

Anhang

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

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäuren
AP	Alkalische Phosphatase
BCIP	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolylphosphat
bHLH	(engl.: basic Helix-Loop-Helix) basisches Helix-Schleife-Helix (-Motiv)
bp	Basenpaare
BSA	(engl.: bovine serum albumin) Rinderserumalbumin
C. B.	Prof. Dr. Carmen Birchmeier
cDNA	(engl.: complementary DNA) komplementäre DNA
cRNA	(engl.: complementary RNA) komplementäre RNA
Cy2	Cyanin
Cy3	Indocarbocyanin
Cy5	Indodicarbocyanin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dCTP	Deoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	(engl.: desoxyribonucleic acid) Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonalstadium (Tag der Embryonalentwicklung nach Vaginalpfropfen)
EDTA	(engl. ethylenendinitrilotetraacetic acid) Ethylendinitrilotetraessigsäure
EIN	Egl-46/IA-1/Nerfin
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ES	embryonale Stamm (-zellen)
EST	(engl.: expressed sequence tags) exprimierte Sequenzstellen
FCS	(engl.: fetal calf serum) fötales Kälberserum
β-gal	β-Galaktosidase
INSERM	Institut national de la santé et de la recherche médicale, Frankreich
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria Broth
LCN	5'- <i>NLS-lacZ-loxP-tACE-Cre-dual-Neo/Kan-loxP</i> -3'
LIF	(engl.: leukemia inhibitory factor) Leukämie-inhibierender Faktor
Maf	musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene
MCS	(engl.: multiple cloning site) multiple Klonierungsstellen
MDC	Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin, Berlin-Buch
MilliQ-H ₂ O	Wasser aus Ultrafiltrationsanlage (Milli-Q UF Plus; Millipore)
MODY	(engl. maturity onset diabetes of the young) Diabetes bei Heranwachsenden
MPI	Max-Planck-Institut
mRNA	(engl. messenger RNA) Boten-Ribonukleinsäure
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
Neo	Neomycin
NLS	nukleäre Lokalisierungssequenz
OD	optische Dichte
PAC	(engl.: P1-derived artificial chromosome) P1-abgeleitetes, artifizielles Chromosom
PBS	(engl. phosphate buffered saline) phosphatgepufferte Salzlösung

pBS	pBluescript SK II (+)
PCI	Phenol:Choroform:Isoamylalkohol
PCR	(engl. polymerase chain reaction) Polymerase-Ketten-Reaktion
PFA	Paraformaldehyd
PP	Pankreatisches Polypeptid
RNA	(engl.: ribonucleic acid) Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	(engl.: revolutions per minute) Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RZPD	Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (Berlin)
SDS	(engl.: sodium dodecylsulfate) Natriumdodecylsulfat
SSC	(engl.: standard saline citrate) Standard-Zitronensäuresalz
Tab.	Tabelle
tACE	testis specific angiotensin converting enzyme
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 Enzymaktivität
üN	über Nacht
UTR	untranslatierte Region
Vers.	Version
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-D-Galaktopyranosid

Tab. A1: Verwendete Chemikalien und Enzyme.

Name	Hersteller
Aceton	Roth
Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	Invitrogen
Ammoniumacetat	Roth
Ampicillin	Roth
L(+)-Arabinose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bacto Pepton	BD, Heidelberg
BCIP	Roche, Mannheim
Böhringer-Blockingreagenz	Roche
BSA	Roth
Chloroform	Merck, Darmstadt
DEPC	Roth
Dextransulfat (Na-Salz)	GE Healthcare
DMSO	Merck
Dulbecco's MEM mit Glutamax-I	Invitrogen
EDTA	Roth
Entellan	Merck
Eosin G	Roth
Essigsäure	Roth
Essigsäureanhydrid	Merck
Ethanol	Roth
FCS	Sigma-Aldrich
Ficoll	Sigma-Aldrich
Formamid	Roth
Formamid (ultrarein, deionisiert)	Roth
Gelatine	Sigma-Aldrich
Geneticin (G418)	Invitrogen
Glutaraldehyd	Merck
Glycerin	Roth
Glyzin	Sigma-Aldrich
H ₂ O ₂	Roth
Hämatoxylin (Hämalaun sauer nach Meyer)	Roth
Härter I	Heraeus-Kulzer
Härter II	Heraeus-Kulzer
HCl	Roth

