rpm in einer Bodenzentrifuge (Heraeus Varifuge 3.0; Thermo) sedimentiert, in 5 mL Medium aufgenommen, sorgfältig vereinzelt und in einer mit teilungsinaktivierten Fibroblasten dicht bewachsenen 6 cm Zellkulturschale (2.2.2.4., Seite 38) ausplattiert und bei 37°C und 7,5% (v/v) CO<sub>2</sub> in einem Inkubator (BB6220C4; Thermo) kultiviert. Das Medium wurde jeden Tag gewechselt und die Zellen 1-2 Tage kultiviert bis sie dicht, aber nicht konfluent gewachsen waren (d. h. Einzelkolonien noch abgrenzbar waren). Die Zellen wurden dann wie Fibroblasten (2.2.2.4., Seite 38) mit 1-3 mL Trypsin-EDTA von den Platten gelöst, bei 900 rpm sedimentiert, in ES-Zellmedium aufgenommen und vor dem Aussäen auf mit teilungsinaktivierten Fibroblasten dicht bewachsenen 10 cm Zellkulturschalen sorgfältig vereinzelt. Die Zellen wurden danach in 10 cm Schalen wie oben in 10 mL Medium kultiviert. Das Medium wurde jeden Tag gewechselt, die Zellen 1-2 Tage kultiviert, bis sie dicht gewachsen waren und eingefroren wurden oder für die Transfektion (2.2.2.5. b), Seite 40) verwendet wurden. Die ES-Zellen wurden wie Fibroblasten (2.2.2.4., Seite 38) eingefroren, nur dass ES-Zellmedium statt des Fibroblastenmediums verwendet wurde.

Nach der Southern Blot-Analyse (2.2.1.5., Seite 31) wurden ausgewählte ES-Zellklone, die positiv für das *Insm2GFPNeo*-Allel waren, von den eingefrorenen 96-Kammer Platten (2.2.2.5. c), Seite 41) in Kultur genommen. Dafür wurde die Zellsuspension einer Kammer schnell mit der Fingerkuppe erwärmt, in eine mit teilungsinaktivierten Fibroblasten dicht bewachsenen 48-Kammer Platte überführt und mit ES-Zellmedium versorgt. Diese ES-Zellkultur wurde dann gemäß der obigen Anleitung sukzessive in mit teilungsinaktivierten Fibroblasten dicht bewachsenen 24-, 12- und 6-Kammer Platten expandiert. Zudem wurden währenddessen Aliquots der Zellen weggefroren. Zum Schluss wurden die Zellen von den 6-Kammer Platten nochmals auf mit teilungsinaktivierten Fibroblasten dicht bewachsene 6-Kammer Platten und gelatinisierte 6-Kammer Platten aufgeteilt. Die Zellen von Ersteren wurden nach ausreichender Kultur weggefroren, die Zellen von Letzteren wurden 7-8 Tage kultiviert und dann für die DNA-Isolierung aus ES-Zellen (2.2.1.1. e), Seite 26) und letztlich Southern Blot-Analysen (2.2.1.5., Seite 31) verwendet.

Methoden

ES-Zellklone, die in Blastozysten injiziert werden sollten, wurden vorher in mit teilungsinaktivierten Fibroblasten dicht bewachsenen 6-Kammer Platten mit ES-Zellmedium kultiviert. Am Tag der Injektion wurden die Zellen abgelöst und in 0,5 mL ES-Zellmedium in einer 24-Kammer Platte ausgesät. Die ES-Zellen konnten nach 30 min. Inkubation abgenommen werden. Dabei war die Kontamination mit Fibroblasten gering, da diese schneller adherierten. Die Injektion der ES-Zellen in Blastozysten wurde dann von der Transgenic Core Facility (TCF) des MPI Dresden durchgeführt.

### b) Transfektion von ES-Zellen

Für die Transfektion von ES-Zellen mit dem DNA-Konstrukt zur gezielten Mutagenese des *Insm2*-Lokus wurden mehrere dicht mit ES-Zellen bewachsene 10 cm Zellkulturschalen verwendet. Das targeting construct zur Transfektion von ES-Zellen wurde zuvor aus dem *targeting* Vektor freigesetzt. Der Restriktionsansatz enthielt 85 µg Plasmid-DNA in 500 µL und wurde mit 50 U des Enzyms Pmel üN bei 37°C inkubiert. Danach wurde die DNA mit PCI extrahiert, mit Ethanol präzipitiert, schließlich auf 1 µg/µL mit sterilem TE verdünnt und bei 4°C gelagert.

Die ES-Zellen wurden zur Transfektion abgelöst, in 10 mL PBS aufgenommen und sorgfältig vereinzelt. Die Zellzahl wurde in einer Neubauerkammer bestimmt, die Zellen pelletiert und mit PBS auf  $1,2\cdot10^7$  Zellen/mL verdünnt. In eine Elektroporationsküvette (Gene Pulser Küvette, Spaltgröße 0,4 cm; Bio-Rad) wurden nun 20 µg des targeting construct und 0,8 mL der Zellsuspension gegeben. Die Transfektion mittels Elektroporation erfolgte mit einem Puls Generator (EPI 2500; L. Fischer, Heidelberg) und einem 2 ms langen Puls, bei 300 V und 1200 µF. Die transfizierten Zellen wurden danach kurz auf Eis gekühlt, in ES-Zellmedium gegeben und auf vier mit teilungsinaktivierten Fibroblasten dicht bewachsenen 10-cm-Zellkulturschalen ausgesät. Die Kultur erfolgte in 10 mL ES-Zellmedium, wobei das Medium bis zur Selektion der ES-Zellen jeden Tag gewechselt wurde.

### c) Selektion von ES-Zellen

Die Positivselektion der ES-Zellklone, bei denen das targeting construct ins Genom integriert worden war, wurde zwei Tage nach der Elektroporation mittels Zugabe von 400 µg/mL Geneticin (G418) in ES-Zellmedium begonnen. Das Antibiotikum G418 wurde von nun an dem Medium immer zugefügt. Die Negativselektion erfolgte in ES-Zellen, die das targeting construct unspezifisch integrierten hatten. Da diese mit hoher Wahrscheinlichkeit auch die DTA-Kassette enthalten wurde ein großer Teil dieser Zellen durch die Expression von Diphterietoxin abgetötet (Yagi et al., 1993). Am neunten Tag nach der Elektroporation konnte mit dem Aufnehmen von runden, klar begrenzten, G418-resistenten Kolonien begonnen werden. Dafür wurde das Medium entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 12 mL PBS zugegeben. Eine Kolonie wurde in einem Volumen von 25 µL aufgesaugt und in die Kammer einer 96-Kammer Zellkulturplatte gegeben. Nachdem eine Platte komplett war, wurden pro Kammer 25 µL Trypsin-EDTA zugegeben und die Zellen durch 3-5 min. Inkubation bei 37°C vereinzelt. Dann wurden je Kammer 50 µL Medium zugegeben, die Zellen sorgfältig durch mehrmaliges Pipettieren vereinzelt und die Suspensionen auf mit teilungsinaktivierten Fibroblasten dicht bewachsene Platten verteilt. Die Zellen wurden kultiviert und das Medium jeden Tag gewechselt.

Am dritten Tag nach der Aufnahme der Kolonien wurden frische 96-Kammer Platten mit 150  $\mu$ L 0,1% Gelatine in PBS pro Kammer für 20 min. gelatinisiert und luftgetrocknet. Die ES- Zellen wurden mit 100  $\mu$ L PBS pro Kammer gewaschen, mit 25  $\mu$ L Trypsin-EDTA abgelöst und es wurden 25  $\mu$ L Medium zugegeben. Die Hälfte dieser Suspension wurde nun in die Kammern der gelatinisierten Platten überführt, die andere Hälfte in mit teilungsinaktivierten Fibroblasten dicht bewachsene Platten gegeben.

Die Zellen in den gelatinisierten Platten wurden für 7-8 Tage kultiviert; dabei wurde das Medium jeden Tag gewechselt. Die Zellen wurden dann für die DNA-Isolierung aus ES-Zellen (2.2.1.1. e), Seite 26) und anschließender Southern Blot-Analyse (2.2.1.5., Seite 31) verwendet. Die andere Hälfte der Zellen in den Platten mit Fibroblasten wurden lediglich 2 Tage kultiviert, in 25 µL Trypsin-EDTA vereinzelt und auf Eis unter 4°C gekühlt. Danach wurde 25 µL eiskaltes Einfriermedium zugegeben, die Suspension gemischt, die Platten in Papiertücher verpackt und langsam auf -70°C heruntergefroren und bei -70°C gelagert.

Für die Southern Blot-Analyse wurden zwei Sonden verwendet, die das *Insm2GFPNeo*-Allel vom Wildtyp-Allel unterscheiden konnten. Auf diese Weise wurden mehrere ES-Zellklone identifiziert, die heterozygot für das *Insm2GFPNeo*-Allel waren (Abb. 9D, Seite 45). Die korrespondierenden Klone wurden anschließend aus den eingefrorenen Zellkulturplatten expandiert (2.2.2.5. a), Seite 38) und schließlich in Blastozysten injiziert (2.2.4.1., Seite 44).

#### 2.2.3. Histologische Methoden

#### 2.2.3.1. Herstellung von Gefrierschnitten

Das Gewebe für Kryoschnitte wurde in eiskaltem PBS präpariert, mehrmals in diesem gespült und danach bei 4°C in 1 x PBS mit 4% PFA (Paraformaldehyd) in 0,1 M Phosphatpuffer fixiert (Pankreas, Nebennieren und Dünndarm 40 min, Hypophyse 20 min). Nach der Fixation wurde das Gewebe mehrfach kurz mit PBS gespült und anschließend für mindestens 1 Stunde bei 4°C in PBS gewaschen, um verbliebenes PFA zu entfernen. Zur Kryoprotektion wurde das Gewebe dann in 30% Saccharose-PBS Lösung transferiert und üN bei 4°C inkubiert. Gewebe, welches für in-situ-Hybridsierung genutzt werden sollte wurde direkt nach der Präparation ohne Fixation oder Kryoprotektion eingebettet. Eingebettet wurden die Gewebeproben in Plastikformen (Peel-A-Way, Thermo Scientific) mit OCT Medium (Sakura), welche auf einem Metallblock in einer Trockeneis/Alkohol-Mischung platziert wurden. Das so behandelte Gewebe wurde entweder bei -70°C aufbewahrt oder sofort geschnitten. Das Schneiden erfolgte an einem Kryostaten (Microm HM560, Walldorf) mit einer Schnittdicke von 12 µm und Temperaturen zwischen -10°C bis -15°C. Die Schnitte wurden auf Adhäsions-Objektträger (Histobond, Marienfeld) aufgenommen, auf einer Heizplatte bei 37°C getrocknet und dann feuchtigkeitsgeschützt bei -70°C eingefroren.

## 2.2.3.2. Immunhistologie auf Gefrierschnitten

Die einzelnen Schnitte wurden mit einem Wachsstift (Dako Pen, Agilent Technologies, Santa Clara USA) umrandet und einmal kurz mit PBS gewaschen. Zum Blocken und für die Färbung mittels primären und sekundären Antikörpern wurde eine Lösung aus 1x PBS, 1% Pferdeserum, 0,1% Triton X-100, 0,2% Fischhaut Gelatine und 0,1% Glycin verwendet. Die Schnitte wurden für eine Stunde geblockt und dann üN bei 4°C mit primärem Antikörper inkubiert . Am folgenden Tag wurden die Schnitte mindestens drei Mal für 15 Minuten in Glasküvetten mit PBX gewaschen und dann für circa 2 Stunden mit sekundärem Antikörper, konjugiert mit Cy2, Cy3 oder Cy5 inkubiert (1:500 verdünnt; Jackson ImmunoResearch). Nach mindestens dreimaligem Waschen für 15 Minuten mit PBX in Glasküvetten, wurden die Schnitte kurz mit MilliQ-H<sub>2</sub>O gespült, leicht angetrocknet, in Immu-Mount (Thermo Scientific) eingedeckelt und üN bei Raumtemperatur getrocknet.

## 2.2.3.3. TUNEL-Färbung

Die TUNEL-Methode (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) dient der Identifizierung von apoptotischen Zellen. TdT steht dabei für Terminal Desoxynucleotidyl Transferase, ein Enzym, das die freien 3'OH-Gruppen der durch Apoptose fragmentierten DNA Moleküle mit Nukleotiden verlängern kann. Als Substrat der Reaktion dienen Nukleotide, die mit Digoxigenin (DIG) markiert sind.

Ein Fluorescein konjugierter Antikörper gerichtet gegen DIG erlaubt schließlich die Analyse der gefärbten Schnitte mittels Fluoreszensmikroskopie. Für die TUNEL-Färbung nutze ich das ApopTag® fluorescein *in-situ* apoptosis detection kit S7110 (Millipore, Darmstadt) gemäß Herstellerangaben.

## 2.2.3.4. Whole-mount X-Gal Färbung

Torsi von Embryonen des Stadiums E18,5 wurden in eiskaltem PBS/20 mM MgCl<sub>2</sub> von allen inneren Organen befreit und die Haut entfernt. So präparierte Torsi wurden zurerst für eine Stunde in 4% PFA fixiert und anschließend üN in 1 x PBS ge-

waschen. Am Folgetag wurden die Torsi für 15 min. in LacZ-Fixationslösung fixiert.

Anschließend wurde das Geweben dreimal für 15 min. in LacZ-Permebealisierungslösung inkubiert. Die Färbung erfolgte in LacZ-Färbelösung, lichtgeschützt, bei RT bis die gewünschte Färbeintensität erreicht war. Die Reaktion wurde mit H<sub>2</sub>O gestoppt und die Präparate schrittweise mit einer Verdünnungsreihe in 100% Methanol überführt. Das Gewebe wurde bei 4°C in Methanol gelagert und zum Klären des Gewebes für Aufnahmen in 2:1 Benzoesäurebenzylester / Benzylalkohol überführt. Nach erfolgter Dokumentation wurde das Gewebe erneut in 100% Methanol gelagert.

#### 2.2.4. Mauszucht und Präparation

#### 2.2.4.1. Erzeugung von heterozygoten Insm2<sup>GFP/+</sup>-Tieren

Zur Erzeugung eines Maustamms mit heterozygoten Insm2<sup>GFP/+</sup>-Tieren wurden zuerst chimäre Mäuse hergestellt. Hierfür wurden Zellklone, die das *Insm2GFPNeo*-Allel heterozygot enthielten (Abb. 9D), durch die Transgenic Core Facility des MPI Dresden in Blastozysten aus dem Stamm C57BL/6 injiziert. Die Blastozysten wurden dann in den Uterus scheinschwangerer Leihmütter transferiert, so dass Mäuse geboren wurden, die chimär für das *Insm2GFPNeo*-Allel waren. Männliche Chimären wurden mit Wildtyp-Weibchen (C57BL/6) verpaart. Die Nachkommen mit braunem Fell waren im Gegensatz zu jenen mit schwarzem Fell aus dem Erbgut der injizierten ES-Zellen entstanden, die in die Keimbahn der Chimären integriert wurden. Durch die Passage in der männlichen Keimbahn der Chimären wurde außerdem die Cre-Neo/Kan-Resistenzkassette durch die Expression von Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des spermienspezifischen tACE-Promoters deletiert (Bunting *et al.*, 1999). Die Nachkommen mit brauner Fellfarbe wurden dann mittels PCR und Southern Blot-Analyse auf eine erfolgreiche Deletion der Resistenzkassette getestet (2.2.2.3., Seite 36).



Abb. 9. Strategie des GFP-Genersatzes im *Insm2*-Lokus in der Maus. (A) Das Insm2GFP targeting construct wurde durch homologe Rekombination mit dem *Insm2*-Promoter im *Insm2*-Lokus der ES-Zellen fusioniert. (B) Rekombinierte ES-Zellen enthalten das heterozygote *Insm2GFP2*-Allel und die Cre-Neo Resistenzkassette. (D) Heterozygote *Insm2GFP2Neo* ES-Zellen wurde mittels Southern Blot-Analyse identifiziert. Positiv getestete ES-Zell Klone wurden genutzt, um chimäre Tiere zu generieren. Männlichen Chimären wurden mit C57BL/6 Weibchen verpaart und resultierende Jungtiere mit PCR und Southern Blot analysiert. (C, E) Die selbstauschneidende Cre-Neo-Selektionskassette wurde durch transgene Cre-Aktivität in der männlichen Keimbahn deletiert. Legende: ► LoxP Sequenz, ■ NLS-GFP Sequenz, ■ Neomycin/Kanamycin-Resistenz und DTA-Kassette zur positiven bzw. negativen Selektion, ■ Cre-Sequenz mit assoziiertem tACE Promoter. Graue Klammern: Erwartete Fragmentgrößen aus der Restriktionshydrolyse mit Spel bzw. Ncol/ BstXI Enzym. Graue Striche: Lage der Sequenzhomologien für 5'- bzw. 3' DNA-Sonde des Southern Blots. Gewinkelte schwarze Pfeile: Richtung und Beginn von Translationsstellen.

Auf diese Weise wurden Nachkommen identifiziert, die heterozygot für das *Insm2GFP*-Allel waren und nur noch das exogene GFP-Reportergen und eine LoxP-Sequenz an Stelle der *Insm2*-Sequenz enthielten (Abb. 9C, E). Die heterozygoten Insm2<sup>GFP/+</sup>-Mäuse mit gemischtem R1/E(129/Ola)-C57BL/6-Hintergrund wurden ab diesem Zeitpunkt für die Nachzucht mit Mäusen des Stamms C57BL/6 verpaart.

#### 2.2.4.2. Präparation von Mausembryonen und Mausgewebe

Das Entwicklungsstadium von Embryos aus experimentellen Kreuzungen wurde anhand der Observation eines Vaginalpropfens geschätzt. Tiere, die sich in Kreuzugen befanden wurden um 12:00 Uhr kontrolliert. Wenn ein Vaginalpropfen festgestellt wurde, wurde das Alter der Embryos als E 0,5 angenommen. Muttertiere wurden mittels zervikaler Dislokation getötet, wenn diese mit Embryonen benötigter Stadien trächtig waren. Die Embryonen wurden so schnell wie möglich dem Uterus entnommen, mit einer Schere dekapitiert und in eiskaltes PBS überführt. Das Entwicklungsstadium wurde dann anhand anatomischer Kriterien genau bestimmt (Edinburgh Mouse Atlas Project; www.emouseatlas.org/emap/home. html).

## 2.2.5. Datenanalyse

### 2.2.5.1. Dokumentation histologischer Daten

Histologischen Daten wurden mit Licht- und Konfokalmikroskopie dokumentiert. Das genutzte Konfokalmikroskop war das LSM 700 in Verbindung mit einem Axio Observer Z1 Mikroskop von Zeiss. Dieses wurde mittels der Zen Software von Zeiss bedient.

Aufnahmen von größeren Gewebepräparaten, wie z.B. *whole-mount* X-Gal Färbungen, wurden mit einem binokularen Stereomikroskop von Leica dokumentiert, welches mit einer digitalen Kamera (Axiocam HRc, Zeiss) und der Axiovision AC-Software (Version 4.5, Zeiss) ausgestattet war.

