

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborausstattung

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

2.1.2 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Tab. 2) wurden von Biotex (Berlin) bezogen. Der Name, die DNA-Sequenz, die Art (PCR-Amplifikat, doppelsträngiger Adaptor), der Verwendungszweck und der Name des Produkts sind aufgeführt.

Tab. 2: Verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz (5'-3')	Produkt / Zweck (Name)
Insm1_probe_Fw	CACCTTCTTCCGATGGTT	DNA-Sonde / Identifizierung <i>Insm1</i> -positiver Klone in der RPCI21-Bibliothek (Insm1-Fw-Rv)
Insm1_probe_Rv	TCTACTGCCACCGAACATCC	
INLA-5'-U	TCGAGGCTAGCGGCCGCCAC	Adaptor / Modifizierung der <i>lacZ</i> -Sequenz in INLA
INLA-5'-L	CATGGTGGCCGGCCGCTAGCC	
DTA.1	GCAGGTACCGGCCGCCGTTTAAACA TTTAAATGGCGCGCCTTAATTAAGCGG CCGCGGATCTGCATTCCACCAC	DTA-Kassette mit seltenen Restriktionsschnittstellen (DTA.1.3)
DTA.3	GCAGGGCCCCGCCGTCGAGCAGTGTG	
pDTA-3'-U	GGCCGCGGCGCGCCTTAATTAATTTA AATGTTTAAACGGCCGCCGAGCT	Adaptor / Einführen von seltenen Restriktionsschnittstellen in pBluescript SK II (+)- (pBS-) DTA.1.3 (pDTA-3')
pDTA-3'-L	CGGCCGGCCGTTTAAACATTTAAATTT AATTAAGGCGCGCCGC	
Insm1-GR-5'.1	GATCATCTCGAGGCTCCTGAGACTGAC	Homologer 5'-Arm / Herstellung des genomischen Subklons (Insm1-GR-5'.1.2)
Insm1-GR-5'.2	GATCATCCCGGGGTGAGTGTCCCTAG T	
Insm1-GR-3'.1	GATCATCCCGGGCACCTGGGGACCAA GTC	Homologer 3'-Arm / Herstellung des genomischen Subklons (Insm1-GR-3'.1.2)
Insm1-GR-3'.2	GATCATACTAGTTGCAGGAAAGAAA GTCATT	
Insm1-TC-5'.1	GATCATCTCGAGGCTGCGGACGCTCTG	Homologer 5'-Arm / Rekombination in den genomischen Subklon (Insm1-TC-5'.1.2)
Insm1-TC-5'.3	GATCATCCATGGTGGCCGCGGTGAAA AGGGC	
Insm1-TC-3'.1	GATCATICTAGAGTCCGGCCTGCTAGA GTG	Homologer 3'-Arm / Rekombination in den genomischen Subklon (Insm1-TC-3'.1.2)

Insm1-TC-3'.3	GATCATCCGCGCAAAGGAGTCACAG CGAGAA	
Insm1.9	TGCTGTCCCGCGCTAT	5'-DNA-Sonde / Identifizierung homologer Rekombination in ES-Zellen (Insm1.9.10)
Insm1.10	TTTGTTCCGGCACATTAGCAT	
Insm1.11	ACACTGTTTGGCTGCTAAGT	3'-DNA-Sonde / Identifizierung homologer Rekombination in ES-Zellen (Insm1.11.12)
Insm1.12	ACAGGGCTGAGGTAATGAC	
Insm1-lacZ_wt.1	CGTCGCCAGGCCTATCT	Genotypisierungsprimer
Insm1-lacZ_wt.2	ACCGAGGGCGCACTCTA	
Insm1-lacZ_Neo	ACCGCTTCCTCGTGCTTTA	
Insm1-lacZ_lacZ	GACCCGCATTGACCCTAA	
Insm1.1	GATCATAAGCTTAGAACTGTGCCTTCA CTCG	<i>In situ</i> -Sonde Insm1(3'-untranslatierte Region (UTR)) (Insm1.1.2)
Insm1.2	GATCATACTAGTAGCAGTTCACAAGCC ATAAT	
Insm1.7	GATCATCCATGGCCCGGGTTTC	<i>In situ</i> -Sonde Insm1(kodierende Sequenz) (Insm1.7.8)
Insm1.8	GATCATGAATTCCTAGCAGGCCGGAC GCAC	

2.1.3 Plasmidvektoren

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

Tab. 3: Verwendete Plasmidvektoren.

Name	Insert	Bezugsquelle/Referenz
pBluescript SK II (+)	-	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
pGEM-T Easy	-	Promega, Mannheim
pcDNA3.1 (+)	-	Invitrogen, Karlsruhe
pKS-DTA	<i>DTA</i> -Kassette	Mathias Treier, EMBL, Heidelberg
INLA	<i>lacZ</i>	Silvia Arber, Universität Basel, Schweiz
pBS-NLS-lacZ	<i>lacZ</i> mit nukleärer Lokalisierungssequenz (NLS) (modifiziertes <i>lacZ</i> aus INLA)	in dieser Arbeit kloniert
pALH28	eukaryotischer/prokaryotischer (dual) Promotor - <i>Neomycin/Kanamycin-loxP</i>	Vilen et al. (2001)
pACN	5'- <i>loxP-tACE-Cre</i> -3' (sich selbst ausschneidende <i>Cre</i> -Rekombinase)	Bunting et al. (1999)
pBS-tACE-Cre	<i>loxP-tACE-Cre</i> aus pACN in pBS	in dieser Arbeit kloniert
pBS-dual-Neo/Kan	5'- <i>dual-Neo/Kan-loxP</i> -3' aus pALH28 in pBS	in dieser Arbeit kloniert
pBS-Cre-Neo/Kan	5'- <i>loxP-tACE-Cre-dual-Neo/Kan-loxP</i> -3' in pBS	in dieser Arbeit kloniert
pLCN	5'- <i>NLS-lacZ</i> (aus pBS-NLS-lacZ) - <i>loxP-tACE-Cre-dual-Neo/Kan-loxP</i> -3' in pBS	in dieser Arbeit kloniert
pDTA	5'- seltene Schnittstellen - amplifizierte <i>DTA</i> -Kassette DTA.1.3 (aus pKS-DTA) - multiple Klonierungsstellen (MCS) - seltene Schnittstellen -3' in pBS	in dieser Arbeit kloniert
pcDNA-NLS-lacZ	<i>NLS-lacZ</i> aus pBS-NLS-lacZ in pcDNA3.1	in dieser Arbeit kloniert
pDTA-Insm1-gr	Insm1-GR-5'.1.2 - Insm1-GR-3'.1.2 in pDTA	in dieser Arbeit kloniert
pDTA-Insm1-sc	<i>Insm1</i> -Subklon in pDTA	in dieser Arbeit kloniert
pBS-Insm1-tc	Insm1-TC-5'.1.2 - <i>LCN</i> aus pLCN - Insm1-TC-3'.1.2 in pBS	in dieser Arbeit kloniert
pDTA-Insm1-tv	mutierter <i>Insm1</i> -Subklon in pDTA (der „targeting vector“)	in dieser Arbeit kloniert
pBS-Insm1-3'-UTR	amplifiziertes Fragment Insm1.1.2 in pBS	in dieser Arbeit kloniert
pBS-Insm1-CDS	amplifizierte kodierende Sequenz von <i>Insm1</i> (Insm1.7.8) in pBS	in dieser Arbeit kloniert

2.1.4 Bakterienstämme

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

Tab. 4: Verwendete Bakterienstämme.

Name	Genotyp	Bezugsquelle/Referenz
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRF'	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI^qZ\Delta M15 Tn10 (Tetr)]$	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> DH10B	F- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 endA1 araD139 \Delta(ara, leu)7697 galU galK \lambda-rpsL nupG$	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> DY380	DH10B [lcl857 (<i>cro-bioA</i>) $\langle \rangle tet$]	Lee et al. (2001a)
<i>Escherichia coli</i> EL350	DH10B [lcl857 (<i>cro-bioA</i>) $\langle \rangle araC-PBADcre$]	Lee et al. (2001a)

2.1.5 PAC-Klone und -Bibliotheken

In dieser Arbeit wurden PAC-Klone, die den genomischen Lokus des Mausgens *Insm1* enthielten, identifiziert und genutzt. Dafür wurden Membranen vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD, Berlin) bezogen, an die die DNA von rund 270000 PAC-Klonen der DNA-Bibliothek RPCI-21 in hoher Dichte gebunden war. Diese Bibliothek war aus genomischer DNA von weiblichen Mäusen des 129/SvEvTac-Stamms generiert worden und die enthaltenen PAC-Klone deckten das Genom ca. 10-fach ab (Osoegawa et al., 2000). Die Membranen wurden mit einer *Insm1*-spezifischen Sonde hybridisiert und *Insm1*-positive Klone konnten identifiziert werden. Der PAC-Klon L1640 (RPCIP711L1640Q2) wurde vom RZPD bezogen und für die Klonierung des „targeting vector“ verwendet.

2.1.6 Antikörper

In Tab. 5 sind die verwendeten polyklonalen Primär-Antikörper aufgelistet, die die genannten murinen Antigene binden. Die verwendete Verdünnung für die Immunhistologie und die Bezugsquelle des Antikörpers ist angegeben. Die benutzten Sekundär-Antikörper für Fluoreszenzimmunhistologie waren anti-Maus-, anti-Kaninchen-, anti-Ziege- oder anti-Meerschweinchen-IgG-Antikörper, jeweils gekoppelt an Cy2, Cy3 oder Cy5 (alle Dianova, Hamburg); sie wurden 1:500 eingesetzt. Für die Immunhistochemie mit DAB als Peroxidasesubstrat wurde ein anti-Ziege-IgG-Sekundär-Antikörper gekoppelt an Peroxidase (Dianova) 1:500 eingesetzt.