Hefe-Extrakt	Roth
Heparin	Sigma-Aldrich
Immunomount	Thermo
Isopropanol	Roth
Kaliumferrizyanid	Sigma-Aldrich
Kaliumferrozyanid	Sigma-Aldrich
Kanamycin	Sigma-Aldrich
KCl	Merck
Lachsspermien-DNA	Sigma-Aldrich
LIF	A. Garratt, Labor von C. B.
Maleinsäure	Sigma-Aldrich, Merck
β -Mercaptoethanol (50 mM)	Invitrogen
Methanol	Roth
MgCl ₂ (Hexahydrat)	Merck
Mitomycin C	Sigma-Aldrich
Na ₂ HPO ₄ (Dihydrat)	Roth
NaCl	Roth
NaH ₂ PO ₄ (Dihydrat)	Roth
NaOH	Roth
Natriumacetat	Merck
NBT	Roche
N-lauroylsarcosine	Sigma-Aldrich
Paraffin (Roti-Plast)	Roth
PBS (10x)	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Invitrogen
PFA	Merck, Roth
Pferdeserum	PAN Biotech, Aidenbach
Phenol	Roth
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol	Ambion, Huntingdon, UK
Polyvinylpyrrolidon	Sigma-Aldrich
Proteinase K	Sigma-Aldrich
RNAlater	Ambion
RNase A	Roche
D(+)-Saccharose	Roth
SDS	Serva, Heidelberg
Sephadex G-50 (coarse)	GE Healthcare
Sigmacote	Sigma-Aldrich
SP6 Polymerase	Roche
T3 Polymerase	Roche
T7 Polymerase	Roche
Technovit 3040	Heraeus-Kulzer
Technovit 7100 (Hydroxyethylmethacrylat)	Heraeus-Kulzer
Tetracyclin	Sigma-Aldrich
Toluol	Merck
Triethnolamin	Sigma-Aldrich
tri-Natriumcitrat (Dihydrat)	Roth
Tris base	Roth
Triton-X 100	Sigma-Aldrich
Trizol	Invitrogen
tRNA (Hefe)	Invitrogen
Trypsin-EDTA-Lösung	PAN Biotech
Tween 20	Roth
X-Gal	Roth
Xylol	Roth
Ziegenserum	Bio-Rad
Zitronensäure	Roth

Tab. A2: Verwendete Lösungen und Medien. Die Lösungen wurden mit MilliQ-H₂O, die Medien mit VE-Wasser angesetzt, falls nicht anders angegeben. Die Lösungen wurden meist autoklaviert oder steril-filtriert.

Name	Zusammensetzung
Acetylierungspuffer	4 ml Triethanolamin 0,5 ml HCl 0,75 ml Essigsäureanhydrid ad 300 ml H ₂ O
AP-Puffer	25 ml 1 M Tris-HCl, pH 9,5 12,5 ml 1 M MgCl ₂ 5 ml 5 M NaCl 375 µl Tween 20 ad 250 ml H ₂ O _{DEPC}
B1-Puffer	0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 0,15 M NaCl
Blockierungslösung (Immunhistologie)	1 % (v/v) Pferdeserum 0,1 % (v/v) Triton-X 100 in PBS
Blockierungslösung (<i>In situ</i> -Hybridisierung auf Paraffinschnitten)	1 % (v/v) Böhlinger-Blockingreagenz 1 % (v/v) Ziegen Serum in TBSX
Böhlinger-Blockingreagenz (10 %)	10 % (w/v) Böhlinger-Blockingreagenz in 1x Maleinsäurepuffer
Denaturierungspuffer	1 M NaCl 0,5 M NaOH
Denhardts Lösung (50x)	5 g Ficoll 5 g Polyvinylpyrrolidon 5 g BSA ad 500 ml H ₂ O
Depurinierungspuffer	250 mM HCl
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	20 % (v/v) DMSO 30 % (v/v) FCS 50 % (v/v) ES-Zellmedium
Eosin-Lösung	0,25 % (w/v) Eosin G 0,1 M Essigsäure
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 β-Mercaptoethanol
H ₂ O _{DEPC}	MilliQ-H ₂ O DEPC-behandelt
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 denaturiert) 5 ml 10 mg/ml Lachsspermien-DNA (10 min bei 95°C denaturiert) 13,75 ml H ₂ O _{DEPC}