#### a) Quantitative Analyse histologischer Daten

Die Zellzahlen wurden auf Bildern von immunhistologischen Färbungen ermittelt. Dabei wurden zu analysierende Proteine mittels Antikörpern auf Gefrierschnitten identifiziert und durch Immunfluoreszens nachgewiesen (2.2.3.2., Seite 43). Zellen wurden manuell mit der ImageJ Software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Version 1.47v) ausgezählt. Dabei wurden mindestens drei unabhängige Schnitte von mindestens drei Mäusen eines jeden Genotyps ausgezählt. In Mausstämmen, die  $\beta$ -Galaktosidase unter der Kontrolle des *Insm1* Promoters exprimierten, wurde ein anti- $\beta$ -Galaktosidase Antikörper genutzt, um jegliche endokrine Zellen zu identifizieren. Pro Pankreas (E18,5) wurden mindestens 300  $\beta$ -Galaktosi

sidase+ Zellen, pro Darm (E18,5) mindestens 100 β-Galaktosidase+ Zellen ausgezählt.

Zellzahlen und Proportionen wurden in Excel (Microsoft, Version 14.4.7) ausgewertet. Das statistische Mittel wurde berechnet als die Summer aller Meßwerte dividiert durch die Stichprobenanzahl:

$$\overline{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=0}^{n} x_i$$

Die Standardabweichung wurde berechnet aus der Wurzel der Mittelwertvarianz:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=0}^{n} (x_i - \overline{x})^2}{n-1}}$$

Der Standardfehler aus der Wurzel der Standardabweichung:

$$\sigma_{\theta} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Die Signifikanz der Unterschiede von Zell-Proportionen der verglichenen Genotypen wurden in der Prism Software (GraphPad Prism, Version 5.0b) getestet. Zellzahlen der verschiedenen Genotypen wurden einer Varianzanalyse mittels one-way ANOVA und anschließendem Mehrfach-Tests unterzogen (Tukey's range test), bei dem diese Genotypen paarweise miteinander verglichen wurden. P-values  $\leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant gewertet (\*),  $\leq 0,01$  (\*\*),  $\leq 0,001$  hoch signifikant (\*\*\*) gewertet.

#### 2.2.5.2. Expressionsanalyse

#### a) Expressionsanalyse in Microarray-Experimenten

Die Daten der Fluoreszenzintensitäten aus den ausgelesenen Microarray-Chips wurden mit der Genome Studio Software (Illumina, San Diego) normalisiert und dann in einem für Partek Genomics Suite lesbaren Datenformat exportiert. In der Partek Genomics Suite (Version 6.3, Partek Inc., St. Louis) wurden die Daten zuerst mit einer *principal component*-Analyse grob auf ihre Qualität überprüft. Die eingesetzten Chips weisen üblicherweise individuelle Unterschiede auf, die sich auf die ausgelesenen Daten aller Proben auf einem Chip auswirken. Um diesen sogenannten *batch effect* zu vermeiden, wurden die Proben der verglichenen Genotypen gleichmäßig über alle verwenden Chips verteilt. Auf diese Weise konnte der *batch effect* in Partek herausgerechnet werden. Falls nach diesem Vorgehen einzelne Proben weiterhin in der *principal component*-Analyse und auch im weiteren Verlauf der Analyse signifikant von den Proben desselben Genotyps abwichen, wurden diese als fehlerbehaftet gewertet, aus dem ursprünglichen Datenset gelöscht und dieses erneut in Partek importiert. Die so behandelten Datensätze wurden in einer ANOVA-Varianzanalyse auf differenziell exprimierte Gene geprüft. Gene, die eine Veränderung der Genexpression mit einem Faktor  $\geq$  1,5 aufwiesen und eine false discovery rate (FDR)  $\leq$  0,05 (Hochberg & Benjamini, 1990) besaßen wurden weiter analysiert. Gene mit einer FDR  $\leq$  0,001 wurden als hochsignifikant gewertet.

#### b) Clustering von Genen basierend auf Datensätzen von Microarray-Analysen

Für das Clustering von Genen, die als differentiell exprimiert identifiziert wurden, wurden zuerst die gesamten Expressionsrohdaten in der Partek Software mittels Mittelwert[0]/Standardabweichung[1]-Transformation normalisiert. Die so normalisierten Daten wurden dann mit der Liste der differentiell exprimierten Gene gefiltert. Die so gewonnene Liste wurde dann partitionierend mit einem k-means Algorithmus mit euklidischer Metrik analysiert (harte Methode: jeder Datenpunkt wird genau einem Cluster zugeordnet). Als maximale Anzahl des iterierenden Minimaldistanzverfahrens wurde dabei 1000 gewählt. Auf diese Weise wurden alle analysierten Gene in Cluster eingeteilt und konnten anschließend, basierend auf der Clusternummer, hierarchisch gruppiert werden. Das hierarchische Clustering lieferte dann eine graphische Darstellung der Einteilung der Gene in die verschiedenen Cluster.

#### c) Expressions analyse mittels quantitativer Real-Time PCR (qPCR)

Um die relative Expressionsänderung zu berechnen wurden alle gemessenen C(t)-Werte (*cycle threshold*) in einem ersten Schritt normalisiert.

Dazu wurden zuerst qPCR-Analysen mit acht verschiedenen Referenzgen-Oligonukleotidpaaren (2.1.2., Seite 19) auf cDNA Matrizen von allen zu analysierenden Geweben durchgeführt, um einen Datensatz von C(t)-Werten für eine Analyse mit dem Excel-Plugin BestKeeper (Pfaffl *et al.*, 2004) zu generieren.

Nachdem so geeignete Referenzgene identifiziert worden waren, wurden diese in den experimentellen qPCR-Analysen parallel analysiert. Für die Normalisierung wurden dann die C(t)-Werte der Referenzgenen gemittelt und von den C(t)-Werten der analysierten Gene subtrahiert.

Auf diese Weise normalisierte C(t)-Werte wurden anschließend delogarithmiert. Dann wurden Mittelwert und der Standardfehler der Expressionsänderung eines jeden analysierten Gens aus diesen Werten berechnet.

Die relativen Expressionsunterschiede analysierter Gene zwischen Mutanten und Kontrolltieren wurden berechnet, indem die Mittelwerte aller untersuchten Genotypen durch den Mittlelwert der Kontrollgruppe dividiert wurden. Die Expression der Kontrollgruppe ist dadurch definiert als 1,0. Der Standardfehler der verglichenen Genotypen wurde normalisiert, indem die Werte der Standardfehler aller Genotypen durch den Mittelwert der Kontrollgruppe dividiert wurden.

Die Signifikanz der relativen Expressionsunterschiede wurde mittels Prism Software (GraphPad Prism, Version 5.0b) getestet. Dazu wurden die delogarithmierten C(t)-Werte der verglichenen Genotypen einer Varianzanalyse mittels one-way ANOVA und anschließendem Mehrfach-Test unterzogen (Tukey's range test), bei dem die Werte der verschiedenen Genotypen paarweise miteinander verglichen wurden. P-values  $\leq$  0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet (\*),  $\leq$  0,01 (\*\*),  $\leq$  0,001 hoch signifikant (\*\*\*) gewertet.

## 3. Ergebnisse

In dieser Arbeit verglich ich die Entwicklung endokriner Zellen in zwei verschiedenen Mausstämmen mit Mutationen in Insm1. Beide Mausstämme wurden zuvor im Labor von Carmen Birchmeier generiert (Gierl et al., 2006; Welcker et al., 2013). In dem einen Mausstamm wurde die gesamte Sequenz von Insm1, die von einem Exon kodiert wird, durch eine Sequenz für β-Galaktosidase ersetzt (Insm1<sup>LacZ/LacZ</sup> bzw. Insm1<sup>Null</sup>). Im zweiten Mausstamm wurde eine 5'-terminale Sequenz von 21 Basenpaaren, die für die SNAG-Domäne kodiert, deletiert und zusätzlich eine FLAG-tag Sequenz eingeführt (Insm1<sup>ΔSNAG/ΔSNAG</sup> bzw. Insm1<sup>ΔSNAG</sup>). Das aus dieser Mutation resultierende Insm1 Protein kann weiterhin durch anti-Insm1 Antikörper detektiert werden. In Insm1<sup>Null</sup> (Insm1<sup>LacZ/LacZ</sup>) Mäusen dagegen kann kein Insm1 Protein nachgewiesen werden (Abb. 10). In diesen Mäusen wird β-Galaktosidase unter der Kontrolle des *Insm1* Promoters exprimiert. Da Insm1 in allen endokrinen Zellen exprimiert wird, können diese in Immunfärbungen mit Antikörpern gegen β-Galaktosidase identifiziert werden. Um diesen Marker in histologischen Analysen zu nutzen, kreuzte ich daher das LacZ-Allel auch auf den Insm1<sup>ΔSNAG</sup> genetischen Hintergrund.



Abb. 10. In Insm1<sup>Null</sup> Mutanten kann kein Insm1 Protein nachgewiesen werden, während das veränderte Insm1 Protein in Insm1<sup> $\Delta$ SNAG</sup> Mutanten weiterhin nachweisbar ist. Immunhistologische Analyse von endokrinen Zellen des Pankreas von Wildtypen (A) Insm1<sup>+/+</sup>, heterozygoten (B) Insm1<sup> $\Delta$ SNAG/+</sup>, (C) Insm1<sup> $LacZ/+</sup> und homozygoten (D) Insm1<sup><math>LacZ/\Delta$ SNAG</sup> bzw. (E) Insm1<sup>LacZ/LacZ</sup></sup> mutanten Mäusen (E18,5) mit Antikörpern gegen β-Galaktosidase (β-Gal, rot) und Insm1 (grün). Größenmaßstab = 100 µm.</sup></sup>

### 3.1. Insm1 in der Entwicklung endokriner Zellen der Hypophyse

Insm1 ist in den endokrinen Zellen der Adenohypophyse exprimiert und wird zur Differenzierung endokriner Zelltypen benötigt. Außerdem ergaben qPCR-Analysen von Insm1<sup>LacZ/LacZ</sup> und Insm1<sup>LacZ/ΔSNAG</sup> mutanten Hypophysen, dass Insm1 für diese Funktion die SNAG-Domäne benötigt (Welcker *et al.*, 2013).

Ich untersuchte systematisch die Genexpression in der Hypophyse, indem ich eine Microarray-Analyse durchführte. Hierzu isolierte ich RNA aus Hypophysen-Homogenisaten von Insm1<sup>LacZ/+</sup>, Insm1<sup>LacZ/LacZ</sup> und Insm1<sup>ΔSNAG/ΔSNAG</sup> mutanten Tieren (E18.5), die im folgenden Text als Kontrolle, Insm1<sup>Null</sup> bzw. Insm1<sup>ΔSNAG</sup> bezeichnet werden und bereitete diese nach Anweisung des Herstellerprotokolls für eine Hybridisierung mit Illumina MouseRef-8 Microarray-Chips auf (2.2.1.4., Seite 29).

### 3.1.1. Die Genexpression in der Hypophyse ist in beiden *Insm1* Mutanten in ähnlicher Weise dereguliert

Die statistische Auswertung der Expressionsdaten mittels Partek Genomics Suite Software (2.2.5.2. a), Seite 47) resultierte in einer Liste von Genen, die in der Hypophyse mutanter Tiere dereguliert waren (Tab. 15). Die Gene dieser Liste können anhand von Unterschieden in der Expression in 2 Gruppen, sogenannte Cluster eingeteilt werden (Abb. 11A; zur Methode des Clusterings siehe Abschnitt2.2.5.2. b), Seite 48). Die Gene in Cluster 1 waren in beiden Mutanten geringer exprimiert und in diesen Clustern sind all die Gene gruppiert, die für Peptidhormone oder Untereinheiten von Peptidhormone kodieren (Somatotropin -GH, Proopiomelanocortin -POMC, Lutropin -LH $\beta$ , Thyreotropin -TSH $\beta$  - $\alpha$ GSU, Follitropin -FSHB, Prolaktin -Prl) bzw. Gene, die für Proteine mit einer Funktion in der Hormon Sekretion (Chromogranin A und B - ChgA/B, Secretogranin II und III - Scgll/III) und Prozessierung (Prohormon Konvertase 2 -PC2) kodieren (Abb. 11B, Cluster 1). Die Gene in Clusters 2 dagegen waren in beiden Mutanten höher exprimiert als in der Kontrolle. In diesem Cluster befinden sich Gene, die für Faktoren des Notch Signalwegs (Hairy and enhancer of split 6 -Hes6, Delta-like 1 -DII1, Transducin-like enhancer of split 1 -Tle1) und muskelspezifische Proteine (Sarcolipin -*Sln*, Myosin light polypeptide 1 -*Myl1*, Actin alpha cardiac muscle 1 -*Actc1*, Myosin light chain phosphorylatable fast skeletal muscle -*Mylpf*, Musculin -*Musc*) kodieren (Abb. 11B, Cluster 2).

Gen- Symbol	Gen Name	FV Insm1 <sup>Null</sup>	FV Insm1 <sup>∆SNAG</sup>	p-Value	
Hormone					
Lhβ	Luteinizing hormone β	-21,97	-21,31	1,51E-07	
Tshβ*	Thyroid stimulating hormone, $\beta$ subunit	-20,75	-12,78	4,77E-07	
GH*	Growth hormone	-9,99	-1,53	5,47E-04	
Fshβ*	Follicle stimulating hormone β	-1,29	-1,41	4,50E-04	
Pomc1*	Proopiomelanocortin	-1,25	-0,27	1,69E-02	
Hormon Pro	ozessierung und Sekretion				
ChgB	Chromogranin B	-11,95	-7,06	1,39E-06	
CgA	Glycoprotein hormones, α subunit	-8,23	-5,32	1,68E-06	
Mc5r	Melanocortin 5 receptor	-6,29	-5,99	1,39E-06	
ChgA	Chromogranin A	-6,07	-4,07	6,45E-05	
Pcsk2*	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 2 (PC2)	-5,89	-1,76	3,66E-04	
Scg2*	Secretogranin II	-5,38	-2,05	1,39E-06	
Scg3	Secretogranin III	-4,92	-2,62	3,39E-06	
Ghsr	Growth hormone secretagogue receptor	-4,25	-2,76	2,93E-04	
Gnrhr	Gonadotropin releasing hormone receptor	-3,54	-0,68	4,55E-03	
Pcsk1n	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor	-2,34	-1,25	4,13E-04	
Mtnr1a	Melatonin receptor 1A	-0,60	-0,48	4,86E-03	
Notch Signa	aling				
Hes6	Hairy and enhancer of split 6	1,63	1,51	8,97E-03	
DII1*	Delta-like 1	0,65	0,56	2,29E-02	
Tle1	Transducin-like enhancer of split 1	0,37	0,76	1,92E-02	
Muskel spezifische Gene					
SIn	Sarcolipin	8,27	5,18	2,71E-04	
Myl1*	Myosin, light polypeptide 1	6,87	2,06	2,89E-04	
Actc1	Actin, alpha, cardiac muscle 1	4,86	4,67	6,87E-06	
Tnnt1	Troponin T1, skeletal, slow	2,22	2,45	1,85E-02	
Mylpf	Myosin light chain, phosphorylatable, fast sk. muscle	1,72	1,18	1,58E-02	
Msc*	Musculin	1,57	0,27	4,35E-02	
Mustn1	Musculoskeletal, embryonic nuclear protein 1	1,29	1,03	3,98E-04	
Thsd7b	Thrombospondin, type I, domain containing 7B	1,19	1,76	1,48E-03	
Tmod1	Tropomodulin 1	1,06	0,84	2,23E-02	
Tnnc1	Troponin C, cardiac/slow skeletal	0,61	1,54	5,07E-03	

Tabelle 15. Differenziell exprimierte Gene in der Hypophyse von Insm1^{Null} und Insm1^{\Delta SNAG} Mutanten E18,5

Genomweite Microarray-Analyse von mRNA aus der Hypophyse von Insm1<sup>LacZ/+</sup> Insm1<sup>LacZ/+</sup> und Insm1<sup>ASNAG/ASNAG</sup> Mäusen (E18,5). Reduzierte Expression ist durch einen negativen Faktor der Veränderung (FV) und erhöhte Expression durch einen positiven Wert gekennzeichnet. Mit \* gekennzeichnete Gene wurden zusätzlich mittels qPCR untersucht.



**Abb. 11. Deregulation von Genen in der Hypophyse von Insm1**<sup>Null</sup> und Insm1<sup>ΔSNAG</sup> Mutanten. Cluster-Analyse der Genexpression in der Hypophyse von Insm1<sup>LacZ/+</sup>, Insm1<sup>LacZ/LacZ</sup> und Insm1<sup>ΔSNAG/ΔSNAG</sup> Mäusen (E18,5). (**A**) 711 differenziell exprimierte Gene ( $p \le 0,05$ ; FC 1,5) können in 2 Cluster eingeteilt werden. (**B**) Eine Auswahl von Genen, die in der Hypophyse von *Insm1* mutanten Tieren dereguliert sind.

Ich überprüfte anschließend eine Reihe von Genen, die im Microarray als dereguliert identifiziert wurden, mittels quantitativer Real-Time PCR (qPCR) (2.2.1.3., Seite 28). Hierzu isolierte ich RNA aus der Hypophyse von Kontrolltieren, Insm1<sup>Null</sup> und Insm1<sup> $\Delta$ SNAG</sup> mutanten Mäusen des gleichen Entwicklungsstadiums (E18.5). Die mRNA-Menge der muskelspezifischen Gene *Myl1* und *Musc* war sowohl in Insm1<sup>Null</sup> als auch in Insm1<sup> $\Delta$ SNAG</sup> Mutanten im Vergleich zu Kontrolltieren erhöht (Abb. 12A). Auch die Expression der Notch-Gene *Dll1* und *Hes5* war in beiden Mutanten erhöht (Abb. 12B). Die Menge der mRNAs von *GH*, *TSH* $\beta$ , *FSH* $\beta$  und *Pomc1* war hingegen in beiden Mutanten deutlich reduziert (Abb. 12C) und auch die Expression von *PC2* und *ScgIII* war vermindert (Abb. 12D). Die Ergebnisse dieser Analysen stimmen insgesamt mit den Ergebnissen von Jochen Welcker überein. Die Veränderung der Expression in  $Insm1^{\Delta SNAG}$  Mutanten war oft weniger stark ausgeprägt als in der  $Insm1^{Null}$  Mutante und dies wurde vor allem für Transkripte der Hormone und sekretorischen Komponenten beobachtet. Die *DII1* und *Hes1* Gene waren dagegen in den beiden Mutanten in ähnlichem Ausmaß dereguliert.



