
Struktur- und Funktionsanalysen des Pax4-Promotors

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Christopher Brink
aus Wolfenbüttel

Göttingen 2001

Diese Arbeit wurde am
Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie,
Karl-Friedrich-Bonhoefer-Institut
in der Abteilung für Molekulare Zellbiologie
unter der Anleitung von Prof. Dr. Peter Gruss
durchgeführt

D7

Referentin: Professorin Dr. Mireille Schäfer

Korreferent: Professor Dr. Peter Gruss

Tag der mündlichen Prüfung:

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	3
<i>GRUNDLAGEN DER ENTWICKLUNG</i>	<i>3</i>
<i>DIE NOTWENDIGKEIT DER REGULATION VON GENAKTIVITÄT</i>	<i>5</i>
<i>MECHANISMEN DER GENREGULATION</i>	<i>8</i>
<i>TRANSKRPTIONSFAKTOREN REGULIEREN GENEXPRESSION BEREITS IM ZELLKERN</i>	<i>11</i>
<i>WICHTIGE TRANSKRPTIONSFAKTOR-FAMILIEN</i>	<i>14</i>
<i>DIE ENTWICKLUNG DER BAUCHSPEICHELDRÜSE</i>	<i>22</i>
<i>ZIEL DIESER ARBEIT</i>	<i>26</i>
II. ERGEBNISSE	27
<i>EXPRESSIONSANALYSE DES 7,8 KB-PROMOTORS</i>	<i>28</i>
<i>UNTERSUCHUNGEN ZUR ERMITTLUNG DES TRANSKRPTIONSSTARTS</i>	<i>40</i>

<i>EIN GENOMISCHER BEREICH VON 254 BASEN REGULIERT PAX4-EXPRESSION</i>	45
<i>CIS-REGULATORISCHE MOTIVE DES PAX4-PROMOTORS</i>	52
<i>ANALYSE DER PAX4-PROMOTORELEMENTE</i>	53
<i>HERSTELLUNG EINER TRANSGENEN MAUS MIT PAX4- KONTROLLIERTER CRE-REKOMBINASE</i>	65
<i>MÖGLICHE PAX4-BINDESTELLE IM PDX1-PROMOTOR</i>	67
III. DISKUSSION	68
<i>DIE ROLLE VON PAX4 WÄHREND DER PANKREASENTWICKLUNG</i>	69
<i>PAX4-EXPRESSION IN-VIVO UND IN-VITRO</i>	73
<i>PAX4 BESITZT KEINEN KLASSISCHEN MINIMALPROMOTOR</i>	76
<i>PDX1 IST DER HAUPTAKTIVATOR VON PAX4</i>	78
<i>DAS E1-ELEMENT</i>	80
<i>WEITERE REGULATIONS-MÖGLICHKEITEN VON PAX4</i>	81
<i>GENETISCHE INTERAKTIONEN WÄHREND DER PANKREASENTWICKLUNG</i>	82
<i>DER ENDOKRINE ZELLSTAMMBAUM</i>	86
<i>AUSBLICK: THERAPIEMÖGLICHKEITEN</i>	89

IV. MATERIAL UND METHODEN	91
<i>IV.1. ORGANISMEN</i>	<i>91</i>
<i>IV.2. MATERIALIEN</i>	<i>92</i>
<i>IV.3. METHODEN</i>	<i>98</i>
V. ZUSAMMENFASSUNG	117
VI. LITERATURVERZEICHNIS	119
VII. ANHANG	154
<i>DANKSAGUNG</i>	<i>154</i>
<i>ABKÜRZUNGEN, BEGRIFFE UND SYMBOLE</i>	<i>155</i>
<i>PUBLIKATIONEN</i>	<i>158</i>
<i>LEBENS LAUF</i>	<i>159</i>

*"**E**S IST GOTTES EHRE, EINE SACHE ZU
VERBERGEN; ABER DER KÖNIGE EHRE IST ES, EINE
SACHE ZU ERFORSCHEN."*

SPRÜCHE 25; 2

I. EINLEITUNG

"DENN DU BILDETEST MEINE NIEREN. DU WOBST MICH IN MEINER MUTTER LEIB. ICH PREISE DICH DARÜBER, DAB ICH AUF EINE ERSTAUNLICHE, AUSGEZEICHNETE WEISE GEMACHT BIN. WUNDERBAR SIND DEINE WERKE, UND MEINE SEELE ERKENNT ES SEHR WOHL."

PSALM 139; 13,14

GRUNDLAGEN DER ENTWICKLUNG

Eine einzige Zelle, die befruchtete Eizelle, Zygote genannt, steht am Beginn der Entwicklung aller höheren Lebewesen dieser Erde. Sie enthält sämtliche Informationen über den sich aus ihr entwickelnden Organismus. Die dazu notwendige Datenmenge befindet sich chemisch kodiert als Sequenz von vier Basen (Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin) auf den Molekülen der Desoxyribonukleinsäure (DNS) im Zellkern. Man kann die Abfolge dieser Basen, ihre Sequenz auf dem DNS-Molekül, in Funktion und Bedeutung mit der Buchstabenfolge eines Textes vergleichen. In den kodierenden DNS-Bereichen besteht dabei ein "Buchstabe", Kodon genannt, aus jeweils drei Basen und jedes dieser Basentriplets repräsentiert eine Aminosäure (Crick, 1966). Aus

Aminosäuren bestehen wiederum die funktionellen Einheiten des Lebens, die Proteine. Dabei stützt sich sämtliches Leben dieser Erde auf die Verwendung von lediglich 20 verschiedenen Aminosäuren. Alle in der Natur beobachtbaren Funktionen und Strukturen von Proteinen und Eiweißen basieren demnach letztendlich auf einer Variation nur dieser 20 Moleküle (Moldave, 1985).

Die Proteine können sich aus einer oder mehreren Aminosäureketten zusammensetzen und finden entsprechend der ihnen von der Aminosäuresequenz vermittelten Eigenschaften Verwendung als Bausteine, Katalysatoren für chemische Reaktionen (Enzyme) oder Regulatoren von Genaktivität (Transkriptionsfaktoren) innerhalb der Zelle (Blout et al., 1960).

Die Bauanleitung für all diese verschiedenen Proteine entspricht der Basensequenz auf der DNS im Zellkern. Genetische Aktivität in einer lebenden Zelle bedeutet das Umsetzen solcher Basensequenzen der DNS in die entsprechenden Aminosäuresequenzen. Der im Zellkern gespeicherte "Text" muß also abgelesen werden (Transkription), auf einer "Blaupause" (Transport - Ribonukleinsäure, mRNS) aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert und dort von den Ribosomen in die entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt werden (Translation) (Darnell et al., 1986).

Die DNS ist die bisher größte bekannte kovalente chemische Verbindung des Universums; jedes einzelne der bei Zellteilungsprozessen mikroskopisch sichtbar werdenden Chromosomen repräsentiert ein einziges DNS-Molekül. Vom Umfang der im Kern vorhandenen Basensequenzen kann jedoch nicht unmittelbar auf die Menge der darin gespeicherten Daten geschlossen werden. Beim Menschen dienen beispielsweise nur drei Prozent der zur Verfügung stehenden Sequenzen tatsächlich als Informationsträger für seine etwa 40.000 Gene (Flam, 1994). Man spricht bei diesen von den kodierenden Sequenzen. Der Rest der Basenfolgen dient entweder der Regulation kodierender Bereiche oder hat offenbar keine Funktion. Trotzdem werden große Bemühungen unternommen, das Genom vollständig zu sequenzieren (Venter et al., 2001).

Die Regulation von Genen ist für die Identität und die Funktion einer Zelle von entscheidender Bedeutung. Alle biochemischen Prozesse, die während der Individualentwicklung, der Ontogenese, und der späteren Wahrnehmung

funktioneller Aufgaben auf zellulärer Ebene notwendig sind, finden ihren Anfang in der differentiellen Expression von kernkodierten Genen.

DIE NOTWENDIGKEIT DER REGULATION VON GENAKTIVITÄT

Um einen funktionellen Organismus bilden zu können, müssen die aus der Zygote durch Teilung hervorgegangenen Tochterzellen nach und nach verschiedenste Aufgaben übernehmen. Man unterscheidet dabei den Vorgang der Differenzierung von dem der Determinierung. Die Differenzierung ist ein in der Regel beobachtbarer Prozeß, bei dem die Zelle durch Veränderung ihrer Eigenschaften beginnt, sich auf eine definierte Aufgabe zu spezialisieren. Die Determinierung ist dagegen nicht von außen erkennbar und geht der Differenzierung voraus. Dabei wird die Zelle durch endogene Prozesse auf einen bestimmten Entwicklungsweg festgelegt, was die Einschränkung ihrer Differenzierungsmöglichkeiten bedeutet (Abb.1; Harrison, 1933; Slack, 1991).

Eine determinierte bzw. differenzierte Zelle ist demzufolge nicht mehr auf eine so große Informationsmenge angewiesen wie eine Zygote, da ihr Aufgabenbereich im Vergleich zu der totipotenten befruchteten Eizelle eingeschränkt ist. Trotzdem ist in jeder Körperzelle der komplette Chromosomensatz mit allen Informationen über den gesamten Organismus vorhanden. Den wissenschaftlichen Nachweis dieser Tatsache liefert das Klonen. Dabei wird ein Zellkern einer differenzierten Zelle in eine Eizelle oder Zygote gebracht, der zuvor der eigene Kern entfernt wurde. Unter gewissen Bedingungen kann sich aus dieser Zelle ein dem Kernspender genetisch identisches Tier, ein Zwilling bzw. Klon, entwickeln (Abb.2; Wilmut et al., 1997).

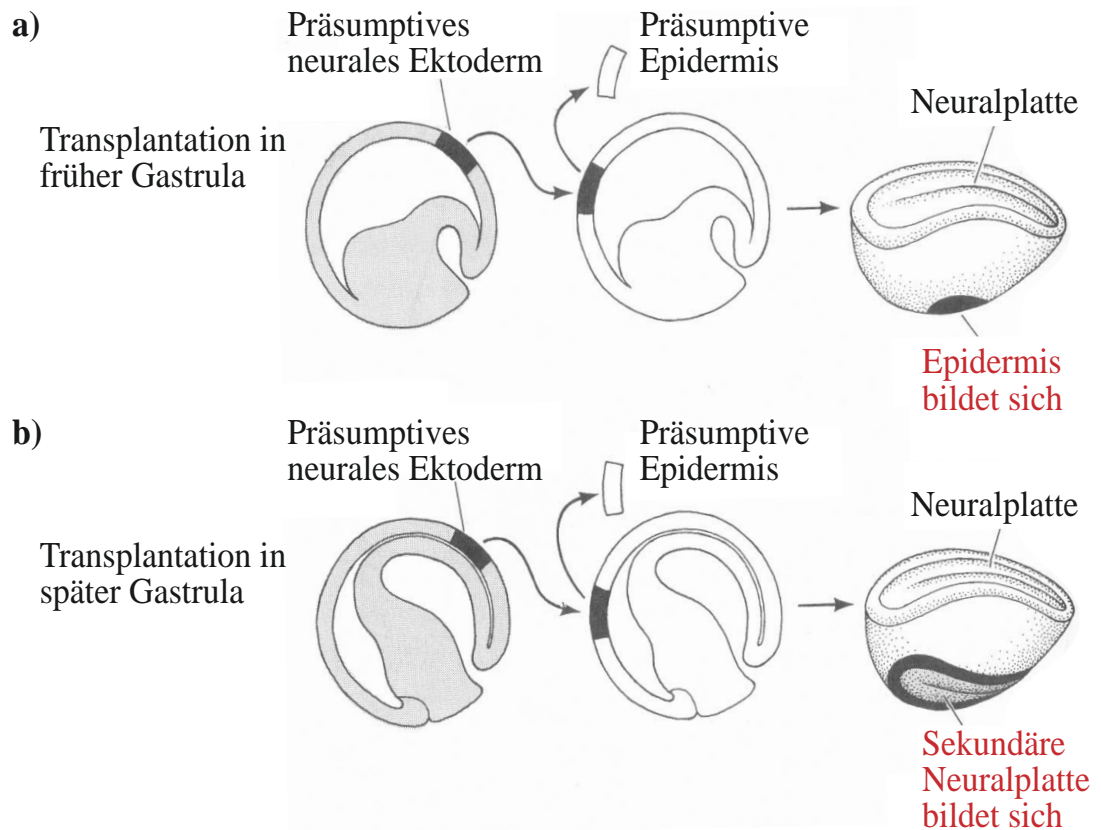


Abb.1: Experiment zum Nachweis der Zelldeterminierung

Das Transplantationsexperiment von Saxén und Toivonen von 1962 zeigt, daß bei Amphibien die Zellen des präsumptiven Ektoderms während der Entwicklung von der frühen zur späten Gastrula determiniert werden, ohne daß Veränderungen von außen erkennbar sind. Wird dieser Bereich aus der frühen Gastrula in eine Region transplantiert, die sich später zu Epidermis entwickelt, ist das Transplantat in der Lage, sich dieser neuen Umgebung anzupassen und bildet ebenfalls Epidermis. Diese Fähigkeit ist in der späten Gastrula jedoch verloren gegangen, das Transplantat folgt seiner Determination entsprechend dem ursprünglichen Entwicklungsweg. Die frühe Gastrula stellt also ein Beispiel für regulative Entwicklung, die späte für Mosaikentwicklung dar.

Determinierung und Differenzierung beruhen also nicht auf dem Verlust von genetischer Information einzelner Zellen, sondern auf Regulation der entsprechenden Genaktivität (Davidson, 1991).

Bezüglich dieser Genregulation sind in der Natur zwei Tendenzen zu beobachten, die als Regulativ- und Mosaikentwicklung bezeichnet werden (Driesch, 1892; Roux, 1888).

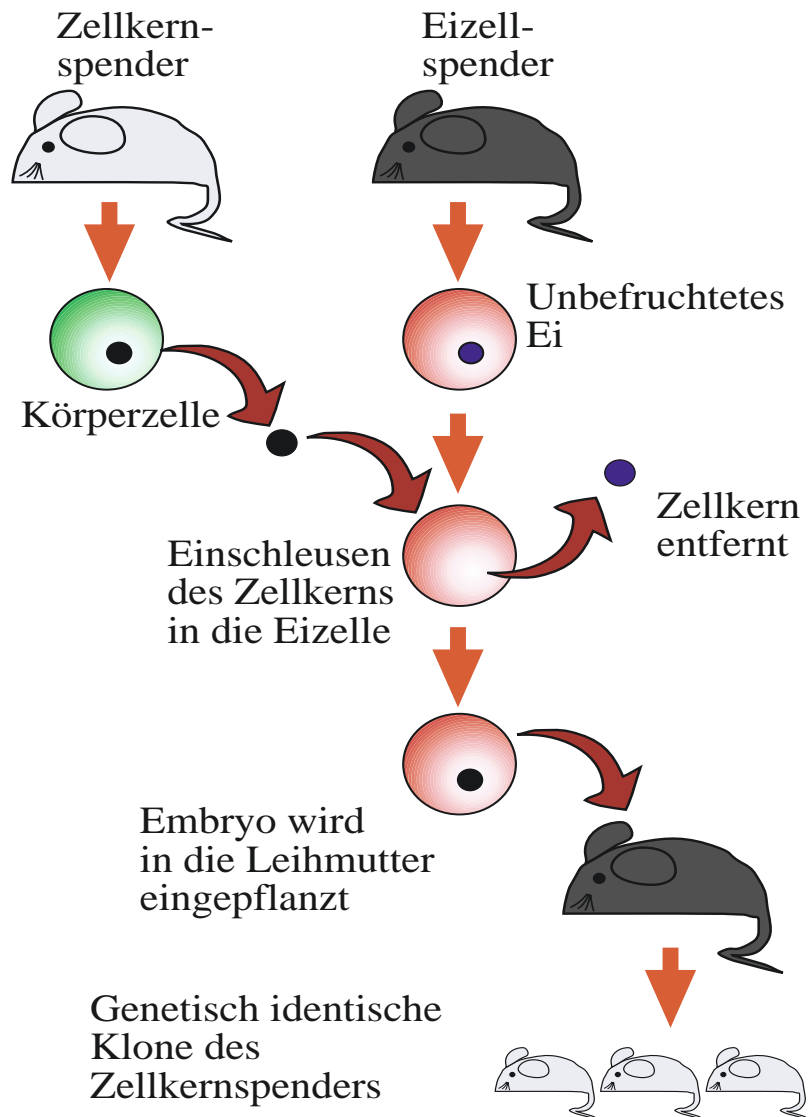


Abb.2: Das Prinzip des Klonens am Beispiel der Maus

Der Kern einer somatischen Zelle aus einer Spendermaus wird in die entkernte Eizelle einer anderen Maus eingebracht. Die so hergestellte Zygote entwickelt sich in einer Leihmutter zu einem dem Spender genetisch identischen Organismus. Das Klonen ist der Nachweis dafür, daß auch somatische Zellen alle Erbinformationen enthalten. Schema vereinfacht nach Wakayama et al., 1998.

Bei der regulativen Entwicklung nimmt die Umgebung einer Zelle entscheidenden Einfluß auf die Steuerung ihrer Gene. Das Potential, auf alle im Kern vorhandenen Informationen zurückzugreifen, ist groß und der Entwicklungsweg, den die Zelle einschlägt, ist flexibel (Wilkins, 1993). Die

präsumptive Potenz, d.h. die Anzahl der Differenzierungsmöglichkeiten für die Zelle, übersteigt somit die präsumptive Bedeutung, also die Anzahl der Aufgaben, die schließlich auch tatsächlich übernommen werden. Als typisches Beispiel für eine stark regulative Entwicklung gelten die Ontogenese von Frosch oder Maus. Bei Transplantationsversuchen stellte sich heraus, daß die Transplantate in vielen Fällen in der Lage waren, sich auf die neue zytologische Situation einzustellen und sich ihrer neuen Umgebung entsprechend zu entwickeln (Abb.1a).

Im Gegensatz dazu ist die Genregulation bei der Mosaikentwicklung von der zytologischen Umgebung weitestgehend unabhängig. Das Zytoplasma der Zelle dominiert die Regulation ihrer eigenen Erbinformation. Somit entspricht bei der Mosaikentwicklung die präsumptive Potenz der präsumptiven Bedeutung, was sich darin äußert, daß sich die Zellen auch nach einer Transplantation ihrer ursprünglichen Herkunft entsprechend verhalten und entwickeln (Abb.1b). Der Einfluß der Umgebung und die Möglichkeit, Entwicklungswege der Zelle zu variieren, sind gering. Ein bekanntes Beispiel für Mosaikentwicklung ist der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, bei dem nahezu keine Variation des Zellstammbaums auftritt (Abb. 3).

In der Regel findet man in Organismen eine Kombination beider Regulationsmöglichkeiten während der Ontogenese (Hörstadius, 1939).

MECHANISMEN DER GENREGULATION

Die Regulation des im Zellkern vorhandenen Erbguts kann folglich von der Umgebung einer Zelle oder von ihrem eigenen Zytoplasma beeinflusst werden. Dabei gibt es vier Ebenen, auf denen Genaktivität prinzipiell beeinflussbar ist (Abb. 4). Die erste Möglichkeit bietet sich bei der **Transkription**, d.h. dem Ablesen der Basensequenz im Zellkern und deren Übertragung auf die

"Blaupause", die mRNS. Transkriptionsfaktoren nehmen dabei durch Bindung an cis-regulatorische Bereiche der DNS in der Umgebung eines Gens auf dessen Expression Einfluß (Jacob und Monod, 1961).