Tab. 5: Verwendete Primär-Antikörper. Der anti- β -Galaktosidase-Antikörper aus der Ziege wurde für die Fluoreszenzimmunhistologie 1:1000 und für die Immunhistochemie mit DAB als Peroxidasesubstrat 1:5000 eingesetzt.

Antigen	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
Amylase	Kaninchen	1:100	Santa Cruz, Heidelberg
Arx	Kaninchen	1:500	Ahmed Mansouri, MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen
β -Galaktosidase	Ziege	1:1000 1:5000	Serotec, Düsseldorf
β -Galaktosidase	Kaninchen	1:10000	ICN Biochemical, Eschwege
Chromogranin A	Kaninchen	1:1000	ImmunoStar, Hudson, WI, USA
Ghrelin	Kaninchen	1:2000	Cathrine Tomasetto, INSERM, Straßburg, Frankreich
Ghrelin	Ziege	1:1000	Santa Cruz
Glukagon	Kaninchen	1:1000	ImmunoStar
Glukagon	Meerschweinchen	1:1000	Linco, St. Charles, MO, USA
Glut2	Ziege	1:1000	Santa Cruz
IAPP	Kaninchen	1:1000	Progen, Heidelberg
Insulin	Kaninchen	1:1000	ImmunoStar
Insulin	Meerschweinchen	1:1000	Serotec
Isl1	Meerschweinchen	1:20000	Tom Jessell, Columbia University, NY, USA
MafA	Meerschweinchen	1:20000	Hagen Wende, Labor von C. B
MafB	Meerschweinchen	1:20000	Hagen Wende
NeuroD1	Ziege	1:500	Santa Cruz
Ngn3	Kaninchen	1:2000	Michael German, University of California in San Francisco, San Francisco, CA, USA
Nkx2.2	Meerschweinchen	1:4000	Beatriz Sosa-Pineda, St. Jude's Children's Hospital, Memphis, TN, USA
NKX6.1	Meerschweinchen	1:500	Maike Sander, University of California in Irvine, CA, USA
Pdx1	Kaninchen	1:500	Chemicon, Hampshire, UK
PP	Kaninchen	1:500	Chemicon
PC 1/3	Kaninchen	1:100	Chemicon
PC 2	Kaninchen	1:100	Chemicon
Ptf1a	Kaninchen	1:500	Helena Edlund, Umeå universitet, Umeå, Schweden
Somatostatin	Kaninchen	1:500	Dako, Hamburg

2.1.7 Eukaryotische Zelllinien

Es wurden COS-1 Zellen (Gluzman, 1981) aus dem Labor von C. B. verwendet, um bestimmte DNA-Konstrukte (pcDNA-NLS-lacZ) zu testen. Des Weiteren wurden embryonale Mausfibroblasten und Stammzellen für die Herstellung von Mäusen genutzt, die heterozygot für das *Insm1*^{lacZ}-Allel waren. Die Neomycin-resistenten Fibroblasten waren im Labor von C. B. aus Mäusen des Stamms ros^{ex} (Sonnenberg-Riethmacher et al., 1996) *ex vivo* isoliert, anschließend kultiviert und in flüssigem Stickstoff gelagert worden. Für die Kultur und Transfektion von ES-Zellen zur Herstellung transgener Mäuse wurde die embryonale Stammzelllinie E14.1 aus dem Mausstamm 129/OlaHsd (Kühn et al., 1991) verwendet. In dieser Arbeit wurde ein Aliquot wenig passagierter ES-Zellen aus dem Labor von C. B. benutzt.

2.1.8 Mausstämme

Für die Etablierung der Mausstämme mit dem *Insm1^{lacZ}*-Allel und die Stammhaltung wurden der C57BL/6J-Inzuchtstamm und der CD1-Auszuchtstamm verwendet. Die Tiere für die Stammhaltung wurden von der Tierhaltung des MDC bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Standardmethoden waren von Sambrook and Russell (2001) abgeleitet und sind hier nicht näher behandelt. DNA-Konstrukte wurden von Karin Gottschling im Labor von C. B. sequenziert.

2.2.1.1 DNA-Isolierung und -Aufreinigung

2.2.1.1.1 Präparation von Plasmid-DNA, PAC-DNA und DNA-Fragmenten

Die Mini-Präparation von Plasmid-DNA erfolgte durch alkalische Lyse. Die Plasmid-DNA wurde zum Schluss meist in 50 µl TE mit 0,2 µg/µl RNase A gelöst und bei 4°C gelagert. Die Präparation von Plasmid-DNA im größeren Maßstab erfolgte mit dem Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) oder dem NucleoBond PC-500 Kit (Machery-Nagel, Düren) gemäß Herstellerangaben. Die DNA wurde dabei meist in 50-100 µl TE gelöst und bei -20°C gelagert.

Für die Präparation von PAC-DNA wurde ebenfalls die Methode der alkalischen Lyse benutzt. Dafür wurden 5-50 ml Übernacht-Bakterienkulturen verwendet, deren Plasmid-DNA zum Schluss in einem passenden Volumen H₂O oder TE aufgenommen und bei 4°C gelagert wurde.

Die präparative Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) oder dem NucleoSpin-Extract II-Kit (Machery-Nagel) gemäß Herstellerangaben. Die DNA wurde dabei meist ein- bis zweimal mit 10-25 µl TE eluiert und bei -20°C gelagert.

2.2.1.1.2 Isolierung genomischer DNA aus embryonalem Gewebe und Biopsien

Die Isolierung genomischer DNA aus embryonalem Gewebe und Biopsien für PCR-Analysen erfolgte aus Gewebestücken frisch präparierter Embryonen und Ohrloch- oder Schwanzbiopsien von Mäusen. Die Gewebestücke wurden über Nacht (üN) in 10-30 µl in Schwanzpuffer mit 20-40 µg/ml Proteinase K bei 55°C verdaut. Die Proteinase K wurde

danach 10 min bei 95°C hitzeinaktiviert und der Gewebeerddau 1:10-1:20 mit Wasser aus einer Ultrafiltrationsanlage (Milli-Q UF Plus; Millipore, Schwalbach) (MilliQ-H₂O) verdünnt.

Die Isolierung genomischer DNA aus embryonalem Gewebe für die Southern-Blot-Analyse erfolgte aus Lebern, die nach der Präparation von E18.5 Mausembryonen bei -20°C eingefroren worden waren. Jede Leber wurde in 2 ml PBS homogenisiert, das Homogenat schnell in 10-25 Volumen DNA-Extraktionspuffer mit 10 µg/ml RNase A gegeben und darin 1 h bei 37°C inkubiert. Dann wurde 100 µg/ml Proteinase K zugegeben und die Suspension 3 h bei 55°C verdaut. Es folgte die DNA-Extraktion mit Phenol und anschließender Ethanolpräzipitation. Die präzipitierte DNA wurde mit einer Pasteurpipette geangelt, 5 min mit 70 % Ethanol gewaschen, kurz abgetropft, mehrere Tage in einem passenden Volumen TE gelöst und bei 4°C gelagert.

2.2.1.1.3 Isolierung und Restriktionshydrolyse genomischer DNA aus ES-Zellen

Es wurde genomische DNA aus ES-Zellen isoliert, die in gelatinisierten 96- oder 6-Loch-Platten (s. 2.2.2.4.1, 2.2.2.4.3) kultiviert worden waren. Die Zellen in 96-Loch-Platten wurden dafür zweimal mit PBS gewaschen und dann ün in 50 µl ES-Zellysepuffer pro Loch bei 60°C in einer Feuchtkammer verdaut. Die DNA wurde dann 30 min mit 100 µl Ethanol-Natriumacetat-Mix pro Loch bei Raumtemperatur (RT) gefällt, dreimal mit 70 % Ethanol gewaschen und mit den Platten kopfüber 15-20 min luftgetrocknet. Die anschließende Restriktionshydrolyse der ES-Zell-DNA wurde mit 20 U des passenden Restriktionsenzym pro Loch in einem 35 µl-Ansatz durchgeführt. Dieser wurde auf die gefällte DNA gegeben und ün bei 37°C inkubiert, dabei wurden die abgedichteten Platten bei 100 rpm in einem Bakterieninkubator geschwenkt. Die gespaltene DNA wurde dann elektrophoretisch aufgetrennt und für die Southern-Blot-Analyse (s. 2.2.1.3) verwendet.

Die Zellen in 6-Loch-Platten wurden mit PBS gewaschen, mit 0,5 ml ES-Zellysepuffer pro Loch 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 (s. 2.2.1.3) mit einer größeren Menge DNA (5-10 µg) pro Ansatz.

2.2.1.1.4 Aufreinigung von Plasmid-DNA, PAC-DNA und DNA-Fragmenten

Die Entsalzung von Plasmid- und PAC-DNA sowie von DNA-Fragmenten für die Transformation mittels Elektroporation (s. 2.2.2.1) erfolgte durch Mikrodialyse mit einer Nitrozellulosemembran (MF disc MCE philic, Porengröße 0,025 μm , Durchmesser 25 mm; Millipore).