Abb. 12. Verifizierung der veränderten Genexpression in Insm1<sup>Null</sup> und Insm1<sup> $\Delta$ SNAG</sup> mutanten Hypophysen. qPCR auf Hypophysen-mRNA aus Insm1<sup>LacZ/+</sup>, Insm1<sup> $LacZ/LacZ</sup></sup> und Insm1<sup><math>\Delta$ SNAG/ $\Delta$ SNAG</sub> Mutanten (E18,5). (A) Muskelspezifische Gene sind in der Hypophyse von *Insm1* Mutanten verstärkt exprimiert. (B) Gene des Notch-Signalwegs sind verstärkt exprimiert (C) Gene, die für Hormone endokriner Zellen der Adenohypophyse kodieren sind *Insm1* Mutanten nur gering exprimiert. (D) Die Expression von Prohormonkonvertase 2 und Secretogranin III ist ebenfalls reduziert;  $p \le 0.05^{*}$ ,  $\le 0.001^{***}$ , n.s., nicht signifikant.</sup></sup></sup>

## 3.2. Insm1 in der Entwicklung sympathoadrenaler Zellen

Insm1 ist in den Neuronen der sympathischen Ganglien exprimiert (Wildner *et al.*, 2008). In Insm1<sup>Null</sup> Mutanten verzögert sich die Differenzierung von Neuronen in sympathischen Ganglien. Außerdem ist die Größe der Ganglien auf Grund einer verringerten Proliferation der sympathischen Vorläuferzellen reduziert. Diese Zellen proliferieren, obwohl sie bereits neuronale Marker, wie z.B. Tuj1 exprimieren. Um zu überprüfen, ob die Größe der sekundären sympathischen Ganglien in Insm1<sup>ΔSNAG</sup> Mäusen ebenfalls reduziert ist, verglich ich X-Gal Färbungen von Insm1<sup>LacZ/+</sup> Insm1<sup>LacZ/LacZ</sup> und Insm1<sup>LacZ/ΔSNAG</sup> Mäusen (2.2.3.4., Seite 43).

Diese Färbungen ergaben, dass die sympathischen Ganglien in Insm1<sup>Null</sup> Mäusen und Insm1<sup>L/Δ</sup> Mäusen eine ähnliche Größe besitzen. Dies ist insbesondere in den großen kranial gelegenen Ganglien des Sympathikus zu sehen. Auf Grund der reduzierten Größe der Ganglien verschmelzen in beiden Mutanten die drei Ganglien, *Ganglion cervicale inferius*, *Ganglion thoracicum I* und *II* nicht vollständig zum *Ganglion stellatum* (Abb. 13B, C, rote Klammern).



Abb. 13. Die Größe der sekundären sympathischen Ganglien ist in Insm1<sup>Null</sup> und Insm1<sup>L/A</sup> mutanten Mäusen reduziert. X-Gal Färbung der sympathischen Ganglienkette in (A) Insm1<sup>LacZ/+</sup>, (B) Insm1<sup>LacZ/LacZ</sup> und (C) Insm1<sup>LacZ/ΔSNAG</sup> Mäusen (E18,5). Rote Pfeilspitzen markieren die Lage der Ganglien, eine gestrichelte Linie markiert den Verlauf des Nervenstrangs. Die Verkleinerung der Ganglien ist besonders im *Ganglion stellatum* offensichtlich (ungefüllte Pfeilespitzen). In den Mutanten verschmelzen die Ganglien *cervicale inferius*. und *thoracicum I* und *II* wegen einer reduzierten Größe der Ganglien nicht vollständig zum *Ganglion stellatum* (rote Klammer). Größenmaßstab = 1mm.

## 3.2.1. Hypoplasie der Nebennieren in *Insm1* mutanten Tieren

Insm1 ist zudem in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks exprimiert, die wie die Neuronen der sympathischen Ganglien der Neuralleiste entstammen. Die Differenzierung dieser Zellen ist in Insm1<sup>Null</sup> Tieren beeinträchtigt (Wildner *et al.*, 2008).

Die Veränderung des Durchmessers der Nebennieren von Insm1<sup>Null</sup> und Insm1<sup>ΔSNAG</sup> Mutanten ist bereits mit bloßem Auge erkennbar (Abb. 14).



Abb. 14. Die Größe der Nebennieren ist in den *Insm1* Mutanten reduziert. Morphologie der Nieren und Nebennieren von Insm1<sup>LacZ/+</sup>, Insm1<sup>LacZ/LacZ</sup> und Insm1<sup> $\Delta$ SNAG/ $\Delta$ SNAG</sub> Mäusen (E18,5). Schwarze Klammern markieren die Lage und Größe der Nebennieren. Größenmaßstab = 1 mm.</sup>

Um zu untersuchen, ob in den Mutanten der programmierte Zelltod erhöht ist und dies die verminderte Größe erklärt, führte ich TUNEL-Färbungen durch. Fragmentierte chromosomale DNA, welche durch Endonukleasen während der Apoptose gespalten wird, wird dabei durch das Enzym TdT (terminale Desoxyribonukleotidyltransferase) mit Digoxigenin-gekoppelten Oligonukleotiden markiert. Die markierten DNA-Fragmente können daher mit anti-Digoxigenin Antikörpern nachgewiesen werden (Li *et al.*, 1995). Ich kombinierte die TUNEL-Färbung mit einer β-Galaktosidase-Immunfärbung, um endokrine apoptotische Zellen zu identifizieren (2.2.3.3., Seite 43). Auf diese Weise analysierte ich das Nebennierenmark von heterozygoten Insm1<sup>LacZ/+</sup> KontrolItieren und Insm1<sup>LacZ/LacZ</sup> bzw. Insm1<sup>LacZ/ΔSNAG</sup> Mutanten (E18.5). Die verglichenen Stämme trugen also alle mindestens ein *Insm1*  *LacZ*-Allel. Ich bestimmte die Zahl der  $\beta$ -Galaktosidase+ Zellen, die Dig-Fluorescin+ waren und berechnete so den Anteil apoptotischer Zellen.



Abb. 15. Zelltod von chromaffinen Zellen in *Insm1* Mutanten. (A) TUNEL-Analyse des Nebennierenmarks von Insm1<sup>LacZ/+</sup>, Insm1<sup>LacZ/LacZ</sup> und Insm1<sup>LacZ/ΔSNAG</sup> mutanten Mäusen (E18,5). Immunhistologische Analyse mit Antikörpern gegen β-Galaktosidase (β-Gal, rot) und Digoxigenin (DIG, grün). Abbildungen der oberen Reihe zeigen das gesamte Nebennierenmark, die unteren Reihe zeigt eine Vergrößerung des oben markierten Ausschnitts. Größenmaßstab = 100 µm (oben) bzw. 50 µm (unten). (B) Quantifizierung des Zelltods;  $p \le 0.05^*$ ,  $p \le 0.01^{**}$ 

Diese Analysen ergaben, dass die Zahl apoptotischer chromaffiner Zellen in beiden mutanten Nebennieren etwa vierfach erhöht war. Übereinstimmend mit diesem Ergebnis war die beobachtete Zahl der β-Galaktosidase+ endokrinen Zellen stark reduziert (Abb. 15A, B).

## 3.2.2. Gestörte Katecholaminsynthese in Insm1<sup>ΔSNAG</sup> mutanten Mäusen

In chromaffinen Zellen von Insm1<sup>Null</sup> Mutanten ist die Expression von Enzymen der Katecholaminsynthese gestört (Wildner *et al.*, 2008). Um zu testen, ob die Differenzierung chromaffiner Zellen auch in Insm1<sup>ΔSNAG</sup> Mutanten beeinträchtig ist, untersuchte ich mittels Microarray-Analyse global die Mengen von mRNA Transkripten in Nebennieren von Insm1<sup>LacZ/+</sup> Kontrolltieren sowie Insm1<sup>Null</sup> und Insm1<sup>ΔSNAG</sup> Mutanten. Die Varianzanalyse der Expressionsdaten resultierte in einer Liste von Genen, deren Transkript-Mengen in mindestens einer der verglichenen Gruppen divergiert. Die Unterschiede der Genexpression zwischen den beiden Mutanten waren insgesamt gering, d.h. die Deletion der SNAG-Domäne verursachte Änderungen in der Genexpression, die denen in der Insm1<sup>Null</sup> Mutante vergleichbar sind (Tab. 16).

Viele der Gene, die auf diese Weise in Insm1<sup>∆SNAG</sup> Mutanten dereguliert waren, sind auch in der Insm1<sup>Null</sup> Mutante nicht korrekt exprimiert: diese Gene kodieren für Enzyme der Katecholaminsynthese oder für Proteine, die an deren Sekretion beteiligt sind. Die analysierten Expressionsunterschiede in *Insm1* mutanten Nebennieren können durch zwei Cluster beschrieben werden. Der erste Cluster enthält Gene, die in beiden Mutanten stärker exprimiert sind, Gene des zweiten Clusters sind reduziert exprimiert (Abb. 16).

Tabelle 16. Differenziell exprimierte Gene in der Nebenniere von Insm1<sup>№III</sup> und Insm1<sup>ΔSNAG</sup> Mutanten

Gen- Symbol	Gen Name	FV Insm1 <sup>Null</sup>	FV Insm1 <sup>∆SNAG</sup>	p-Value		
Enzyme der Katecholaminsynthese und sekretorische Proteine						
Pnmt*	Phenylethanolamine-N-methyltransferase	-6,21	-7,37	8,15E-06		
Akr1c18*	Aldo-keto reductase family 1, member C18	-2,43	-1,58	1,93E-03		
Th*	Tyrosine hydroxylase	-2,75	-1,19	4,91E-06		
ChgA*	Chromogranin A	-2,33	-2,20	1,15E-04		
ChgB*	Chromogranin B	-2,49	-2,38	2,13E-07		
Scg2	Secretogranin II	-1,86	-1,59	1,11E-03		
DBH*	Dopamine beta hydroxylase	-1,73	-0,97	4,48E-05		
Sgne1	Secretogranin V	-0,92	-1,67	1,73E-04		
Slc7a8	Cationic amino acid transporter (LAT2)	-0,63	-0,50	5,92E-03		
Andere Faktor	en					
Resp18	Regulated endocrine-specific protein 18	-3,61	-3,43	1,84E-05		
lgf1	Insulin-like growth factor 1	0,87	0,01	3,79E-02		

Genomweite Microarray-Analyse von mRNA aus der Nebenniere von Insm1<sup>LacZ/+</sup> Insm1<sup>LacZ/+</sup> und Insm1<sup>ΔSNAG/ΔSNAG</sup> Mäusen (E18,5). Reduzierte Expression ist durch einen negativen Faktor der Veränderung (FV) und erhöhte Expression durch einen positiven Wert gekennzeichnet. Mit \* gekennzeichnete Gene, wurden zusätzlich mittels qPCR untersucht.



Abb. 16. Deregulierte Genexpression in der Nebenniere von Insm1<sup>Null</sup> und Insm1<sup> $\Delta$ SNAG</sup> mutanten Mäusen. Cluster-Analyse der Genexpression in der Nebenniere von Insm1<sup> $\Delta$ SNAG/ $\Delta$ SNAG</sub> Insm1<sup> $\Delta$ SNAG/ $\Delta$ SNAG</sub> Mäusen (E18,5). (A) 722 differenziell exprimierte Gene (p ≤ 0,05; FC 1,5) können in 2 Cluster eingeteilt werden. (B) Eine Auswahl von Genen, die in der Nebenniere von *Insm1* mutanten Tieren dereguliert sind.</sup></sup>

Im Weiteren untersuchte ich zur Verifizierung dieser Ergebnisse zusätzlich die Genexpression mittels *In-situ*-Hybridisierung (2.2.1.6. b), Seite 34). Die zeigte, dass die Expression von Tyrosin Hydroxylase (*TH*), Dopamin  $\beta$ -Hydroxylase (*DBH*) und Phenylethanolamin N-methyltransferase (*PNMT*) in Insm1<sup>Null</sup> und Insm1<sup>ΔSNAG</sup> Tieren stark reduziert war (Abb. 17).



Abb. 17. Reduzierte Expression von Enzymen der Katecholaminsynthese in chromaffinen Zellen von *Insm1* Mutanten. *In-situ*-Hybridisierung mit Sonden gegen Tyrosinhydroxylase (TH), Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase (DBH) und Phenylethanolamin N-methyltransferase (PNMT). Die Hybridisierung erfolgte auf Gefrierschnitten von Nebennieren von Insm1<sup>LacZ/+</sup>, Insm1<sup>LacZ/LacZ</sup> und Insm1<sup> $\Delta$ SNAG/ $\Delta$ SNAG</sub> Mäusen (E18,5). Die gestrichelte Linie markiert den Umriss der Nebennierenrinde. Größenmaßstab = 200 µm.</sup>

Zur weiteren Verifikation der Expressionsunterschiede untersuchte ich mRNA aus Nebennieren anhand von qPCR-Analysen. Dabei verglich ich die Transkripte von *TH*, *DBH*, *PNMT*, *Akr1c18* (*aldo-keto reductase family 1, member C18*), Chromogranin A und B (*ChgA*, *ChgB*). Die Expression dieser Gene ware in beiden Mutanten in ähnlichem Umfang reduziert, wie ich es zuvor in der Microarray-Analyse und in der *In-situ*-Hybridisierung beobachtet hatte (Abb. 18A).

Des Weiteren analysierte ich die Expression von Transkriptionsfaktoren, die die Entwicklung chromaffiner Zellen regulieren, d.h. Mash1, Phox2a, Phox2b, Gata2, Gata3, Hand2 und Ebf1. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Hendrik Wildner (2008) beobachtete ich, dass die mRNA von *Mash1* in Insm1<sup>Null</sup> Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren erhöht war. Eine verstärkte *Mash1* Expression konnte ich auch in der Nebenniere von Insm1<sup>ΔSNAG</sup> Mutanten beobachten, jedoch war diese geringer als in Insm1<sup>Null</sup> Mutanten (Abb. 18B). In meiner Microarray-Analyse war *Mash1* allerdings nicht als dereguliert identifiziert worden (Tab. 16). Die Expression von *Gata2/3*, *Phox2a/b*, *Hand2* und *EBf1* war in beiden Mutanten nicht oder nur geringfügig verändert (Abb. 18B).



Abb. 18. Geringe Unterschiede der Genexpression in Nebennieren von Insm1<sup>Null</sup> und Insm1<sup>ΔSNAG</sup> mutanten Mäusen. qPCR-Analyse von mRNA aus Nebennieren von Insm1<sup>LacZ/+</sup>, Insm1<sup>LacZ/LacZ</sup> und Insm1<sup>ΔSNAG/ΔSNAG</sup> Mäusen (E18,5). (**A**) Gene, die für Enzyme der Katecholaminsynthese und des sekretorischen Apparats kodieren, sind in beiden *Insm1* Mutanten reduziert exprimiert. (**B**) Die Expression von Mash1 ist in beiden *Insm1* Mutanten erhöht;  $p \le 0.05^{\circ}$ ,  $\le 0.01^{\circ}$ ,  $\le 0.001^{\circ}$ , n.s., nicht signifikant.

### 3.3. Insm1 in endokrinen Zellen der Lunge

Im Epithel der Atemwege sind vereinzelte (PNEC, *pulmunary neuroendocrine cells* und Anhäufungen (NEBs, *neuroepithelial bodies*; neuroepitheliale Körperchen) endokriner Zellen zu finden (Brouns *et al.*, 2006, 2009).

## 3.3.1. Reduzierte Zahl endokriner Zellen in neuroepithelialen Körperchen von *Insm1* Mutanten

Ich verglich mittels Immunhistologie Lungengewebe aus heterozygoten Insm1<sup>LacZ/+</sup> Kontrolltieren und aus Insm1<sup>LacZ/LacZ</sup> bzw. Insm1<sup>LacZ/ $\Delta$ SNAG</sub> mutanten Tieren (E18.5), die im Folgenden als Insm1<sup>Null</sup> bzw. Insm1<sup>L/ $\Delta$ </sup> bezeichnet werden. Die verglichenen Stämme trugen also alle ein Insm1 *LacZ*-Allel, so dass endokrine Zellen auch in Kontrolltieren und Insm1<sup>L/ $\Delta$ </sup> Mutanten durch  $\beta$ -Galaktosidasefärbung identifiziert werden konnten. Bei einer ersten Betrachtung dieser Färbungen wurde offensichtlich, dass die Zahl von endokrinen Zellen, die ein NEB bilden, in beiden *Insm1* Mutanten reduziert war (Abb. 19).</sup>



Abb. 19. Reduzierte Zahl endokriner Zellen in neuroepithelialen Körperchen von *Insm1* Mutanten. Durchschnittliche Zahl  $\beta$ -Galaktosidase+ Zellen in NEBs von Insm1<sup>LacZ/</sup>, Insm1<sup>LacZ/LacZ</sup> und Insm1<sup>LacZ/ASNAG</sup> Lungen (E18,5). p  $\leq$  0.05 \*,  $\leq$  0.01 \*\*

## 3.3.2. Gestörte Differenzierung von pulmonaren endokrinen Zellen in *Insm1* Mutanten

Zwei Proteine, die von differenzierten NEBs produziert werden, sind *Calcitonin gene-related peptide* (CGRP) und *ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1* (PGP9.5); ich konnte diese Proteine in endokrinen Zellen von Kontrolltieren nach-

weisen. In endokrinen Zellen der *Insm1* Mutanten waren diese Proteine hingegen nicht nachweisbar (Abb. 20). Die Expression von CGRP und PGP9.5 war in Insm1<sup>Null</sup> und Insm1<sup>L/Δ</sup> mutanten Tieren also ähnlich verändert.



Abb. 20. PGP9.5 und CGRP Färbungen weisen keine neuroepithelialen Körperchen in Insm1 mutanten Tieren nach. Immunhistologische Analyse des Lungenepithels von Insm1<sup>LacZ/+</sup>, Insm1<sup>LacZ/LacZ</sup> und Insm1<sup>LacZ/ASNAG</sup> mutanten Mäusen (E18,5) mit Antikörpern gegen: (**A**, **B**)  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal, rot), (**A-A''**) *calcitonin gene related peptide* (CGRP, grün) und (**B-B''**) *ubiquitin carboxyl-terminal esterase* L1 (PGP9.5, grün). Größenmaßstab = 20  $\mu$ m

#### 3.4. Insm1 in der Entwicklung enteroendokriner Zellen

Die endokrinen Zellen des Darms werden von Vorläuferzellen, den Lieberkühnschen Krypten gebildet. Diese Zellen exprimieren Insm1 und benötigen Insm1 für ihre korrekte Differenzierung (Gierl *et al.*, 2006).

# 3.4.1. Die Differenzierung von enteroendokrinen Zellen ist in Insm1<sup>∆snag</sup> mutanten Tieren gestört

Um zu analysieren, ob ein Fehlen der Insm1 SNAG-Domäne zu einem Differenzierungsdefekt in enteroendokrinen Zellen führt, untersuchte ich Gewebe des Duodenums histologisch. Im Besonderen analysierte ich das Vorhandensein von Hormonen (Serotonin- Ser, Sekretin- Skt, Cholecystokinin- CCK), des Neuropeptids Substanz P (SubP) und des Vesikelproteins Chromogranin A (ChgA). Während Hormone/Neuropeptide nur von Subgruppen der endokrinen Zellen



exprimiert werden, ist Chromogranin A in den meisten endokrinen Zellen vorhanden.