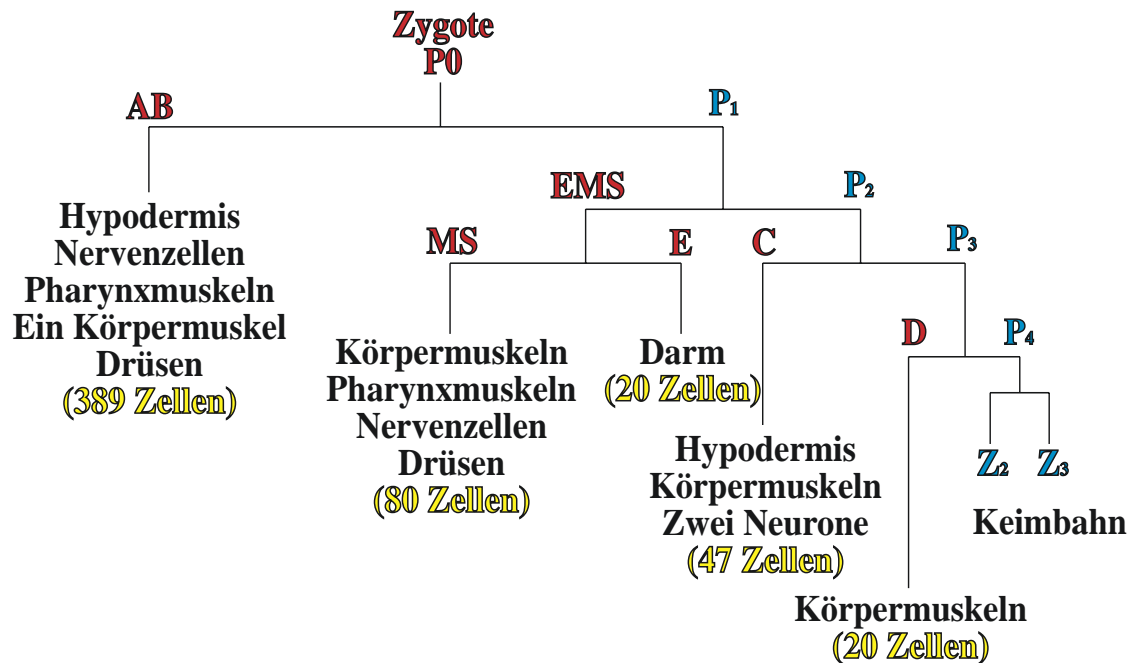


Abb.3: Mosaikentwicklung beim Fadenwurm *C.elegans* nach Strome und Wood

Zu den beeindruckendsten Beispielen der Mosaikentwicklung zählt der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*. Bei dieser Art ist der Zellstammbaum während der Entwicklung zwischen den einzelnen Individuen bezüglich fast jeder Einzelzelle identisch. Daher erhielten die ersten aus der Zygote hervorgehenden Zellen einen Buchstabenkode, der hier dargestellt ist. Mit P werden dabei immer die Zellen bezeichnet, aus denen sich später einmal die Keimbahn entwickeln wird.

Der kodierende Bereich von Genen ist bei Eukaryoten in mehrere sogenannte Exons aufgeteilt, die durch die entsprechende Anzahl von Introns räumlich getrennt werden. Nach der Transkription erfolgt noch im Zellkern das Ausschneiden dieser Introns aus dem sogenannten Primärtranskript, das **Prozessieren** der RNS. Dieser Vorgang bietet gleichzeitig eine zweite Möglichkeit, die Aktivität von Genen zu beeinflussen, indem auf die Geschwindigkeit oder auch die Nutzung verschiedener

Kombinationsmöglichkeiten beim Prozessierungsvorgang Einfluß genommen wird (Sharp, 1986).

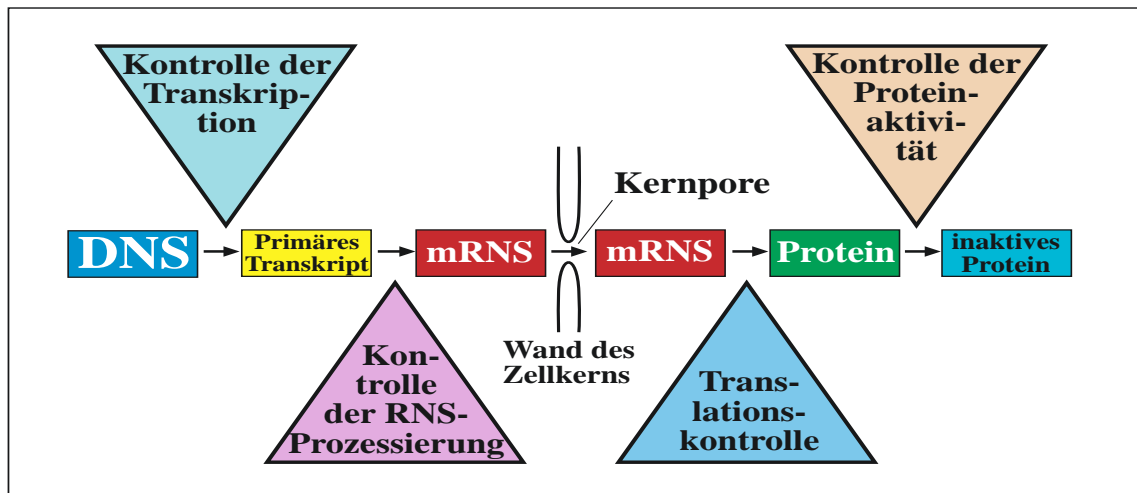


Abb.4: Mögliche Ebenen von Genregulation

Auf dem Weg von der DNS zum Protein ergeben sich vier Stationen, an denen enzymatisch auf die am Ende resultierende Aktivität des jeweiligen Gens Einfluß genommen werden kann.

Nach Transport der mRNS aus dem Kern ins Zytoplasma ist die **Translation** die dritte Ebene möglicher Regulation. Von der Stabilität der mRNS und der Aktivität der Ribosomen, die die mRNS-Sequenz in eine Aminosäuresequenz übersetzen, hängt die Menge des jeweils produzierten Proteins ab (Moldave, 1985).

Schließlich besteht noch die Möglichkeit, am Protein selbst Einfluß auf dessen Aktivität zu nehmen. Durch Manipulation der Faltung der Aminosäurekette, durch **Phosphorylierung** bestimmter Domänen zur Steuerung von deren Aktivität oder durch Bildung unterschiedlicher Proteinkomplexe laufen viele biologische Regulationsprozesse ab. Abhängig von seiner Konstitution kann ein Protein an bestimmte Aufgaben und Zellkompartimente delegiert werden (Koshland, 1973).

TRANSKRIPTIONSFAKTOREN REGULIEREN GEN-EXPRESSION BEREITS IM ZELLKERN

Im Brennpunkt der Entwicklungsbiologie steht die zu Beginn der Genaktivität mögliche Regulation der Transkription. Diese erfolgt durch Bindung von spezialisierten Enzymen, den Transkriptionsfaktoren, an cis-regulatorische DNS-Bereiche eines Gens (Abb.5). Diese Basensequenzen, die sich in der Nachbarschaft des zu regulierenden Gens befinden, werden anhand ihrer spezifischen Basenfolge von den Proteinen erkannt (Jacob und Monod, 1961).

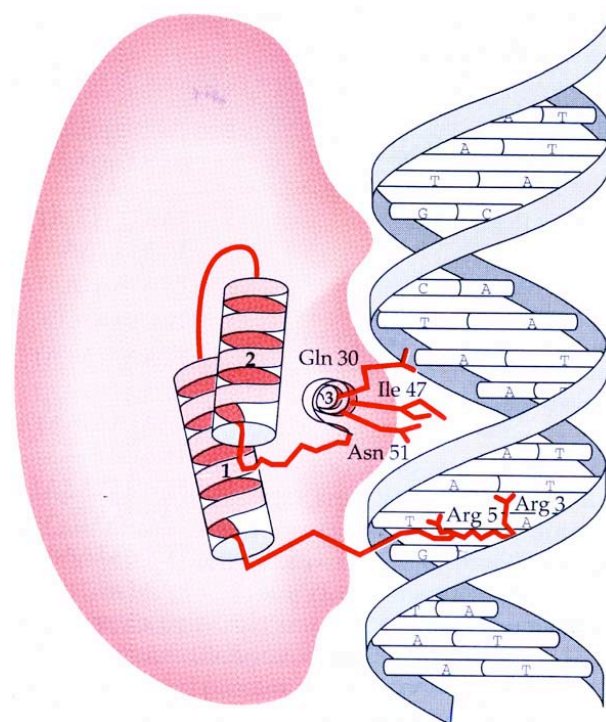


Abb.5: Der Transkriptionsfaktor *engrailed* lagert sich direkt an DNS an

Mittels kristallografischer Untersuchungen können die durch die Anlagerung von Transkriptionsfaktoren an DNS entstehenden Komplexe strukturell analysiert werden. In diesem Schema wird durch die Andeutung der Lage von drei α -Helices des *engrailed* Proteins - Helix 1 und 2 repräsentieren dabei das Helix-turn-Helix-Motiv der *Homöo-Box* - sowie einzelner für die Bindung ausschlaggebender Aminosäuren, klar, daß das Protein in gebundenem Zustand beide Furchen des DNS-Moleküls zur Erkennung des richtigen DNS-Motivs nutzt. Nach Pabo und Sauer, 1992.

Durch Bindung an solche DNS-Bereiche nimmt der jeweilige Transkriptionsfaktor auf chemischem Wege Einfluß auf die Transkription. Die Transkriptionskontrolle ermöglicht eine sehr spezifische und präzise Regulation der Genaktivität (Nüsslein-Volhard et al., 1987). Man bezeichnet die Gesamtheit der für die Genexpression verantwortlichen cis-regulatorischen Sequenzen als den Promotor eines Gens (Wilder et al., 2001). Häufig wird dieser Begriff in der Literatur aber auch zur Beschreibung des minimalen, für die reine Expression ausreichenden genomischen DNS-Bereiches verwendet. In diesem Fall unterscheidet man den Promotor von sogenannten "Enhancern", d.h. im aktiven Zustand auf die Transkription verstärkend wirkende Regionen, und "Silencern", die bei Bindung des entsprechenden Transkriptionsfaktors die Expression abschwächen. Einem einzigen cis-regulatorischen Element können dabei - abhängig vom daran bindenden Faktor - unterschiedliche Funktionen zufallen (Diamond et al., 1990).

Im Laufe der Evolution bildete sich in den verschiedensten Arten eine Reihe von Regulationskaskaden und Netzwerken zur Steuerung der Entwicklung aus, bei denen ein Transkriptionsfaktor direkt Einfluß auf die Expression eines anderen nimmt (Stanojevic et al., 1989). Auf diese Weise ist es möglich, Entwicklungsprozesse in der Abhängigkeit von Genaktivitäten in einem komplexen Netzwerk von Steuerungsvorgängen zu kontrollieren, wobei sich die Zellen an den Expressionsmustern verschiedener Gene orientieren können (Wolpert, 1971). Handelt es sich in diesem Fall um eine konzentrationsabhängige Wirkung von diffundiblen Faktoren, so spricht man bei diesen von Morphogenen (Struhl et al., 1989).

Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, daß die von der Natur einmal entwickelten Regulationsmechanismen während der Evolution immer neue Einsatzbereiche übernahmen (wie zum Beispiel das Konzept der lateralen Inhibition über Notch: Bray, 1998). Das bedeutet, daß man nicht nur einzelne Transkriptionsfaktoren oder entsprechende Genfamilien, sondern häufig auch ganze Regulationskaskaden von Genen gleichsam kopiert vorfindet, wobei die so entstandenen Duplikate unterschiedliche physiologische

Aufgabenbereichen übernommen haben oder auch mit gleichen oder ähnlichen Funktionen in unterschiedlichen Spezies vorkommen (Shelton und Wassermann, 1993). Mittlerweile ist allgemein akzeptiert, daß die Genfamilien durch wiederholte Verdoppelungsprozesse von Einzelgenen innerhalb des Genoms entstanden sind (McGinnis, 1984). Die neu entstandenen Gene übernahmen daraufhin neue Aufgaben. So bildeten sich während der Evolution verschiedene Klassen von gegenseitig voneinander abstammenden Transkriptionsfaktoren heraus, die sich alle durch die biochemische Eigenschaft, bestimmte Sequenzmotive der DNS zu erkennen, auszeichnen (Übersichtsartikel: Struhl, 1989). Die Konservierung von derart wichtigen Eigenschaften auch über Artgrenzen hinweg war für die Evolution von entscheidender Bedeutung. Denn die Natur wäre nicht so vielfältig, wenn jede Tier- und Pflanzenart die hochspezialisierten Regulationsmechanismen der Transkriptionskontrolle immer wieder neu hätte erfinden müssen.

Dem Bestreben und der Möglichkeit der Natur, altgediente biochemische Mechanismen immer wieder neuen Aufgaben und Spezies zuzuführen, verdanken wir also die Tatsache, daß einige Gene und Genfamilien in hochkonservierter Form gleichzeitig in so verschiedenen Organismen wie Hydra, Fliege und Mensch zu finden sind (McGinnis et al., 1984). Dieses Phänomen wiederum ermöglicht es der Biologie, von in Modellorganismen erforschten Prozessen auf für die Humanmedizin relevante Vorgänge im menschlichen Körper zu schließen (Beispiel: Hann und Balmain, 2001). Darüber hinaus eröffnet es die Perspektive, genetische Ähnlichkeiten zur Interpretation von phylogenetischen Zusammenhängen und Abstammungen heranzuziehen (Beispiel: Kundu et al., 2001). Die für Systematiker oft schwierige Differenzierung zwischen Homologie und Analogie ist durch das Studium der Genome der einzelnen Arten stark vereinfacht worden.

WICHTIGE TRANSKRIPTIONSFAKTOR-FAMILIEN

Die DNS-bindende Eigenschaft eines Transkriptionsfaktors wird durch eine bestimmte Domäne innerhalb des jeweiligen Proteins vermittelt (Scott et al., 1989). Dementsprechend ist dieser Bereich der Aminosäuresequenz einer strikten Selektion unterworfen, da die kleinste Veränderung hier die Gefahr des Verlustes der Affinität vom Protein zum DNS-Molekül in sich birgt. Demzufolge findet sich im für derart ausschlaggebende Proteinbereiche kodierenden DNS-Sequenzabschnitt ein hohes Maß an Übereinstimmung zwischen den Transkriptionsfaktoren einer Familie, während andere Sequenzbereiche einzelner Gene untereinander stärker variieren können (Übersichtsartikel *Pax*-Gene: Noll, 1993). Das eröffnet die Möglichkeit, sich bei der Analyse der kodierenden DNS-Sequenzbereiche von Transkriptionsfaktoren an den für die DNS-Bindedomäne des Proteins verantwortlichen Sequenzmotiven, die auch als Kasette oder "box" bezeichnet werden, zu orientieren (Übersichtsartikel: Schughart et al., 1988).

Doch nicht nur für Protein-Nukleinsäure-Interaktionen, sondern auch für die Bindung von Proteinen untereinander finden sich derart wiederkehrende Sequenzmotive (wie z.B. die *Lim*-Domäne: Sanchez-Garcia und Rabbitts, 1994).

Häufig enthalten Transkriptionsfaktoren verschiedene Motive unterschiedlicher Kategorien, da oft nicht nur einzelne Faktoren, sondern ganze Proteinkomplexe durch variable Bindung an verschiedene cis-regulatorischen Bereiche die Genexpression regulieren (Beispiel Dachshund: Chen et al., 1997). Die bereits an der kodierenden DNS-Sequenz erkennbare gleichzeitige Bindungsmöglichkeit sowohl an DNS als auch an andere Faktoren stellt beispielsweise ein typisches Erkennungsmerkmal eines innerhalb eines Proteinkomplexes auf Transkription kontrollierend einwirkenden Proteins dar (Steroidhormonrezeptoren: Beato, 1989).

Man nutzt die Zusammensetzung und die graduellen Ähnlichkeiten solcher Motive zur Einteilung der Transkriptionsfaktoren in verschiedene Klassen und

ordnet diese anhand der jeweils vorhandenen Kassetten und dem Grad ihrer Übereinstimmung bestimmten Familien zu. Die wichtigsten bisher bekannten Transkriptionsfaktorfamilien und insbesondere solche, die für die Entwicklung der Bauchspeicheldrüse eine entscheidende Rolle spielen, sollen im Folgenden anhand der jeweiligen Sequenzmotive vorgestellt werden:

Wegen ihrer umfassenden Bedeutung für die Regulation der Entwicklung verschiedenster Tier- und auch Pflanzenarten auf der einen und den sich für die Entwicklungsbiologie daraus ergebenden weitreichenden Erkenntnissen über molekulare Regulationsvorgänge während der Ontogenese auf der anderen Seite sind an erster Stelle die **Homöo-Box-Gene** zu nennen (Müller et al., 1988). Die Proteine enthalten ein 60 Aminosäuren umfassendes "helix-turn-helix" Motiv und haben als Transkriptionsfaktoren unter anderem entscheidenden Einfluß auf die regionale Spezifizierung entlang der anterior-posterioren Achsen im gesamten Tierreich (Übersichtsartikel: Kappen und Ruddle, 1993). Ursprünglich wurden sie in der Fliege *Drosophila melanogaster* entdeckt (Lewis, 1978).

In diesem Insekt liegen einige *Homöo-Box-Gene* zu zwei Gruppen lokal zusammengefaßt auf dem Chromosom drei. Man spricht daher von Genkomplexen bzw. Klustern. Bei der Fliege wird einer davon entsprechend einem darin enthaltenen Gen "Antennapediakomplex", der andere "Bithoraxkomplex" genannt (Lewis, 1978). Man nimmt an, daß diese große Zahl benachbarter *Homöo-Box-Gene* durch Duplikationsereignisse während der Evolution entstanden ist (Kappen und Ruddle, 1993). Darüber hinaus sind im weiteren Verlauf der Evolution offenbar die gesamten Komplexe sowie auch einzelne Gene daraus mehrfach kopiert worden und konnten anschließend ähnliche oder aber ganz neue Aufgaben in den sich entwickelnden höheren Organismen übernehmen. Augenscheinlichstes Beispiel dafür sind die vier "*Hox*-kluster" bei Säugetieren (Kessel, 1992).

In manchen Proteinen wird die *Homöo*-Domäne von einem weiteren DNS-bindenden Motiv begleitet. In einem speziellen Fall faßt man eine solche Kombination verschiedener Domänen in der Nomenklatur als **POU-Domäne**

zusammen, benannt nach den Genen *Pit-1*, *Oct-1* und *unc-86*, in denen dieses spezielle Motiv zuerst entdeckt worden ist (Herr et al., 1988).

Die recht heterologe Gruppe der **NK-Homöo-Box-Gene** geht zurück auf eine Durchmusterung einer *Drosophila*-Genbank mit Oligonukleotiden aus *Homöo*-Domänen. Dabei wurden vier Gene, *NK1-4*, entdeckt (Kim und Nierenberg, 1989). Seitdem kam eine Reihe weiterer, diesen Genen ähnlicher *Homöo*-Box-Gene in unterschiedlichen Arten hinzu (so die *Nkx*-Gene der Maus, McMahon, 2000).