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Restriktionshydrolysen oder PCI-Extraktionen erfolgte im Allgemeinen durch Gelfiltration mit Sephadex G-50-Säulen. Dafür wurde Sephadex G-50 mit TE üN bei 4°C gesättigt; eine passende Menge wurde in eine 1 ml Insulin-Spritze gegeben, die zuvor mit einer 0,45 μm Fritte verschlossen worden war. Überschüssiges TE wurde dann 3 min mit 1800 rpm in einer Bodenzentrifuge (Heraeus Varifuge 3.0; Thermo, Langenselbold) abzentrifugiert. Auf diese vorbereitete Säule wurde das Probenvolumen gegeben, erneut 3 min mit 1800 rpm zentrifugiert und die aufgereinigte Probe in einem Gefäß aufgefangen.

2.2.1.2 PCR

Die PCR wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Klonierung und die Genotypisierung eingesetzt. Dafür wurden PCR-Standardmethoden (Sambrook and Russell, 2001) angewendet und PCR-Maschinen von Bio-Rad (München) und Biometra (Göttingen) benutzt. Verwendet wurden die folgenden Polymerasen mit den entsprechenden Puffern gemäß Herstellerangaben: Taq (Invitrogen), Pyrobest, LA-Taq (beide von Takara, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich; bezogen von Cambrex, Potsdam), PfuUltra (Stratagene) sowie das Advantage GC 2 PCR Kit (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich). Für die präparative PCR wurde das Amplifikationsprodukt entweder PCI-extrahiert oder elektrophoretisch aufgetrennt und dann isoliert.

Die Routine-Genotypisierung wurde mit DNA durchgeführt, die aus embryonalem Gewebe oder Biopsien extrahiert worden war (s. 2.2.1.1.2). Ein Reaktionsansatz enthielt 1-2 μl des hitzeinaktivierten Lysats, 2 μl dNTPs (2,5 mM je Nukleotid; Invitrogen, Berlin), 2 μl 10x Puffer (Invitrogen), 1,2 μl Primer 1 (5 μM Insm1-lacZ_wt.2), 1,2 μl Primer 2 (5 μM Insm1-lacZ_wt.1 oder Insm1-lacZ_lacZ), 1 μl DMSO, 0,8 μl 50 mM MgCl_2 (Invitrogen), 0,15 μl Taq und MilliQ- H_2O auf 20 μl . Das PCR Programm umfasste 5 min 94°C, 35x den Zyklus 30 s 95°C, 20 s 57°C und 1 min 72°C, schließlich folgte 4°C.

2.2.1.3 Southern-Blot-Analyse

2.2.1.3.1 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Zur Herstellung von radioaktiv-markierten DNA-Sonden für Southern-Blot-Analysen wurde das Prime-It RmT Random Primer Labeling-Kit (Stratagene) gemäß Herstellerangaben verwendet. In den Reaktionsansatz wurden 25-50 ng der gereinigten DNA-Matrize (s. 2.2.1.1) und nach deren Denaturierung 5 μ l α -³²P-dCTP mit 1,85 MBq (EasyTides, 25 μ l mit 250 μ Ci (9,25 MBq); PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim) gegeben und für 10 min bei 37°C inkubiert. Die markierte Sonde wurde auf eine vorbereitete MicroSpin G-50 Säule (GE Healthcare, München) gegeben und 3 min mit 2000 rpm in einer Tischzentrifuge (Centrifuge 5417; Eppendorf, Hamburg) bei RT durch die Säulen in ein Reaktionsgefäß zentrifugiert, in dem 10 μ g genomische DNA vorgelegt worden waren. Es wurde 1 ml Southern-Hybridisierungslösung zugeben, 10 min bei 95°C denaturiert und dann 30 min bei 65°C prähybridisiert. Danach wurde die Sonde für die Southern-Hybridisierung eingesetzt.

2.2.1.3.2 Southern-Blotting

Am ersten Tag des Southern-Blottings wurde das Agarosegel mit der aufgetrennten DNA 8 min in Depurinierungspuffer bei RT geschwenkt und dann kurz in vollentsalztem (VE-) Wasser gespült. Sodann wurde das Gel zweimal 20 min in Denaturierungspuffer inkubiert und anschließend 5 min mit 20x SSC gewaschen. Das Gel wurde nun mit den Taschen nach unten auf eine Glasplatte gelegt, von oben mit 20x SSC befeuchtet und eine in MilliQ-H₂O vorinkubierte, der Gelgröße entsprechende, Nitrozellulosemembran (Hybond N+; GE Healthcare) luftblasenfrei angedrückt. Drei ebenso große Whatman-Papiere, die kurz in 20x SSC eingeweicht worden waren, wurden daraufhin luftblasenfrei angedrückt und mit einer dicken Lage aus Papiertüchern überdeckt. Darauf wurde eine zweite Glasplatte gelegt und der gesamte Aufbau umgedreht, um den Transfer der DNA durch die Schwerkraft zu unterstützen. Am nächsten Tag wurde der Aufbau zerlegt, die Membran luftgetrocknet, zweimal kurz in 2x SSC gewaschen und dann für Hybridisierungen eingesetzt oder bei RT gelagert.

2.2.1.3.3 Southern-Hybridisierung

Die Southern-Hybridisierung wurde zur Identifizierung von Klonen, die den *Insm1*-Lokus enthalten, mit den Membranen der RPCI21-Bibliothek durchgeführt. Zudem wurden Membranen aus Southern-Blots hybridisiert, um die homologe Rekombination des *Insm1*-Lokus im Genom von ES-Zellen zu identifizieren.

Am ersten Tag der Southern-Hybridisierung wurde die Membran des Southern-Blots oder der RPCI21-Bibliothek kurz in VE-Wasser vorinkubiert und dann mit Hilfe einer Messpipette luftblasenfrei an die Innenwand einer Hybridisierungsröhre abgewickelt, so dass die Seite mit der immobilisierten DNA ins Innere der Röhre wies. Sodann wurde die Membran mindestens 30 min in 10 ml Hybridisierungslösung in einem Rollofen (OV4 Compact Line Hybridization Oven; Biometra) bei 65°C prähybridisiert. Anschließend wurde die denaturierte, radioaktiv-markierte DNA-Sonde zugegeben und üN bei 65°C hybridisiert.

Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung entsorgt, 5 min mit 1x SSC/1 % SDS in der Röhre bei 65°C gewaschen und 5 min mit 1x SSC/0,1 % SDS in der Röhre bei 65°C gewaschen. Die Membran wurde dann in einer Schale in ein 65°C-Wasserbad überführt und dort zweimal mindestens 30 min mit 0,5x SSC/0,1% SDS gewaschen. Die Membran wurde schließlich feucht in Plastikfolie verpackt.

Zur Autoradiographie wurde ein Röntgenfilm (Kodak BioMax MR; Kodak, Stuttgart) auf die Membran gelegt, bei -70°C exponiert und nach 1-7 d entwickelt. Die Hybridisierungsmuster auf den Membranen der RPCI21-Bibliothek wurde gemäß der Angaben des RZPD analysiert und die identifizierten Klone bestellt.

2.2.1.4 Microarray-Expressionsanalyse

2.2.1.4.1 RNA-Isolierung und -Aufreinigung

Die Microarray-Expressionsanalyse für die Identifizierung differentiell exprimierter Gene wurde an RNA durchgeführt, die aus Pankreata von E15.5 und E18.5 Mausembryonen isoliert worden war. Die Pankreata von Wildtyp- und homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Embryonen wurden in kaltem PBS_{DEPC} herauspräpariert, in RNAlater gegeben und darin üN bei 4°C inkubiert. Danach wurden in vier (E15.5) und drei (E18.5) unabhängigen Ansätzen je drei Pankreata (E15.5) bzw. 1 Pankreas (E18.5) in 500 µl Trizol gesammelt und homogenisiert. Jede Suspension wurde mit Trizol auf 1600 µl aufgefüllt. Es wurden 320 µl Chloroform zugegeben und 15 s vermischt. Anschließend wurde 15 min mit 10000 x g in einer Tischkühlzentrifuge (Universal 32R; Hettich, Tuttlingen) bei 4°C zentrifugiert, die obere

Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 2 µl Polyacrylträger (MRC; Fermentas, St. Leon-Rot) zugegeben. Nun wurden 0,83 Volumen Isopropanol zugegeben, die Lösung dann 10 min bei RT inkubiert und die gesamte RNA 10 min mit 12000 x g in einer Tischkühlzentrifuge bei 4°C präzipitiert. Das Pellet wurde mit 1,5 ml 75 % Ethanol gewaschen, 2 min mit 14000 rpm in einer Tischzentrifuge (Centrifuge 5417; Eppendorf) bei RT abzentrifugiert, luftgetrocknet und in 100 µl H₂O_{DEPC} für die Säulenaufreinigung aufgenommen.

Die Säulenaufreinigung totaler RNA erfolgte mit dem RNeasy MinElute Cleanup-Kit (Qiagen) gemäß Herstellerangaben. Die RNA wurde zweimal mit 11 µl H₂O_{DEPC} eluiert und die Konzentration photometrisch mit 1 µl RNA-Lösung in 80 µl H₂O_{DEPC} bestimmt. Die RNA wurde nun für die cDNA-Synthese verwendet oder bei -70°C gelagert.