Abb. 21. Die Differenzierung endokriner Zellen des Duodenums ist in beiden *Insm1* Mutanten ähnlich gestört. Immunhistologische Analyse des Duodenums von Insm1<sup>LacZ/+</sup>, Insm1<sup>LacZ/LacZ</sup> und Insm1<sup>LacZ/ASNAG</sup> Mäusen (E18,5) mit Antikörpern gegen (A-E)  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal, rot), (A) Cholecystokinin (CCK, grün), (B) Serotonin (Ser, grün), (C) Sekretin (Skt, grün), (D) Substanz P (SubP, grün) und (E) Chromogranin A (ChgA, grün). Doppelt positive Zellen sind exemplarisch mit weißen Pfeilspitzen markiert. Ergebnisse der Quantifizierung jeweils links dargestellt;  $p \le 0.05 *$ ,  $\le 0.01 **$ ,  $\le 0.001 ***$  n.s., nicht signifikant. Größenmaßstab = 50 µm.

Gewebe von Insm1<sup>Null</sup>, Insm1<sup>L/Δ</sup> und heterozygoten Insm1<sup>LacZ/+</sup> Mäuse wurde verglichen. Auch im Darm wurden die endokrinen Zellen mittels anti- $\beta$ -Galaktosidase Antikörpern nachgewiesen. Gleichzeitig ermittelte ich die Zahl der endokrinen Zellen, die Hormone/Neuropeptid oder Chromogranin A koexprimierten (z.B. Serotonin+ Zellen/β-Galaktosidase+ Zellen).

Die Zahl der Serotonin+ und Cholecystokinin+ endokrinen Zellen war sowohl in Insm1<sup>Null</sup>, als auch in Insm1<sup>L/Δ</sup> Duodena in ähnlichem Umfang reduziert (Abb. 21A, B). Auch die Zahl der Zellen, die Sekretin, Substanz P und Chromogranin A exprimierten, war in beiden Mutanten reduziert. Die Reduktion von Sekretin war in Insm1<sup>Null</sup> Mutanten stärker ausgeprägt als in Insm1<sup>L/Δ</sup> Tieren (Abb. 21C).



Abb. 22. Veränderungen der Genexpression im Darm von *Insm1* Mutanten. qPCR-Analysen auf mRNA aus dem Duodenum (E18,5) zeigen dass Expression der Hormone Choleccystokinin (CCK) und Serotinin (Tph, Tryptophan Hydroxylase) reduziert ist, allerding ist die Reduktion in Insm1<sup>ΔSNAG</sup> Mutanten weniger stark ausgeprägt, als in Insm1<sup>Null</sup> Tieren. Auch das Neuropeptid Substanz P (SubP) und das Vesikelprotein Chromogranin A sind in Insm1<sup>ΔSNAG</sup> mutanten Mäusen weniger stark dereguliert. Die Expression des Neuropeptids Neurotensin (Nts) ist in beiden mutanten Gruppen in gleichem Umfang reduziert und der Transkriptionsfaktor NeuroD1 in Insm1<sup>ΔSNAG</sup> Mutanten verstärkt exprimiert;  $p \le 0,05^*, \le 0,01^{**}, \le 0,001^{***}$ , n.s., nicht signifikant.

Um die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung zu verifizieren, analysierte ich die Geneexpression mittels qPCR. Untersucht wurde die mRNA von *SubP*, *Skt CCK* und *Thp1*. Der Serotonin Stoffwechsel wurde anhand der mRNA von *Thp1* (Tryptophan Hydroxylase) dem Enzym, dass den ersten Schritt der Synthese von Serotonin aus L-Tryptophan katalysiert, untersucht. Des Weiteren testete ich die Expression von *Nts* (Neurotensin), *Syp* (Synaptophysin), *ChgA* und *NeuroD1*.

Die Transkriptmenge vieler analysierter Gene (*CCK*, *Tph1*, *SubP*, *ChgA*, *Synaptophysin*, *Neurotensin*), deren Proteinprodukte zum Teil zuvor mittels Immunfärbung analysiert worden war, war zwar in beiden *Insm1* Mutanten reduziert, ich beobachtet aber oft, dass die Expression weniger stark in Insm1<sup>ΔSNAG</sup> als in Insm1<sup>Null</sup> Mutanten beeinträchtigt war (Abb. 22). Die Expression von *Skt* war wenig verändert. Die Expression von *NeuroD1*, dass für einen Helix-loop-helix (bHLH) Transkriptionsfaktor kodiert war in beiden *Insm1* Mutanten signifikant erhöht (Abb. 22).

#### 3.5. Insm1 in der Entwicklung endokriner Zellen des Pankreas

Insm1 kontrolliert auch die Terminaldifferenzierung von endokrinen Zellen des Pankreas und rekrutiert in solchen Zellen über die SNAG-Domäne verschiedene Faktoren, wie die Chromatin-modifizierenden Enzyme Kdm1a, Hdac1/2 und Rcor1-3 (Liu *et al.*, 2006; Welcker *et al.*, 2013). Ich analysierte und verglich die Differenzierung des dorsalen Pankreas von Insm1<sup>LacZ/LacZ</sup>, Insm1<sup>LacZ/ΔSNAG</sup> und Insm1<sup>LacZ/+</sup> Mäusen (E18,5). Hierfür nutzte ich Antikörper gegen verschiedene Peptidhormone, die von α-, β-, δ-, ε- und PP-Zellen produziert werden (d.h. Glucagon -Gcg, Insulin -Ins, Somatostatin -Sst, Ghrelin -Ghr, pankreatisches Polypeptid -PP) und untersuchte generelle Differenzierungsmarker von endokrinen Zellen (Prohormonkonvertase 2 -PC2, Islet amyloid polypeptide -IAPP, Chromogranin A -ChgA).

## 3.5.1. Unterschiedliche Zahl von Hormon-produzierenden Zellen im Pankreas von Insm1<sup>Null</sup> und Insm1<sup>ΔSNAG</sup> Mutanten

Um die Ergebnisse der Färbung genau zu quantifizieren, bestimmte ich die Zahl der Glukagon+ Zellen und die Zahl aller endokrinen Zellen ( $\beta$ -Galaktosidase+ Zellen). Die Proportion der  $\alpha$ -Zellen wurde dann berechnet (Glucagon+ Zellen/ $\beta$ -Galaktosidase+ Zellen). Dieses Verfahren benutzte ich auch für alle anderen Marker, die ich in der histologischen Analyse einsetzte. Die Analyse der Glukagon+ Zellen ergab, dass in Insm1<sup>Null</sup> und Insm1<sup>L/ $\Delta$ </sup> Mutanten die Zahl der  $\alpha$ -Zellen nicht signifikant reduziert war (Abb. 23A).

Andere endokrine Zelltypen zeigten aber unterschiedlich starke Veränderungen. So war die Zahl Insulin exprimierender  $\beta$ -Zellen in Insm1<sup>L/Δ</sup> Tieren der in Kontrolltieren ähnlich, während die  $\beta$ -Zellzahl in Insm1<sup>Null</sup> Pankreata deutlich erniedrigt
war (Abb. 23B). Die Zahl der Somatostatin+ δ-Zellen war in Insm1<sup>L/Δ</sup> Mutanten erhöht, so dass ich mehr δ-Zellen als in Insm1<sup>Null</sup> oder in Kontrolltieren beobachten konnte (Abb. 23C). Ghrelin+ Zellen waren in Pankreata von Insm1<sup>L/Δ</sup> Mutanten deutlich reduziert, aber in Insm1<sup>Null</sup> Mutanten nicht verändert (Abb. 23D). Die Zahl der Zellen, die pankreatisches Polypeptid exprimieren, war dagegen in Kontrollund Insm1<sup>Null</sup> mutanten Tieren ähnlich, aber in Insm1<sup>L/Δ</sup> Pankreata deutlich erhöht (Abb. 23E). In der Entwicklung der pankreatischen endokrinen Zellen sind also deutliche Unterschiede zwischen Insm1<sup>Null</sup> und Insm1<sup>L/Δ</sup> Mutanten zu beobachten.

Im Weiteren analysierte ich andere Differenzierungsmarker. Untersucht wurden Proteine des sekretorischen Apparats und Hormon-prozessierende Enzyme. Die Prohormonkonvertasen (PC) schneiden Prohormone und generieren dadurch funktionelle Hormone (Marcinkiewicz *et al.*, 1994); PC2 ist in  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ - und PP-Zellen vorhanden. Die PC2+ Zellzahl war in Pankreata beider Mutanten reduziert, aber die Reduktion war in Insm1<sup>L/Δ</sup> Mutanten weniger stark ausgeprägt. (Abb. 23F). *Islet amyloid polypeptide* (IAPP) wird in  $\beta$ -Zellen exprimiert, zusammen mit Insulin in Vesikeln gelagert und sezerniert (Cooper *et al.*, 1989; Nishi *et al.*, 1989). Die Zahl der IAPP+ Zellen war nur in Pankreata Insm1<sup>Null</sup> mutanten Tieren vermindert (Abb. 23G). Chromogranin A (ChgA) wird in einer Vielzahl endokriner Zellen exprimiert und wird ebenfalls mit Hormonen in Vesikeln gelagert und sezerniert (Karlsson, 2001; Taupenot *et al.*, 2003). Die Zahl der Chromogranin A+ Zellen war in Insm1<sup>Null</sup> und Insm1<sup>L/Δ</sup> Tieren ähnlich stark reduziert (Abb. 23H)



Abb. 23. a) Analyse von Peptidhormonen und anderen endokrin-spezifischen Proteinen in  $\beta$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ - und PP-Zellen in Kontrolltieren, Insm1<sup>Null</sup> und Insm1<sup>L/A</sup> Pankreata. Immunhistologische Analyse des dorsalen Pankreas von Insm1<sup>LacZ/+</sup>, Insm1<sup>LacZ/LacZ</sup> und Insm1<sup>LacZ/ASNAG</sup> Mäusen (E18,5) mit Antikörpern gegen: (A-E)  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal, rot), (A) Glucagon (Gcg, grün), (B) Insulin (Ins, grün), (C) Somatostatin (Sst, grün), (D) Ghrelin (Ghrl, grün), (E) pankreatisches Polypeptid (PP, grün). Ergebnisse der Quantifizierungen sind jeweils links dargestellt; p ≤ 0,05 \*, ≤ 0,01 \*\*\*, n.s., nicht signifikant. Größenmaßstab = 100 µm.



Abb. 23. b) Analyse von Peptidhormonen und anderen endokrin-spezifischen Proteinen in  $\beta$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ - und PP-Zellen in Kontrolltieren, Insm1<sup>Null</sup> und Insm1<sup>LA</sup> Pankreata. Immunhistologische Analyse des dorsalen Pankreas von Insm1<sup>LacZ/+</sup>, Insm1<sup>LacZ/LacZ</sup> und Insm1<sup>LacZ/LASNAG</sup> Mäusen (E18,5) mit Antikörpern gegen: (F-H)  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal, rot), (F) Prohormonkonvertase 2 (PC2, grün), (G) Islet amyloid Polypeptid (IAPP, grün) und (H) Chromogranin A (ChgA, grün). Ergebnisse der Quantifizierungen sind jeweils links dargestellt; p ≤ 0,05 \*, ≤ 0,01 \*\*, ≤ 0,001 \*\*\*, n.s., nicht signifikant. Größenmaßstab = 100 µm.

# 3.5.2. Genomweite Transkriptionsanalyse des Pankreas mittels Microarray-Analysen

Um weitere Hinweise auf die Funktion der Insm1 SNAG-Domäne in der Entwicklung endokriner Zellen des Pankreas zu bekommen, führte ich eine genomweite Transkriptanalyse mittels Microarray durch. Hierzu isolierte ich die RNA aus dorsalem Pankreasgewebe von Mäusen (E18,5). Ich verglich Pankreata aus drei Gruppen von Tieren: Heterozygoten Insm1<sup>LacZ/+</sup> Kontrolltieren und Insm1<sup>LacZ/LacZ</sup> sowie Insm1<sup>ΔSNAG/ΔSNAG</sup> Mutanten.

Die statistische Analyse der gemessenen Expressionsintensitäten resultierte in einer Liste von Genen, deren Transkriptionsniveau entweder von dem der Kontrollgruppe abwich oder sich innerhalb beider mutanten Gruppen unterschied (Tab. 17 und Abb. 24). Gene dieser Liste wurden aufgrund der Unterschiede in der Expression in Cluster unterteilt.

Tabelle	17.	Differenziell	exprimierte	Gene	im	Pankreas	von	Insm1 <sup>Null</sup>	und	Insm1 <sup>∆SNAG</sup>
Mutante	n									

Gen-Symbol	Gen Name	FV Insm1 <sup>Null</sup>	FV Insm1 <sup>∆SNAG</sup>	p-Value
Hormone				
Ins1*	s1* Insulin I		-1 11	3 44E-08
Ins2*	Insulin II	-22 44	-0.58	1 18E-08
Gca*	Glucagon	-1.64	0.00	8.10E-04
Pov*	PP	0.68	4 10	5.81E-04
Ghrl*	Ghrelin	-0.22	-2 24	1.86E-02
Sst*	Somatostatin	-0.57	0.35	ns
Npy	Neuropeptide Y	-11,23	-7,26	2,92E-05
Glukose Meta	bolismus			
SIc2a2	Glut2	-0.76	-0.64	4 64E-03
G6pc2	Glukose-6-phosphatase, islet specific	-4,16	-2,07	6,50E-04
Hormon Proz	essierung und Sekretion			
PC2*	Prohormone convertase 2	-0.58	n.v.	2.38E-02
ChaA*	Chromogranin A	-8.78	-2.81	4.45E-04
ChaB*	Chromogranin B	-12.91	-8.49	2.09E-07
Nnat	Neuronatin	-3.49	-1.67	6.94E-04
Resp18	Regulated endocrine-specific protein 18	-2.62	-2.31	4.96E-04
Sca2	Secretogranin II	-9.85	-6.58	4.82E-06
Sca3*	Secretogranin III	-8.12	-1.40	1.09E-05
Sane1	Secretogranin V	-3.71	-2.74	4.78E-03
Sytl4	Synaptotagmin-like 4	-3,39	-1,49	3,13E-03
Transkription	sfaktoren			
Nkx2.2*	Nkx2.2	n.v.	n.v.	-
Nkx6.1*	Nkx6.1	-1.62	-0.39	5.34E-04
Pax4*	Pax4	1.15	0.43	3.20E-02
Pax6*	Pax6	n.v.	n.v.	-
lpf1*	Pdx1	-0.42	-0.85	3.89E-02
MafA*	MafA	n.v.	n.v.	, -
MafB*	MafB	n.v.	n.v.	-
MafG	MafG	-0.50	-0.41	3.98E-02
Arx	Arx	n.v.	n.v.	-
Zelladhäsion				
Cdh1	Cadherin-Related Family Member 1	-2,06	0,16	1,351E-03
Andere				
Scgn	Secretagogin	-4,38	-3,04	8,11E-06
IAPP*	Islet amyloid polypeptide	-0,89	1,69	1,40E-02
PYY*	Peptide YY	0,26	1,26	6,90E-03
Gja9	Connexin 36	-4,88	-2,12	4,87E-05
Gng4	GTP-binding protein y 4 subunit	-1,36	-0,50	6,96E-03
Sez6/2	Seizure-related 6 homolog-like 2	-1,37	-1,24	4,64E-04
Slc30a8	Solute carrier family 30 member 8	-2,72	-0,58	3,70E-03

Genomweite Microarray-Analyse von mRNA des dorsalen Pankreas von Insm1<sup>LacZ/+</sup> Insm1<sup>LacZ/+</sup> Insm1<sup>LacZ/LacZ</sup> und Insm1<sup>ΔSNAG/ΔSNAG</sup> Mäusen (E18,5). Reduzierte Expression ist durch einem negativen Faktor der Veränderung (FV) und erhöhte Expression durch einem positiven Wert gekennzeichnet. n.v., nicht verändert; n.s., nicht signifikant. Mit \* gekennzeichnete Gene, wurden zusätzlich mittels qPCR untersucht.

In der Hälfte aller deregulierten Genen beobachtete ich eine ähnliche Tendenz in den mutanten Gruppen, das heißt die Expression war in beiden Mutanten entweder erhöht oder erniedrigt (Abb. 24, Cluster 1-2). In diesem Clustern waren Gene mit einer Funktion in der Hormonsekretion (*ChgA/B*, *ScgII/III* und *V*) und im Glukosemetabolismus (*G6pc2*).



Abb. 24. Deregulation von Genen im Pankreas von Insm1<sup>Null</sup> und Insm1<sup> $\Delta$ SNAG</sup> Mutanten. Cluster-Analyse der Genexpression im dorsalen Pankreas von Insm1<sup>LacZ/+</sup></sup> Insm1<sup> $LacZ/LacZ</sup></sup> und Insm1<sup><math>\Delta$ SNAG/ $\Delta$ SNAG</sub> Mäusen (E18,5). (A) 156 differenziell exprimierte Gene (p  $\leq$  0,05; Faktor der Veränderung von  $\geq$  1,5 in einer der beiden Mutanten) werden in 6 Gruppen eingeteilt. (B) Auswahl von differentiell exprimierten Genen.</sup></sup>

Die andere Hälfte der Gene war in Pankreata der *Insm1* Mutanten gegenläufig reguliert (Abb. 24, Cluster 3-6). Ich beobachtete Gene, die in der Insm1<sup>Null</sup> Mutante fast keine Veränderung aufwiesen, die in der Insm1<sup> $\Delta$ SNAG</sup> Mutante aber stark dereguliert waren, wie zum Beispiel Ghrelin (*Ghrl*) oder Pankreatisches Polypetid (*PP*). Ich identifizierte aber auch Gene, die in der Insm1<sup> $\Lambda$ Ull</sup> Mutante, aber nicht in der Insm1<sup> $\Delta$ SNAG</sup> Mutante dereguliert waren, wie zum Beispiel Insulin 2 (*Ins2*).

Die Änderungen der Genexpression, die in der Microarray-Analyse identifiziert wurden, waren also erstaunlich unterschiedlich. Um die Daten zu verifizieren, analysierte ich eine Auswahl der identifizierten Genen mittels qPCR. Dazu isolierte ich erneut RNA aus dorsalen Pankreata.

In Übereinstimmung mit immunhistologischen- und Microarray-Analyse beobachtete ich in qPCR-Analysen eine starke Reduktion der *Insulin1* und *Insulin2* mRNA-Menge in Insm1<sup>Null</sup> Pankreata. In den Pankreata von Insm1<sup>ΔSNAG</sup> Tieren dagegen war die Expression weniger stark reduziert (Abb. 25A). Die Menge der Glukagon mRNA war in Insm1<sup>ΔSNAG</sup> mutanten Tieren unverändert, aber in Insm1<sup>Null</sup> mutanten Tieren reduziert. In der immunhistologischen Analyse hatte ich keinen Unterschied in der Zahl Glukagon+ Zellen beobachtet und starke Unterschiede in der Proteinmenge waren dort nicht offensichtlich. *Ghrelin* mRNA war in Insm1<sup>ΔSNAG</sup> mutanten Tieren reduziert, in Insm1<sup>Null</sup> Mutanten jedoch unverändert. Ähnliches hatte ich auch in der Microarray- und immunhistologischen-Analyse beobachtet. Die Menge von *PP* mRNA war in Insm1<sup>ΔSNAG</sup> aber nicht in Insm1<sup>Null</sup> Tieren erhöht, wie ich dies bereits in den immunhistologischen- und Microarray-Analysen beobachtet hatte.