Die erst in den vergangenen Jahren definierte **Onecut-Genfamilie** besitzt zwei benachbarte *Homöo*-Domänen, die durch eine variable Verbindungssequenz getrennt sind. Eine der beiden *Homöo*-Domänen ist durch das "cut"-Gen bekannt, das bei der Entwicklung der Sinnesorgane der Fruchtfliegen eine wichtige Rolle spielt. Sie wird deshalb cut-Domäne genannt (Lannoy et al., 1998).

Die für Interaktionen zwischen Proteinen verantwortliche **LIM-Domäne** ist ebenfalls nach den ersten Genen benannt, in denen dieses Sequenzmotiv beschrieben wurde (*lin-11*, *isl-1*, *mec-3*). Es handelt sich dabei um Bereiche, die auffällig häufig die Aminosäure Cystein enthalten und über diese in der Lage sind, zwei Zinkionen zu binden. Von der richtigen Anordnung dieser Zinkionen hängt offensichtlich die Effektivität der Bindungseigenschaften an andere Proteine ab. Die *LIM*-Domäne findet in den unterschiedlichsten Bereichen der Protein-Protein-Interaktion Verwendung. Sie tritt in Kombination mit DNS-bindenden Motiven von Transkriptionsfaktoren, Phosphorylierungsdomänen von Kinasen, aber auch als einziges funktionelles Motiv eines Gens auf (Dawid et al., 1995).

Bei den **Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren** treten ebenfalls Zinkionen in Kombination mit in charakteristischen Abständen auftretenden Cysteinen auf. Die sich daraus ergebende Struktur hat in diesem Fall allerdings DNS-bindende Eigenschaften und dient einer Reihe von Transkriptionsfaktoren als DNS-erkennendes Element (Rosenberg et al., 1986). Häufig findet man eine Kombination mehrerer Zinkfinger motive (Kaptein, 1992). Ein typisches Beispiel für die Verwendung der DNS-bindenden Eigenschaften von

Zinkfingerdomänen in Kombination mit anderen funktionellen Einheiten sind die strukturell hochkonservierten Steroidhormon-Rezeptor-Proteine (Kumar et al., 1987). Sie besitzen sowohl eine Hormon-bindende, als auch eine DNS-bindende und darüber hinaus eine Transaktivierungsdomäne. Letztere vermittelt nach Erkennen des Hormons durch das Protein und die dadurch möglich gewordene Bindung am Promotor des Zielgens dessen gewünschte Regulation.

Bei der Klasse der **Helix-Schleife-Helix-Proteine** (basic helix-loop-helix, bHLH) wird die DNS-Bindung durch einen Strang von basischen Aminosäuren vermittelt, die mit der negativ geladenen DNS interagieren können. Die bHLH-Proteine binden DNS in Form von Dimeren, wobei die Regulation der Genaktivität von der jeweils verwendeten Zweierkombination abhängt (Murre et al., 1989). Häufig findet man ubiquitär exprimierte bHLH-Proteine, die als Homodimer kaum Einfluß auf die Transkription nehmen. In Kombination mit anderen Partnern kann dann aber eine spezifische Aktivität vermittelt werden (Beispiel *MyoD*: Benezra et al., 1990).

Den bHLH-Proteinen sehr ähnlich, wird bei den Transkriptionsfaktoren der bZip-Klasse (**basischer Leucin-Reißverschluß** (Zipper)) die Dimerisierung durch einen "Leucin-Reißverschluß" vermittelt. Die regelmäßig in einer α -Helix angeordneten Aminosäuren sind wasserabweisend und lagern sich deshalb leicht in enger Nachbarschaft aneinander an (Landschultz et al., 1988).

Transkriptionsfaktoren mit dem Sequenzmotiv "**fork head/winged helix**" besitzen eine dem "helix-turn-helix"-Motiv ähnliche Struktur. Die Bezeichnung "winged helix", also "Helix mit Flügeln" ergibt sich aus der Struktur des Proteins, wenn es an die DNS gebunden ist. Die spezifische Basensequenzen erkennenden Bereiche liegen dann in der größeren der beiden DNS-Furchen und unspezifische, die Zuckerphosphate bindende Bereiche ragen wie Flügel bei einem Schmetterling von dort ausgehend aus der Furche heraus. Das *fork head* Gen ist der namensgebende Repräsentant dieser Genfamilie, der in der Fliege entdeckt worden ist (Kaufmann und Knöchel, 1996).

DIE FAMILIE DER PAX-GENE

Das gemeinsame Merkmal der *Pax*-Gene ist die 128 Aminosäuren umfassende "*Paired-Box*". Sie wurde in der Fliege als gemeinsames Sequenzmotiv der Gene *paired*, *gooseberry-distal* und *gooseberry-proximal* entdeckt (Bopp et al., 1986). Seitdem gelang der Nachweis von Vertretern dieser Genfamilie in nahezu jeder daraufhin untersuchten Tierart (Übersichtsartikel zum Beispiel *Pax6*: Callaerts et al., 1997). Durch Ausbildung von zwei Helix-Drehung-Helix-Strukturen ermöglicht die *Paired*-Domäne (PD) dem jeweiligen Protein sequenzspezifische DNS-Bindung (Breitling und Gerber, 2000). Darüber hinaus findet sich in einigen Vertretern dieser Genfamilie zusätzlich eine *Homöo*-Domäne (HD) und eine konservierte Okta-Box (O), deren Funktion die Steuerung der Methylierung (Ziman und Kay, 1998) oder Interaktion mit anderen Proteinen sein könnte (Eberhard et al., 2000). Je nach Zusammenstellung des jeweiligen *Pax*-Gens erfolgt die Einteilung der *Pax*-Gene in vier Klassen (Abb. 6, Übersichtsartikel: Underhill, 2000; Noll, 1993). Bei der Maus konnten neun *Pax*-Gene isoliert werden (Walther et al., 1991). Vier von ihnen besitzen neben der namensgebenden *Paired*-Domäne noch eine *Homöo*-Domäne. Im Gegensatz zu den *Hox*-Genen sind die *Pax*-Gene jedoch nicht in Komplexen organisiert, sondern finden sich über das Genom verstreut (Walther et al., 1991).

Pax-Gene spielen eine wichtige Rolle bei der Zellspezifizierung während musterbildender Prozesse sowie beim Erhalt regionaler Identitäten (Stoykova und Gruss, 1994). Ihre Aktivität ist entscheidend für die Entwicklung so unterschiedlicher Organe wie Gehirn, Auge, Mittelohr, Bauchspeicheldrüse, Niere, Schilddrüse sowie von aus der Neuralleiste hervorgehenden Strukturen (Übersichtsartikel: Mansouri et al., 1996). Das konnte durch gezielte Gen-Inaktivierungen der einzelnen *Pax*-Gene in der Maus gezeigt werden (Übersichtsartikel: Wehr und Gruss, 1996). Darüber hinaus stellte sich heraus, daß die menschlichen Erbkrankheiten Waardenburg-Syndrom (*Pax3*) und Aniridie (*Pax6*) sowie vererbare Nieren- und Sehnervfehlbildungen (*Pax2*), Schilddrüsen- (*Pax8*) und Zahndefekte (*Pax9*) auf Fehlfunktion von *Pax*-Genen

zurückzuführen sind (Übersichtsartikel: Mansouri et al., 1994 und Mansouri et al., 1998; Peters et al., 1998).

Darüber hinaus können *Pax*-Gene als Protoonkogene fungieren. Eine Überexpression von Mitgliedern der *Pax*-Familie in 3T3 Fibroblasten hatte deren Transformation zur Folge (Sarris und Ford, 1999; Maulbecker und Gruss, 1993). Außerdem konnte nachgewiesen werden, daß die humanen Gene *PAX3* und *PAX7* eine Rolle im Rhabdomyosarkom, einer Tumorerkrankung im Kindesalter, spielen (Barr, 2001).

Gen	Klasse	Lokus	Struktur			Mausmutante	Erbkrankheit	K.O. Phänotyp
			PD	O	HD			
Pax1	I	20p11		undulated		Skelettdefekte		
Pax9	I	14q12 - q13			Zahndefekte	Zahndefekte		
Pax3	II	2q35		splotch	Waardenburg	Defekte in Neuralrohr, Muskel und Neuralleiste		
Pax7	II	1p36.2				Fehlfunktion von Neuralleistenzellderivaten		
Pax2	III	10q25		1Neu	Nierenhypoplasie Sehnervfehlbildung	Defekte in Urogenitalsystem und Mittelohr		
Pax5	III	9p13				B-Zelldefekt, Gehirndefekte		
Pax8	III	2q12 - q14			Schilddrüsenfehlbildung	Keine Thyroxin-Produktion der Schilddrüse		
Pax4	IV	7q				Diabetes, keine Langerhansinseln		
Pax6	IV	11p13		small eye	Aniridia	Defekte in Auge, Gehirn und Bauchspeicheldrüse		

Abb. 6: Übersicht über die *Pax*-Gene und entsprechende menschliche Syndrome

Die Tabelle zeigt die neun in der Maus isolierten *Pax*-Gene. Aus der Aufstellung ist die Einteilung in vier Klassen erkennbar, die vom Vorhandensein von *Paired*-Domäne (PD), *Octabox* (O) und *Homöo*-Domäne (HD) abhängt. Die Kartierung der Gene zeigt ihre Verteilung über das Genom. Außerdem sind die bereits vor der Entdeckung der entsprechenden *Pax*-Gene bekannten Mausmutanten, auf Mutationen von *Pax*-Genen beruhende Erbkrankheiten sowie die in der Maus beobachteten Null-Mutanten-Phänotypen (Knockout-Phänotypen, K.O.) beschrieben.

PAX4 UND PAX6

Die zur Gruppe IV zusammengefaßten Gene *Pax4* und *Pax6* besitzen eine *Paired*- und eine *Homöo*-Domäne, jedoch keine Oktabox (Abb. 6). Verglichen mit den anderen Genen der *Pax*-Familie weichen diese beide Kandidaten in ihrer Basensequenz recht stark von der Konsensussequenz innerhalb der konservierten Sequenzbereiche der übrigen *Pax*-Gene ab. Dies gilt für *Pax4* in noch weit stärkerem Maße als für *Pax6* (Walther et al., 1991). Eine weitere Gemeinsamkeit findet sich in der Expression beider Gene in der sich entwickelnden Bauchspeicheldrüse. Hier ist keines der übrigen *Pax*-Gene aktiv (Mansouri et al., 1999). Davon abgesehen ist die Expression der beiden Gene jedoch sehr unterschiedlich. *Pax4* kann in Vorläuferzellen der Bauchspeicheldrüse beginnend von Stadium E 9,5 an in der Maus nachgewiesen werden (Sosa-Pineda et al., 1997). Lediglich vereinzelte *Pax4*-positive Zellen tauchen vorübergehend im Neuralrohr auf. Beobachtet man in frühen Entwicklungsstadien noch eine Koexpression mit Glukagon und Insulin, so ist die *Pax4*-Aktivität später auf Insulin- und Somatostatin- produzierende Zellen des Organs beschränkt (Dohrmann et al., 2000). Gleichzeitig mit der Geburt der Maus findet schließlich ein komplettes Abschalten der *Pax4*-Expression statt.

Während die Aktivität von *Pax4* also im Wesentlichen auf ein Organ beschränkt bleibt, findet sich *Pax6*-Protein beginnend vom embryonalen Tag acht der Entwicklung an (E 8,0) weit verbreitet in Auge, Nase, Neuralrohr und verschiedensten Gehirnbereichen (Stoykova und Gruss, 1994; Kammandel et al., 1999). Die bereits in der Genexpression erkennbare unterschiedliche Rolle beider Gene findet sich auch bei der Analyse der Knockout-Mausmutanten. Bereits in *Pax6*-Heterozygoten kann nämlich ein Augendefekt beobachtet werden, der der menschlichen Aniridia und der Mausmutante "small eye", entspricht (Hill et al., 1991). Heterozygote *Pax4*-Mäuse zeigen dagegen keine Beeinträchtigungen. Erst bei komplettem Ausschalten der *Pax4* Funktion fehlen der Bauchspeicheldrüse die Insulin- und Somatin- produzierenden Zellen, stattdessen ist die Zahl der Glukagonomazellen erhöht. Die Mäuse sterben nach der Geburt an Diabetes (Sosa-Pineda et al., 1997).

Mäuse, denen funktionelles *Pax6*-Protein fehlt, zeigen ein größeres Spektrum an Defekten. Den Tieren fehlen Augen und Nase (Quinn et al., 1996; Grindley et al., 1995). Es lassen sich schwere Entwicklungsdefekte in Telencephalon und Diencephalon beobachten (Stoykova et al., 1996) und in der Bauchspeicheldrüse unterbleibt sowohl die Ausbildung der Langerhans-Inseln als auch die Differenzierung von Glukagon produzierenden Zellen (St.Onge et al., 1997).

Besonderes Interesse erweckte jedoch die Rolle von *Pax6* während der Augenentwicklung. Zum einen gelang der Nachweis der Homologie zum *eyeless*-Gen der Fliege (Quiring et al., 1994). Trotz der unterschiedlichen Struktur der optischen Organe in Fliege und Maus stellt *Pax6* in beiden Fällen einen Hauptschalter am Beginn der Augenentwicklung dar (Gehring, 1996). So führt das Ausschalten des Gens in beiden Fällen zu einem Verlust der Augen. Darüber hinaus gelang es, dieses Phänomen bei der Fliege durch ektopische Reaktivierung eines menschlichen *PAX6*-Allels rückgängig zu machen. Durch starkes ubiquitäres Einschalten des murinen *Pax6*-Gens gelang außerdem die Induktion ektopischer Augen in Fliege und Fisch (Übersichtsartikel: Oliver und Gruss, 1997).

Zum anderen konnte gezeigt werden, daß *Pax6* nach einer ersten Induktion eine Reihe entscheidender Aufgaben auch später während der Augenentwicklung übernimmt (Ashery-Padan und Gruss, 2001). Durch zielgerichtetes Abschalten des Gens in Linse und Retina gelang der Nachweis, daß das Gen zum einen für die Diversifizierung von Zelltypen in der Retina verantwortlich ist (Marquardt et al., 2001) und zum anderen für die Differenzierung und Reifung der Linse (Ashery-Padan et al., 2000). Ohne intakte Linse ist auch die anatomische Retinaentwicklung gestört und anstatt einer einzigen ausgerichteten Netzhaut beobachtet man als Folge bei diesem Experiment mehrere ungeordnete Epithelschichten innerhalb des optischen Vesikels.

DIE ENTWICKLUNG DER BAUCHSPEICHELDRÜSE

Die Bauchspeicheldrüse bei Säugetieren ist ein im Ursprung anatomisch sowie auch funktionell zweigeteiltes Organ. Seine Entwicklung im Rahmen der Ontogenese ist in genetischer Hinsicht in der Maus intensiv untersucht worden (Übersichtsartikel: Huang und Tsai, 2000; Yamaoka und Itakura, 1999; Edlund, 1998; Slack, 1995).

Nach einer Induktion durch die Chorda dorsalis beginnt am Tag E 8,5 des sich entwickelnden Mausembryos im oberen Bereich des Zwölffingerdarms die Knospung eines dorsalen und eines ventralen Teils des Organs (Abb. 7a). Durch eine Drehung des Darms fusionieren beide Kompartimente im Laufe der Entwicklung und sind funktionell nicht voneinander zu unterscheiden. Trotzdem nimmt das Organ zwei völlig unterschiedliche Aufgaben wahr. Funktionell unterscheidet man bei der Bauchspeicheldrüse einen exokrinen Teil, der Verdauungsenzyme produziert, und einen endokrinen Teil, der durch Hormonproduktion den Blutzuckerspiegel reguliert. Im exokrinen Pankreas findet man dementsprechend Drüsenzellen, die Verdauungsenzyme synthetisieren und über ein Gangsystem, das aus den sogenannten Gangzellen besteht, an den Darm abgeben. Das endokrine Pankreas setzt sich aus vier Zelltypen zusammen, die zellmorphologisch in den Langerhans-Inseln zusammengefaßt und in exokrines Gewebe eingebettet sind (Abb. 7b). Die vier Zelltypen unterscheiden sich durch ihre jeweilige Produktion der Hormone Insulin, Glukagon, Somatostatin und pankreatisches Polypeptid (PP) und werden als β -, α -, δ - und PP-Zellen bezeichnet.

DIE GENETIK DER PANKREASENTWICKLUNG

Im Rahmen der Analyse von genetischen Aspekten der Pankreasentwicklung gelang in den vergangenen Jahren die Isolation und funktionelle Charakterisierung einer Reihe von Genen, die für die Reifung des Organs essenziell sind. Die wichtigsten von ihnen werden im Folgenden anhand ihrer

Expressionsdaten und der Funktionsanalyse durch Geninaktivierung vorgestellt.

Die Genprodukte *Sonic hedgehog (Shh)* und *Activin* vermitteln als Signalmoleküle die zu Beginn der Pankreasentwicklung stehende Induktion durch die Chorda dorsalis (Hebrok et al., 2000). Das im Endoderm exprimierte *Shh* unterdrückt dort normalerweise *Pdx1*-Aktivität (Apelqvist et al., 1997). Durch Kontakt des frühen Darms zur Activin exprimierenden Chorda dorsalis wird in einem definierten Bereich, aus dem sich das Organ bilden wird, die *Shh*-Aktivität jedoch reprimiert und *Pdx1*-Expression induziert (Roy et al., 2001).