2.2.1.4.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese für die *in vitro*-Transkription und Biotin-Markierung von cRNA wurde mit dem SuperScript Double-Stranded cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Der Reaktionsansatz für die Erststrangsynthese enthielt 1 µl 100 µM Oligo-(dT)₂₄-T7 Primer (MWG, Ebersberg) und 8 µg gesamte RNA aus der Säulenaufreinigung (s. 2.2.1.4.1). Der Ansatz wurde mit H₂O_{DEPC} auf 12 µl aufgefüllt und 10 min bei 70°C erhitzt. Dann wurden 4 µl 5x Erststrangpuffer, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTPs und nach einer Inkubation von 2 min bei 42°C, 1 µl Superscript III RT (Invitrogen) zugegeben. Die Erststrangsynthese erfolgte für 1 h bei 42°C.

Das Produkt wurde danach auf Eis gekühlt; der Reaktionsansatz für die Zweitstrangsynthese erwärmte sich nie über 16°C. Zum Probenvolumen der Erststrangsynthese wurden 91,6 µl H₂O, 30 µl second strand buffer, 2,4 µl 12,5 mM dNTPs, 1 µl *E. coli* DNA Ligase, 4 µl *E. coli* DNA Polymerase, 1 µl *E. coli* RNase H gegeben und der Zweitstrang 2 h bei 16°C synthetisiert. Nun wurden 2 µl T4 DNA Polymerase zugegeben, für 5 min bei 16°C inkubiert und die Reaktion mit 10 µl EDTA abgestoppt.

Für die Aufreinigung der cDNA wurden 162 µl PCI zum Reaktionsansatz gegeben, kurz gemischt und in ein vorbereitetes Reaktionsgefäß mit Phase Lock Gel (Eppendorf) gegeben. Dann wurde 2 min mit 14000 rpm in einer Tischzentrifuge (Centrifuge 5417; Eppendorf) zentrifugiert, die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die cDNA mit 0,5 Volumen 7,5 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumen von -20°C kaltem 100 % Ethanol gefällt. Die cDNA wurde 2 min mit 14000 rpm pelletiert, mit 80 % Ethanol gewaschen, 2 min mit 14000 rpm abzentrifugiert, luftgetrocknet und in 12 µl H₂O_{DEPC}

aufgenommen. Diese cDNA-Lösung wurde danach zur Herstellung Biotin-markierter cRNA verwendet.

2.2.1.4.3 *In vitro*-Transkription und Biotin-Markierung von cRNA

Die *in vitro*-Transkription und Biotin-Markierung von cRNA erfolgte mit der aufgereinigten cDNA-Lösung (s. 2.2.1.4.2) und dem IVT Labeling Kit (Affymetrix, High Wycombe, UK). Ein Reaktionsansatz enthielt 6 µl cDNA-Lösung, 4 µl MilliQ-H₂O, 2 µl IVT Labeling-Puffer und 6 µl IVT Labeling NTP-Mix, 6 µl IVT Labeling NTP-Mix, 2 µl IVT Enzymmix und wurde ca. 16 h bei 37°C inkubiert. Die Biotin-markierte cRNA wurde danach mit dem GeneChip Sample Cleanup Module (Affymetrix) aufgereinigt und zweimal mit 15-25 µl MilliQ-H₂O eluiert. Dann wurde die Konzentration und die Fragmentgrößen der markierten cRNA photometrisch bzw. elektrophoretisch bestimmt und 15 µg cRNA für die Hybridisierung von Microarrays eingesetzt.

2.2.1.4.4 Microarray-Hybridisierung

Die Biotin-markierte cRNA wurde gemäß Herstellerangaben auf Affymetrix MOE430 2.0 microarrays hybridisiert. Pro Genotyp wurden je vier (E15.5) bzw. drei (E18.5) Microarrays hybridisiert. Die Hybridisierung der cRNA und die Aufzeichnung der Hybridisierungsergebnisse wurden als Dienstleistung von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Norbert Hübner (Experimentelle Genetik von Herz-Kreislaufkrankungen, MDC) durchgeführt. Die Expressionsrohdaten, bestehend aus den Hybridisierungsintensitäten, wurden im Rahmen dieser Arbeit weiter bearbeitet und analysiert (s. 2.2.5.3).

2.2.2 Bakterien- und Zellkultur

2.2.2.1 Bakterientransformation

Die Transformation von Bakterien mit Plasmid- und PAC-DNA sowie von Ligationsansätzen erfolgte durch Hitzeschock von chemisch-kompetenten Zellen des Bakterienstamms *E. coli* XL1-Blue MRF['] gemäß Sambrook and Russell (2001) oder durch Elektroporation elektro-kompetenter Zellen. Für die Elektroporation wurde dialytisch aufgereinigte DNA (s. 2.2.1.1.4) in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Gene Pulser Küvetten, Spaltgröße 0,1 cm; Bio-Rad) zu kalten, elektro-kompetenten Zellen der Bakterienstämme *E. coli* DY380 und EL350 (s. 2.2.2.2) gegeben und gemischt. Mit einem Elektroporator (MicroPulser; Bio-Rad) wurden die Zellen mit 1,80 kV, 25 µF und 200 Ω transformiert. Sie wurden dann sofort in warmes LB-Medium aufgenommen und bis zu

1,5 h bei 32°C inkubiert. Danach wurden verschiedene Mengen auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Selektionsantibiotika ausplattiert und üN bei 32°C kultiviert.

2.2.2.2 Homologe Rekombination in Bakterien

Die homologe Rekombination in Bakterien (Lee et al., 2001a; Yu et al., 2000) wurde zur Klonierung eines DNA-Konstrukts für die gezielte Mutagenese des *Insm1*-Lokus in ES-Zellen verwendet. Dafür wurden elektro-kompetente Zellen der Bakterienstämme *E. coli* DY380 und EL350, die z. T. bereits PAC- oder Plasmid-DNA enthielten, benötigt. Aus einem Glycerinstock wurden 5 ml LB-Medium mit den passenden Antibiotika angeimpft und üN bei 32°C kultiviert. Dann wurden 100 ml LB-Medium mit den passenden Antibiotika mit 1 ml dieser Vorkultur angeimpft und bei 32°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert.

Sollten DY380- und EL350-Zellen mit PAC- oder Plasmid-DNA transformiert werden, wurde die Bakterienkultur danach in 50 ml-Gefäße verteilt, 10 min in Eiswasser gekühlt, 10 min bei 2500 rpm in einer Bodenkühlzentrifuge (Avanti J-20 XP; Beckman Coulter, Krefeld) bei 4°C zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde in 50 ml 10 % Glycerin in Eiswasser in einem Kühlraum resuspendiert, 10 min mit 4000 rpm bei 4°C abzentrifugiert, wieder in 50 ml 10 % Glycerin aufgenommen, erneut 10 min mit 6000 rpm bei 4°C pelletiert, nochmals in 50 ml 10 % Glycerin aufgenommen und zum Schluss 10 min mit 8000 rpm bei 4°C abzentrifugiert. Die Zellen wurden in einem möglichst kleinen Volumen 10 % Glycerin aufgenommen und in 26-µl-Aliquots aufgeteilt. Sie wurden nun direkt für die Elektroporation verwendet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

Zur Induktion der homologen Rekombination in DY380-Zellen und anschließender Transformation wurden die Zellen nach der Kultivierung für 15 min bei 42°C inkubiert. Danach wurden sie wie oben für die Transformation vorbereitet.

Für die Induktion der Cre-Rekombinase in EL350-Zellen, die bereits Plasmid-DNA enthielten, erfolgte die Kultur der Zellen bei 32°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4. Danach wurde L(+)-Arabinose zugegeben (Endkonzentration 0,1 %), und die Zellen 1 h bei 32°C inkubiert.

2.2.2.3 Kultur embryonaler Fibroblasten

Um Fibroblastenzellen für die spätere Kultur von embryonalen Stammzellen (ES) in Kultur zu nehmen, wurde ein Aliquot der Zellen schnell bei 37°C aufgetaut und in 9 ml Fibroblastenmedium bei RT vermischt. Nach 3 min Zentrifugation mit 1100 rpm in einer Bodenzentrifuge (Heraeus Varifuge 3.0; Thermo) wurden die Zellen pelletiert und in Medium resuspendiert und danach in 15 cm-Zellkulturschalen in 15 ml Medium ausplattiert und bei 37°C und 7,5 % (v/v) CO₂ in einem Inkubator (BB6220C4; Thermo) kultiviert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt, bis die Zellen konfluent waren und geteilt, eingefroren oder teilungsinaktiviert wurden.

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 pelletiert, in Medium aufgenommen und in 15 cm-Schalen ausplattiert.

Vor dem Einfrieren der Zellen wurden sie wie oben abgelöst und pelletiert, zum Schluss in 0,5 ml Medium pro Kryoröhrchen resuspendiert und auf unter 4°C gekühlt. Dann wurden 0,5 ml eiskaltes Einfriermedium pro Kryoröhrchen langsam 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 2 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Medium entfernt, zweimal mit PBS gewaschen und neues Medium zugegeben oder die Zellen wurden abgelöst und neu ausplattiert.