Zudem analysierte ich die mRNA-Menge von anderen endokrin-spezifischen Markern. Ich konnte eine starke Reduktion der mRNA-Menge von *Scg3* in beiden Mutanten beobachten (Abb. 25B). In der Microarray-Analyse war die Reduktion dagegen in Insm1<sup>Null</sup> Mutanten stärker ausgeprägt als in Insm<sup>ΔSNAG</sup> Pankreata.

Die *Chromogranin A* und *B* mRNA-Menge war in beiden Mutanten verringert, aber die Reduktion war in Insm1<sup>Null</sup> Tieren stärker als in Insm1<sup>ΔSNAG</sup> Mutanten ausgeprägt. Ähnliches konnte ich auch in Microarray-Analysen beobachten, während ich in der immunhistologischen Analyse von ChgA Protein keine sichtbaren Unterschiede beobachtete. Die Menge von *IAPP* und *PC2* mRNA war in Insm<sup>ΔSNAG</sup> Mutanten unverändert, während sie in Insm1<sup>Null</sup> deutlich reduziert war. Ähnliches beobachtete ich auch in der immunhistologischen Analyse, aber die Microarray-Analysen wichen davon ab.



Abb. 25. Verifizierung der Unterschiede in der pankreatischen Genexpression in Insm1<sup>Null</sup> und Insm1<sup>ASNAG</sup> Mutanten. qPCR Analyse aus dorsalen Pankreata (E18,5). Relative Expressionsniveaus verschiedener mRNA-Transkripte. (A) Hormone (B) Trankriptionsfaktoren (C) andere endokrin-spezifische Gene.  $p \le 0.05^{\circ}$ ,  $\le 0.01^{\circ}$ ,  $\le 0.001^{\circ}$ , n.s., nicht signigikant.

Auch die Transkriptmengen von Transkriptionsfaktoren wichen teilweise in qPCR-Analysen von denen in Microarray-Analysen ab. So beobachtete ich für *MafA*, *MafB* und *Pax6* keine signifikante Änderung in Microarray-Analysen, identifizierte aber eine Reduktion in qPCR-Analysen (Abb. 25C). Die Menge der *Pax4* mRNA war in beiden Analysen in Insm1<sup>Null</sup>, aber nicht in Insm1<sup> $\Delta$ SNAG</sup> Pankreata erhöht. Die Expression von *Pdx1* war in den beiden Mutanten ebenfalls unterschiedlich dereguliert. Die qPCR Analyse zeigt also auch, dass die Veränderungen der Expression in Insm1<sup> $\Lambda$ ull</sup> und Insm1<sup> $\Delta$ SNAG</sup> mutanten Pankreata erstaunlich unterschiedlich lich sind.

### 3.6. Insm2 Expression in der Maus

*Insm2* ist ein wenig untersuchtes Paralog von *Insm1*. Um die Funktion von Insm2 *in-vivo* zu analysieren, ersetzte ich *Insm2* kodierende Sequenzen durch eine cDNA für kernlokalisiertes GFP (2.2.4.1., Seite 44). GFP wird also unter der Kontrolle des *Insm2*-Promoters exprimiert.

Die homozygote *Insm2* Mutation (Insm2<sup>GFP/GFP</sup>) zeigt keine offensichtliche Veränderung des Phänotyps. Um Expression von Insm1 und Insm2 zu vergleichen, führte ich immunhistologische Färbungen mit anti-GFP und anti- $\beta$ -Galaktosidase Antikörpern an doppelt heterozygoten Insm1<sup>LacZ</sup>; Insm2<sup>GFP</sup> Tieren in verschiedenen Entwicklungsstadien durch. Im Allgemeinen beobachtete ich wenig Koexpression von Insm1 und Insm2. Insm1 wird transient in allen sich differenzierenden Neuronen im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert. Dabei ist die  $\beta$ -Galaktosidase stabiler als das Insm1 Protein, d.h. mittels anti- $\beta$ -Galaktosidase Antikörper werden Neurone markiert in denen das Insm1 Protein bereits abgebaut wurde. Im Vergleich dazu wird Insm2 nur ganz vereinzelt im Nervensystem exprimiert, die Insm2 exprimieren.

### 3.6.1. Insm2 Expression im peripheren Nervensystem

Im peripheren Nervensystem war Insm2 in kranialen sensorischen Ganglien exprimiert. So beobachtete ich GFP+ Zellen im *Ganglion geniculi* (E12,5) und im *Ganglion trigeminale* (E16,5) (Abb. 26). Während Insm2 früh in der Entwicklung nicht in Spinalganglien exprimiert war, konnte ich dort ab E16,5 GFP+ Zellen nachweisen (Abb. 27A-C). In den sympathischen Ganglien beobachtete ich zu allen analysierten Stadien (E12,5, E16,5 und P4) GFP+ Zellen (Abb. 27D-F).



**Abb. 26.** Insm2 wird in kranialen Ganglien exprimiert. Immunhistologische Analyse des Gehirns von Insm1<sup>LacZ/+</sup>/Insm2<sup>GFP/+</sup> Mäusen (E12,5, E16,5) mit Antikörpern gegen GFP (grün) und  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal, rot). (**A**) Sagittale und (**B**) coronale Schnitte des Gehirns. (**A', B'**) Jeweils rechts dargestellt, Detailansichten. (**A-A'**, weiße Pfeile) *Ganglion geniculi* des *Nervus facialis* (VII). (**B**, **B'**, weiße Pfeilspitze) Hypophyse. (**B**, **B'**, weißer Pfeil) *Ganglion trigeminale* des *Nervus Trigeminus* (V), Größenmaßstab = 500 µm, bzw. 200 µm in Detailansichten.



**Abb. 27. Insm2 wird in peripheren Ganglien exprimiert.** Immunhistologische Analyse des Rückenmarks von Insm1<sup>LacZ/+</sup>/Insm2<sup>GFP/+</sup> Mäusen (E12,5, E16,5, P4) mit Antikörpern gegen GFP (grün) und  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal, rot). (**A-C**) transversale Schnitte des Rückenmarks. (**A'-C'**) Jeweils rechts dargestellt, Detailansichten. (**D-F)** Sympathische Ganglien. Größenmaßstab = 200 µm, bzw. 50 µm in **D**.

#### 3.6.2. Insm2 Expression im zentralen Nervensystem

Auch im zentralen Nervensystem war die Insm2 Expression auf spezifische Regionen beschränkt. So konnte ich zu E12,5 GFP+ Zellen in einer sehr kleinen Subpopulation von Neuronen im ventralen Rückenmark identifizieren. Diese bildeten einen Streifen von GFP+ Zellen, die in der Mantelzone lokalisiert waren (weiße Pfeile in Abb. 28). Es könnte sich dabei um einen neugeborenen Neuronen-Subtyp in einer der spezifischen Domänen des Rückenmarks handeln.





Abb. 28. Insm2 wird früh im Rückenmark exprimiert. Immunhistologische Analyse des Rückenmarks von Insm1<sup>LacZ/+</sup>/Insm2<sup>GFP/+</sup> Mäusen (E12,5) mit Antikörpern gegen GFP (grün) und  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal, rot). (**A**, **A'**)Transversale und (**A''**) sagittale Schnitte des Rückenmarks. (**A-A''**, weiße Pfeile) Ein Streifen von GFP+ Zellen ist in einer Subpopulation von motorischen Neuronen in der Mantelzone der Basalplatte lokalisiert. (**A-A''**, weiße Pfeilspitzen) Vereinzelte Stränge von nicht-neuronalen GFP+ Zellen erstrecken sich zwischen der Bodenplatte des Rückenmarks und dorsalem Aspekt der Sklerotome. Größenmaßstab = 200 µm.

Auf transversalen und sagittalen Schnitten des Gehirns von Tieren des Stadiums E12,5 beobachtete ich GFP+ Zellen im terminalen und caudalen Hypothalamus, Pons, in der medialen Wand des lateralen Ventrikels, in der Dachplatte des Diencephalon und verstreut in der Medulla oblongata (Abb. 29). Meist war in diesen Zellen  $\beta$ -Galaktosidase koexprimeirt, d.h. es sollte sich dabei um post-mitotische Neurone in diesen Gebieten handeln. Ausnahmen waren eine kleine Gruppe neuronaler Vorläuferzellen in der Dachplatte des Diencephalons. Auf sagittalen Schnitten beobachtete ich außerdem Insm2 Expression in der präoptischen Domäne (Abb. 29A).

Im weiteren Verlauf der Entwicklung nahm die Expression von Insm2 im zentralen Nervensystem ab, war aber in vereinzelten Zellen im Hypothalamus, Hippocampus und in den Meningen zu beobachten (Abb. 30). Postnatal war hingegen keine Insm2 Expression im zentralen Nervensystem zu beobachten (Abb. 31).



Abb. 29. Insm2 ist in spezifischen Bereichen des zentralen Nervensystem exprimiert. Immunhistologische Analyse des Gehirns von Insm1<sup>LacZ/+</sup>/Insm2<sup>GFP/+</sup> Mäusen (E12,5) mit Antikörpern gegen GFP (grün) und  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal, rot). (A) Sagittale und (B-E) transversale Schnitte. Jeweils rechts dargestellt, Detailansichten (A'-E'). GFP+ Zellen können in verschiedenen Regionen des ZNS beobachtet werden: (A, A', weiße Pfeile) caudaler und terminaler Hypothalamus (A, A', weiße Pfeilspitzen) präoptische Domäne. (B, B'', weiße Pfeilspitze) mediale Wand des lateralen Ventrikels. (B, B', weißer Pfeil) Dachplatte des Diencephalon (C, C', weiße Pfeilspitze) terminaler Hypothalamus, (C, C', weißer Pfeil) Pons, (D, D' weiße Pfeilspitzen) *Plexus choroideus* des Tel- und Rhombencephalon, (D, D', weißer Pfeil) caudaler Hypothalamus (E, E', weiße Pfeilspitze) Medulla oblangata. Der Größenmaßstab = 500 µm, bzw. 200 µm in Detailansichten.



Abb. 30. Insm2 ist in spezifischen Regionen des zentralen Nervensystems exprimiert. Immunhistologische Analyse des Gehirns von Insm1<sup>LacZ/+</sup>/Insm2<sup>GFP/+</sup> Mäusen (E16,5) mit Antikörpern gegen GFP (grün) und  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal, rot). (A) sagittale und (B-C) coronale Schnitte. (A'-C') Jeweils rechts dargestellt, Detailansichten. GFP+ Zellen können in verschiedenen Bereichen des Gehirns nachgewiesen werden: (A, A', weißer Pfeil) *Ganglion* trigeminale (A, A', weiße Pfeilspitzen) Hippocampus, (B, B', weißer Pfeil) Hypothalamus. (C, C', weiße Pfeilspitzen) Hypothalamus. (C, C', weißer Pfeil) Im Hippocampus. Größenmaßstab = 500 µm, bzw. 200 µm in Detailansichten.



Abb. 31. Insm2 ist postnatal nicht im zentralen Nervensystem exprimiert. Immunhistologische Analyse des Gehirns von Insm1<sup>LacZ/+</sup>/Insm2<sup>GFP/+</sup> Mäusen (P4) mit Antikörpern gegen GFP (grün) und  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal, rot). (**A**) Sagittale und (**B**) coronale Schnitte. Größenmaßstab = 1 mm.

Auch in Zellen der Retina konnte ich GFP+ Zellen beobachten. In den Stadien E12,5 und E16,5 waren diese Zellen hauptsächlich basal lokalisiert (Abb. 32A, B) Ich konnte auch LacZ+ Zellen beobachten und in einigen Zellen waren LacZ und GFP koexprimiert. Im Stadium P4 beobachtete ich GFP+ Zellen, vermutlich Photorezeptoren, die in Form eines Streifens auf apikaler Seite lokalisiert waren (Abb. 32C). Auffallend ist dabei, dass nicht alle Zellen in dieser Schicht GFP exprimierten. LacZ+ konnte ich in postnatalen Stadien nicht beobachten. Insm1 scheint daher postnatal nicht in der Retina exprimiert zu sein (Abb. 32C). Zusammenfassend wird Insm2 also bereits zu Beginn der Neurogenese (E12) in Vorläuferzellen der Retina exprimiert und einige dieser Zellen koexprimieren beide Faktoren. Postnatal scheint Insm2 in einer Subpopulation von Photorezeptoren exprimiert zu sein.



**Abb. 32.** Insm2 wird in der Retina exprimiert. Immunhistologische Analyse der Retina von Insm1<sup>LacZ/+</sup>/Insm2<sup>GFP/+</sup> Mäusen (E12,5, E16,5, P4) mit Antikörpern gegen GFP (grün) und  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal, rot). (**A-C**) coronale Schnitte der Retina. (**A'-C'**) Jeweils rechts dargestellt, Detailansichten. (**A**, **B**, weiße Pfeilspitzen) Insm1 und Insm2 werden vereinzelt koexprimiert. Größenmaßstab = 200 µm.

#### 3.6.3. Insm2 Expression in nicht-neuronalen Zellen

Wie Insm1 wird auch Insm2 in endokrinen Zellen exprimiert. Ich beobachtete GFP in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks (Abb. 33) und in der Hypophyse (Abb. 26B). Zusätzlich beobachtet ich Expression im *Plexus choroideus*, d.h.

einer nicht-neuronalen Zellpopulation die von Hirnhäuten gebildet wird und viele Endothelzellen enthält (Abb. 29D).

Außerdem konnte ich ventral des Rückenmarks Stränge von nicht-neuronalen GFP+ Zellen, wahrscheinlich endothelialen Zellen, beobachten, die sich von der Peripherie ins Rückenmark erstrecken (weiße Pfeilspitzen in Abb. 28).



Abb. 33. Insm2 ist in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks exprimiert. Immunhistologische Analyse mit Antikörpern gegen GFP (grün) und  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal, rot). (A) sagittale und (A') transversale Schnitte des Torsos und (B-C) sagittale Schnitte der Nebennieren von Insm1<sup>LacZ/+</sup>/Insm2<sup>GFP/+</sup> Mäusen (E12,5, E16,5, P4). (B', C') Jeweils rechts dargestellt, Detailansichten. (A, A', weiße Pfeile) GFP+ Zellen sind in der Nebennieren-Anlage zu beobachten. (A, A', weiße Pfeilspitzen) GFP+ Zellen in primären sympathischen Ganglien. (B, B') GFP+ chromaffine Zellen. (C, C') in postnatalen chromaffinen Zellen ist Insm2 nicht exprimiert. Größenmaßstab = 200 µm, bzw. 500 µm in A.

Insm2 und Insm1 werden also in unterschiedlichen Mustern exprimiert und ihre Expression zeigt wenig Überlappung. Während sich die Expression von Insm2 auf spezifische, kleinere Bereiche des Gehirns und Rückenmarks beschränkt, ist Insm1 in der Entwicklung des Nervensystems transient in vielen oder sogar allen Neuronen exprimiert.

Im peripheren Nervensystem, zum Beispiel in den Spinalganglien und sympathischen Ganglien, ist Insm2 dagegen breiter exprimiert und zeigt dadurch mehr Ähnlichkeit mit der Expression von Insm1.

### 4. Diskussion

Der Insm1 Transkriptionsfaktor besitzt fünf Zinkfinger-Domänen, die eine Bindung von spezifischen DNA-Sequenzen ermöglichen (Breslin et al., 2002; Wang et al., 2008, Shiqi Jia und Andranik Ivanov, unpublizierte Daten). Die N-terminale SNAG-Domäne von Insm1 interagiert mit verschiedenen Enzymen (Hdac1/3, Kdm1a), die Chromatin modifizieren und dadurch die Aktivität von Genen modifizieren und meist reprimieren. Allerdings wurden für Kdm1a auch aktivierende Funktionen beschrieben (Wang et al., 2007). Insm1 wird in der Literatur bisweilen als transkriptioneller Repressor beschrieben, obwohl unsere Daten darauf hinweisen, dass Insm1 Genexpression aktivieren und reprimieren kann (Breslin et al., 2002; Liu et al., 2006; Wang et al., 2008 und eigene unveröffentlichte Ergebnisse). Um zu untersuchen, ob die SNAG-Domäne essentiell für die Entwicklung endokriner Zellen ist, verglich ich zwei Mausstämme mit verschiedenen Insm1 mutanten Allelen. Das erste entspricht einer Null-Mutation von Insm1 (Insm1<sup>Null</sup>), während im zweiten die SNAG-Sequenzen deletiert wurden (Insm1<sup>ΔSNAG</sup>). Der Rest der Insm1-kodierenden Sequenzen ist also intakt und das veränderte Insm1 Protein kann in der Mutante noch nachgewiesen werden (Welcker et al., 2013 und Abb. 10, Seite 50). Ich verglich in beiden Mutanten die Entwicklung verschiedener endokriner Zelltypen. In diesen endokrinen Zellen war zuvor eine Funktion von Insm1 beschreiben worden (Gierl et al., 2006; Mellitzer et al., 2006; Pedersen et al., 2006; Wildner et al., 2008; Welcker et al., 2013; Osipovich et al., 2014).

# 4.1. Veränderungen der endokrinen Differenzierung in Insm1<sup>∆sNAG</sup> und Insm1<sup>№III</sup> Mutanten sind ähnlich, aber nicht identisch

Der Verlust von *Insm1* oder die Deletion der SNAG-Domäne führt im Allgemeinen zu ähnlichen histologischen Veränderungen. Die Differenzierung der endokrinen Zellen in Hypophyse, Nebenniere, Lunge und Darm ist in beiden Mutanten beeinträchtig. Auch zeigte ein systematischer Vergleich der Genexpression in der Hypophyse, dass dieselben Gene dereguliert waren. Gene, die differentiell exprimiert waren können durch zwei Cluster beschrieben werden. Ein Cluster enthält Gene die verstärkt und der andere Cluster Gene, die reduziert exprimiert werden. Eine große Zahl der Gene (66%) war in den Mutanten ähnlich dereguliert. Unter den Genen, die in den Mutanten unterschiedlich stark dereguliert waren, war die überwiegende Zahl (82%) in der Insm1<sup>Null</sup> Mutante stärker als in der Insm1<sup>ΔSNAG</sup> Mutante dereguliert.

Diese Beobachtung konnte ich durch qPCR-Analysen verifizieren, d.h. auch die qPCR-Analysen zeigten, dass die meisten Gene in den beiden Mutanten ähnlich dereguliert waren. Ich identifizierte auch einige Gene, die in den beiden Mutanten unterschiedlich stark verändert waren, z.B. *Myl1* (Expression erhöht) und *Pomc1* (Expression erniedrigt). In beiden Fällen waren die Expressionsunterschiede in Insm1<sup>ΔSNAG</sup> Mutanten weniger stark ausgeprägt als in den Null-Mutanten.