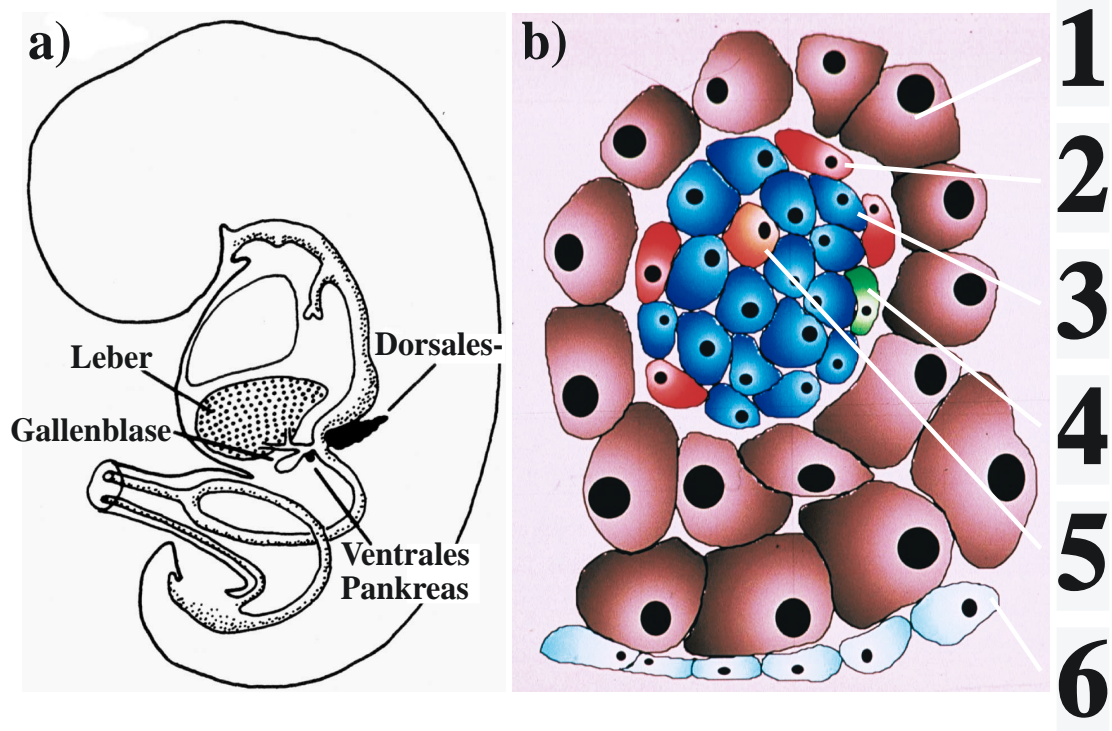


Abb.7: Die Bauchspeicheldrüse, Langerhans-Insel

a) Lage des Organs im Embryo während der frühen Entwicklung.

b) Langerhans-Inseln: Während sich die in der Insel mehrheitlich vorkommenden Insulin-produzierenden Zellen im Zentrum der Insel aufhalten, findet man die übrigen Zellsorten in der Peripherie. 1) Azinäre Zellen des exokrinen Pankreas. 2) Glukagonoma (α -) Zellen. 3) Insulinoma (β -) Zellen. 4) Somatostatinoma (δ -) Zellen. 5) PP-Zellen. 6) Gangzellen

Das Gen ***Pdx1*** wurde ursprünglich als ein die Insulin-Transkription regulierendes Gen entdeckt (Ohlsson et al., 1991). Es gehört zu den *Homöo*-Box-Transkriptionsfaktoren (Ohlsson et al., 1993). *Pdx1*-Expression im Duodenum am Tag 8,5 der Mausentwicklung ist der erste Hinweis auf dieses Organ im sich entwickelnden Organismus (Johnsson et al., 1994). Fehlt der Maus *Pdx1*, so stoppt die Pankreasentwicklung zu einem sehr frühen Zeitpunkt bereits bei der Knospung, und die Ausbildung der Bauchspeicheldrüse bleibt aus (Offield et al., 1996). Während man *Pdx1* zu einem frühen Zeitpunkt der Entwicklung in allen Zellen des sich entwickelnden Organs exprimiert vorfindet, so ist die spätere Expression und die Aktivität in der adulten Maus auf die insulinproduzierenden β -Zellen beschränkt und nimmt hier auf die Regulation der Insulinaktivität Einfluß (Macfarlane et al., 2000).

Die drei Faktoren ***HNF-6***, ***ngn3*** und ***NeuroD*** spielen bei der Abgrenzung des endokrinen vom exokrinen Pankreas eine entscheidende Rolle (Jacquemin et al., 2000; Gradwohl et al., 2000; Naya et al., 1997). *HNF-6* ist ein *Onecut*-Protein, *ngn3* und *NeuroD* gehören zu den bHLH-Proteinen. Alle drei Faktoren sind früh in der sich entwickelnden Bauchspeicheldrüse exprimiert und später in allen Zellen des endokrinen Pankreas aktiv. *HNF-6* und *ngn3* führen nach Inaktivierung in der Maus zu einem Verlust der Langerhans-Inseln, und nur vereinzelte, nicht ausdifferenzierte endokrine Zellen können detektiert werden. Im *NeuroD*-Knockout ist die Population aller vier endokriner Zelltypen deutlich reduziert. *NeuroD* ist in der Lage, als Heterodimer mit *Pan*-Genprodukten an E-Box-Motive der DNS zu binden (Mutoh et al., 1997).

Das ***Isl1***-Protein ist namensgebendes Genprodukt der *Lim/Homöo*-Domänen-Familie von Transkriptionsfaktoren (Karlsson et al., 1990). Expression dieses Gens findet sich in der gesamten Bauchspeicheldrüse und dem dorsalen Mesenchym, das das Organ umgibt. Nach Inaktivierung des *Isl1*-Gens in der Maus fehlt den homozygoten Tieren der dorsale Teil der Bauchspeicheldrüse und das umgebende Mesenchym (Ahlgren et al., 1997).

Die beiden mit dem *Drosophila NK-2* Gen verwandten Faktoren ***Nkx2.2*** und ***Nkx6.1*** nehmen Einfluß auf die Differenzierung einer bereits als endokrine Zellen determinierten Zellpopulation (Sander et al., 2000). Dabei ist *Nkx2.2* in

allen β -Zellen, 80 Prozent der α -Zellen und den meisten δ -Zellen aktiv. Ohne *Nkx2.2* bleibt eine Ausdifferenzierung dieser Zelltypen entsprechend der Expressionsrate aus; somit führt hier das Fehlen ausdifferenzierter β -Zellen zu Diabetes (Sussel et al., 1998). *Nkx6.1* findet sich nach einer anfänglichen recht ubiquitären Expression hauptsächlich in β -Zellen. In der Knockout-Situation bleibt deren endgültige Differenzierung aus. *Nkx6.1* wird vermutlich von *Nkx2.2* reguliert (Sander et al., 2000).

PAX4 UND PAX6

Pax4 und *Pax6* tragen maßgeblich zur Entwicklung der Bauchspeicheldrüse bei (Übersichtsartikel: Mansouri et al., 1996). Dabei ist *Pax6* für die anatomische Struktur der Langerhans-Inseln verantwortlich (St.Onge et al., 1997). Das Gen ist in allen endokrinen Zelltypen exprimiert, und ohne seine Aktivität bleibt die Zusammenlagerung der endokrinen Zellen zu Inseln aus. Ferner finden sich unter den somit ohne Struktur im exokrinen Gewebe verstreuten endokrinen Zellen keine α -Zellen. Weitere endodermale Veränderungen sind im Magen der Mäuse zu beobachten (Larsson et al., 1998). Im distalen Magenbereich, dem Antrum, liegt ohne *Pax6* eine signifikante Verringerung von Gastrin- und Somatostatin-Produktion vor. Die Anzahl der entsprechenden endokrinen Zellen ist reduziert.

In der frühen Entwicklungsphase der Bauchspeicheldrüse ist *Pax4* in vielen Vorläuferzellen exprimiert. Später erfolgt jedoch eine Begrenzung der Aktivität auf β - und δ -Zellen (Übersichtsartikel: Dohrmann et al., 2000). Ein Expressionsmaximum ist zwischen den Stadien E 13,5 und E 15,5 der Mausentwicklung zu beobachten. Nach der Geburt ist *Pax4* inaktiv.

Die Deletion von *Pax4* führt zum Verlust der Insulin-produzierenden β - und der Somatostatin synthetisierenden δ -Zellen. In den anatomisch nach wie vor intakten Inseln ist eine entsprechend erhöhte Anzahl von α -Zellen vorzufinden, was auf einen alternativ beschrittenen Differenzierungsweg der ursprünglich als β -Zellen vorgesehenen Zellpopulation hinweist (Sosa-Pineda et al., 1997). Ferner ist *Pax4* für die Differenzierung aller endokrinen Zellen im Zwölffingerdarm

verantwortlich. Die Serotonin-, Sekretin-, Gastrin-, und Glukagonkonzentration ist in den *Pax4*-Knockout-Mäusen signifikant reduziert (Larsson et al., 1998).

Wie zu erwarten, hat ein gleichzeitiges Ausschalten beider *Pax*-Gene einen Verlust von Inselstruktur, sowie der α -, β -, und δ -Zellen im Pankreas zur Folge (StOnge et al., 1997).

REGULATION VON PAX4 UND PAX6

Zu Beginn dieser Arbeit lag bereits eine detaillierte Promotoranalyse des *Pax6*-Gens vor. Demzufolge stellt *Pdx1* einen der Hauptregulatoren der für die Pankreas-Expression verantwortlichen cis-regulatorischen Bereiche im *Pax6*-Promotor dar (Plaza et al., 1999; Kammandel et al., 1999).

Für *Pax4* konnte ein genomisches 7,8 kb DNS-Fragment isoliert werden, durch das eine der natürlichen *Pax4*-Expression entsprechende Regulation des *lacZ*-Reporter-Gens gelang. Darüber hinaus lag die genomische Sequenz des genomischen humanen *PAX4*-Lokus vor (Brink, 1998).

ZIEL DIESER ARBEIT

Ziel dieser Arbeit ist eine Eingrenzung des funktionellen *Pax4*-Promotors und eine detaillierte Analyse der cis-regulatorischen Elemente, die gleichzeitig Einblick in die Rolle der an der Regulation von *Pax4* beteiligten Transkriptionsfaktoren gibt.

II. ERGEBNISSE

"UNSER ZIEL IST ES, HERAUSZUFINDEN, OB STRUKTUR UNMITTELBAR DURCH DNS-KODIERTE INFORMATION IN DER ZYGOTE DETERMINIERT IST - INWIEWEIT STRUKTUR AUF REINE INFORMATION REDUZIERT WERDEN KANN."

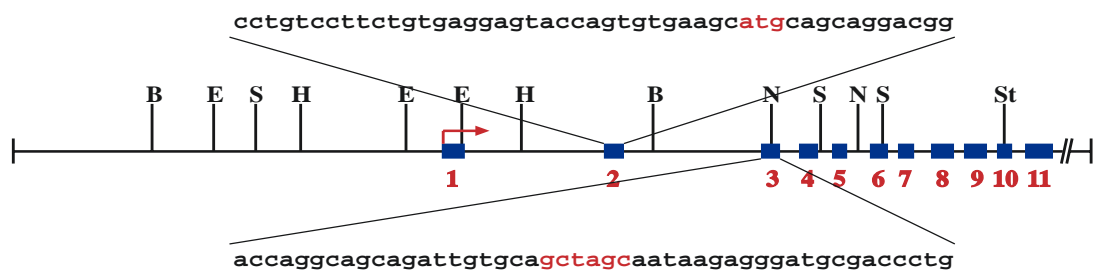
JONATHAN BARD (1990)

Grundlage dieser Arbeit stellt die Isolation eines 7,8 kb großen funktionellen genomischen DNS-Fragments innerhalb des murinen *Pax4*-Lokus dar, das in der Lage ist, das Reporter-gen *lacZ* in der Bauchspeicheldrüse räumlich und zeitlich dem *Pax4*-Gen entsprechend zu aktivieren (Brink, 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das regulatorische Potential dieses Promotors hinsichtlich der Parallelen zur *Pax4*-Expression genauer untersucht. Dabei gelang eine Präzisierung und weitere Eingrenzung der regulativen Bereiche und schließlich die Identifikation einzelner funktioneller Elemente des *Pax4*-Promotors, die Rückschlüsse auf die an der Regulation von *Pax4* beteiligten Transkriptionsfaktoren erlaubt.

EXPRESSIONSANALYSE DES 7,8 KB-PROMOTORS

Das in einer ersten Analyse untersuchte 7,8 kb große genomische DNS-Fragment enthält die ersten beiden, sowie Teile des dritten Exons. Das Reportergen *lacZ* wurde dem Translationsrahmen entsprechend in das dritte Exon eingesetzt, so daß dem daraus resultierenden Protein noch ein kurzer *Pax4*-kodierter Bereich anhaftet (Abb. 8).

a)



b)

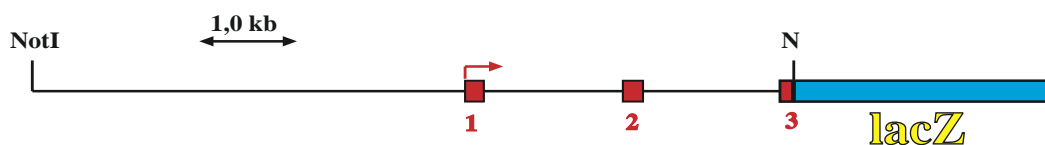


Abb. 8: Reporterkonstrukt mit 7,8 kb genomischer Sequenz

a) Physikalische Karte des *Pax4*-Lokus. Dargestellt sind die Elf Exons des Gens (blau, mit roter Numerierung) und die Schnittstellen der Restriktionsenzyme BamHI (B), EcoRI (E), HindIII (H), NheI (N), SmaI (S) und StuI (St), sowie Ausschnitte der Sequenzen des zweiten (oben) und dritten (unten) Exons. In der Sequenz sind der Translationsstart im zweiten Exon und die zur Klonierung verwendete NheI-Schnittstelle des dritten Exons hervorgehoben.

b) Reporterkonstrukt mit dem an das dritte Exon anschließenden Reporter-gen.

Während zu Beginn dieser Arbeit die bis dahin vorliegende Analyse des 7,8 kb Promotorfragments lediglich auf Daten von transient transgenen Mäusen beruhte, wurde nun, um durch eine stabile Insertion des Konstruktes in das Mausgenom reproduzierbare Daten erheben zu können, die Expression anhand von transgenen Mauslinien studiert. Bei der Analyse der auf diese Weise auch in den Folgegenerationen von aktiven Promotorkonstrukten vermittelten Reporterogenaktivität können Effekte aufgrund einer unkontrollierten schimären Situation, die bei transienten Tieren durchaus wahrscheinlich ist, ausgeschlossen werden.

Deshalb wurden mit dem 7,8 kb Reporterkonstrukt durch Mikroinjektion vier transgene Mauslinien hergestellt und analysiert. Die Effektivität der Mikroinjektion betrug 9 Prozent transgene Tiere und 7 Prozent exprimierende Transgene pro Gesamtzahl der aus der Mikroinjektion hervorgegangenen Mäuse.

Tabelle 1:

Konstrukt	Tiere insgesamt.	Davon Transgene	Transgene mit Expression
7,8 kb	45	4 (8,9%)	3 (6,7%)

Tab. 1: Effektivität der Mikroinjektion des 7,8 kb Konstruktes

Die Genotypisierung der Tiere wurde mittels Southern-Blot-Hybridisierung einer *lacZ*-Probe und mittels PCR unter Verwendung von Primern aus dem *lacZ*-Gen vorgenommen (Abb. 10 - 12). Dabei erkannte die radioaktiv markierte Probe für den Southern-Blot nach BamHI-Verdau der genomischen DNS ein 5,2 kb großes DNS-Fragment (Abb. 10). Mit der PCR wurde ein 415 Basenpaare großes DNS-Fragment innerhalb des *lacZ*-Gens amplifiziert (Abb. 12). Die Verpaarung der transgenen F0-Mäuse mit Tieren des Mausstammes FVB (bei der Mikroinjektion werden Eizellen des FVB-Mausstammes verwendet) führte,

II. ERGEBNISSE

wie zu erwarten, zu einem 50 prozentigen Anteil transgener Tiere in der F1-Generation (Abb. 11).

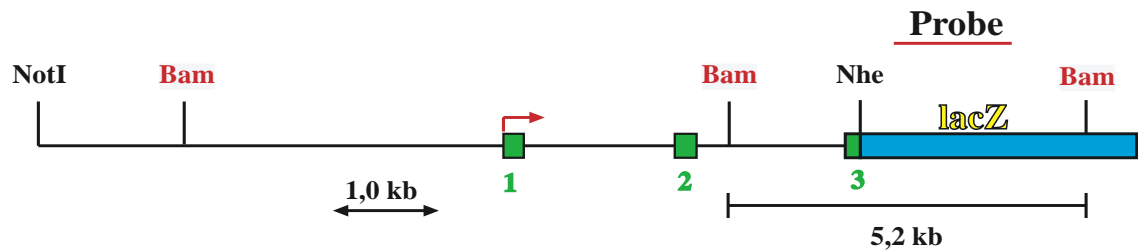


Abb. 10: Lage von Probe und markiertem DNS-Fragment auf dem Promotorkonstrukt

Die genomische DNS wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI geschnitten. Die relevanten Schnittstellen auf dem Konstrukt sind angegeben (Bam). Eine für Teile des *lacZ*-Gens kodierende Probe markiert dadurch ein 5,2 kb großes DNS-Fragment.

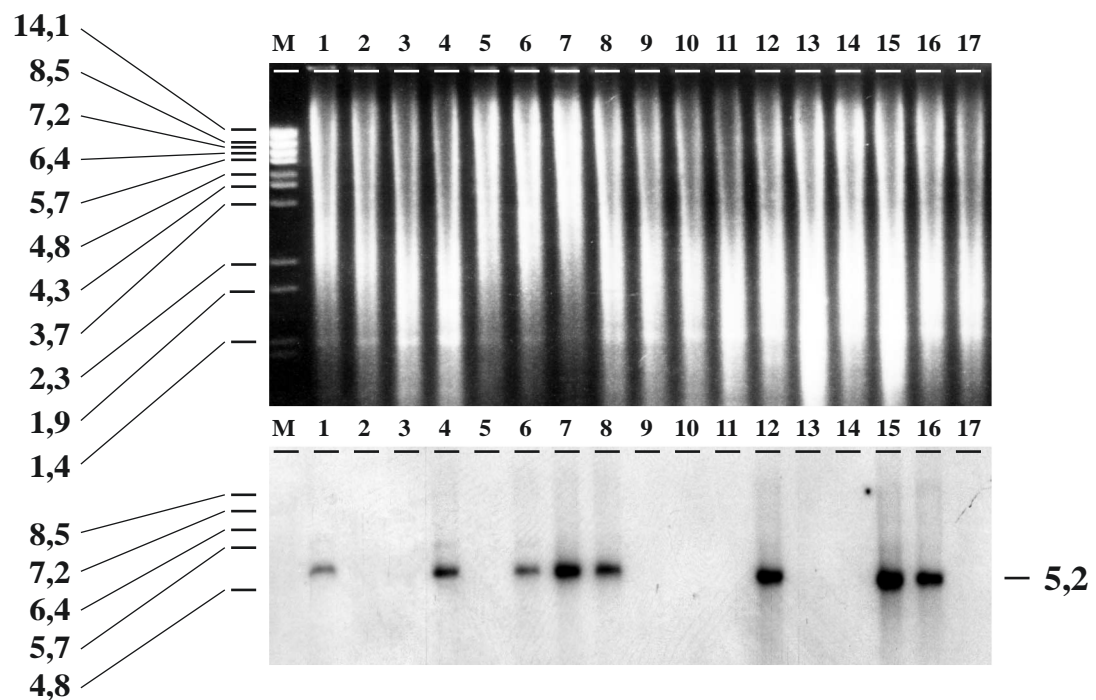


Abb. 11: Genotypisierung der Mauslinien durch Southern-Blot-Analyse

Zu erkennen ist, daß Acht der 17 untersuchten Mausembryonen transgen sind. Zur Bestimmung der Größe des markierten DNS-Fragments wurde ein Lambda-Längenstandard verwendet. Mit Hilfe eines Lineals wurde der Maßstab vom Gel auf das autoradiographische Bild übertragen.

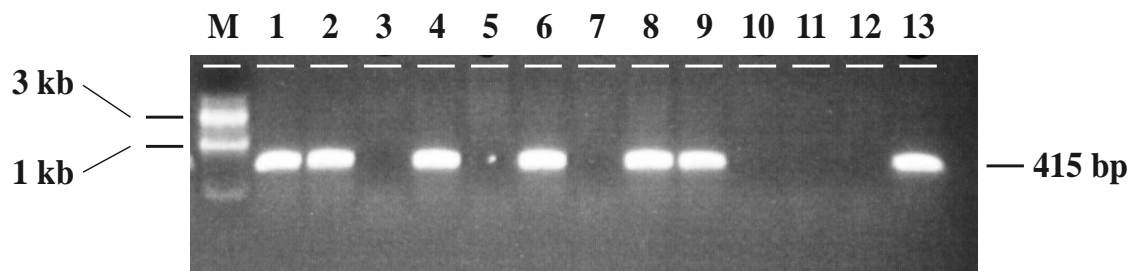


Abb. 12: PCR zur Genotypisierung der Mäuse der F1-Generation

Die Primer amplifizieren ein 415 Basen langes DNS-Fragment, das nach Gelelektrophorese mit einem geeigneten Längenmarker nachgewiesen werden kann. Auch hier ist zu erkennen, daß die Rate der transgenen Mäuse bei 50 Prozent liegt. Sieben von 13 Tieren (Maus 1,2,4,6,8,9 und 13) tragen das Reporterkonstrukt.