2.2.2.4 Kultur, Transfektion und Selektion von ES-Zellen

2.2.2.4.1 Kultur von ES-Zellen

Um ES-Zellen für die Mutagenese des *Insm1*-Lokus in Kultur zu nehmen, wurde ein Aliquot der Zellen schnell bei 37°C aufgetaut und mit 9 ml ES-Zellmedium bei RT gemischt. Die Zellen wurden 3 min mit 900 rpm in einer Bodenzentrifuge (Heraeus Varifuge 3.0; Thermo) pelletiert, in 5 ml Medium aufgenommen, sorgfältig vereinzelt und in einer mit teilungsinaktivierten Fibroblasten dicht bewachsenen 6-cm-Zellkulturschale (s. 2.2.2.3) ausplattiert und bei 37°C und 7,5 % (v/v) CO₂ 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 sichtbar waren). Die Zellen wurden dann wie Fibroblasten (s. 2.2.2.3) mit 1-3 ml Trypsin-

EDTA abgelöst, bei 900 rpm pelletiert, immer in ES-Zellmedium aufgenommen und vor dem Ausplattieren 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 (s. 2.2.2.4.2) verwendet wurden. Die ES-Zellen wurden wie Fibroblasten (s. 2.2.2.3) eingefroren, nur dass ES-Zellmedium statt Fibroblastenmedium verwendet wurde.

Nach der Southern-Blot-Analyse (s. 2.2.1.3) wurden ausgewählte ES-Zellklone, die positiv für das *Insm1*^{lacZNeo}-Allel waren, von den eingefrorenen 96-Loch-Platten (s. 2.2.2.4.3) in Kultur genommen. Dafür wurde die Zellsuspension eines Lochs schnell erwärmt, in eine mit teilungsinaktivierten Fibroblasten dicht bewachsenen 48-Loch-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-Loch-Platten expandiert. Zudem wurden währenddessen Aliquots der Zellen weggefroren. Zum Schluss wurden die Zellen von den 6-Loch-Platten nochmals auf mit teilungsinaktivierten Fibroblasten dicht bewachsene 6-Loch-Platten und gelatinisierte 6-Loch-Platten (s. 2.2.2.4.3) aufgeteilt. Die Zellen von Ersteren wurden nach ausreichender Kultur weggefroren, die Zellen von Letzteren wurden 7-8 d kultiviert und dann für die DNA-Isolierung aus ES-Zellen (s. 2.2.1.1.3) und letztlich Southern-Blot-Analysen (s. 2.2.1.3) verwendet.

ES-Zellklone, die in Blastozysten injiziert werden sollten, wurden vorher in mit teilungsinaktivierten Fibroblasten dicht bewachsenen 6-Loch-Platten mit ES-Zellmedium kultiviert. Am Tag der Injektion wurden die Zellen abgelöst und in 0,5 ml ES-Zellmedium in einer 24-Loch-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 des MDC (TCF) durchgeführt (s. 2.2.3.1).

2.2.2.4.2 Transfektion von ES-Zellen

Für die Transfektion von ES-Zellen mit dem DNA-Konstrukt zur gezielten Mutagenese des *Insm1*-Lokus wurden mehrere dicht mit ES-Zellen bewachsene 10-cm-Zellkulturschalen verwendet (s. 2.2.2.4.1). Das „targeting construct“ zur Transfektion von ES-Zellen wurde zuvor aus dem „targeting vector“ freigesetzt. Der Restriktionsansatz

enthielt 80 µg Plasmid-DNA in 300 µl und wurde mit 100 U des Enzyms *PacI* in 100 µl bei 37°C inkubiert. Danach wurde die DNA mit PCI extrahiert, Ethanol-präzipitiert, schließlich auf 1 µg/µl mit sterilem TE eingestellt und bei 4°C gelagert.

Die ES-Zellen wurden zur Transfektion abgelöst (s. 2.2.2.4.1), in 10 ml PBS aufgenommen und sorgfältig vereinzelt. Die Zellzahl wurde in einer Neubauerkammer bestimmt, die Zellen pelletiert und mit PBS auf $1,2 \cdot 10^7$ Zellen/ml eingestellt. In eine Elektroporationskuvette (Gene Pulser Kuvette, 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 Elektroporator (Elektroporations-Impulsgenerator; 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.

2.2.2.4.3 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 und am neunten Tag nach der Elektroporation konnte mit dem Aufnehmen von runden, klar begrenzten, nicht zu großen, 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 ein Loch einer 96-Loch-Zellkulturplatte gegeben. Nachdem eine Platte komplett war, wurden je Loch 25 µl Trypsin-EDTA zugegeben und die Zell-Zell-Kontakte 3-5 min bei 37°C gelöst. Dann wurden je Loch 50 µl Medium zugegeben, die Zellen sorgfältig 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-Loch-Platten mit 150 µl 0,1 % Gelatine in PBS pro Loch für 20 min gelatinisiert und luftgetrocknet. Die ES-Zellen wurden mit 100 µl PBS pro Loch gewaschen, mit 25 µl Trypsin-EDTA abgelöst (s. 2.2.2.4.1) und es wurden 25 µl Medium zugegeben. Die Hälfte dieser Suspension wurde

nun in die Löcher 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 d kultiviert; dabei wurde das Medium jeden Tag gewechselt. Die Zellen wurden dann für die DNA-Isolierung aus ES-Zellen (s. 2.2.1.1.3) und die Southern-Blot-Analyse (s. 2.2.1.3) verwendet, die letztlich zur Identifizierung von ES-Zellklonen führte, die das „targeting construct“ homolog in ihr Genom rekombiniert hatten.

Die Zellen in den Platten mit Fibroblasten wurden 2 d 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 bei -70°C eingefroren. Ausgewählte ES-Zellklone, die positiv für das *Insm1^{lacZNeo}*-Allel waren, wurden ausgehend von diesen Platten expandiert (s. 2.2.2.4.1) und schließlich in Blastozysten injiziert (s. 2.2.3.1).

2.2.2.5 Kultur, Transfektion und Färbung von COS1-Zellen

Die COS1-Zellen für die Transfektion mit Plasmidvektoren wurden wie Fibroblasten (s. 2.2.2.1) in Fibroblastenmedium kultiviert. Die Zellen wurden nach ausreichender Kultur mit dem Vektor pcDNA-NLS-lacZ (s. 2.1.3) mittels Lipofectamin (Invitrogen) gemäß Herstellerangaben transfiziert. Damit ließ sich die Integrität der kodierenden Sequenz von *NLS-lacZ* überprüfen, da die exprimierte β-Galaktosidase durch eine Färbung nachweisbar war.

Für den Nachweis der β-Galaktosidase wurden die Zellen 48 h nach der Transfektion 10 min in 4 % PFA in PBS bei RT fixiert, zweimal kurz mit PBS gewaschen und üN in lacZ-Färbelösung bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden danach zweimal mit PBS gewaschen und die Reaktion damit abgestoppt.

2.2.3 Mausezucht und -präparation

2.2.3.1 Erzeugung von heterozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tieren

Zur Erzeugung von Maustämmen mit heterozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tieren wurden zuerst chimäre Mäuse hergestellt. Dafür wurden vom TCF drei ES-Zellklone mit dem *Insm1^{lacZNeo}*-Allel in Blastozysten aus dem Stamm C57BL/6 injiziert und diese wiederum in den Uterus scheinchwangerer Weibchen vom Stamm CB6F1 transferiert. Mit den Nachkommen, die dann chimär für die mutierten ES-Zellen waren, konnte ein mutanter Mausstamm etabliert werden.

Die chimären Männchen wurden mit Weibchen vom Stamm C57BL/6 verpaart, um heterozygote *Insm1^{lacZ}*-Tiere zu erzeugen. Die Nachkommen mit braunem Fell waren im Gegensatz zu jenen mit schwarzem Fell aus den injizierten ES-Zellen entstanden, die Teil der Keimbahn der Chimären geworden und somit an ihre Nachkommen weitergegeben worden waren. Die Weitergabe des *Insm1^{lacZNeo}*-Allels durch die männliche Keimbahn hatte zugleich zur Folge, dass die sich selbst ausschneidende *Cre-Neo/Kan*-Resistenzkassette durch Rekombination deletiert wurde (Bunting et al., 1999) und nur eine *loxP*-Stelle im Genom der Nachkommen verblieb. Die braunen Nachkommen wurden mit Hilfe der PCR genotypisiert und heterozygote Tiere dann für die Zucht verwendet.

Heterozygote *Insm1^{lacZ}*-Mäuse mit dem gemischten 129/Ola-C57BL/6-Hintergrund wurden mit Mäusen des Auszuchtstamms CD1 verpaart, um die embryonale Letalität zu mildern. Dafür wurden CD1-Weibchen über zwei bis drei Generationen in den mutanten Stamm eingekreuzt, so dass Tiere mit gemischtem CD1-129/Ola-C57BL/6-Hintergrund entstanden.

2.2.3.2 Präparation von Mausembryonen und Mausgewebe

Es wurden hier *Insm1^{lacZ}/+*-Tiere miteinander verpaart, um so *Insm1^{lacZ}/Insm1^{lacZ}*-Tiere zu erhalten. Zur Abschätzung des Alters der Embryonen wurde am Tag des Vaginalpfropfens beim Weibchen 12:00 Uhr als 0,5 d nach Koitus/der Embryonalentwicklung (E0.5) angenommen. Schwangere Weibchen wurden durch Rückgratdislokation getötet, E9.5-E15.5 Embryonen dem Uterus entnommen, schnell in eiskaltes PBS überführt, dekapitiert und präpariert. E18.5 Embryonen wurden den Weibchen entnommen, zur Spontanatmung animiert und dabei trocken und warm gehalten. Zur Präparation wurden die Tiere dekapitiert und schnell in eiskaltes PBS überführt. Während der Präparation erfolgte eine genau Bestimmung des Entwicklungsstadiums der Embryonen anhand der Größe und anatomischer Kriterien (Edinburgh Mouse Atlas Project; <http://genex.hgu.mrc.ac.uk>). Weitere Verwendung fanden nur die Tiere eines Wurfs mit gleicher Größe und gleichem Entwicklungsstadium.