Auch in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks benötigt Insm1 die SNAG-Domäne, um seine Funktion in der Differenzierung auszuüben. In beiden Mutanten war die Größe der Nebennieren aufgrund von erhöhter Apoptose reduziert. Mittels Microarray-, gPCR- und in *In-situ*-Hybridisierungs-Analysen beobachtet ich eine starke Reduktion der Expression von Enzymen der Katecholaminsynthese. Systematische Analysen der Genexpression in beiden Mutanten zeigten erneut, dass die deregulierten Genen in zwei Cluster eingeteilt werden können: Gene, die verstärkt und Gene, die reduziert exprimiert wurden. Die überwiegende Zahl der Gene (69%) war in den Mutanten ähnlich dereguliert. Von den Genen, die in den Mutanten unterschiedlich dereguliert waren, waren 64% in Insm1<sup>Null</sup> Mutanten stärker dereguliert als in Insm1<sup>ΔSNAG</sup> Mutanten. Auch die in qPCR-Analysen beobachteten quantitativen Unterschiede zwischen den beiden Mutanten waren typischerweise nicht sehr groß. Zusammenfassend kann ich also sagen, dass die histologischen Veränderungen und Genexpressionsunterschiede im Nebennierenmark von Insm1<sup>Null</sup> und Insm1<sup>ΔSNAG</sup> Mutanten ähnlich sind.

Auch endokrine Zellen des Darms benötigen die SNAG-Domäne von Insm1 für ihre korrekte Differenzierung. Ich beobachtete im Darmepithel der Mutanten weniger Zellen, die endokrin-spezifische Proteine exprimierten. Einige der Veränderungen, z.B. die Reduktion der Zahl der Zellen, die Substance P und Chromogranin A exprimierten, waren in Insm1<sup>ΔSNAG</sup> Mutanten weniger stark ausgeprägt. Auch qPCR-Analysen ergaben, dass die Expression von *Substance P* und *Chromogranin A* weniger stark in diesen Mutanten reduziert war. Zusammenfassend zeigt meine Untersuchung der endokrinen Zellen von Insm1<sup>ΔSNAG</sup> und Insm1<sup>Null</sup> Mutanten, dass die SNAG-Domäne für die volle Funktion von Insm1 benötigt wird.

Meine Untersuchungen zeigen also, dass endokrine Zellen von Hypophyse, Nebennieren und Darm durch die Insm1<sup>Null</sup> und Insm1<sup>ΔSNAG</sup> Mutationen ähnlich beeinträchtigt werden. In einigen Fällen konnte ich beobachten, dass die Effekte auf die Geneexpression in Insm1<sup>ΔSNAG</sup> Tieren weniger stark ausgeprägt waren. Verglichen mit der Null-Mutante scheint der Phänotyp der Insm1<sup>ΔSNAG</sup> Mutante in diesen endokrinen Zellen also leicht attenuiert zu sein.

Auch für die Differenzierung endokriner Zellen der Lunge, in den neuroepithelialen Körperchen, wird Insm1 benötigt. Die Zahl endokriner Zellen in den neuroepithelialen Körperchen war in beiden *Insm1* Mutanten vergleichbar reduziert. Differenzierte endokrine Zellen der Lunge exprimieren PGP9.5 bzw. CGRP und beide Marker konnte ich in diesen Zellen in *Insm1* Mutanten nicht nachweisen. Ich beobachtete daher keine Unterschiede beim Vergleich dieser Zellen in Insm1<sup>Null</sup> und Insm1<sup>ΔSNAG</sup> Mutanten. Die endokrinen Zellen der Lunge sind nicht sehr gut untersucht und nur wenige Marker sind bekannt. Ich setzte deshalb für meine histologischen Untersuchungen nur zwei Antikörper ein. Wegen der geringen Zahl endokriner Zellen im Gewebe führte ich keine systematische Genexpressions-Analyse durch. Ich kann deshalb nicht ausschließen, dass auch in diesem Fall Veränderungen in der Genexpression existieren, die in Insm1<sup>ΔSNAG</sup> Mutanten weniger stark als in den Null-Mutanten ausgeprägt sind.

Insm1 kann über seine SNAG-Domäne verschiedene Chromatin-modifizierende Enzyme rekrutieren (Liu *et al.*, 2006; Welcker *et al.*, 2013). Diese Histonmodifikationen führen in den meisten Fällen zu einer Repression des assoziierten Gens. Eine Derepression, verursacht durch den Verlust der Interaktion mit HDACs und Kdm1a, sollte deshalb in beiden Mutanten vorhanden sein, also in Insm1<sup>ΔSNAG</sup> und Insm1<sup>Null</sup> Tieren beobachtet werden können. Meine Ergebnisse weisen darauf hin, dass das verbliebene Insm1 Protein unabhängig von der SNAG-Domäne eine Funktion übernehmen kann. Die Deletion der SNAG-Domäne umfasst lediglich sieben Aminosäuren und lässt dadurch das restliche Protein intakt. Intakt bleiben zum Beispiel die Zinkfinger-Domänen, die eine spezifische Bindung an DNA, RNA und Interaktionen mit anderen Proteinen ermöglichen können (Tsai & Reed, 1998; Fox *et al.*, 1999; Hata *et al.*, 2000; Brayer *et al.*, 2008). Des Weiteren befinden sich Prolin-reiche Abschnitte in der Nähe von N- und C-Terminus und es gibt Hinweise auf Proteininteraktionen in diesen Regionen (Zhang *et al.*, 2009). Ein (kleiner) Teil der Insm1 Funktionen kann also anscheinend in der SNAG Mutante ausgeübt werden.

Ein weiterer Aspekt, der bei der Interpretation des Insm1<sup> $\Delta$ SNAG</sup> Phänotyps berücksichtigt werden muss ist, dass sich *Insm1* negativ autoreguliert und dies durch das Fehlen der SNAG-Domäne unterbunden wird. So wird in der Hypophyse von Insm1<sup> $\Delta$ SNAG</sup> Mutanten mehr Insm1 Protein als in Kontrollen beobachtet (Welcker *et al.*, 2013). Die erhöhte Menge des Insm1<sup> $\Delta$ SNAG</sup> Proteins könnte daher SNAG-unabhängige Insm1 Funktionen verstärken.

Offen bleibt die Frage, welche Domänen des Insm1∆SNAG Proteins für die verbliebene Funktion benötigt werden und mit welchen anderen Proteinen das Insm1∆SNAG Protein dabei interagiert. Mein Kollege Shiqi Jia zeigte kürzlich, dass Insm1 die Transkriptionsfaktoren Foxa2 und NeuroD1 bindet und zusammen mit diesen Faktoren an Chromatin bindet (Shiqi Jia, unpublizierte Daten). Das Insm1∆SNAG Protein ist noch immer fähig, Foxa2 und NeuroD1 zu binden. Es ist möglich, dass andere Insm1 Domänen, z.B. Zinkfinger- oder Prolin-reiche Domänen, solche Interaktionen ermöglichen. Analysen von Insm1 Protein-Varianten ohne Zinkfinger- bzw. Prolin-reiche Domänen werden helfen, diese Frage aufzuklären.

# 4.2. Veränderungen der endokrinen Differenzierung im Pankreas von Insm1<sup>ΔSNAG</sup> und Insm1<sup>Null</sup> Mutanten unterscheiden sich

Ich verglich auch die endokrinen Zellen des Pankreas in Insm1<sup>∆SNAG</sup> und Null-Mutanten. Die Veränderungen, die ich in der Null-Mutante beobachtete, waren ähnlich, wie der von M. Gierl bestimmte und publizierte Phänotyp (Gierl *et al.*, 2006). Die Deletion der SNAG-Domäne und der gesamten *Insm1* Sequenz hatten in endokrinen Zellen des Pankreas unterschiedliche Konsequenzen.

Diskussion

Eine systematische Analyse der Genexpression von Pankreata aus beiden Mausstämmen lieferte eine Liste von Genen, die in den Mutanten dereguliert waren. Anhand der Unterschiede der Expression konnten diese Gene in sechs Cluster eingeteilt werden. Zwei der Cluster enthalten Gene, die in beiden *Insm1* Mutanten ähnlich dereguliert sind, d.h. in beiden Mutanten stärker oder schwächer exprimiert werden. In den vier anderen Clustern finden sich Gene, die auf unterschiedliche Art dereguliert sind. Im Vergleich zu den anderen analysierten endokrinen Zelltypen, deren Veränderungen in zwei Clustern hinreichend beschrieben werden konnten, sind die Expressionsunterschiede in endokrinen Zellen des Pankreas also wesentlich komplexer.

Offensichtlich wird dieser Unterschied am Beispiel der Insulin-Expression. Während in Insm1<sup>Null</sup> Tieren kaum noch Insulin immunhistologisch nachgewiesen werden konnte, war Insulin in Insm1<sup> $\Delta$ SNAG</sup> Pankreata gut detektierbar. Die Zahl der Insulin+ Zellen war in Pankreata von Insm1<sup> $\Delta$ SNAG</sup> Mutanten und Kontrolltieren sogar ähnlich. Die *Ins1/Ins2* Transkriptmengen waren allerdings auch in Insm1<sup> $\Delta$ SNAG</sup> Mutanten reduziert.  $\beta$ -Zellen von Insm1<sup> $\Delta$ SNAG</sup> Tieren produzierten zwar Insulin, trotzdem konnte nur wenig Insulin im Blut der Tiere nachgewiesen werden und die Tiere waren hyperglykämisch (Shiqi Jia, unpublizierte Daten). Insulin wurde also in  $\beta$ -Zellen von Insm1<sup> $\Delta$ SNAG</sup> Tieren produziert.

Unterschiedliche Effekte waren auch in anderen endokrinen Zellen zu beobachten. Zum Beispiel waren  $\beta$ - und  $\delta$ - Zellen in Insm1<sup> $\Delta$ SNAG</sup> Mutanten weniger stark als in Null-Mutanten beeinträchtigt, während die Zahl der  $\epsilon$ -Zellen in Insm1<sup> $\Delta$ SNAG</sup>, aber nicht in der Null-Mutanten, erniedrigt war. Die Unterschiede in der Bildung endokriner Zellen oder der Genexpression können also nicht durch eine attenuierte Funktion des Insm1<sup> $\Delta$ SNAG</sup> Proteins erklärt werden.

Die Differenzierung endokriner Vorläuferzellen des Pankreas wird durch Transkriptionsfaktoren reguliert, die Gene aktivieren bzw. reprimieren und dadurch bestimmte endokrine Zellschicksale einleiten (Abb. 8, Seite 18). Dies kann in linearer Weise geschehen, wobei jeweils ein Transkriptionsfaktor einen hierarchisch untergeordneten Faktor reguliert. Transkriptionsfaktoren können auch in Netzwerken organisiert sein, und die Regulation dieser Netzwerks ist weitaus komplexer. Im Pankreas wird die Bildung endokriner Zellen durch solche Netzwerke gesteuert. Zum Beispiele wird Arx (aristaless related homeobox) für die Differenzierung von  $\alpha$ -Zellen und Pax4 (paired box 4) für die Differenzierung von  $\beta$ -Zellen benötigt (Abb. 34, Seite 89). Arx und Pax4 reprimieren sich gegenseitig und die Mutation eines der Faktoren verschiebt das Gleichgewicht zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zellen, d. h. ein Zelltyp wird auf Kosten des anderen produziert (Collombat *et al.*, 2003). Arx reprimiert zusätzlich die Bildung von  $\delta$ -Zellen und die Deletion von *Arx* und *Pax4* führt daher zu einer erhöhten Zahl von  $\delta$ -Zellen auf Kosten der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zellen (Collombat *et al.*, 2005).

Die beiden *Insm1* Mutationen scheinen diese komplexen Regelkreise auf unterschiedliche Weise zu beeinflussen und durch Verschiebung der Repressionsgleichgewichte die Anteile der verschiedenen Zelltypen zu verändern. Zusätzlich könnten lineare Diffenzierungskaskaden unterschiedlich gestört sein. Die komplexen Veränderungen der Genexpression im Pankreas könnten auf solche Weise erklärt werden.





Zusammenfassend kann ich die Unterschiede der endokrinen Differenzierung in den verschiedenen Organen folgendermaßen interpretieren. In endokrinen Zellen von Hypophyse, Darm, Lunge und Nebenniere wirkt Insm1 hauptsächlich in einer linearen Diffenzierungskaskade. Die SNAG- und Null-Mutation wirken sich in diesem Kontext nur leicht unterschiedlich aus, wobei für Insm1<sup>ΔSNAG</sup> oft attenuierte Phäntypen beobachtet werden. Im Pankreas wirkt Insm1 nicht nur in linearen Differenzierungskaskaden, sondern auch in regulatorischen Netzwerken. Dies hat nicht nur Auswirkungen auf die Differenzierung der Vorläuferzellen, sondern verändert auch die relative Häufigkeit der verschiedenen endokrinen Zelltypen im Pankreas. Die Veränderungen der Genexpression sind somit komplexer und die Unterschiede zwischen den Phänotypen der Insm1<sup>ΔSNAG</sup> und Null-Allele stärker ausgeprägt.

#### 4.3. Immunhistologische Analyse der Insm2 Expression

*Insm2* ist ein wenig untersuchtes Paralog von *Insm1* und kodiert für ein Protein, das wie Insm1 fünf Zinkfinger-Domänen und eine SNAG-Domäne trägt (Cai *et al.*, 2011).

Um die Funktion von Insm2 in-vivo zu untersuchen generierte ich einen Mausstamm, in dem Insm2 kodierende Sequenzen durch eine Sequenz für kernlokalisiertes GFP ersetzt wurde, und analysierte die Expression von Insm1 und Insm2 in doppelt heterozygoten Insm1<sup>LacZ</sup>; Insm1<sup>ΔSNAG</sup> Mäusen an verschiedenen Entwicklungsstadien. Im Gegensatz zu der Mutation von Insm1 ist die Mutation von Insm2 nicht letal und der Phänotyp von Insm2 Null-Mutanten zeigte keine auffälligen Besonderheiten. Die Expressionsanalyse ergab, dass Insm2 hauptsächlich im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert ist. Die Expression von Insm2 im zentralen Nervensystem war dabei im Gegensatz zu Insm1, welches transient in allen Neuronen exprimiert wird, auf kleine Regionen beschränkt, die zuvor Insm1 exprimierten. Diese Zellen sind also vermutlich post-mitotische Neuronen. Am stärksten war Insm2 in frühen Entwicklungsstadien (E12,5) exprimiert. Ich beobachtete unter anderem Expression von Insm2 im caudalem und terminalen Hippothalamus, Hippocampus, Pons, Medulla oblongata und der präoptischen Domäne. Im Laufe der Entwicklung nahm die beobachtete Expression im ZNS ab (E16,5) und in postnatalen Stadien konnte ich keine Expression von Insm2 im Gehirn und Rückenmark beobachten (P4).

Auch in der Retina wird Insm2 exprimiert. In der Maus entwickeln sich Gliazellen, Neurone und Photorezeptoren der Netzhaut zwischen E12 und P10 (Reese, 2011). Die Vorläuferzellen teilen sich mitotisch an der Oberfläche des Ventrikels

Diskussion

und migrieren in basaler Richtung, wobei sie die Retina bilden, eine hoch geordnete laminare Struktur aus mehreren miteinander vernetzten Schichten von Zellen. Die unterschiedlichen Zelltypen der Retina werden sequentiell gebildet. Der frühste Typ sind Ganglienzellen, gefolgt von Horizontalzellen, Zapfen, Amakrinen Zellen, Stäbchen, Bipolarzellen und Müller Glia (Rapaport, 2006; Wong & Rapaport, 2009). Die Neurogenese der Retina beginnt zu E12, daher ist es wahrscheinlich, dass die beobachteten Insm2+ Zellen retinalen Vorläuferzellen entsprechen. Insm1 war ebenfalls in diesem Stadium in Vorläuferzellen exprimiert, und ich beobachtete Zellen, in denen Insm1 und Insm2 koexprimiert waren. Im Stadium P4 beobachtete ich Insm2+ Zellen, vermutlich Photorezeptoren, die in Form eines breiten Streifens auf apikaler Seite lokalisiert waren. Insm1 dagegen war in postnatalen Stadien in der Retina nicht exprimiert.

Im peripheren Nervensystem war eine Expression von Insm2 in Neuronen der Ganglien von kranialen Nerven (V und VII), in sensorischen Neuronen der Spinalganglien und in sympathischen Neuronen zu beobachten. In den Spinalganglien und sympathischen Ganglien ist Insm2 breit exprimiert und zeigt deshalb mehr Ähnlichkeit mit dem Expressionsmuster von Insm1. Wie lange Insm1 und oder Insm2 in diesen Neuronen persistiert ist im Augenblick unklar: Wir wissen bereits, dass LacZ stabiler als das Insm1 Protein ist. Ähnliches könnte auch für GFP und das Insm2 Protein gelten. Insm1 und Insm2 spezifische Antikörper könnten diese offene Frage erhellen. Um weitere Erkenntnisse über mögliche Funktionen von Insm2 in solchen Neuronen zu gewinnen sind weitere Analysen nötig. So könnten Antikörper, die spezifische neuronale Subtypen erkennen, eingesetzt werden und mit der Expression von Insm2 verglichen werden. Die Ergebnisse einer solchen Analyse würden es ermöglichen, subtile potentielle Veränderungen in den *Insm2* Mutanten zu identifizieren.

Auch in einigen nicht-neuronalen Zellen konnte ich Expression von Insm2 beobachten. Dazu gehörten endotheliale Zellen des *Choroid Plexus* im Thelencephalon und Rhombencephalon. Desweiteren beobachtete ich eine sehr kleine Population von endothelialen Zellen, die im Rückenmark lokalisiert waren; andere Endothelien exprimieren Insm2 nicht. Außerdem fand ich Insm2 in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks. Insm2+ chromaffine Zellen konnte ich in Embryonalstadien, aber nicht postnatal beobachten.

Insm1 ist im Gegensatz zu Insm2 in der Entwicklung des Nervensystems transient in vielen oder sogar allen Neuronen exprimiert. Die Expression von Insm2 hingegen ist auf kleinere Bereiche des Gehirns und Rückenmarks beschränkt. Zusammenfassend zeigt das Expressionsmuster von Insm2 im zentralen Nervensystem also wenig Ähnlichkeit mit dem von Insm1. Eine reduntante Funktion von Insm2 im zentralen Nervensystem ist daher nicht wahrscheinlich.

## 5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass essentielle Funktionen von Insm1 durch die SNAG-Domäne vermittelt werden. Meine Analysen von Insm1<sup>Null</sup> und Insm1<sup>ΔSNAG</sup> mutanten Mäusen ergaben, dass der Phänotyp in den *Insm1* Mutanten sehr ähnlich ist. Ein Teil der Insm1 Funktion scheint jedoch auch ohne die SNAG-Domäne ausgeübt zu werden. Diese Restfunktionalität führte in der Mehrzahl der von mir untersuchten Gewebe zu leicht attenuierten Phänotypen in den Insm1<sup>ΔSNAG</sup> Mutanten. Die beobachteten Unterschiede zwischen den Insm1 Mutanten sind vermutlich in kleinen Änderungen linearer Regulationskaskaden von Transkriptionsfaktoren begründet.