In Abb. 11 zeigen acht der 17 im Southern-Blot genotypisierten Mäuse die zu erwartende 5,2 kb Bande nach Hybridisierung mit der radioaktiven Probe und sind somit transgen (Mäuse No. 1, 4, 6, 7, 8, 12, 15 und 16).

Wegen der größeren Schnelligkeit erfolgte später die Genotypisierung durch Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Abb. 12 zeigt ein Beispiel zur Genotypisierung der F1-Generation. Sieben der 13 analysierten Tiere sind transgen (Nummer 1, 2, 4, 6, 8, 9 und 13) und zeigen demzufolge die von den Primern definierte und somit amplifizierte 415 Basen-Bande.

PAX4-EXPRESSION WÄHREND DER MAUSENTWICKLUNG

Alle im Folgenden vorgestellten *in-vivo*-Analysen beruhen auf einem Vergleich der von genomischen DNS-Fragmenten des *Pax4*-Gens vermittelten Expression des Reportergens *lacZ* einerseits mit der natürlichen Expression von *Pax4*, die durch den vollständigen, intakten *Pax4*-Promotor vermittelt wird, andererseits. Als Referenz für diese Expression diente die *lacZ*-Reporter-genaktivität in heterozygoten *Pax4*-Knockout-Mäusen, bei denen durch die homologe Rekombination des Konstruktes das *lacZ* Gen unter der Kontrolle

des natürlichen *Pax4*-Promotors steht. In diesen Mäusen fehlt lediglich der die *Homöo*-Box enthaltene kodierende Bereich von 1,3 kb, der zum Zweck der Geninaktivierung deletiert wurde. Da dieser Bereich relativ klein ist und darüber hinaus recht weit entfernt in 3'-Richtung vom Transkriptionsstart liegt, kann davon ausgegangen werden, daß die Expression des Reportergens in den heterozygoten Tieren der natürlichen *Pax4*-Expression entspricht. In diesen Mäusen konnte ein Beginn der Expression in der Bauchspeicheldrüse ab Tag E 10,0 der Mausentwicklung beobachtet werden. Diese blieb bis zur Geburt (P0) der Föten erhalten. Nach der Geburt nimmt die Expression rapide ab und verschwindet schließlich (Abb. 13).

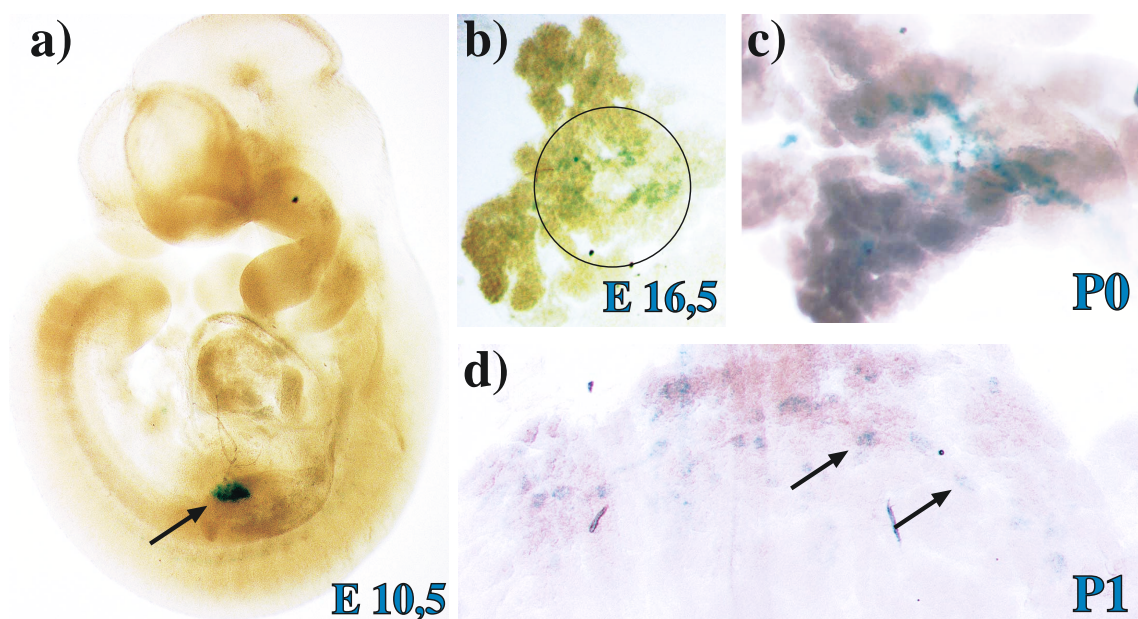


Abb. 13: Expression von *lacZ* in einer heterozygoten *Pax4*-Knockout-Maus

Dargestellt ist der Verlauf der Expression von *Pax4* während der Embryonalentwicklung. Bereits deutlich zu sehen im Stadium E 10,5 (a), bleibt diese spezifische Aktivität in den endokrinen Pankreaszellen im Organ verstreut (E 16,5; b), um mit der Zusammenlagerung dieser Zellen zu Langerhans-Inseln im Stadium E17,5 auf diese beschränkt zu werden. Diese Aktivität in den Inseln ist deutlich kurz nach der Geburt zu sehen (P0; c). Bald darauf geht die *Pax4*-Aktivität in den Inseln jedoch zurück (P1; d), um schließlich ganz zu verschwinden.

DAS 7,8 KB PROMOTORFRAGMENT VERMITTELT FRÜHE PANKREASEXPRESSION

Zunächst erfolgte eine Kontrolle der vom 7,8 kb Promotorfragment vermittelten Aktivierung des Reportergens im frühen Stadium der Pankreasentwicklung in E 11,5 - Mäusen. Drei der vier transgenen Linien wiesen übereinstimmend eine Expression in der Bauchspeicheldrüse auf, eine Linie zeigte trotz genomischer Insertion des Reporterkonstruktes keine Expression. Bei zwei der drei das Reportergen exprimierenden Linien zeigte sich aufgrund von Positionseffekten zusätzlich ektopische Expression (Abb. 14 b).

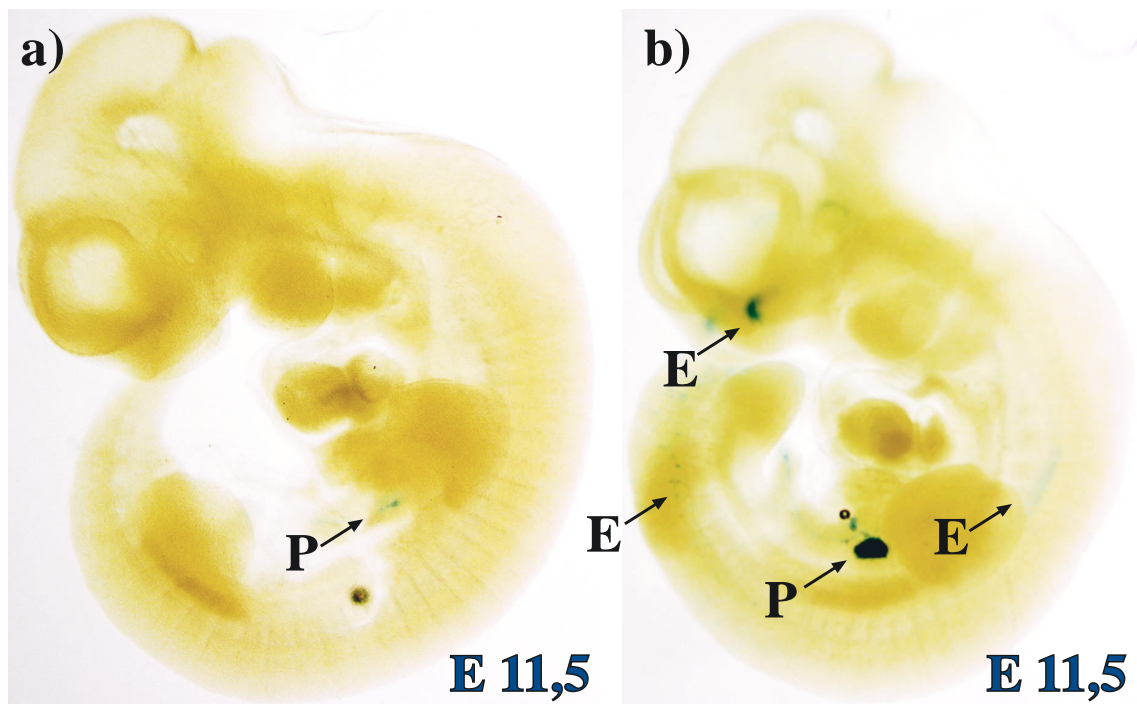


Abb.14: *lacZ*-Expression in der Bauchspeicheldrüse (P) in für das 7,8 kb-Konstrukt transgenen E 11,5 Embryos

a) Transgene Mauslinie für das 7,8 kb Promotorkonstrukt: schwache Expression, allerdings ohne Einflußnahme benachbarter Kontrollbereiche, dadurch zeigt sich eine mit der heterozygoten Knockout-Maus (Abb. 13) vergleichbare Expression.

b) Beispiel für eine transgene Mauslinie für das 7,8 kb Promotorkonstrukt in der durch Positionseffekte nicht nur starke pankreatische Expression, sondern auch ektopische Aktivität (E) des Reportergens an unterschiedlichen Stellen auftritt.

Diese wird durch Einflußnahme von nach zufälliger Insertion des Konstruktes im Genom in enger Nachbarschaft zu liegen kommenden Enhancern anderer Gene vermittelt, die nun auf die Expression des Reportergens einwirken. Es zeigte sich jedoch, daß die Expressionsdomänen der ektopischen Genaktivität zwischen den einzelnen Linien variierten, während die Expression innerhalb der Bauchspeicheldrüse konstant blieb (Abb. 14).

NACHWEIS SPÄTER EXPRESSION DER STADIEN E 16,5 UND P0

Die Aktivität des Reportergens unter der Kontrolle des 7,8 kb Promotorfragments wurde daraufhin auch in Stadium E 16,5 der Maus-Embryonalentwicklung und kurz vor (E 17,5) sowie kurz nach der Geburt der Mausföten (P0) kontrolliert.

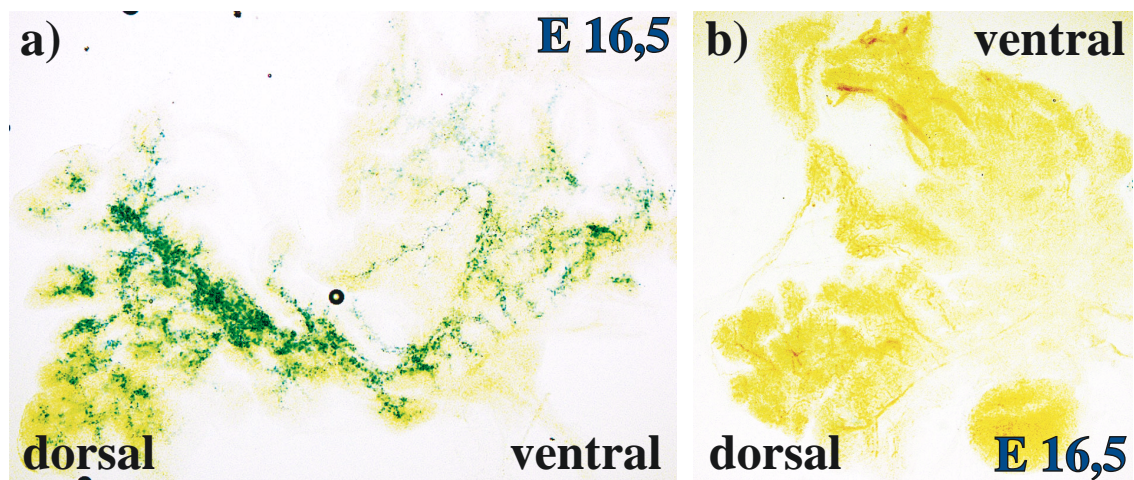


Abb.15: Reportergenexpression im Pankreas von E 16,5 Embryos

a) Die Reportergenexpression unter der Kontrolle des 7,8 kb Promotorelements ist sowohl in der dorsalen, als auch in der ventralen Bauchspeicheldrüse deutlich zu erkennen. Die Expression findet sich in den zentralen Bereichen des Organs. Gut zu erkennen ist auch, daß sich die Zellen noch nicht zu Inseln formiert haben, da dieses erst im Stadium E 17,5 geschieht.

b) Negativkontrolle: Bauchspeicheldrüse einer Maus, an der zwar dieselbe Färbeprozedur wie bei a) durchgeführt wurde, die aber nicht transgen für das Reporterkonstrukt ist. Sie zeigt eine nur eine sehr schwache unspezifische Hintergrundfärbung.

Da sich die endokrinen Zellen erst im Entwicklungsstadium E 17,5 zu Langerhans-Inseln zusammenlagern, zeigte sich bei der Kontrolle des Stadiums E 16,5 erwartungsgemäß eine über das Organ in einzelne Zellen verstreute Expression (Abb. 15).

NACHWEIS DER EXPRESSION IN ENDOKRINEN β -ZELLEN

Wie bei der natürlichen *Pax4*-Expression, so ist auch die Aktivität des unter der Regulation des 7,8 kb Promotorfragments stehenden Reportergens kurz vor der Geburt auf die Langerhans-Inseln beschränkt. Ein Vergleich zwischen der *lacZ*-Expression in den transgenen Mauslinien und der Insulin-Antikörperfärbung zur Kennzeichnung der Inseln machte dies deutlich.

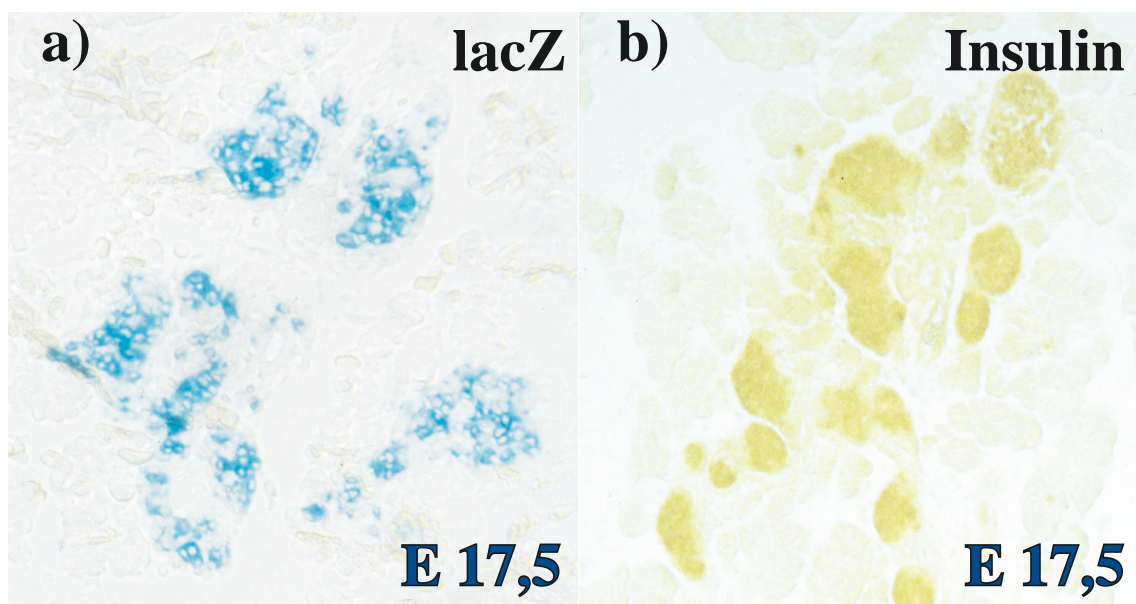


Abb.16: Vergleich von Reporter- und Insulinexpression in der Bauchspeicheldrüse

a) Die Expression des *lacZ*-Gens unter der Kontrolle des 7,8 kb Promotorelements zeigt in E 17,5-Embryos eine deutliche Beschränkung auf distinkte Bereiche des Pankreas kurz vor der Geburt der transgenen Mäuse.

b) Die Struktur der Langerhans-Inseln im Stadium E 17,5, hier durch einen Insulin-Antikörper sichtbar gemacht, zeigt ebenfalls ein locker verteiltes Muster von in exokrinem Gewebe eingebetteten und von diesem deutlich abgegrenzten Zellgruppen.

In *lacZ*-gefärbten Mikrotomschnitten von Bauchspeicheldrüsen transgener Tiere des Stadiums E 17,5 zeigten sich deutliche Parallelen in der Anfärbung von im Pankreas verstreut liegenden Zellgruppen zum Muster der Anfärbung mit einem Insulinantikörper, der die Langerhans-Inseln markiert (Abb. 16).

Darüber hinaus gelang der Nachweis von Koexpression des Reportergens und Insulin in den β -Zellen der transgenen Tiere. Dazu wurde die Färbung des Insulins mit einem Fluoreszenz-Antikörper im Anschluß an die Blaufärbung der β -Galaktosidase durch Gabe des Substrates x-Gal auf einem Schnitt vorgenommen. In der Tat stellte sich heraus, daß beide Färbungen in denselben Zellgruppen vorlagen. Somit handelt es sich bei den Strukturen, in denen der Reporter durch das *Pax4* Promotorelement angetrieben wird, tatsächlich um die Langerhans-Inseln (Abb. 17)

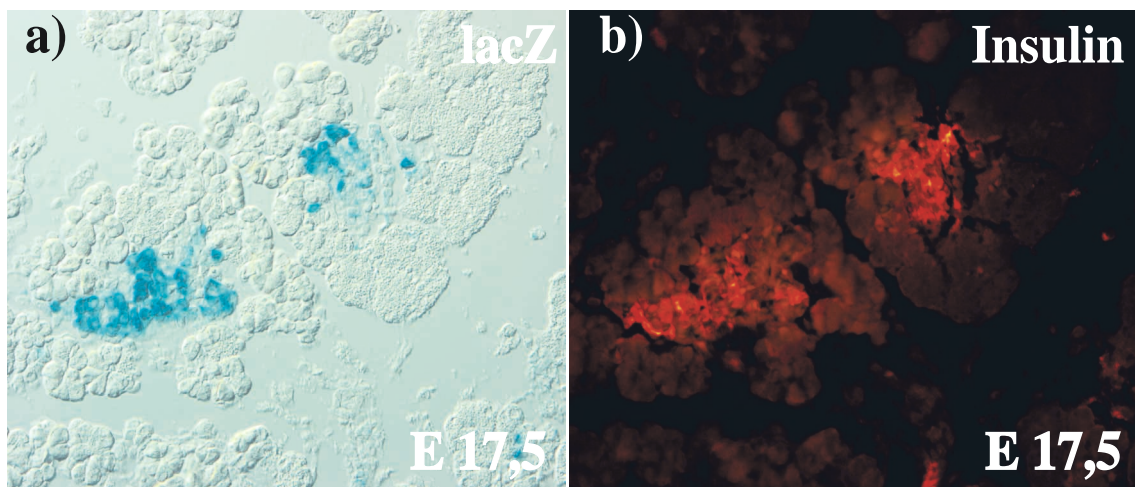


Abb.17: Die Reportergenaktivität kolokalisiert mit Insulinexpression (E 17,5)

a) Blaufärbung der durch das 7,8 kb Promotorfragment vermittelten Reporterexpression.

b) Anfärbung des selben Schnittes mit einem Fluoreszenz-Insulin-Antikörper. Beide Färbungen finden sich in den selben Zellen, es handelt sich hierbei also um die Langerhans-Inseln.