Hybridisierungslösung (<i>In situ</i> -Hybridisierung auf Paraffinschnitten)	15 ml ultrareines, deionisiertes Formamid 15 ml 10 % Böhlinger-Blockingreagenz 7,5 ml 20x SSC 6 ml 50 % (w/v) Dextransulfat 300 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0 30 µl Tween 20 300 µl 10 mg/ml Lachsspermien-DNA (10 min bei 95°C denaturiert) 300 µl 10 mg/ml tRNA (10 min bei 95°C denaturiert) 30 µl 1 M Heparin
Hybridisierungslösung (Whole mount <i>in situ</i> -Hybridisierung)	50 ml ultrareines, deionisiertes Formamid 25 ml 20x SSC _{DEPC} 6 ml 1 M Zitronensäure _{DEPC} 1 ml 10 mg/ml Lachsspermien-DNA (10 min bei 95°C denaturiert) 100 µl 50 mg/ml tRNA (10 min bei 95°C denaturiert) 150 µl Tween 20 40 µl 100 mg/ml Heparin ad 100 ml H ₂ O _{DEPC}
lacZ-Färbelösung	20 mM MgCl ₂ 0,5 mg/ml X-Gal 5 mM Kaliumferrozyanid 5 mM Kaliumferrizyanid in PBS
LB-Medium	1 % (w/v) Bacto-Trypton 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt 1 % (w/v) NaCl pH 7,5 mit NaOH
Lösung I (Whole mount <i>in situ</i> -Hybridisierung)	125 ml Formamid 62,5 ml 20x SSC 375 µl Tween 20 ad 250 ml H ₂ O _{DEPC}
Lösung II (Whole mount <i>in situ</i> -Hybridisierung)	25 ml 5 M NaCl 2,5 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5 375 µl Tween 20 ad 250 ml H ₂ O _{DEPC}
Lösung III (Whole mount <i>in situ</i> -Hybridisierung)	125 ml Formamid 25 ml 20x SSC 375 µl Tween 20 ad 250 ml H ₂ O _{DEPC}
Maleinsäurepuffer (5x)	1 M Maleinsäure 1,5 M NaCl
Mitomycin C-Lösung	0,2 % (w/v) Mitomycin C in PBS
Natriumacetat	3 M Natriumacetat pH 5,2 mit Essigsäure
NTMT	100 mM NaCl 100 mM Tris-HCl pH 9,5 50 mM MgCl ₂ 0,1 % (v/v) Tween 20
PBS _{DEPC}	PBS DEPC-behandelt
PBT	PBS _{DEPC} 0,15% Tween 20
Phosphatpuffer	0,2 M NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ pH 7,4
Schwanzpuffer	200 mM NaCl 100 mM Tris-HCl, pH 8,0 5 mM EDTA, pH 8,0 0,2% SDS
Southern-Hybridisierungslösung	0,5 M NaH ₂ PO ₄ 1 mM EDTA pH 7,2 mit NaOH dann bei 68°C 1 % (w/v) BSA 7 % (w/v) SDS

SSC (20x)	3 M NaCl 0,3 M tri-Natriumcitrat pH 7,0 mit HCl
SSC _{DEPC}	1x SSC DEPC-behandelt
TBS	150 mM NaCl 100 mM Tris-HCl, pH7,4 2 mM KCl
TBST	8,0 g NaCl 0,2 g KCl 2,5 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,4 1,5 ml Tween 20 ad 1 l H ₂ O _{DEPC}
TBSX	0,1 % (v/v) Triton-X 100 in TBS
TE	10 mM Tris base 1 mM EDTA, pH 8,0 pH 8,0 mit HCl
TES-Puffer	0,5 M NaCl 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA, pH 8,0
Tris-HCl	1 M Tris base pH 7,4, 7,5, 8,0, 9,5 mit HCl
Vorbereitungslösung	100 ml Technovit 7100 mit 1 g Härter I
Zitronensäure _{DEPC}	1 M Zitronensäure DEPC-behandelt

Danksagung

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

Des Weiteren möchte ich allen Mitgliedern des Labors für die Zusammenarbeit und die tolle gemeinsame Zeit danken. Besonders hervorheben möchte ich Hagen Wende, der mir bei der Southern-Blot-Analyse geholfen hat und auch sonst immer gute Ratschläge für mich hatte. Außerdem möchte ich mich besonders bei Nikos Karoulias und Michael Strehle bedanken, die mir bei der Expressionsanalyse und den Zellzählungen geholfen haben. Ein herzlicher Dank geht auch an Verena Sasse, Petra Stallerow, Claudia Päseler und Karin Gottschling für die exzellente technische Assistenz.

Folgenden Wissenschaftler danke ich für das Material, das sie mir zur Verfügung gestellt haben: Gérard Gradwohl (INSERM, Straßburg, Frankreich; *Ngn3*-Plasmid), Silvia Arber (INLA-Plasmid), Mathias Treier (pKS-DTA) und Helena Edlund (*Pdx1*-Plasmid); Michael Strehle (Mausfibroblasten, ES-Zellen) und Alistair Garratt (Labor von C. B., COS1-Zellen, LIF); für die jeweiligen Antikörper Tom Jessell (*Isl1*), Maike Sander (*NKX6.1*), Ahmed Mansouri (*Arx*), Helena Edlund (*Ptf1a*), Michael German (*Ngn3*), Cathrine Tomasetto (*Ghrelin*) und Beatriz Sosa-Pineda (*Nkx2.2*).

Schließlich möchte ich mich bei Arnhild Schrage und Hagen Wende für die Korrektur dieser Dissertation bedanken. Arnhild, meinen Freunden und meiner Familie danke ich für die stetige Unterstützung.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Die genutzte Hilfe und die verwendeten Hilfsmittel und Quellen habe ich vollständig angegeben. Abbildungen, die anderen Quellen unverändert entnommen oder diesen entlehnt wurden, sind mit der Quellenangabe gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich mich nicht anderwärtig um einen Doktorgrad beworben habe oder einen entsprechenden Doktorgrad besitze. Diese Dissertation habe ich bei keinem anderen Fachbereich oder keiner anderen Universität vorgelegt. Die Bestimmungen der Promotionsordnung des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin sind mir bekannt. Diese Dissertation ist von Prof. Dr. Carmen Birchmeier betreut worden und mit ihrem Einvernehmen wurden Teile dieser Arbeit veröffentlicht (s. Zusammenfassung).

Berlin, den 06.03.2007

Mathias Gierl