Im Pankreas dagegen waren deutliche Unterschiede zwischen den beiden Mutationen zu beobachteten, und die Veränderungen der Genexpression waren komplex. Die Differenzierung der endokrinen Zellen des Pankreas wird durch ein komplexes transkriptionelles Netzwerk reguliert. Insm1 ist Bestandteil dieses Netzwerks, und die beiden *Insm1* Mutationen verändern dessen Regelkreise offenbar unterschiedlich. Dadurch werden Repressions-Gleichgewichte und damit die Proportion der verschiedenen endokrinen Zelltypen verändert. Zusätzlich könnten lineare Diffenzierungskaskaden unterschiedlich stark gestört sein. Die komplexen Veränderungen der Genexpression im Pankreas könnten auf solche Weise erklärt werden.

*Insm2*, ein *Insm1* Paralog, kodiert ebenfalls für ein Zinkfinger-Protein, das im zentralen (ZNS) und peripheren Nervensystem (PNS) exprimiert wird. Beide Faktoren werden früh in der Entwicklung exprimiert, und die Expression nimmt im Laufe der Entwicklung zusehends ab. Während Insm1 transient in vielen, wenn nicht sogar allen Neuronen exprimiert wird, ist die Expression von Insm2 auf spezifische, kleine Regionen des Gehirns und Rückenmarks beschränkt. Eine redundante Funktion von Insm2 in der Neurogenese des ZNS ist daher unwahrscheinlich. Im PNS ist Insm2 dagegen breiter exprimiert und zeigt mehr Ähnlichkeit mit dem Expressionsmuster von Insm1.

## Abstract

This work reveals an essential role for the Insm1 SNAG-domain in regulating endocrine cell differentiation. Defects in the differentiation of endocrine cells in pituitary gland, adrenal medulla, small intestine and lung of *Insm1* null mice resemble to a large extent those of mice carrying a mutation in which only the SNAG-coding sequence has been deleted. However, residual Insm1 function seems to remain in the Insm1<sup>ΔSNAG</sup> mutants, leading to a slightly attenuated differentiation phenotype in these endocrine cell types. These differences could be explained by mild changes in linear regulatory cascades that govern differentiation.

In endocrine cells of the pancreas, however, more pronounced differences in  $Insm1^{\Delta SNAG}$  and  $Insm1^{Null}$  mutants were apparent, for instance in the extent of gene deregulation as well as the number of cells that produced detectable levels of specific hormones. Endocrine cell fate in the pancreas is known to be controlled not only in a linear and hierarchical manner, but also by complex networks in which transcription factors mutually activate/repress each other. The striking differences in phenotypes of the *Insm1* mutants might be due to changes in such complex regulatory networks, leading to shifts in the proportion of endocrine cells formed in  $Insm1^{\Delta SNAG}$  and  $Insm1^{Null}$  mutants. In addition, linear differentiation cascades might be also impaired to mildly differing extents.

Immunohistological analysis of *Insm2*, an *Insm1* paralog, revealed an expression pattern which is restricted to specific regions of the brain and spinal cord. These narrow expression domains differ from the Insm1 expression pattern: Insm1 is known to be transiently expressed in most if not all developing neurons. Redundant Inms1 and Inms2 function during neurogenesis in the central nervous system is therefore unlikely. In contrast, Insm2 is more broadly expressed in sensory and sympathetic neurons of the peripheral nervous system, which more closely resembles the Insm1 expression.

## 6. Literaturverzeichnis

- Ahlgren U., Jonsson J. & Edlund H. 1996. The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/ PDX1-deficient mice. *Development* 122(5): 1409-1416.
- **Aiken K.D. & Roth K.A.** 1992. Temporal differentiation and migration of substance P, serotonin, and Sekretin immunoreactive enteroendocrine cells in the mouse proximal small intestine. *Dev Dyn* 194(4): 303-310.
- Andersen F.G., Heller R.S., Petersen H.V., Jensen J., Madsen O.D. & Serup P. 1999a. Pax6 and Cdx2/3 form a functional complex on the rat glucagon gene promoter G1-element. *FEBS Lett* 445(2-3): 306-310.
- Andersen F.G., Jensen J., Heller R.S., Petersen H.V., Larsson L.I., Madsen O.D. et al. 1999b. Pax6 and Pdx1 form a functional complex on the rat somatostatin gene upstream enhancer. *FEBS Lett* 445(2-3): 315-320.
- Bagga S., Bracht J., Hunter S., Massirer K., Holtz J., Eachus R. et al. 2005. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 122(4): 553-563.
- Barash Y., Calarco J.A., Gao W., Pan Q., Wang X., Shai O. et al. 2010. Deciphering the splicing code. *Nature* 465(7294): 53-59.
- **Bartel D.P.** 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116(2): 281-297.
- Black D.L. 2003. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72: 291-336.
- Borges M., Linnoila R.I., van de Velde H.J., Chen H., Nelkin B.D., Mabry M. et al. 1997. An achaete-scute homologue essential for neuroendocrine differentiation in the lung. *Nature* 386(6627): 852-855.
- Brayer K.J., Kulshreshtha S. & Segal D.J. 2008. The protein-binding potential of C2H2 zinc finger domains. *Cell Biochem Biophys* 51(1): 9-19.
- Breslin M.B., Zhu M., Notkins A.L. & 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(4): 1038-1045.
- Brissova M., Shiota M., Nicholson W.E., Gannon M., Knobel S.M., Piston D.W. et al. 2002. Reduction in pancreatic transcription factor PDX-1 impairs glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* 277(13): 11225-11232.
- Brouns I., Oztay F., Pintelon I., De Proost I., Lembrechts R., Timmermans J.P. et al. 2009. Neurochemical pattern of the complex innervation of neuroepithelial bodies in mouse lungs. *Histochem Cell Biol* 131(1): 55-74.
- Brouns I., Pintelon I., De Proost I., Alewaters R., Timmermans J.P. & Adriaensen D. 2006. Neurochemical characterisation of sensory receptors in air-

way smooth muscle: comparison with pulmonary neuroepithelial bodies. *Histochem Cell Biol* 125(4): 351-367.

- Bunting M., Bernstein K.E., Greer J.M., Capecchi M.R. & Thomas K.R. 1999. Targeting genes for self-excision in the germ line. *Genes & development* 13(12): 1524-1528.
- Cai T., Chen X., Wang R., Xu H., You Y., Zhang T. et al. 2011. Expression of insulinoma-associated 2 (INSM2) in pancreatic islet cells is regulated by the transcription factors Ngn3 and NeuroD1. *Endocrinology* 152(5): 1961-1969.
- **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): 586-590.
- **Candal E., Alunni A., Thermes V., Jamen F., Joly J.S. & Bourrat F.** 2007. Olinsm1b, a SNAG family transcription factor involved in cell cycle arrest during medaka development. *Dev Biol* 309(1): 1-17.
- **Cardoso W.V. & Lu J.** 2006. Regulation of early lung morphogenesis: questions, facts and controversies. *Development* 133(9): 1611-1624.
- Chen C., Fang R., Davis C., Maravelias C. & Sibley E. 2009. Pdx1 inactivation restricted to the intestinal epithelium in mice alters duodenal gene expression in enterocytes and enteroendocrine cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 297(6): G1126-G1137.
- **Cheng H. & Leblond C.P.** 1974. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat* 141(4): 537-561.
- Cho P.F., Poulin F., Cho-Park Y.A., Cho-Park I.B., Chicoine J.D., Lasko P. et al. 2005. A new paradigm for translational control: inhibition via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP. *Cell* 121(3): 411-423.
- Chu D.S., Dawes H.E., Lieb J.D., Chan R.C., Kuo A.F. & Meyer B.J. 2002. A molecular link between gene-specific and chromosome-wide transcriptional repression. *Genes Dev* 16(7): 796-805.
- Cirillo L.A., Lin F.R., Cuesta I., Friedman D., Jarnik M. & Zaret K.S. 2002. Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol Cell* 9(2): 279-289.
- **Collombat P., Hecksher-Sorensen J., Broccoli V., Krull J., Ponte I., Mundiger T. et al.** 2005. The simultaneous loss of Arx and Pax4 genes promotes a somatostatin-producing cell fate specification at the expense of the alpha- and beta-cell lineages in the mouse endocrine pancreas. *Development* 132(13): 2969-2980.
- Collombat P., Mansouri A., Hecksher-Sorensen J., Serup P., Krull J., Gradwohl G. et al. 2003. Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. *Genes Dev* 17(20): 2591-2603.

- Cooper G.J., Day A.J., Willis A.C., Roberts A.N., Reid K.B. & Leighton B. 1989. Amylin and the amylin gene: structure, function and relationship to islet amyloid and to diabetes mellitus. *Biochim Biophys Acta* 1014(3): 247-258.
- **Core L.J. & Lis J.T.** 2008. Transcription regulation through promoter-proximal pausing of RNA polymerase II. *Science* 319(5871): 1791-1792.
- Cutz E., Pan J., Yeger H., Domnik N.J. & Fisher J.T. 2013. Recent advances and contraversies on the role of pulmonary neuroepithelial bodies as airway sensors. *Semin Cell Dev Biol* 24(1): 40-50.
- Cvekl A. & Piatigorsky J. 1996. Lens development and crystallin gene expression: many roles for Pax-6. *Bioessays* 18(8): 621-630.
- **Decker C.J. & Parker R.** 1994. Mechanisms of mRNA degradation in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* 19(8): 336-340.
- Duggan A., Madathany T., de Castro S.C., Gerrelli D., Guddati K. & García-Añoveros 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(4): 1497-1520.
- Farkas L.M., Haffner C., Giger T., Khaitovich P., Nowick K., Birchmeier C. et al. 2008. Insulinoma-associated 1 has a panneurogenic role and promotes the generation and expansion of basal progenitors in the developing mouse neocortex. *Neuron* 60(1): 40-55.
- **Fox A.H., Liew C., Holmes M., Kowalski K., Mackay J. & Crossley M.** 1999. Transcriptional cofactors of the FOG family interact with GATA proteins by means of multiple zinc fingers. *EMBO J* 18(10): 2812-2822.
- Fre S., Huyghe M., Mourikis P., Robine S., Louvard D. & Artavanis-Tsakonas S. 2005. Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature* 435(7044): 964-968.
- Gedamu L. & Dixon G.H. 1978. Effect of enzymatic "decapping" on protamine mRNA translation in wheat germ S-30. *Biochem Biophys Res Commun* 85(1): 114-124.
- **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): 2465-2478.
- **Gittes G.K.** 2009. Developmental biology of the pancreas: a comprehensive review. *Dev Biol* 326(1): 4-35.
- Goto Y., De Silva M.G., Toscani A., Prabhakar B.S., Notkins A.L. & 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(21): 15252-15257.
- Grimes H.L., Chan T.O., Zweidler-McKay P.A., Tong B. & Tsichlis 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(11): 6263-6272.

- Guillemot F., Lo L.-C., Johnson J.E., Auerbach A., Anderson D.J. & Joyner A.L. 1993. Mammalian< i> achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* 75(3): 463-476.
- Guz Y., Montminy M.R., Stein R., Leonard J., Gamer L.W., Wright C.V. et al. 1995. Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in beta cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny. *Development* 121(1): 11-18.
- Hata A., Seoane J., Lagna G., Montalvo E., Hemmati-Brivanlou A. & Massague J. 2000. OAZ uses distinct DNA- and protein-binding zinc fingers in separate BMP-Smad and Olf signaling pathways. *Cell* 100(2): 229-240.
- **Hochberg Y. & Benjamini Y.** 1990. More powerful procedures for multiple significance testing. *Statistics in medicine* 9(7): 811-818.
- Huber K., Brühl B., Guillemot F., Olson E.N., Ernsberger U. & Unsicker K. 2002. Development of chromaffin cells depends on MASH1 function. *Development* 129(20): 4729-4738.
- Huber K., Karch N., Ernsberger U., Goridis C. & Unsicker K. 2005. The role of Phox2B in chromaffin cell development. *Developmental biology* 279(2): 501-508.
- **International Human Genome Sequencing Consortium s.** 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431(7011): 931-945.
- Ito T., Udaka N., Yazawa T., Okudela K., Hayashi H., Sudo T. et al. 2000. Basic helix-loop-helix transcription factors regulate the neuroendocrine differentiation of fetal mouse pulmonary epithelium. *Development* 127(18): 3913-3921.
- Jenny M., Uhl C., Roche C., Duluc I., Guillermin V., Guillemot F. et al. 2002. Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. *EMBO J* 21(23): 6338-6347.
- Jensen J., Pedersen E.E., Galante P., Hald J., Heller R.S., Ishibashi M. et al. 2000. Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nat Genet* 24(1): 36-44.
- Johnson J.E., Birren S.J. & Anderson D.J. 1990. Two rat homologues of Drosophila achaete-scute specifically expressed in neuronal precursors. *Nature* 346(6287): 858-861.
- Jonsson J., Carlsson L., Edlund T. & Edlund H. 1994. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371(6498): 606-609.
- Jorgensen M.C., Ahnfelt-Ronne J., Hald J., Madsen O.D., Serup P. & Hecksher-Sorensen J. 2007. An illustrated review of early pancreas development in the mouse. *Endocr Rev* 28(6): 685-705.
- Karlsson E. 2001. The role of pancreatic chromogranins in islet physiology. *Current molecular medicine* 1(6): 727-732.

- Kawaguchi Y., Cooper B., Gannon M., Ray M., MacDonald R.J. & Wright C.V. 2002. The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet* 32(1): 128-134.
- **Kimmel A.R. & Berger S.L.** 1987. [32] Preparation of cDNA and the generation of cDNA libraries: Overview. *Methods in enzymology* 152: 307-316.
- Kondrashov N., Pusic A., Stumpf C.R., Shimizu K., Hsieh A.C., Xue S. et al. 2011. Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. *Cell* 145(3): 383-397.
- Kozak M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic acids research* 15(20): 8125-8148.
- Krapp A., Knofler M., Ledermann B., Burki K., Berney C., Zoerkler N. et al. 1998. The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes Dev* 12(23): 3752-3763.
- Kuzin A., Brody T., Moore A.W. & Odenwald W.F. 2005. Nerfin-1 is required for early axon guidance decisions in the developing Drosophila CNS. *Dev Biol* 277(2): 347-365.
- Lamolet B., Poulin G., Chu K., Guillemot F., Tsai M.-J. & Drouin J. 2004. Tpitindependent function of NeuroD1 (BETA2) in pituitary corticotroph differentiation. *Molecular Endocrinology* 18(4): 995-1003.
- Lan M.S., Li Q., Lu J., Modi W.S. & Notkins A.L. 1994. Genomic organization, 5'-upstream sequence, and chromosomal localization of an insulinoma-associated intronless gene, IA-1. *J Biol Chem* 269(19): 14170-14174.
- Larsson L.I., St-Onge L., Hougaard D.M., Sosa-Pineda B. & Gruss P. 1998. Pax 4 and 6 regulate gastrointestinal endocrine cell development. *Mech Dev* 79(1-2): 153-159.
- Lee C.S., Perreault N., Brestelli J.E. & Kaestner K.H. 2002. Neurogenin 3 is essential for the proper specification of gastric enteroendocrine cells and the maintenance of gastric epithelial cell identity. *Genes Dev* 16(12): 1488-1497.
- Lee E., Yu D., Martinez de Velasco J., Tessarollo L., Swing D.A., Court D.L. et al. 2001. A Highly Efficient Escherichia coli-Based Chromosome Engineering System Adapted for Recombinogenic Targeting and Subcloning of BAC DNA. *Genomics* 73(1): 56-65.
- Li X., James W.M., Traganos F. & Darzynkiewicz Z. 1995. Application of biotin, digoxigenin or fluorescein conjugated deoxynucleotides to label DNA strand breaks for analysis of cell proliferation and apoptosis using flow cytometry. *Biotech Histochem* 70(5): 234-242.
- Lin Y., Wu Y., Li J., Dong C., Ye X., Chi Y.I. et al. 2010. The SNAG domain of Snail1 functions as a molecular hook for recruiting lysine-specific demethylase 1. *EMBO J* 29(11): 1803-1816.

- Liu W.D., Wang H.W., Muguira M., Breslin M.B. & Lan M.S. 2006. INSM1 functions as a transcriptional repressor of the neuroD/beta2 gene through the recruitment of cyclin D1 and histone deacetylases. *Biochem J* 397(1): 169-177.
- Marcinkiewicz M., Ramla D., Seidah N.G. & Chretien M. 1994. Developmental expression of the prohormone convertases PC1 and PC2 in mouse pancreatic islets. *Endocrinology* 135(4): 1651-1660.
- Mellitzer G., Bonné S., Luco R.F., Van De Casteele M., Lenne-Samuel N., Collombat P. et al. 2006. IA1 is NGN3-dependent and essential for differentiation of the endocrine pancreas. *EMBO J* 25(6): 1344-1352.
- **Miller J., McLachlan A.D. & Klug A.** 1985. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from Xenopus oocytes. *EMBO J* 4(6): 1609-1614.
- Mutoh H., Naya F.J., Tsai M.J. & Leiter A.B. 1998. The basic helix-loop-helix protein BETA2 interacts with p300 to coordinate differentiation of Sekretin-expressing enteroendocrine cells. *Genes Dev* 12(6): 820-830.
- Nair M., Bilanchone V., Ortt K., Sinha S. & Dai X. 2007. Ovol1 represses its own transcription by competing with transcription activator c-Myb and by recruiting histone deacetylase activity. *Nucleic Acids Res* 35(5): 1687-1697.
- Nishi M., Chan S.J., Nagamatsu S., Bell G.I. & Steiner D.F. 1989. Conservation of the sequence of islet amyloid polypeptide in five mammals is consistent with its putative role as an islet hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(15): 5738-5742.
- Offield M.F., Jetton T.L., Labosky P.A., Ray M., Stein R.W., Magnuson M.A. et al. 1996. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 122(3): 983-995.
- **Ogryzko V.V., Schiltz R.L., Russanova V., Howard B.H. & Nakatani Y.** 1996. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87(5): 953-959.
- Osipovich A.B., Long Q., Manduchi E., Gangula R., Hipkens S.B., Schneider J. et al. 2014. Insm1 promotes endocrine cell differentiation by modulating the expression of a network of genes that includes Neurog3 and Ripply3. *Development* 141(15): 2939-2949.
- Parker K.L. & Schimmer B.P. 1996. The roles of the nuclear receptor steroidogenic factor 1 in endocrine differentiation and development. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 7(6): 203-207.
- Pattyn A., Goridis C. & Brunet J.F. 2000. Specification of the central noradrenergic phenotype by the homeobox gene Phox2b. *Mol Cell Neurosci* 15(3): 235-243.
- Pedersen J.K., Nelson S.B., Jorgensen M.C., Henseleit K.D., Fujitani Y., Wright C.V. et al. 2005. Endodermal expression of Nkx6 genes depends differentially on Pdx1. *Dev Biol* 288(2): 487-501.