DAS 7,8 KB PROMOTORELEMENT SCHALTET DIE EXPRESSION NACH DER GEBURT AB

Die durch das 7,8 kb Promotorelement vermittelte Genaktivität endet wie auch die endogene *Pax4*-Aktivität nach der Geburt. Während kurz vor der Geburt noch deutliche Reporter-genaktivität zu beobachten ist (Abb. 16), nimmt diese wie die natürliche *Pax4*-Expression nach der Geburt schnell ab und verschwindet schließlich. Das zeigte sich bei einer x-Gal-Färbung von Organen transgener Mausembryonen der entsprechenden Stadien. Ein Beispiel für die Färbung der Bauchspeicheldrüse eines transgenen Tieres des Stadiums P2 ist in Abb.18 dargestellt.

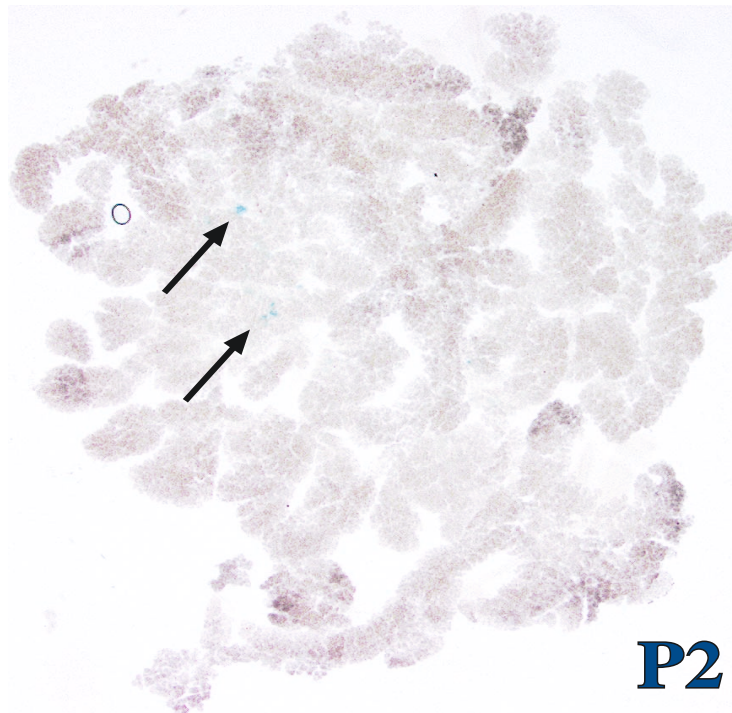


Abb. 18: Das 7,8 kb Promotorfragment vermittelt keine adulte Expression

In transgenen Mäusen mit dem 7,8 kb Promotorfragment stoppt die Expression kurz nach der Geburt. Dargestellt ist die Bauchspeicheldrüse einer Maus zwei Tage nach der Geburt. Wie bei der natürlichen *Pax4*-Expression ist auch hier bereits die Aktivität fast vollständig zurückgegangen. Außer einigen wenigen gefärbten Bereichen (Pfeile) ist keine Aktivität mehr zu erkennen.

EXPRESSION IN PANKREATISCHEN TUMORZELLINIEN

Außer der *in-vivo*-Analyse der durch das 7,8 kb Promotorfragment vermittelten Reporterexpression fand auch eine *in-vitro*-Studie der Expression in aus der Bauchspeicheldrüse gewonnenen Tumorzelllinien statt. Diese Zellen wurden mittels einer chemischen Behandlung durch Lipofektamin mit dem Reporterkonstrukt transformiert.

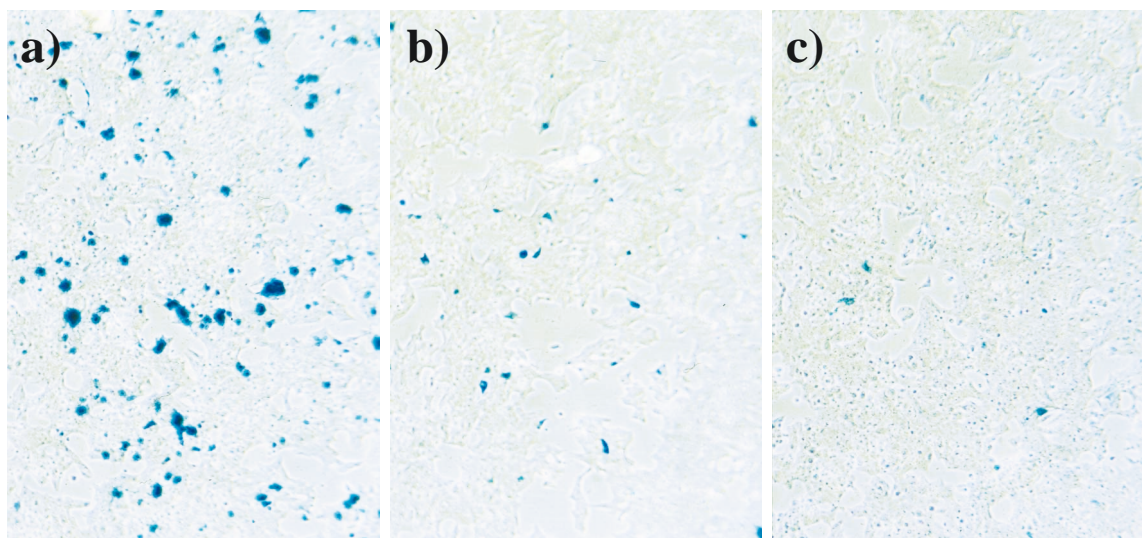


Abb. 19: Aktivität des 7,8 kb Promotorfragments in β TC1b-Zellen

a) Positivkontrolle. Das vom ubiquitären CMV-Promotor kontrollierte *lacZ* Gen ist nach der Transformation in etwa 20 Prozent der Zellen aktiv.

b) Unter Kontrolle des 7,8 kb Promotorfragments zeigen nur noch 5-10 Prozent der Zellen Reporteraktivität.

c) Negativkontrolle. Die Transformation des Reportergens unter der Kontrolle eines nicht aktiven Promotorelements führt zu einer leichten Hintergrundreaktion.

Als Referenz der daraufhin detektierbaren Expression diente zum einen die zu gleichen Bedingungen durchgeführte Transformation eines Konstruktes, in dem das *lacZ*-Gen unter der Kontrolle eines starken, ubiquitären Promotors, in diesem Fall des CMV-Promotors, steht. Die in dieser Positivkontrolle zu beobachtende Reporteraktivität gibt einen Hinweis auf die

Transformationeffizienz. Zum Zweck einer Negativkontrolle wurde das *lacZ* Gen unter der Kontrolle eines unwirksamen Promotors transformiert. Auch dabei war vereinzelt die Färbung von Zellen zu beobachten, die einen Hinweis auf die Stärke von unspezifischer, spontaner Hintergrundaktivität zuläßt. Die auf diese Weise mit β -TC1b-Zellen durchgeführte Analyse ist in Abb. 19 dargestellt. Zwar konnte nach Transfektion des Promotorkonstrukts eine leicht höhere Anzahl von das Reportergen exprimierenden Zellen als in der Negativkontrolle beobachtet werden; die Effektivität lag allerdings deutlich unter derjenigen, die mit dem *lacZ* Gen unter der Kontrolle des CMV-Promotors erzielt werden konnte.

In derselben Art und Weise erfolgte die Überprüfung weiterer Zelllinien (α TC1-9, β HC13), von denen jedoch keine eine deutliche, oder gar mit der Positivkontrolle vergleichbare Aktivierung des Reportergens zeigte.

PDX UND ISL1 AKTIVIEREN DEN 7,8 KB PROMOTOR IN COS-ZELLEN NICHT, NEUROD FÜHRT ZU EINER LEICHTEN AKTIVIERUNG

Zu Beginn dieser Arbeit lag die Information vor, daß innerhalb des 7,8 kb Promotorfragments anhand der Basensequenz eine Reihe von potentiellen *NeuroD*- und *Isl1*- Bindestellen zu finden sind (Brink, 1998). *Pdx1* stellt als Hauptschalter der Pankreasentwicklung ebenfalls einen wichtigen Kandidaten für *Pax4*-Regulation dar. Um zu überprüfen, ob sich eine direkte Regulation des *Pax4*-Promotors durch diese Faktoren nachweisen läßt, wurde eine parallele Transfektion des Reporterkonstrukts mit jeweils CMV-kontrollierten *Pdx1*-, *NeuroD*- und *Isl1*- cDNA-Sequenzen in cos-Zellen durchgeführt (Abb. 20).

Es konnte keine Aktivierung des Promotors durch *Pdx1* und *Isl1* festgestellt werden. Bei *NeuroD* ergab sich bei einigen Kotransfektionen ein leichter Anstieg der Anzahl gefärbter Zellen. Dieses Ergebnis war in Folgeversuchen jedoch nicht zuverlässig reproduzierbar. Auch eine Kotransfektion des Promotorkonstruktes mit mehreren Expressionsvektoren für verschiedene Gene gleichzeitig führte zu keinem signifikanten Anstieg der Reportergenaktivität in den Zellen.

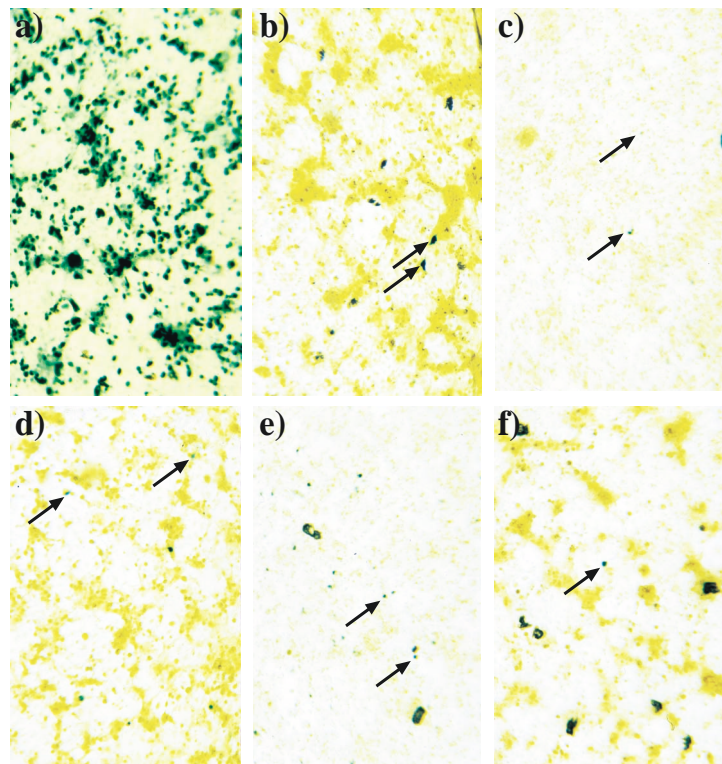


Abb. 20: *Pdx1*, *Isl1* und *NeuroD* zeigen bei Kotransfektion mit dem 7,8 kb-Konstrukt in Cos-Zellen keine deutliche Aktivierung des *Pax4*-Promotors

Obere Reihe: Kontrolltransfektionen. In a) wurde als Positivkontrolle ein CMV-*lacZ*-Konstrukt transfiziert, in b) erfolgte Transfektion des *lacZ*-Gens ohne funktionellen Promotor und in c) die Transfektion des 7,8 kb-Konstruktes allein.

Untere Reihe: Die Kotransfektion von *Pdx1* (d), *NeuroD* (e) und *Isl1* (f) mit dem 7,8 kb-Konstrukt. Nur die Kotransfektion mit *NeuroD* führte in einigen Versuchen zu einer vermehrten Reporterogenaktivität in den Cos-Zellen (e).

UNTERSUCHUNGEN ZUR ERMITTLUNG DES TRANSKRIPTIONSSTARTS

Um einen genaueren Einblick in die genomische Organisation des *Pax4*-Gens zu bekommen und um dadurch Hinweise auf die Lage von cis-regulativen Elementen zu erhalten - diese liegen in der Regel im 5'-Bereich eines Gens

(Dyanan, 1989) - wurden Untersuchungen zur Ermittlung des Transkriptionsstarts durchgeführt. Durch einen Vergleich von genomischer- und bereits publizierter cDNS-Sequenz (Inoue et al., 1998) war bereits ein Transkriptionsstart definiert worden. Dieser weist jedoch in seiner Nähe kein übliches Promotormotiv, wie eine TATA oder Sp1-box, auf (Kadonaga et al., 1988; Abb. 21). Lediglich eine CAAT-Box-ähnliche Sequenz ist hier vorhanden (Smith et al., 2000). Auch ein Initiatorelement, wie es bereits zuvor in anderen Promotoren beschrieben worden ist (O'Shea-Greenfield und Smale, 1992), sorgt nicht für die Positionierung des Transkriptionsstarts von *Pax4* (Abb. 21).

Oberhalb der möglichen CAAT-box befindet sich anstelle von Promotorelementen eine 16-fache Wiederholung des Basentriplets CTC. Anhand der Sequenzdaten erscheint ein Transkriptionsstart an dieser Stelle also recht unwahrscheinlich. 2 kb stromaufwärts dieses Bereiches findet sich dagegen ein potentieller Minimalpromotor mit TATA- und Sp1-Box, der Vermuten läßt, daß hier der eigentliche Transkriptionsstart verbunden mit einem weiteren, kleinen Exon liegt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Versuche durchgeführt, die ein weiteres Exon nachweisen würden.

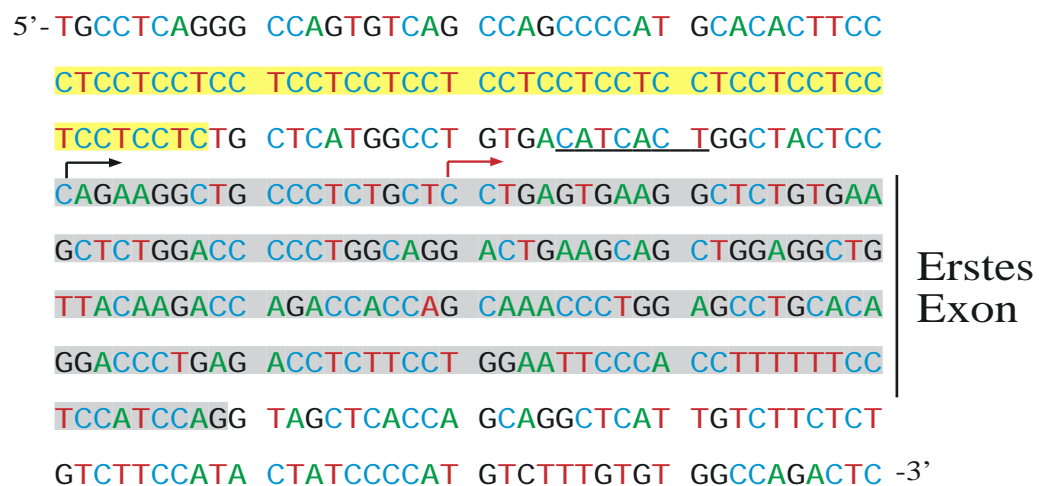


Abb. 21: Sequenzbereich des *Pax4*-Transkriptionsstarts

Der *Pax4*-Transkriptionsstart (schwarzer Pfeil) weist nicht das häufig begleitende Motiv einer TATA-box auf. Stattdessen liegt vor dem ersten Exon ein Bereich 16-facher CTC-Wiederholung (gelb hervorgehoben) und eine mögliche CAAT-box (unterstrichen). Roter Pfeil: Transkriptionsstart nach Xu und Murphy, 2000.

DIE REPORTERGENAKTIVITÄT IST VOM PAX4-TRANSKRIPTIONSSTART UNABHÄNGIG

Zunächst wurde unter Ausnutzung günstig gelegener Restriktionsenzym-Schnittstellen (*NcoI*, Abb. 22) das erste Exon mit den um den Transkriptionsstart liegenden DNS-Bereichen zur Untersuchung von dessen Bedeutung aus dem Promotorfragment herausgeschnitten.

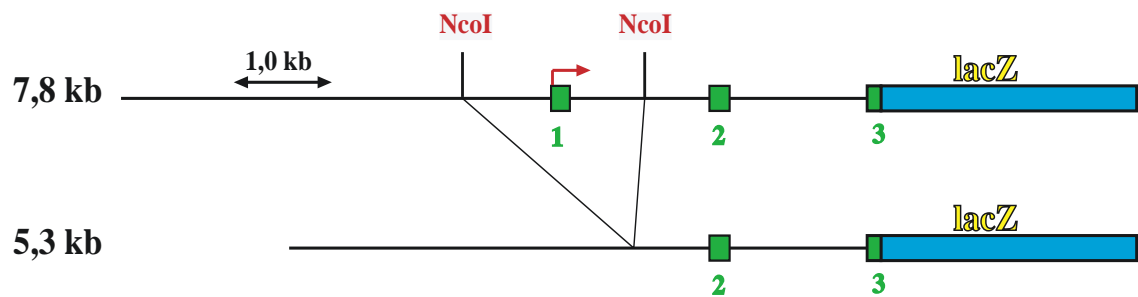


Abb. 22: Bau eines Reporterkonstruktes ohne den Bereich des *Pax4*-Transkriptionsstarts

Das Schneiden des 7,8 kb Reporterkonstrukts mit *NcoI* führte nach Religation zu einem neuen, 5,3 kb genomische Sequenz enthaltenden Promotorkonstrukt.

Das daraus gewonnene, nun ein lediglich 5,3 kb großes genomisches DNS-Fragment enthaltende Reporterkonstrukt, wurde erneut mikroinjiziert. Die daraus erhaltenen, transgenen Mäuse zeigten Expression in der gleichen Weise, wie sie durch das 7,8 kb Fragment vermittelt wird (Abb. 23). Dieses war möglich, obwohl das verwendete *lacZ*-Reportergen keinen eigenen Minimalpromotor enthält.

Auf diese Weise gelang der Nachweis, daß die von dem 7,8 kb Promotorfragment vermittelte Genaktivität unabhängig von dem zuvor für *Pax4* ermittelten Transkriptionsstart ist. Eine Deletion dieses Bereiches führte nämlich nicht zu einem Verlust der Reportergenaktivität.