2.2.4 Histologische Methoden

2.2.4.1 Herstellung von Gewebeschnitten

2.2.4.1.1 Methacrylatschnitte

Zur Herstellung von Methacrylatschnitten wurden die präparierten Gewebestücke (s. 2.2.3.2) mit 4 % PFA in PBS 2 d fixiert und in einer Ethanolreihe (je 1 d in 30 %, 50 %, 70 %, 85 %, 96 %, 98 %, 99 % Ethanol) bei 4°C dehydriert. Dann wurde das Gewebe in 1:1 100 % Ethanol:Technovit 7100 bei 4°C präinfiltriert, üN in Vorbereitungslösung bei RT infiltriert, schließlich in 15:1 Vorbereitungslösung:Härter II in einer Einbettform (Heraeus-Kulzer, Hanau) eingebettet und üN bei RT auspolymerisiert. Die Präparate wurden dann mit Technovit 3040 auf Histoblöcken (Heraeus-Kulzer) fixiert und bei RT gelagert. Es wurden 5 µm-Semidünnschnitte mit einem Rotationsmikrotom (Microm HM360; Microm, Walldorf) angefertigt, im warmen Wasserbad gestreckt, auf Objektträger (Roth, Karlsruhe) aufgezogen und auf einem Heizblock getrocknet.

2.2.4.1.2 Vibratomschnitte

Vibratomschnitte wurden von E9.5 und E10.5 Embryonen nach whole mount *in situ*-Hybridisierung (s. 2.2.4.3.3) angefertigt. Die Präparate wurden in eine Peel-A-Way Einbettform (Thermo) mit flüssiger 20 % Gelatine in PBS (ca. 55°C) überführt, ausgerichtet und die Einbettform dann zum Aushärten der Gelatine in Eis gegeben. Die Vibratomschnitte wurden in eisgekühltem, filtriertem PBS mit einem Vibratom (Leica VT1000S; Leica, Wetzlar) angefertigt. Die Schnittdicke betrug 35 µm und die Schnitte wurden auf Objektträger (Roth) aufgezogen, kurz getrocknet und schließlich mit Immunomount und Deckgläschen eindeckt.

2.2.4.1.3 Paraffinschnitte

Für die Herstellung von Paraffinschnitten wurden frisch präparierte ganze Embryonen oder embryonale Gewebestücke (s. 2.2.3.2) üN in 4 % PFA in PBS_{DEPC} bei 4°C fixiert. Dann wurden die Präparate zweimal kurz mit PBS_{DEPC} gewaschen und mit einer Methanolreihe (je 1 h 25 %, 50 %, 75 % und zweimal 100 % Methanol in PBS) bei 4°C dehydriert und in 100 % Methanol bei -20°C gelagert.

Die Präparate wurden für die Einbettung in Paraffin 1 h in 100 % Ethanol inkubiert, zweimal 1 h in Toluol vollständig dehydriert und dann in eine Gitterform (Histosette; Simport, Beloeil, Kanada) überführt. Diese wurde in eine Küvette mit flüssigem Paraffin gegeben und die Präparate üN bei 60°C mit Paraffin infiltriert. An den beiden folgenden

Tagen wurden die Präparate jeweils in ein neues Paraffinbad überführt und wie oben infiltriert. Sodann wurden die Präparate in eine Metalleinbettform mit flüssigem Paraffin überführt und ausgerichtet, dann härtete das Paraffin aus. Die Blöcke wurden auf dem Deckel der Gitterform befestigt und bei 4°C gelagert.

Die Paraffinschnitte wurden an einem Mikrotom (Microm HM360) mit gekühlter Objektklammer (Cool Cut) und Schnitt-Transfer-System (STS; alle Microm) angefertigt; die Schnittdicke betrug 5-7 µm. Die Schnitte wurden bei 46°C im Wasserbad gestreckt und auf Adhäsions-Objekträger (Histobond, Marienfeld, Lauda-Königshofen) aufgezogen, 1 h bei 37°C getrocknet und bei 4°C gelagert.

2.2.4.1.4 Gefrierschnitte

Zur Herstellung von Gefriergewebeschnitten wurden frisch präparierte ganze Embryonen oder embryonale Gewebestücke (s. 2.2.3.2) in eiskaltem PBS_{DEPC} gespült. Wenn die Schnitte für die *in situ*-Hybridisierung auf Gefrierschnitten (s. 2.2.4.3.5) verwendet werden sollten, wurden die Präparate entweder frisch in Tissue-Tek O.C.T Compound (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet (s. u.), oder erst wie nachstehend fixiert.

Für die Immunhistologie (s. 2.2.4.4) wurden die Präparate 2 h in 4 % PFA in Phosphatpuffer bei 4°C fixiert, kurz in PBS bei RT und 3x mit PBS bei 4°C gewaschen. Sodann erfolgte die Kryoprotektion der Präparate 3x in 30 % D(+)-Saccharose in Phosphatpuffer bei 4°C. Die Präparate wurden dann kurz in Tissue-Tek geschwenkt, in eine Peel-A-Way Einbettform (Thermo) mit Tissue-Tek überführt und ausgerichtet. Die Präparate wurden anschließend in einer Mischung aus Ethanol und Trockeneis eingefroren und bei -70°C gelagert.

Die Gefrierschnitte wurden mit einem Kryostaten (Microm HM560 Cryo-Star; Microm) angefertigt; die Schnittdicke betrug 12 oder 20 µm (12 µm für die Immunhistologie, 12 oder 20 µm für die *in situ*-Hybridisierung). Die Schnitte wurden auf Adhäsions-Objekträger (Histobond, Marienfeld, Lauda-Königshofen) aufgezogen, bei 37°C getrocknet (mindestens 30 min für die Immunhistologie, mindestens 1 h für die *in situ*-Hybridisierung) und luftdicht verpackt bei -70°C gelagert.

2.2.4.2 Hämatoxylin/Eosin-Färbung von Methacrylatschnitten

Zur Hämatoxylin/Eosin-Färbung von Methacrylatschnitten wurden die Semidünnschnitte 45 min in Hämatoxylin bei RT gefärbt. Die Färbung wurde 15 min in fließendem Wasser differenziert und die Schnitte kurz in VE-Wasser gespült. Die Gegenfärbung erfolgte für

10 min in filtrierter Eosin-Lösung. Danach wurde 10 min in fließendem Wasser und abschließend kurz in VE-Wasser gespült. Die Schnitte wurden nun getrocknet und die Objektträger mit Entellan und Deckgläschen eindeckt.

2.2.4.3 *In situ*-Hybridisierungsmethoden

2.2.4.3.1 *In vitro*-Transkription und DIG-Markierung von RNA-Sonden

Zur Herstellung einer RNA-Sonde für die *in situ*-Hybridisierung wurde Plasmid-DNA für die anschließende *in vitro*-Transkription und DIG-Markierung linearisiert. Die Linearisierung erfolgte mit 50 µg Plasmid-DNA in einem 100 µl Reaktionsansatz mit 50 U des passenden Enzyms üN bei 37°C. Die Aufreinigung der DNA wurde mit Lösungen aus dem Jetquick Plasmid Miniprep Spin Kit und dem Jetquick PCR Product Purification Spin Kit (beide Genomed, Löhne) durchgeführt. Dabei wurde der Reaktionsansatz von 100 µl mit 400 µl Puffer H1 vermischt und auf eine Säule aus den genannten Kits gegeben. Dann wurde 1 min bei 14000 rpm in einer Tischzentrifuge (Centrifuge 5417; Eppendorf) bei RT zentrifugiert, 500 µl Puffer GX auf die Säule gegeben, 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert, 700 µl Puffer G4 zugegeben, 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert und die Säule schließlich 2 min bei 14000 rpm trocken zentrifugiert. Sodann wurden 25 µl 70°C-warmes 10 mM Tris, pH 8,0 (RNase-frei) auf die Säule gegeben, darin 2 min bei 70°C inkubiert und die DNA durch 1 min Zentrifugation bei 14000 rpm und RT eluiert. Die Elution wurde mit weiteren 25 µl 70°C-warmem 10 mM Tris, pH 8,0 wiederholt. Danach wurde die linearisierte Plasmid-DNA bei -20°C gelagert.

Für die *in vitro*-Transkription und DIG-Markierung von RNA-Sonden wurden, wenn nicht anders angegeben, Reagenzien und Enzyme von Roche (Mannheim) verwendet. Die Linearisierung der DNA-Matrize erfolgte mit 50 µg Plasmid-DNA in einem 100 µl Reaktionsansatz mit 50 U des passenden Enzyms üN bei 37°C. Ein Reaktionsansatz enthielt 1-2 µl linearisiertes und aufgereinigtes Plasmid als Matrize, 2 µl 10x Transkriptionspuffer, 2 µl DIG-Labeling-Mix, 1 µl RNase-Inhibitor (RNaseOUT; Invitrogen), 1 µl der passenden Polymerase (T7, T3, SP6), wurde auf 20 µl mit H₂O_{DEPC} 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) oder dem NucleoSpin RNA II Kit (Macherey-Nagel, Düren) gemäß Herstellerangaben. Die DIG-markierte RNA-Sonde wurde zweimal mit je 25 µl H₂O_{DEPC} eluiert mit 50 µl Formamid vermischt und für die *in situ*-Hybridisierung (s. 2.2.4.3) eingesetzt oder bei -70°C gelagert.