- Pedersen N., Pedersen M.W., Lan M.S., Breslin M.B. & Poulsen H.S. 2006. The insulinoma-associated 1: a novel promoter for targeted cancer gene therapy for small-cell lung cancer. *Cancer Gene Ther* 13(4): 375-384.
- Pfaffl M.W., Tichopad A., Prgomet C. & Neuvians T.P. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26(6): 509-515.
- **Post L.C., Ternet M. & Hogan B.L.** 2000. Notch/Delta expression in the developing mouse lung. *Mech Dev* 98(1-2): 95-98.
- Price E.R., Ding H.F., Badalian T., Bhattacharya S., Takemoto C., Yao T.P. et al. 1998. Lineage-specific signaling in melanocytes. C-kit stimulation recruits p300/CBP to microphthalmia. *J Biol Chem* 273(29): 17983-17986.
- Pulichino A.-M., Vallette-Kasic S., Tsai J.P.-Y., Couture C., Gauthier Y. & Drouin J. 2003. Tpit determines alternate fates during pituitary cell differentiation. *Genes & development* 17(6): 738-747.
- Rapaport D.H. 2006. Retinal neurogenesis. Retinal development 30-58.
- **Reese B.E.** 2011. Development of the retina and optic pathway. *Vision Res* 51(7): 613-632.
- **Reynolds S.D., Giangreco A., Power J.H. & Stripp B.R.** 2000. Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration. *Am J Pathol* 156(1): 269-278.
- **Rosenbaum J.N., Duggan A. & García-Añoveros J.** 2011. Insm1 promotes the transition of olfactory progenitors from apical and proliferative to basal, terminally dividing and neuronogenic. *Neural Dev* 6: 6.
- **Rosenthal E.T., Hunt T. & Ruderman J.V.** 1980. Selective translation of mRNA controls the pattern of protein synthesis during early development of the surf clam, Spisula solidissima. *Cell* 20(2): 487-494.
- Roth K.A., Hertz J.M. & Gordon J.I. 1990. Mapping enteroendocrine cell populations in transgenic mice reveals an unexpected degree of complexity in cellular differentiation within the gastrointestinal tract. *J Cell Biol* 110(5): 1791-1801.
- 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): 562-572.
- Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual+ Cold Spring Harbor.
- Sander M., Neubuser A., Kalamaras J., Ee H.C., Martin G.R. & German M.S. 1997. Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. *Genes Dev* 11(13): 1662-1673.

- Sauer F., Fondell J.D., Ohkuma Y., Roeder R.G. & Jackle H. 1995. Control of transcription by Kruppel through interactions with TFIIB and TFIIE beta. *Nature* 375(6527): 162-164.
- **Schwind J.L.** 1928. The development of the hypophysis cerebri of the albino rat. *American Journal of Anatomy* 41(2): 295-319.
- Scully K.M. & Rosenfeld M.G. 2002. Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis. *Science* 295(5563): 2231-2235.
- Seymour P.A., Freude K.K., Tran M.N., Mayes E.E., Jensen J., Kist R. et al. 2007. SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(6): 1865-1870.
- Shan L., Aster J.C., Sklar J. & Sunday M.E. 2007. Notch-1 regulates pulmonary neuroendocrine cell differentiation in cell lines and in transgenic mice. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 292(2): L500-9.
- Sheng H.Z., Moriyama K., Yamashita T., Li H., Potter S.S., Mahon K.A. et al. 1997. Multistep control of pituitary organogenesis. *Science* 278(5344): 1809-1812.
- **Sheng H.Z. & Westphal H.** 1999. Early steps in pituitary organogenesis. *Trends in Genetics* 15(6): 236-240.
- **Slack J.M.** 1995. Developmental biology of the pancreas. *Development* 121(6): 1569-1580.
- Sonnenberg-Riethmacher E., Walter B., Riethmacher D., Gödecke S. & Birchmeier C. 1996. The c-ros tyrosine kinase receptor controls regionalization and differentiation of epithelial cells in the epididymis. *Genes & development* 10(10): 1184-1193.
- Sorokin S.P., Hoyt R.F.J. & Shaffer M.J. 1997. Ontogeny of neuroepithelial bodies: correlations with mitogenesis and innervation. *Microsc Res Tech* 37(1): 43-61.
- Sosa-Pineda B., Chowdhury K., Torres M., Oliver G. & Gruss P. 1997. The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature* 386(6623): 399-402.
- 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): 205-210.
- Stoffers D.A., Ferrer J., Clarke W.L. & Habener J.F. 1997. Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet* 17(2): 138-139.
- Taupenot L., Harper K.L. & O'Connor D.T. 2003. The chromogranin–secretogranin family. *New England Journal of Medicine* 348(12): 1134-1149.
- Thomas S.A., Matsumoto A.M. & Palmiter R.D. 1995. Noradrenaline is essential for mouse fetal development. *Nature* 374(6523): 643-646.
- **Tsai R.Y. & Reed R.R.** 1998. Identification of DNA recognition sequences and protein interaction domains of the multiple-Zn-finger protein Roaz. *Mol Cell Biol* 18(11): 6447-6456.
- van Es J.H., van Gijn M.E., Riccio O., van den Born M., Vooijs M., Begthel H. et al. 2005. Notch/γ-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature* 435(7044): 959-963.
- Van Lommel A. 2001. Pulmonary neuroendocrine cells (PNEC) and neuroepithelial bodies (NEB): chemoreceptors and regulators of lung development. *Paediatr Respir Rev* 2(2): 171-176.
- Vesper A.H., Raetzman L.T. & Camper S.A. 2006. Role of prophet of Pit1 (PROP1) in gonadotrope differentiation and puberty. *Endocrinology* 147(4): 1654-1663.
- **Vogelstein B. & Gillespie D.** 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(2): 615-619.
- Wang H.W., Muguira M., Liu W.D., Zhang T., Chen C., Aucoin R. et al. 2008. Identification of an INSM1-binding site in the insulin promoter: negative regulation of the insulin gene transcription. *J Endocrinol* 198(1): 29-39.
- Wang J., Scully K., Zhu X., Cai L., Zhang J., Prefontaine G.G. et al. 2007. Opposing LSD1 complexes function in developmental gene activation and repression programmes. *Nature* 446(7138): 882-887.
- Welcker J.E., Hernandez-Miranda L.R., Paul F.E., Jia S., Ivanov A., Selbach M. et al. 2013. Insm1 controls development of pituitary endocrine cells and requires a SNAG domain for function and for recruitment of histone-modifying factors. *Development* 140(24): 4947-4958.
- 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): 473-481.
- Wong L.L. & Rapaport D.H. 2009. Defining retinal progenitor cell competence in Xenopus laevis by clonal analysis. *Development* 136(10): 1707-1715.
- 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 J.D., Pfäffle R.W., Dasen J.S., Frisch H., O'Connell S.M. et al. 1998. Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. *Nature genetics* 18(2): 147-149.
- Xie J., Cai T., Zhang H., Lan M.S. & Notkins A.L. 2002. The zinc-finger transcription factor INSM1 is expressed during embryo development and interacts with the Cbl-associated protein. *Genomics* 80(1): 54-61.
- Yagi T., Nada S., Watanabe N., Tamemoto H., Kohmura N., Ikawa Y. et al. 1993. A novel negative selection for homologous recombinants using diphtheria toxin A fragment gene. *Analytical biochemistry* 214(1): 77-86.

- Yang Q., Bermingham N.A., Finegold M.J. & Zoghbi H.Y. 2001. Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science* 294(5549): 2155-2158.
- Yu D., Ellis H.M., Lee E.-C., Jenkins N.A. & Copeland N.G. 2000. An efficient recombination system for chromosome engineering in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(11): 5978-5983.
- Zhang T., Liu W.D., Saunee N.A., 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* 284(9): 5574-5581.
- Zhao L., Bakke M., Krimkevich Y., Cushman L.J., Parlow A.F., Camper S.A. et al. 2001. Steroidogenic factor 1 (SF1) is essential for pituitary gonadotrope function. *Development* 128(2): 147-154.

# Anhang

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
BCIP	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bHLH	(engl.: basic Helix-Loop-Helix) basisches Helix-Schleife-Helix (-Motiv)
BMP	(engl.: bone morphogenetic protein) Knochenmorphogenetische Proteine
bp	Basenpaare
BSA	(engl.: bovine serum albumin) Rinderserumalbumin
bzw	beziehungsweise
cDNA	(engl : complementary DNA) komplementare DNA
cRNA	(engl.: complementary BNA) komplementare BNA
$C_{V2}$	Cvanin
Cv3	Indocarbocyanin
Cy5	Indedicarbocyanin
	2 2' Diaminghonzidin
	Desoxycytioniniphosphat
DIG	Digoxigenin
DIVISO	
DNA	(engl.: desoxyribonucieic acid) Desoxyribonukieinsaure
	Desoxyribonukieosidtripnosphate
	Dithiothreitol
E	Embryonalstadium (Tag nach Konstatierung eines Vaginalpfropfens um 12:00)
EDTA	(engl. ethylenendinitrilotetraacetic acid) Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGF	(engl.: epidermal growth factor receptor) EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase
EIN	Egl-46/IA-1/Nerfin
ES	embryonale Stammzellen
engl.	aus dem Englischen
EST	(engl.: expressed sequence tags) exprimierte Sequenzstellen
FCS	(engl.: fetal calf serum) fötales Kälberserum
FGF	(engl.: fibroblast growth factor) Fibroblasten-Wachstumsfaktor
β-gal	β-Galaktosidase
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
lat.	aus dem Lateinischen
LB	Luria Broth (-Medium)
LIF	(engl: leukemia inhibitory factor) Leukämie-inhibierender Faktor
Maf	musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene
MBa	Megahecquerel
MCS	(engl : multiple cloping site) multiple Klopierungsstellen
MDC	Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin, Berlin-Buch
	Wasser aus Litrafiltrationsanlage (Milli-O LE Plus: Millipore)
min	Minutan
	(and, maturity onset dispetes of the young) Dispetes hei Hersnwachsenden
MDI	(engl. maturity onset diabetes of the young) Diabetes ber neranwachsenden Max Diabete institut
	(and massanger DNA) Boton DNA
	(engi. messenger KivA) bolen-KivA
ND I	Nicrobiduletrazonumentonu
NEO	
NLS OD	nukleare Lokalisationssequenz
	optische Dichte
BAC	(engl.: bacterial artificial chromosome) bakterielles, artifizielles Chromosom
PBS	(engl. phosphate buffered saline) phosphatgepufferte Salziosung
pBS	pBiuescript SK II (+)
PCI	Phenol:Chorotorm:Isoamylalkohol
PCR	(engl. polymerase chain reaction) Polymerase-Ketten-Reaktion
PFA	Paratormaldehyd
PP	Pankreatisches Polypeptid
qPCR	(engl. quantitative Real-Time PCR) quantitative Real-Time PCR
RNA	(engl.: ribonucleic acid) Ribonukleinsäure

RNase	Ribonuklease
rpm	(engl.: revolutions per minute) Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
sek.	Sekunden
SDS	(engl.: sodium dodecylsulfate) Natriumdodecylsulfat
sog.	sogenannte
SSC	(engl.: standard saline citrate) Standard-Zitronensäuresalz
Tab.	Tabelle
tACE	testis specific angiotensin converting enyzme
TBS	(engl.: tris buffered saline) Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	TBS-Tween 20
TBSX	TBS-Triton-X 100
TCF	Transgenic Core Facility, MDC
TE	Tris-EDTA
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
tRNA	(engl.: transfer RNA) Transfer-Ribonukleinsäure
U	(engl.: unit) Einheit der Enyzmaktivität
üN	üN
UTR	untranslatierte Region
Vers.	Version
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Inolyl-D-Galaktopyranosid

Name	Hersteller
Aceton	Roth, Karlsruhe
Ammoniumactetat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bacto Pepton	BD, Heidelberg
BCIP	Roche, Mannheim
Benzoesäurebenzylester	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
Benzylalkohol	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
BSA	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Merck, Darmstadt
DAPI	Roche, Mannheim
DEPC	Roth, Karlsruhe
DMSO	Merck, Darmstadt
DMEM	Life Technologies, Carlsbad USA
EDTA	Roth, Karlsruhe
EGTA	Roth, Karlsruhe
Entellan	Merck, Darmstadt
Essigsäureanhydrid	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethanolamin	Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich
FCS	Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich
FCS. dialvsiert	Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich
Ficoll	Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich
Formamid	Roth. Karlsruhe
Formamid (ultrarein, deionisiert)	Roth, Karlsruhe
Glutaraldehyd (25%)	Serva, Heidelberg
Glyzerin	Roth. Karlsruhe
Glyzin	Sigma-Aldrich. St. Louis USA
HCI (37%)	Roth, Karlsruhe
Hefe-Extrakt	Roth. Karlsruhe
Immunomount	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumferrizyanid	Sigma-Aldrich
Kaliumferrozvanid	Sigma-Aldrich
Kanamycin	Sigma-Aldrich
KCI	Merck, Darmstadt
Lachsspermien-DNA	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
Methanol	Roth, Karlsruhe
MqCl <sub>2</sub> (Hexahydrat)	Merck, Darmstadt
Na2HPO4 (Dihvdrat)	Roth. Karlsruhe
NaCl	Roth, Karlsruhe
NaH2PO4 (Dihydrat)	Roth, Karlsruhe
NaOH	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumdesoxychelat	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
NBT	Roche, Mannheim
NP40 (=lgepal)	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
PBS (10x)	Life Technologies, Carlsbad USA

#### Tab. A1: Verwendete Chemikalien und Enzyme

Penicillin/Streptomycin-Lösung	Life Technologies, Carlsbad USA
PFA	Merck, Darmstadt
Pferdeserum	PAN Biotech, Aidenbach
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol	Life Technologies, Carlsbad USA
Proteinase K	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
RNase A	Roche, Mannheim
D(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe
SDS	Serva, Heidelberg
Sephadex G-50 (coarse)	GE Healthcare, Little Chalfont UK
Sigmacote	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
SP6 Polymerase	Roche, Mannheim
T3 Polymerase	Roche, Mannheim
T7 Polymerase	Roche, Mannheim
Triethnolamin	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
tri-Natriumcitrat (Dihydrat)	Roth, Karlsruhe
Tris base	Roth, Karlsruhe
Triton-X 100	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
Trizol	Life Technologies, Carlsbad USA
tRNA (Hefe)	Life Technologies, Carlsbad USA
Trypsin-EDTA-Lösung	PAN Biotech, Aidenbach
Tween 20	Roth, Karlsruhe
X-Gal	Roth, Karlsruhe
Ziegenserum	Bio-Rad, Hercules USA

### 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 Triethanolamtin 0,5 mL HCl 0,75 mL Essigsäureanhydrit ad 300 mL MilliQ-H₂O
B1-Puffer ( <i>In-situ-</i> Hybridisierung auf Gefrierschnitten)	25 mL 1 M Tris-HCl, pH 9,5 12,5 mL 1 M MgCl 5 mL 5 M NaCl 375 Tween 20 ad 250 mL nukleasefreies $H_2O$
Biopsielysepuffer	200 mM NaCl 100 mM Tris·HCl, pH 8,0 5 mM EDTA, pH 8,0 0,2% SDS
Blockierlösung (Immunhistologie)	1x PBS 1% Pferdeserum 0,1% Triton X-100 0,2% Fischhaut Gelatine 0,1% Glycin
Church Puffer (Southern Blot)	0,5 M NaH₂PO₄ 1 mM EDTA pH 7,2 mit NaOH erhitzen auf 68°C 1% (w/v) BSA 7% (w/v) SDS hinzufügen
Denaturierungspuffer (Southern Blot)	1 M NaCl 0,5 M NaOH
Denhardts Lösung (50x)	5 g Ficoll 5 g Polyviniylpyrrolidon 5 g BSA ad 500mL MilliQ-H₂O
Depurinierungspuffer (Southern Blot)	250 mM HCI
DNA-Extraktionspuffer	10 mM Tris·HCl, pH 8,0 100 mM EDTA, pH 8,0 0,5% (w/v) SDS
EDTA	0,5 M EDTA pH 8,0 mit NaOH
Einfriermedium (ES Zellkultur)	20% (v/v) DMSO 30% (v/v) FCS 50% (v/v) ES-Zellmedium
ES-Zelllysepuffer	10 mM Tris·HCl, pH 7,5 10 mM EDTA, pH 8,0 10 mM NaCl 0,5% (w/v) N-lauroylsarcosine 0,2 mg/mL Proteinase K
ES-Zellmedium	500 ml Dulbecco's MEM mit Glutamax-I mit 90 ml hitzeinaktiviertes FCS 6 ml 100x nicht-essentielle Aminosäuren 6 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung 1,2 ml β-Mercaptoethanol 60 μl LIF
Ethanol-Natriumacetat-Mix	0,15 M Natriumacetat, pH 5,2 in Ethanol
Fibroblastenmedium	500 mL Dulbecco's MEM mit Glutamax-I mit 60 mL hitzeinaktiviertes FCS 5,7 mL 100x nicht-essentielle Aminosäuren 5,7 mL Penicillin/Streptomycin-Lösung 1,2 mL 50 mM ß-Mercaptoethanol
Hybridisierungslösung ( <i>In-situ-</i> Hybridisierung auf Gefrierschnitten)	50 mL ultrareines, deionisiertes Formamid 25 mL 20x SSC 10 mL 50x Denhardts Lösung 0,5 mL 50 mg/mL tRNA (10 min. bei 95°C denatu- riert) 5 mL 10 mg/mL Lachsspermien-DNA (10 min. bei 95°C denaturiert) 13,75 mL MilliQ-H <sub>2</sub> O

LacZ-Fixationslösung	2 mM MgCl2 (200 mM Lsg.) 2 mM EGTA (200 mM Lsg.) 0,2% Glutaraldehyd (25% Lsg.) in 1x PBS
LacZ-Permeabilisierungslösung	0,01% Natriumdesoxychylat (1% Lsg.) 0,02% NP40 (=Igelpal, 2% Lsg.) 2 mM MgCl2 (200 mM Lsg.) 2 mM EGTA (200 mM Lsg.) in 1x PBS
LacZ-Färbelösung	20 mM MgCl2 (200 mM Lsg.) 1 mg/mL X-Gal (50mg/mL in DMEF) 5 mM Kaliumferrozyanid (200 mM Lsg.) 5 mM Kaliumferrizyanid (200 mM Lsg.) in 1x PBS
LB-Medium	1% (w/v) Bacto-Trypton 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt 1% (w/v) NaCl pH 7,5 mit NaOH
Mitomycin C-Lösung	0,2% (w/v) Mitomycin C in PBS
Natriumacetat	3 M Natriumactat pH 5,2 mit Essigsäure
NTMT	100 mM NaCl 100 mM Tris·HCl pH 9,5 50 mM MgCl2 0,1% (v/v) Tween 20
PBX	PBS 1% TritonX-100
Phosphatpuffer	0,2 M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7,4
SSC (20x)	3 M NaCl 0,3 M tri-Natriumcitrat pH 7,0 mit HCl
ТЕ	10 mM Tris base 1 mM EDTA, pH 8,0 pH 8,0 mit HCI
Tris-HCI	1 M Tris base gewünschten pH mit HCI einstellen

#### Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Bei der Verfassung der Dissertation wurden keine anderen als die im Text angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet.

Ein Promotionsverfahren wurde zu keinem früheren Zeitpunkt an einer anderen Hochschule oder bei einem anderen Fachbereich beantragt.

Berlin, den 10.03.2015

Ulrich Koestner