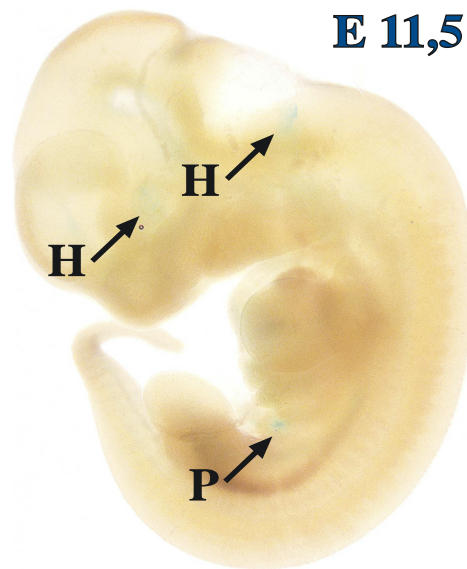


Abb. 23: Expression aufgrund von Injektion des 5,3 kb Promotorkonstruktes

Beispiel für einen E 11,5 Embryo, der transgen für das 5,3 kb Reporterkonstrukt ist. Außer einer schwachen unspezifischen Hintergrundfärbung (H) ist in diesem Fall nur die Blaufärbung der Bauchspeicheldrüse ohne ektopische Expressionsdomänen zu erkennen. Dieser positive Befund läßt einen weiter Stromaufwärts gelegenen Transkriptionsstart als den zuvor angenommenen vermuten.

DER TRANSKRIPTIONSSTART LIEGT NICHT 2 KB STROMAUFWÄRTS DES ERSTEN EXONS

Aufgrund dieser Daten wurde in einem weiteren Versuchsansatz versucht, den Transkriptionsstart auf direktem Wege nachzuweisen. Da es sich wegen der in der Bauchspeicheldrüse in großen Mengen vorhandenen RNS-zerstörenden Enzyme als schwierig herausstellte, größere Mengen unbeschädigter RNS aus der Bauchspeicheldrüse zu gewinnen, wurde dabei eine Methode angewendet, mit der es möglich ist, auch mit kleinsten Mengen intakter RNS den Transkriptionsstart zu ermitteln.

Aufgrund der Sequenzdaten konnte ein potentieller Minimalpromotor 2 kb stromaufwärts des ersten Exons identifiziert werden, der sowohl eine TATA-, als auch eine Sp1-Box enthält. Dieser ist innerhalb des 7,8 kb Promotorfragments sowohl der dem ersten Exon am nächsten gelegene sowie der seine Sequenz betreffend vielversprechendste Minimalpromotor. Aus diesem Grunde wurde

versucht unter Verwendung von an diesen potentiellen Minimalpromotor in 3' Richtung anschließende genomischen Sequenzen repräsentierenden Primern durch RT-PCR ein weiteres Exon nachzuweisen (Abb. 24).

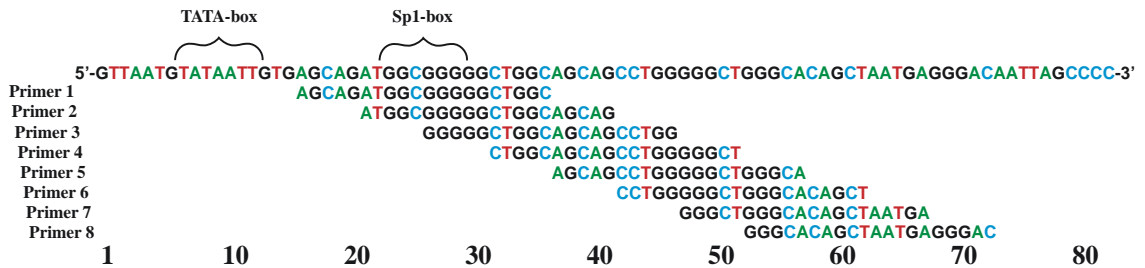


Abb. 24: Zur Amplifikation eines potentiellen zwölften Exons benutzte Primer

Die Abbildung zeigt die Lage von TATA- und Sp1-box und die acht Primer, die definiert wurden, um ein potentielles Exon, das von diesen Promotorelementen initiiert würde, zu amplifizieren. Der zweite Primer war jeweils innerhalb des bekannten ersten Exons definiert worden. Das resultierende cDNS-Stück hätte eine Größe von etwa 150 Basen.

Dieses Verfahren wurde mit RNS durchgeführt, die aus Tumorzellen und aus Bauchspeicheldrüsen gewonnen wurde. Aber auch mit einer aus der Bauchspeicheldrüse gewonnenen cDNS-Bank wurde der Versuch unternommen, mit Hilfe der in Abb. 24 gezeigten Primer neue, weiter 5' liegende cDNS-Fragmente zu amplifizieren und somit zu identifizieren. Alle drei Ansätze führten jedoch zu keinem positiven Ergebnis. Es gelang nicht, DNS-Fragmente definierter Länge zu amplifizieren. Ein bei der RT-Reaktion amplifiziertes, etwa 400 Basen großes DNS-Fragment erwies sich nach dessen Sequenzierung als Produkt einer unspezifischen Wechselwirkung der Primer mit ribosomaler RNS.

Im Laufe der weiteren Untersuchungen stellte sich heraus, daß es sich bei dem untersuchten genomischen DNS-Bereich nicht um den Transkriptionsstart handelt, sondern vielmehr um die wichtigsten cis-regulatorischen Sequenzen, die zur Expressionskontrolle des *Pax4*-Gens notwendig sind. Der Nachweis dieser Tatsache wird in den folgenden Kapiteln dargelegt.

EIN GENOMISCHER BEREICH VON 254 BASEN REGULIERT *PAX4*-EXPRESSION

Basierend auf den aus der Mikroinjektion der 7,8 kb und 5,3 kb -Konstrukte gewonnenen Ergebnissen, wurde nun eine fortschreitende Eingrenzung des die Reporter-genaktivität vermittelnden genomischen DNS-Bereichs vorgenommen. Dabei erfolgte zunächst eine stufenweise Deletion des 5,3 kb Promotorkonstruktes durch Ausschneiden weiterer DNS-Bereiche (Abb. 25).

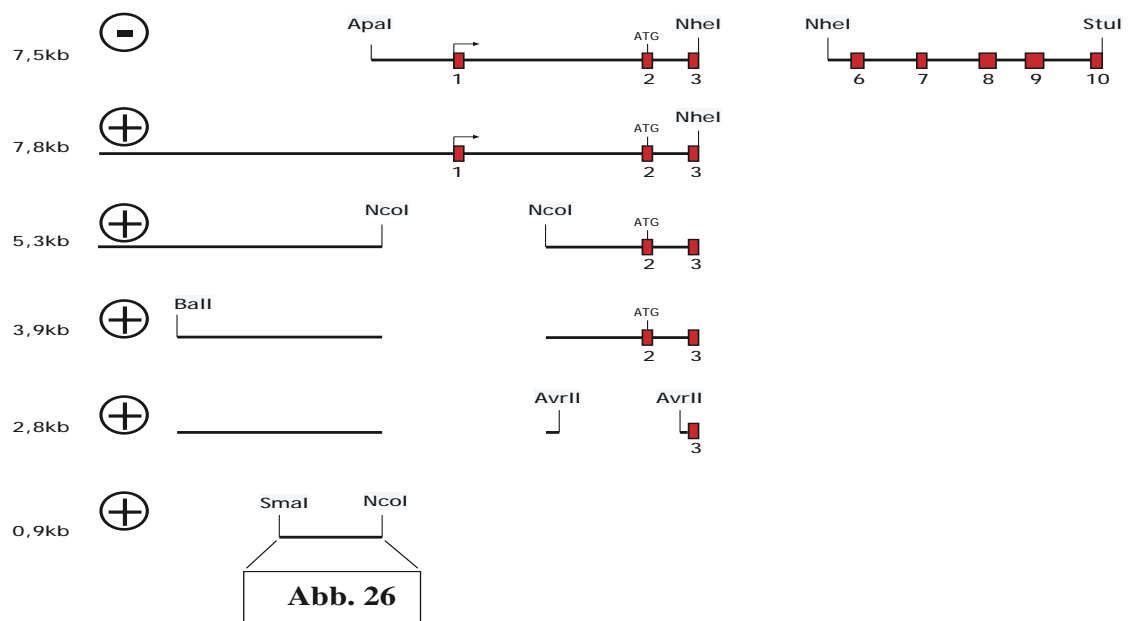


Abb. 25: Übersicht über die analysierten Promotorkonstrukte

Dargestellt sind die genomischen DNS-Bereiche des *Pax4* Promotors, die jeweils bezüglich ihrer Regulation des *lacZ*-Reportergens in transgenen Mäusen untersucht wurden. Die zur Herstellung des jeweiligen Konstruktes verwendeten Restriktionsenzyme sind angegeben, die Lage der Exons, des Transkriptionsstarts (Pfeil) und des Translationsstarts (ATG) ist markiert. Auf der linken Seite ist die Gesamtlänge des im Konstrukt enthaltenen genomischen Bereiches angegeben, in den Kreisen ist mit "Plus" bzw. "Minus" angegeben, ob eine der *Pax4*-Aktivität entsprechende Expression beobachtet werden konnte. Bei dem Konstrukt mit 7,5 kb genomischer DNS handelt es sich um das 'Knockout-Konstrukt'.

Durch diese Vorgehensweise konnte der funktionelle Promotor auf 0,9 kb eingegrenzt werden (Abb. 25, 27, 28). Die für eine weitere Einengung verwendeten genomischen Fragmente wurden durch PCR aus einem Vektor mit der entsprechenden genomischen DNS amplifiziert und anschließend vor das Reporter-gen *lacZ* kloniert. Zum Zweck der Eingrenzung des für die Regulation von *Pax4* ausreichenden minimalen genomischen DNS-Bereiches erfolgte auf diese Weise eine Überprüfung von genomischen Fragmenten bis hinab zur Größe von 254 Basen (Abb. 26).

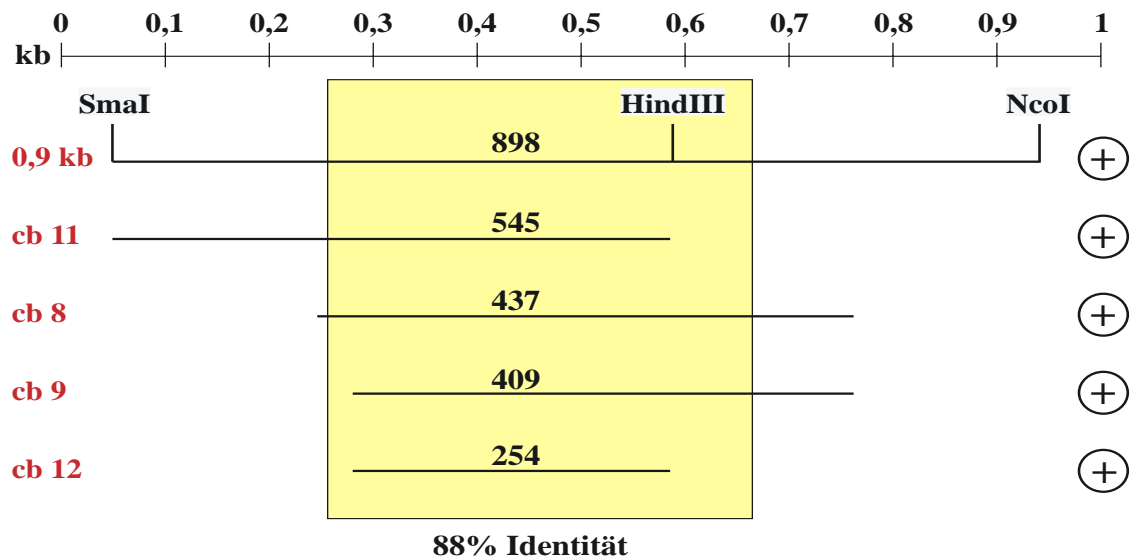


Abb. 26: Lage der den 0,9 kb Promotor weiter einengenden Konstrukte

In der Abbildung ist die Lage der für die Konstrukte 0,9 kb, cb 8, cb 9, cb 11 und cb 12 verwendeten genomischen Fragmente zueinander, sowie die Position von für die Ligation an das *lacZ*-Reporter-gen eine Rolle spielenden Schnittstellen der Restriktionsenzyme *SmaI*, *HindIII* und *NcoI* angegeben. Der gelbe Kasten markiert einen DNS-Bereich, der 88 Prozent Identität zur homologen Sequenz des menschlichen *Pax4*-Lokus aufweist. Die Zahlen im Kasten geben die Länge der Fragmente (Basenpaare) an. Alle Konstrukte waren in der Lage, die der natürlichen *Pax4*-Expression entsprechende Aktivität des Reporters zu vermitteln (+).

Die Effektivität der aus der Mikroinjektion dieser Konstrukte erhaltenen transgenen Tiere schwankte je nach Konstrukt zwischen 2,5 und 4,5 Prozent und

betrug demzufolge im Mittel 3,5 Prozent. Die Effektivität der Injektion der Konstrukte aus Abb. 26 ist im Einzelnen in Tabelle 2 aufgeführt. Mit nur wenigen Ausnahmen zeigten alle transgenen Tiere Expression des Reportergens. Lediglich bei den aus Reporterkonstrukten cb 9 und cb 12 hervorgehenden Tieren waren nicht alle transgenen Linien in der Lage, Expression in der Bauchspeicheldrüse zu vermitteln. Bei cb 12 konnten nur zwei der insgesamt vier Linien analysiert werden, da bei nur diesen Linien die Verpaarung zur F1-Generation gelang.

Tabelle 2:

Konstrukt	Tiere insgesamt	Davon Transgene	Transgene mit Expression
<i>0,9 kb</i>	44	2 (4,5%)	2 (4,5%)
<i>cb 8</i>	57	2 (3,5%)	2 (3,5%)
<i>cb 9</i>	90	4 (4,4%)	3 (3,3%)
<i>cb 11</i>	79	2 (2,5%)	2 (2,5%)
<i>cb 12</i>	128	4 (3,1%)	1 (0,8%)
<i>Gesamt</i>	398	14 (3,5%)	10 (2,5%)

Tab. 2: Effektivität der Mikroinjektion

Bei den Mikroinjektionen zeigte sich eine Effektivität bezüglich der Produktion transgener Tiere von durchschnittlich 3,5 Prozent. Der Gesamtwert für Transgene Tiere mit Expression muß im Hinblick auf das negative Ergebnis von cb 12 gewertet werden und weicht deshalb nach unten hin vom Mittel ab. Ohne Einbeziehung von cb 12 liegt der prozentuale Anteil zu den Gesamtmäusen hier bei 3,3 Prozent.

Alle in Abbildung 26 dargestellten genomischen Fragmente konnten durch die Reporterkonstrukte nach deren Mikroinjektion die charakteristische Blaufärbung der Bauchspeicheldrüse in den daraus hervorgehenden transient transgenen Mäusen bzw. Mauslinien vermitteln (Abb. 27-31). Das kleinste verwendete und zu einem positiven Resultat führende genomische Fragment hat eine Länge von 254 Basenpaaren (Abb. 30, 31).

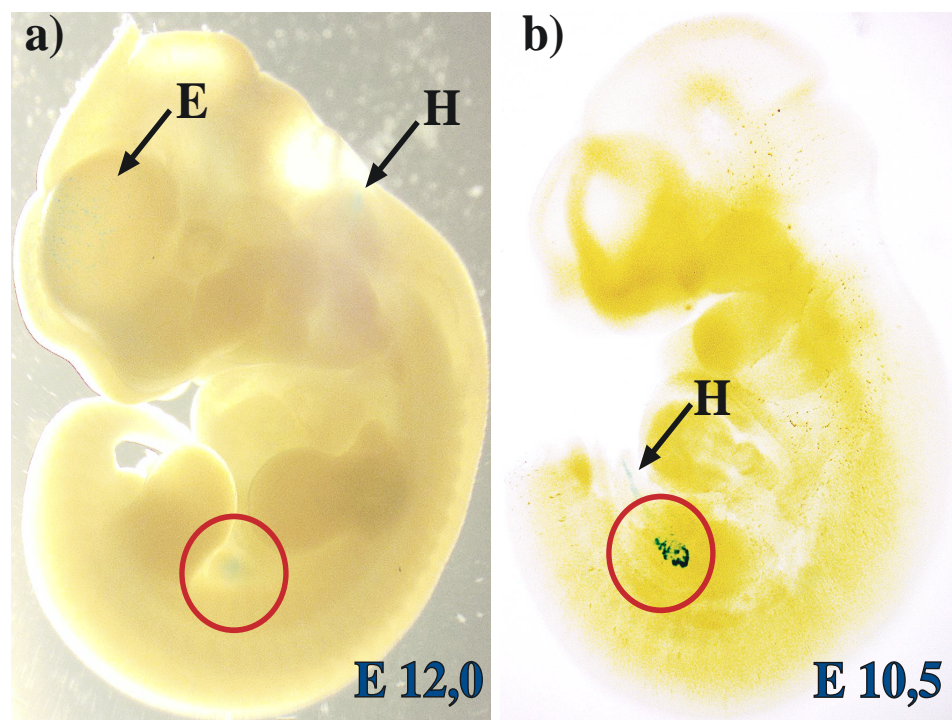


Abb. 27: Transgene Linien für das 0,9 kb-Konstrukt

Beide Linien exprimieren das Reportergen in der Bauchspeicheldrüse (rote Kreise). Während a) ektopische Expression zeigt (E), ist in b) unspezifische Hintergrundfärbung (H) der Nabelschnur zu erkennen, aber auch Bereiche des Hinterhirns zeigen häufig ein Hintergrundsignal (a, H).

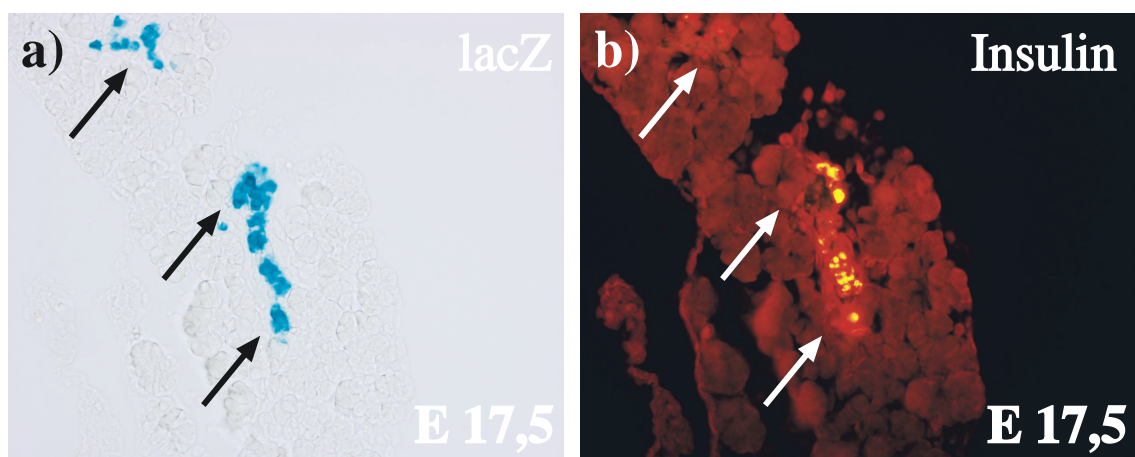


Abb. 28: Die cb 9-Reportergenaktivität kolokalisiert mit Insulinomazellen

Mit einer aus der Injektion mit dem Konstrukt 0,9 kb hervorgehenden Linie wurde eine detaillierte histologische Analyse vorgenommen. Es konnte nachgewiesen werden, daß die Färbung aufgrund der Reportergenaktivität (a) und die durch einen Insulinantikörper markierten β -Zellen (b) kolokalisieren.