2.2.4.3.2 Herstellung von Embryopulver

Die Herstellung von Embryopulver erfolgte mit E10.5-E13.5 Mausembryonen, die nach der Präparation bei -20°C eingefroren worden waren. Je nach Größe wurden 10-20 Embryonen in einem möglichst kleinen Volumen von eiskaltem PBS homogenisiert. Sodann wurden 4 Volumen eiskaltes Aceton zugegeben und die Suspension 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Präzipitat 10 min mit 10000 x g in einer Bodenkühlzentrifuge (Heraeus Varifuge 3.0 OR; Thermo) bei 4°C pelletiert, mit eiskaltem Aceton gewaschen und erneut pelletiert. Das Präzipitat wurde nun ausgebreitet, luftgetrocknet, fein gemörsert und bei -20°C gelagert.

2.2.4.3.3 Whole mount *in situ*-Hybridisierung

Am ersten Tag der whole mount *in situ*-Hybridisierung wurden die Präparate (s. 2.2.3.2) in kleine Glasfläschchen (3 ml Volumen) überführt, in einer Methanolreihe (je 15 min in 75 %, 50 %, 25 % Methanol in PBT) bei 4°C rehydriert und dreimal 15 min mit PBT bei 4°C gewaschen. Anschließend wurde das Gewebe 20 min in 20 µg/ml Proteinase K in PBT bei RT verdaut. Sodann wurden die Präparate 20 min in 0,2 % Glutaraldehyd/4 % PFA in PBS_{DEPC} refixiert und dreimal 15 min mit PBT gewaschen. Dann wurde 15 min in Hybridisierungslösung umgepuffert und 1-3 h in Hybridisierungslösung bei 65°C prähybridisiert. Vor der Hybridisierung wurden 12 µl DIG-markierte RNA-Sonde pro 3 ml Hybridisierungslösung 10 min bei 80°C denaturiert. Sodann wurde die Sonde auf die Präparate in Hybridisierungslösung gegeben und $\bar{u}N$ bei 65°C hybridisiert.

Am nächsten Tag wurden die Präparate zweimal 40 min mit Lösung I bei 65°C gewaschen, dann z. T. 15 min in 1:1 Lösung I:Lösung II bei 65°C und dreimal 15 min in Lösung II bei RT umgepuffert. Weiterhin optional wurde die unspezifische Bindung der Sonde mit einem Verdau in 50 µg/ml RNase A in Lösung II für zweimal 30 min bei 37°C weiter reduziert. Immer wurde danach dreimal 1 h mit Lösung III bei 62°C stringent gewaschen und anschließend dreimal 15 min in TBST bei RT umgepuffert. Vor der Inkubation mit dem anti-DIG-Antikörper, an den AP gekoppelt war, wurden die Schnitte 1 h in TBST mit 20 % Ziegen Serum (Blockierungslösung) vorinkubiert. Währenddessen wurde ein kleiner Laborlöffel Embryopulver 30 min in 4 ml TBST bei 65°C hitzeinaktiviert. Das Embryopulver wurde 5 min mit 5000 rpm in einer Bodenkühlzentrifuge (Heraeus Varifuge 3.0 OR; Thermo) bei RT pelletiert und der Überstand verworfen. Danach wurden 0,75 ml TBST mit 5 % Ziegen Serum und der Antikörper 1:500 zugegeben, mit dem Embryopulver vermischt und 1 h bei 4°C präadsorbiert. Das Embryopulver wurde wieder 5 min mit

5000 rpm bei 4°C pelletiert und der Überstand 1:4 mit TBST und 5 % Ziegen Serum verdünnt. Die Blockierungslösung wurde abgenommen und die Präparate üN mit anti-DIG-Antikörper 1:2000 in 3 ml TBST mit 5 % Ziegen Serum bei 4°C inkubiert.

Am dritten Tag wurde dreimal 15 min in TBST bei RT, dann 8-10 Mal 40-60 min in TBST bei RT und schließlich üN mit TBST bei 4°C gewaschen.

Am vierten Tag wurden die Präparate zweimal 45 min in AP-Puffer bei RT umgepuffert und anschließend wurde die filtrierte Färbelösung mit je 0,035-0,35 µl/ml NBT und BCIP in AP-Puffer zugegeben. Die Präparate wurden mehrere Tage lichtgeschützt bei 4°C in der Lösung inkubiert, bis die gewünschte Färbungsintensität erreicht war. Die Lösung wurde dabei alle zwei Tage gewechselt und ihre Konzentration an die gewünschte Reaktionsgeschwindigkeit angepasst. Zum Schluss wurde zweimal in AP-Puffer und dreimal mit PBS gewaschen. Die Präparate wurden danach üN in 4 % PFA in PBS bei 4°C postfixiert, zweimal mit filtriertem PBS gewaschen und darin bei 4°C gelagert; z. T. wurden die Präparate über eine Glycerinreihe (30 %, 70 % Glycerin) geklärt.

2.2.4.3.4 *In situ*-Hybridisierung auf Paraffinschnitten

Am ersten Tag der *in situ*-Hybridisierung auf Paraffinschnitten wurden die Objektträger mit den Schnitten (s. 2.2.4.1.3) auf einer Glasscheibe befestigt, dreimal 5 min in Xylol bei RT entwacht, dann in einer Ethanolreihe (zweimal 5 min in 100 %, je einmal 2 min in 95 %, 85 %, 70 %, 50 %, 30 % Ethanol in H₂O_{DEPC}) rehydriert und 5 min mit PBS_{DEPC} gewaschen. Anschließend wurde 15 min in 4 % PFA in PBS_{DEPC} refixiert und zweimal 5 min mit PBS_{DEPC} gewaschen. Sodann wurde 15 min in 6 % H₂O₂ gebleicht und dreimal 2 min mit PBS_{DEPC} gewaschen. Danach wurde das Gewebe 10 min in 10 µg/ml Proteinase K in PBS_{DEPC} verdaut; die Proteinase durch 0,2 % Glycin in PBS_{DEPC} inaktiviert und es wurde zweimal 2 min mit PBS_{DEPC} gewaschen. Anschließend wurde nochmals 15 min in 4 % PFA in PBS_{DEPC} refixiert und zweimal 5 min mit PBS_{DEPC} gewaschen. Dann wurde 2 min in 100 mM Tris, pH 7,5 in H₂O_{DEPC} umgepuffert, 10 min in 0,25 % Essigsäureanhydrid in 100 mM Tris, pH 7,5 in H₂O_{DEPC} acetyliert und zweimal mit 2x SSC_{DEPC} gewaschen. Die Schnitte wurden sodann in einer Ethanolreihe (je 2 min in 30 %, 50 %, 70 %, 85 %, 95 % und 100 % Ethanol in H₂O_{DEPC}) dehydriert, 30-60 min getrocknet und mit einem Fettstift umrandet. Währenddessen wurden Deckgläschen silanisiert; sie wurden dafür kurz in Sigmacote getaucht, 20 min getrocknet, kurz mit Ethanol gewaschen und 5 min getrocknet. Vor der Hybridisierung wurden 1-3 µl der DIG-markierten RNA-Sonde 5 min in 150 µl Hybridisierungslösung bei 80°C denaturiert. Diese Lösung wurde schnell

abgekühlt, auf die Schnitte gegeben, mit einem silanisierten Deckgläschen bedeckt und üN in einer Feuchtkammer (mit 5x SSC/50 % Formamid) bei 65°C hybridisiert.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger in eine Küvette überführt und die Deckgläschen 5 min in 5x SSC/50 % Formamid bei 60°C abgelöst. Es wurde danach einmal 10 min und einmal 8 min mit 2x SSC/50 % Formamid bei 60°C gewaschen. Dann wurde das halbe Volumen der Lösung mit TES-Puffer ersetzt, 2 min weiter bei 60°C gewaschen und schließlich zweimal 2 min in TES-Puffer bei 37°C umgepuffert. Die unspezifische Bindung der Sonde wurden mit einem Verdau in 20 µg/ml RNase A in TES-Puffer für 15 min bei 37°C weiter reduziert, die Schnitte wurden dann 5 min mit TES-Puffer bei RT gewaschen. Sodann wurde zweimal 15 min in 1x SSC/50 % Formamid, sowie einmal 1 h mit 0,2x SSC/50 % Formamid jeweils bei 60°C stringent gewaschen. Anschließend wurde zweimal 5 min in TBS bei RT umgepuffert. Vor der Inkubation mit dem anti-DIG-Antikörper, an den AP gekoppelt war, wurden die Schnitte 2 h in 500 µl Blockierungslösung in einer Feuchtkammer bei 4°C vorinkubiert. Währenddessen wurde ein kleiner Laborlöffel Embryopulver 30 min in 1 ml Blockierungslösung bei 65°C hitzeinaktiviert. Das Embryopulver wurde 5 min mit 5000 rpm in einer Tischzentrifuge (Centrifuge 5417; Eppendorf) bei RT pelletiert. Die Blockierungslösung wurde gewechselt, der Antikörper 1:125 zugegeben und 2 h bei 4°C an das resuspendierte Embryopulver präadsorbiert. Schließlich wurde das Embryopulver 10 min mit 14000 rpm in einer Tischkühlzentrifuge (Universal 32R; Hettich) bei 4°C pelletiert, der Überstand 1:8 mit Blockierungslösung verdünnt und die Schnitte üN in 500 µl 1:1000 Anti-DIG-Antikörper in Blockierungslösung in einer Feuchtkammer bei 4°C inkubiert.

Am dritten Tag wurden die Objektträger wieder in Küvetten überführt, sechs- bis zehnmal 30 min mit TBSX bei RT gewaschen und zweimal 10 min in NTMT-Puffer bei RT umgepuffert. Anschließend wurden die Schnitte in die Färbelösung mit je 0,2 µl/ml NBT und BCIP in NTMT-Puffer gegeben und mehrere Tage lichtgeschützt bei 4°C inkubiert bis die gewünschte Färbungsintensität erreicht war. Die Lösung wurde dabei alle zwei Tage gewechselt. Zum Schluss wurde dreimal mit PBS gewaschen und die Objektträger mit Immunomount und Deckgläschen eindeckt.

2.2.4.3.5 *In situ*-Hybridisierung auf Gefrierschnitten

Am ersten Tag der *in situ*-Hybridisierung auf Gefrierschnitten wurden die Schnitte (s. 2.2.4.1.4) 1-2 h bei RT aufgetaut, mit einem Fettstift umrandet, dann in eine Küvette überführt, 10 min in 4 % PFA in PBS_{DEPC} bei RT refixiert und dreimal 5 min mit PBS_{DEPC} gewaschen. Sodann wurde 10 min in Acetylierungspuffer acetyliert und dreimal 5 min mit PBS_{DEPC} gewaschen. Die Schnitte wurden schließlich 1,5-3 h in 400 µl Hybridisierungslösung in einer Feuchtkammer bei RT prähybridisiert; währenddessen wurden Deckgläschen silanisiert (s. 2.2.4.3.4). Vor der Hybridisierung wurden 1,5 µl der DIG-markierten RNA-Sonde 5 min in 150 µl Hybridisierungslösung bei 80°C denaturiert und die Lösung danach schnell abgekühlt. Die Prähybridisierungslösung wurde schließlich von den Schnitten entfernt und die Hybridisierungslösung mit Sonde aufgetragen. Die Objektträger wurden nun mit einem silanisierten Deckgläschen bedeckt und üN in einer Feuchtkammer (mit 5x SSC/50 % Formamid) bei 70°C hybridisiert.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger in eine Küvette überführt und die Deckgläschen 5 min in 5x SSC bei RT abgelöst. Es wurde danach zweimal 30 min mit 0,2x SSC bei 70°C stringent gewaschen. Anschließend wurde 5 min mit 0,2x SSC bei RT gewaschen und 5 min in B1-Puffer umgepuffert. Vor der Inkubation mit dem anti-DIG-Antikörper, an den AP gekoppelt war, wurden die Schnitte 1 h in 1 ml B1-Puffer mit 10 % Ziegen Serum (Blockierungslösung) in einer Feuchtkammer bei 4°C vorinkubiert. Danach wurde die Blockierungslösung entfernt und die Schnitte üN in 400 µl 1:2500 anti-DIG-Antikörper in B1-Puffer mit 10 % Ziegen Serum bei 4°C inkubiert.

Am dritten Tag wurden die Objektträger wieder in Küvetten überführt, dreimal 10 min mit B1-Puffer bei RT gewaschen und 5 min in NTMT-Puffer bei RT umgepuffert. Anschließend wurden die Schnitte in die Färbelösung mit je 0,2 µl/ml NBT und BCIP in NTMT-Puffer gegeben und mehrere Tage lichtgeschützt bei 4°C inkubiert bis die gewünschte Färbungsintensität erreicht war. Die Lösung wurde dabei alle zwei Tage gewechselt. Zum Schluss wurde dreimal mit PBS gewaschen und die Objektträger mit Immunomount und Deckgläschen eindeckt.

2.2.4.4 Immunhistologie

Am ersten Tag der Immunhistologie auf Gefrierschnitten wurden die Schnitte (s. 2.2.4.1.4) 1-2 h bei RT aufgetaut, mit einem Fettstift umrandet und danach 1 h in Blockierungslösung in einer Feuchtkammer bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte kurz in PBS getaucht und üN mit den Primär-Antikörpern (s. 2.1.6) in Blockierungslösung bei 4°C

inkubiert. Am zweiten Tag wurden die Schnitte innerhalb 1 h viermal mit Blockierungslösung bei RT gewaschen, wobei sie vor jedem Waschschrift und zum Schluss kurz in PBS getaucht wurden. Dann wurde 1 h mit den Sekundär-Antikörpern (s. 2.1.6) in Blockierungslösung bei RT inkubiert und danach wie oben 1 h mit Blockierungslösung gewaschen. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Objektträger mit den gefärbten histologischen Schnitten zum Schluss mit Immunomount und Deckgläschen eingelegt.

Für die Immunhistochemie mit DAB als Peroxidasesubstrat wurden die histologischen Schnitte kurz zweimal mit PBS gewaschen und dann mit dem DAB Substrate Kit for Peroxidase (Vector Labs; Axxora, Grünberg) gemäß Herstellerangaben angefärbt. Die Objektträger wurden danach zweimal mit PBS gewaschen und zum Schluss mit Immunomount und Deckgläschen eingelegt.

2.2.5 Datenanalyse

2.2.5.1 Dokumentation histologischer Daten

Die Dokumentation histologischer Daten erfolgte mittels Licht- oder Fluoreszenzmikroskopie. Die Lichtmikroskopie von Schnitten erfolgte an einem aufrechten Mikroskop (Axiophot; Zeiss, Oberkochen) ausgestattet mit Kamera (Axiocam HRc; Zeiss) und der Axiovision AC Software Version (Vers.) 4.5 (Zeiss). Die Lichtmikroskopie von gefärbtem Gewebe erfolgte an einem Stereomikroskop (Leica MZ16; Leica, Wetzlar) ausgestattet mit Kamera (Axiocam; Zeiss) und der Axiovision Software. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte an einem Laser Scanning Mikroskop (LSM 5 Pascal; Zeiss) mit der LSM 5 Pascal Software Vers. 3.2 (Zeiss). Die generierten Bilder wurden mit Photoshop Vers. 8 (Adobe, München) bearbeitet.

2.2.5.2 Zellzahlen

Zellzahlen wurden auf Bildern von immunhistologischen Färbungen bestimmt. β -Galaktosidase und die pankreatischen Hormone wurden mit Immunfluoreszenz oder enzymatisch (s. 2.2.4.4) auf Gefrierschnitten nachgewiesen. Zellen mit einem spezifischem Signal wurden teilautomatisch mit Hilfe der Software ImageJ Vers. 1.371 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) ausgezählt.

Es wurden mindestens drei unabhängige Schnitte von mindestens drei Mäusen jedes Genotyps ausgezählt. Pro Tier wurden insgesamt mindestens 300 β -Galaktosidase⁺ Zellen im Pankreas von E15.5 und E18.5 Mäusen und mindestens 100 Zellen im Pankreas von

E12.5 Mäusen ausgezählt. Um für jeden gefärbten Schnitt den Anteil β -Galaktosidase⁺ Zellen zu bestimmen, die ein bestimmtes pankreatisches Hormon ko-exprimieren, wurden die doppelt-positiven Zellen ebenfalls gezählt.

β -Galaktosidase⁺ Zellen wurden zudem auf Konsekutivschnitten von kompletten Pankreata enzymatisch detektiert und dann lichtmikroskopisch ausgezählt. Abgeleitet von Collombat et al. (2005) wurden die Zellen jedes fünften (E15.5) bzw. zehnten Schnitts (E18.5) von drei Mäusen jedes Genotyps gezählt. Die durchschnittliche Zahl der β -Galaktosidase⁺ Zellen pro Schnitt ergab sich aus der Gesamtzahl der gezählten β -Galaktosidase⁺ Zellen bezogen auf die Anzahl der Konsekutivschnitte durch das komplette Pankreas des Tieres.

2.2.5.3 Statistik und Expressionsanalyse

Zellzahlen und -proportionen wurden mit Excel Vers. X (Microsoft, Unterschleißheim) statistisch ausgewertet und dargestellt. Die Berechnung der Signifikanz von beobachteten Differenzen erfolgte mit einem T-Test für eine zweiseitige Verteilung und eine ungleiche Varianz zweier Proben. Unterschiede wurden als signifikant betrachtet, wenn der p -Wert $< 0,05$ war.

Die Expressionsanalyse wurde zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene im Pankreas von Wildtypen und homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tieren genutzt. Die Rohdaten der Microarray-Hybridisierung (s. 2.2.1.4) wurden dafür mit der Basisinstallation der Software Bioconductor (Gentleman et al., 2004) ausgewertet, die die R-Umgebung für statistische Berechnungen (R Development Core Team, 2005) nutzt. Die Qualität der Microarray-Hybridisierung wurde mit dem Bioconductor-Modul affyPLM untersucht und die Daten wurden dann mit dem gcrma-Modul (Zhijin et al., 2004) normalisiert. Sonden mit geringer Varianz der Expression über alle Microarrays wurden herausgefiltert und differentiell exprimierte Gene wurden mit dem limma-Modul (Smyth, 2005) identifiziert. Dieses Modul implementiert die empirische Bayes-Methode und dient der Fehlerkorrektur, vor allem dem Ausschluss Falschpositiver. Gene wurden als differentiell exprimiert angenommen, wenn $p < 0,05$ für den Unterschied des Expressionsniveaus war.