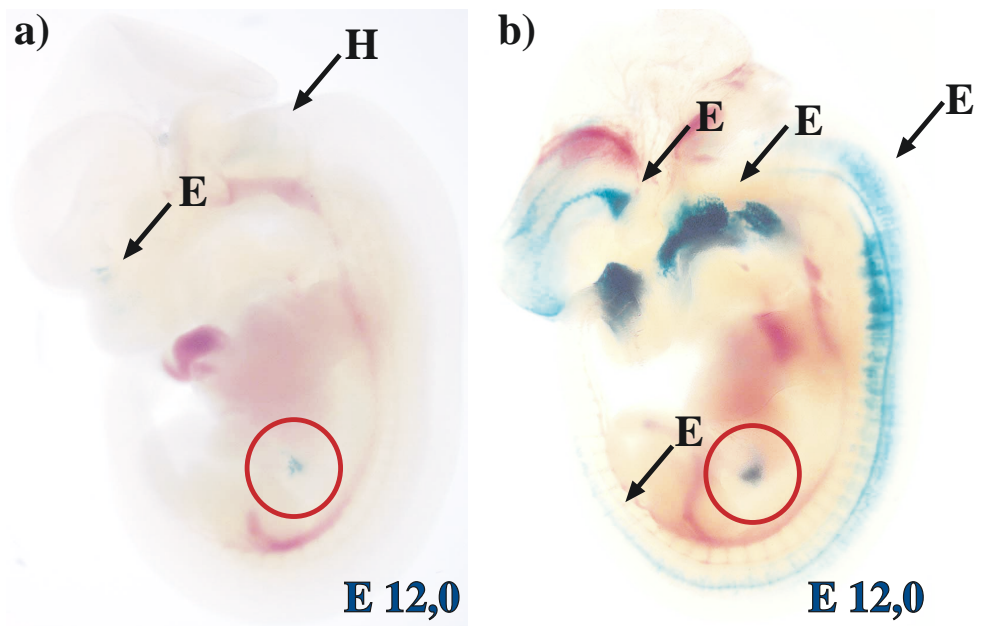


Abb. 29: Expression der Linien cb 11 (a) und cb 8 (b) (E 12,0)

Auch Hier übereinstimmende Expression in der Bauchspeicheldrüse (rote Kreise). cb 8 (b) ist gleichzeitig ein Beispiel für positionsbedingte starke ektopische Expression.

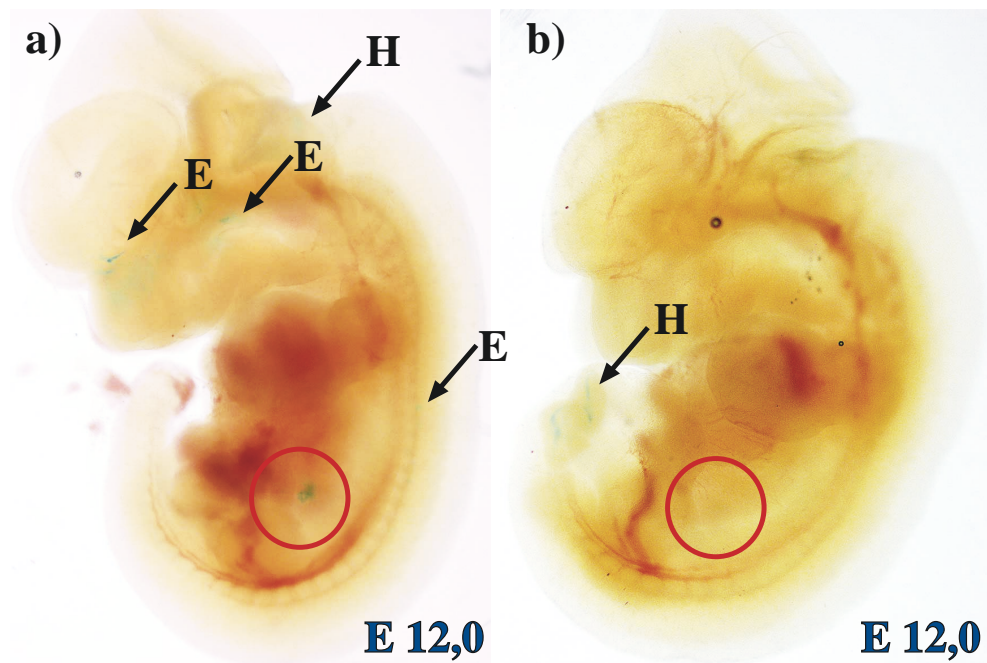


Abb. 30: Transgene Linien für das Konstrukt cb 9 und cb 12 im Stadium E 12,0

Die Expression in der Bauchspeicheldrüse ist jeweils mit einem roten Kreis gekennzeichnet. Detailliertere Ansicht von b) in Abb. 31. Auch hier treten ektopische Expression (E) sowie Hintergrundfärbung in Hinterhirn und Nabelschnur (H) auf.

Bei Verwendung des Konstruktes 0,9 kb wurde neben der frühen Aktivität (Abb. 27, E 12,0) auch die spätere spezifische Expression in β -Zellen (Abb. 28) und eine abgeschwächte Aktivität nach der Geburt beobachtet.

Das genomische 254 Basenpaar-Fragment liegt inmitten eines Sequenzbereichs, der 88 Prozent Identität zum homologen Humanen DNS-Bereich aufweist (Abb. 26). Die Mikroinjektion des entsprechenden Reporterkonstruktes cb 12 führte in einer von zwei analysierten Linien zu einem positiven Ergebnis. Die Expression war zwar recht schwach, jedoch auch hoch spezifisch in der Bauchspeicheldrüse zu erkennen (Abb. 30, 31). Das 254-Basenpaar-Fragment wird aufgrund dieses positiven Ergebnisses im Folgenden als *Pax4*-Promotor bezeichnet.

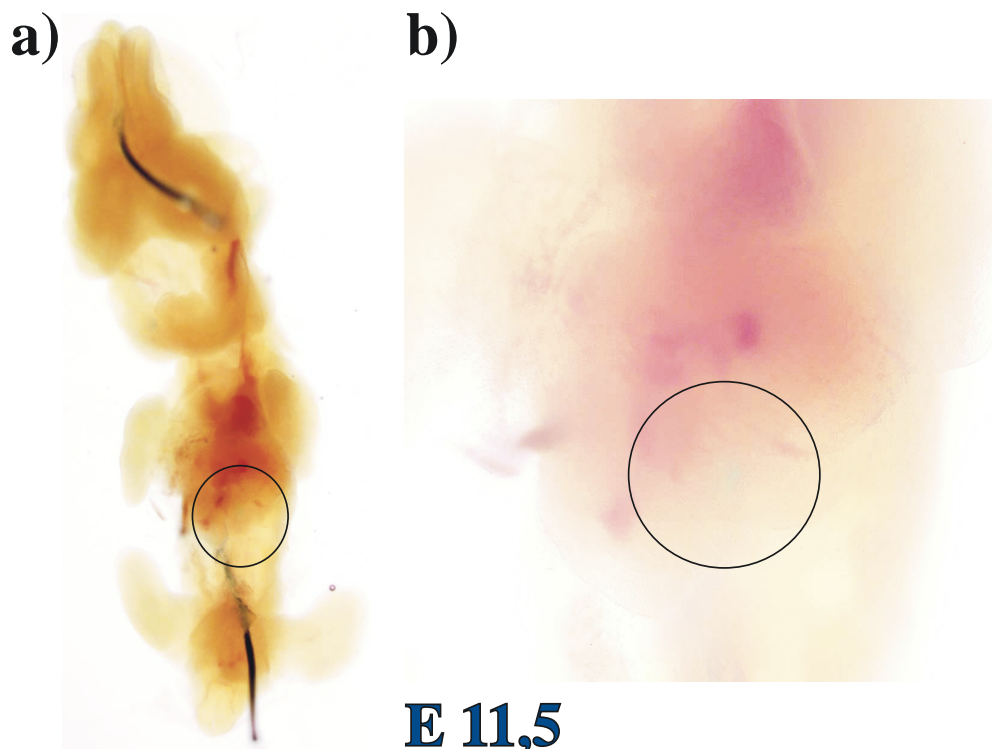


Abb. 31: Pankreatische Expression der transgenen Linie cb 12 im Stadium E 11,5

Die Linie cb 12 mit einem 254 Basen umfassenden genomischen DNS-Bereich des *Pax4*-Promotors zeigt eine schwache, aber spezifische Färbung der Bauchspeicheldrüse. In a) der durch Nadeln fixierte Embryo, in b) das gefärbte Organ (Kreise) in stärkerer Vergrößerung.

Die Sequenz des *Pax4*-Promotors ist in Abb. 32 wiedergegeben. Es handelt sich dabei um den genomischen Bereich, der aufgrund des darin enthaltenen TATA- und Sp1-Motivs bereits zuvor auf kodierende cDNS-Sequenzen getestet worden war (Abb. 24). Bei der Sequenz in den hochkonservierten Bereichen (ohne Sterne) fallen mehrere TAAT-Motive auf.

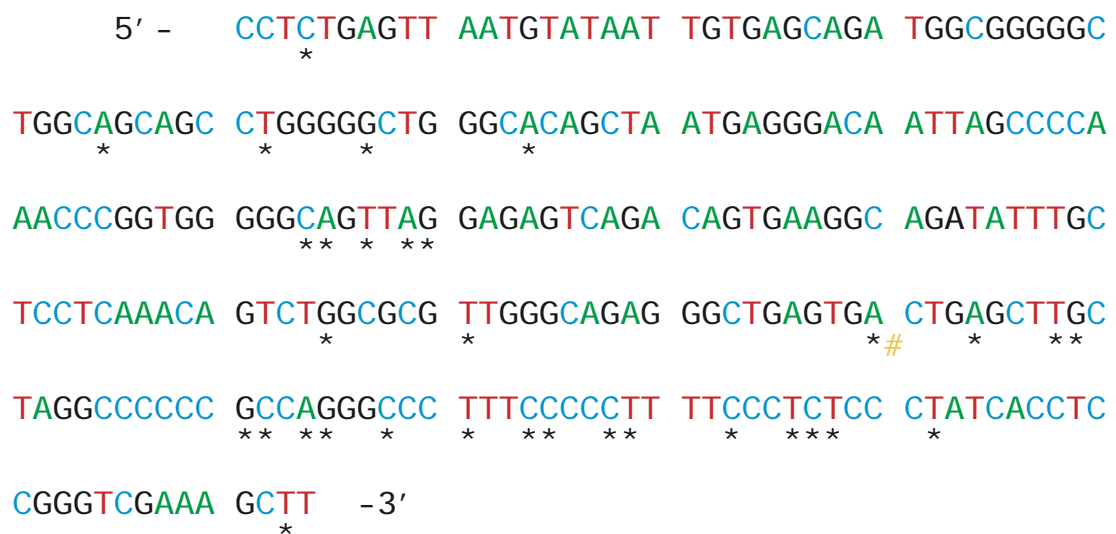


Abb. 32: Für Expression notwendige Sequenz des *Pax4*-Promotors

Die für *Pax4* ausschlaggebende DNS-Sequenz umfaßt lediglich die hier dargestellten 254 Basen. Diese liegen in einem chromosomalen Bereich, der 88 Prozent Identität zur homologen humanen Sequenz aufweist. Die nicht mit der homologen menschlichen genomischen Sequenz übereinstimmenden Basen sind mit einem Stern markiert. Die gelbe Raute markiert eine Position, an der die Maussequenz gegenüber der menschlichen Sequenz eine Deletion von Acht Basen aufweist.

Derartige Motive finden sich häufig auf von *Homöo*-Box-Genen erkannten cis-regulatorischen DNS-Sequenzen von Promotoren, wobei meistens zwei in unmittelbarer Nachbarschaft liegende und durch einen wenige Basen umfassenden Verbindungsbereich getrennte TAAT-Motive (Kalousová et al., 1999) von den Transkriptionsfaktoren erkannt werden. Ein derartiges Sequenzmotiv findet sich gleich zu Beginn der *Pax4*-Promotorsequenz. Vor einer weiteren experimentellen Analyse des *Pax4*-Promotors wurde der Promotorbereich im Folgenden eingehend auf weitere derartige, bereits

bekannte und beschriebene DNS-Erkennungsmotive von Transkriptionsfaktoren untersucht.

CIS-REGULATORISCHE MOTIVE DES *PAX4* PROMOTORS

Eine detaillierte Analyse des *Pax4*-Promotors führte zu der Entdeckung verschiedener Sequenzmotive, die bereits als cis-regulatorische Elemente in Promotoren anderer, ebenfalls in der Bauchspeicheldrüse aktiver Gene beschrieben wurden (Abb. 33).

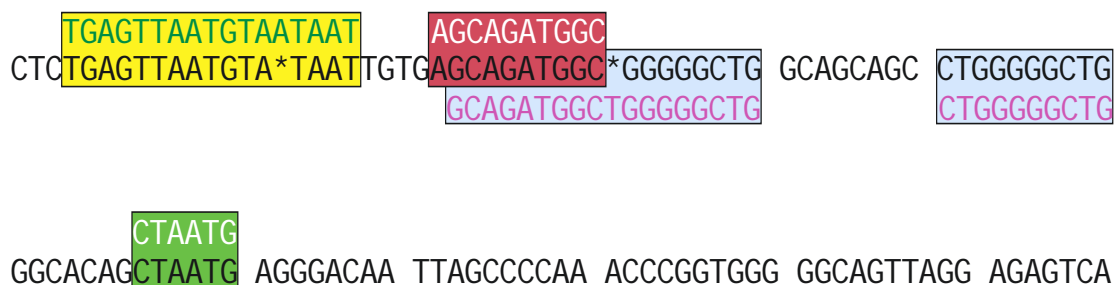


Abb. 33: Sequenzmotive innerhalb des funktionellen *Pax4*-Promotorelements

Der 5'-Bereich der Sequenz des *Pax4*-Promotors ist als durchlaufende Basenfolge dargestellt, die Sequenz ähnlicher und identischer Motive zu anderen Promotoren befindet sich darüber bzw. darunter und ist in farbigen Kästen hervorgehoben. Fehlende Übereinstimmung aufgrund fehlender Basen ist mit einem Stern markiert. Gelber Kasten: Homologie zu der im Amylin-Peptid-Promotor gefundenen Erkennungssequenz für den *Pdx1*-Transkriptionsfaktor (A2-Element). Roter Kasten: Zum E1-Element des Insulin-Promotors identisches Motiv. Grüner Kasten: Kernsequenz der von *Isl1* erkannten Motive. Blauer Kasten: Zum Insulin-Promotor identische Bereiche.

So befindet sich ein 17 Basen umfassendes Sequenzmotiv auf dem *Pax4* Promotor, das zu 94 Prozent mit einer *Pdx1*-bindenden Domäne des Amylin-

Peptid-Promotors identisch ist (**A2**-Element, Carty et al., 1997). Perfekte Übereinstimmung besteht zwischen einer 10 Basen umfassenden Sequenz des im Insulinpromotor entdeckten **E1**-Elements (German et al., 1995) und einem Motiv des *Pax4*-Promotors. Des weiteren findet sich die Kernsequenz des von *Isl1* erkannten Sequenzmotivs (Karlsson et al., 1990). Bindestellen für *Pax6* (Xu et al., 1999) und *HNF-6* (Lemaigre, pers. Mitteilung) konnten nicht identifiziert werden.

Der zum Insulinpromotor identische Bereich umfaßt nicht nur das E1-Element, sondern es konnten weitere 18 Basen identifiziert werden, die mit Sequenzen aus dem Insulinpromotor identisch sind.

ANALYSE DER *PAX4*-PROMOTORELEMENTE

Um zu überprüfen, inwieweit diese Elemente tatsächlich Einfluß auf *Pax4*-Expression nehmen, wurden durch PCR-Amplifikation genomische DNS-Fragmente hergestellt, bei denen einzelne Elemente selektiv aus dem Sequenzkontext entfernt wurden (Abb. 34). Die Deletionen wurden durch die Wahl entsprechender 5'-Primer definiert und durch Sequenzierung der entsprechenden Konstrukte verifiziert. Die auf diese Weise gewonnenen DNS-Fragmente wurden ihrerseits wie die Konstrukte zuvor an das *lacZ*-Gen ligiert.

Die Auswahl der deletierten Elemente erfolgte nach folgenden Kriterien: Das von *Pdx1* erkannte A2-Element (cb 13) und das zum E1-Element des Insulinpromotors identische Motiv (cb 16) wurden deletiert, da diese bereits auf anderen Promotoren gefunden worden waren, welche spezifische Expression im endokrinen Organ vermitteln. Bei dem Konstrukt cb 14 fehlen beide Elemente, in cb 19 fehlt zusätzlich dazu ein Teil der sich an E1 anschließenden zum Insulinpromotor identischen Sequenz. Darüber hinaus wurden zwei Deletionen ausgewählt, die den zum Insulinpromotor identischen Bereich allein

betreffen (cb 17, cb 18). Für diese Bereiche sind noch keine Funktion oder ein Bindungspartner beschrieben worden. Ein Deletionskonstrukt für die potentiell von *Isl1* erkannte Sequenz wurde nicht erstellt, da die Expression von *Isl1* nicht auf das Organ beschränkt ist und auch die Inaktivierung von *Isl1* zu keinem spezifisch das (endokrine) Pankreas betreffenden Phänotyp führt (Ahlgren et al., 1997). Nach Injektion dieser Konstrukte erfolgte erneut eine Analyse der Expression während unterschiedlicher Stadien der Mausentwicklung.

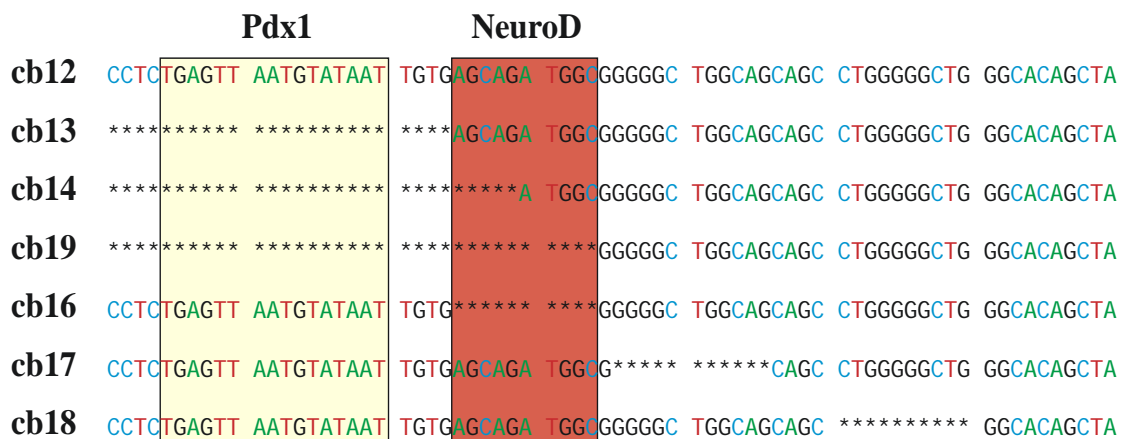


Abb. 34: Deletionskonstrukte zur Ermittlung der Funktion der entdeckten Elemente

Dargestellt ist der am weitesten 5' gelegene Bereich des *Pax4*-Promotors. Die deletierten Bereiche sind durch Sterne markiert. cb 12 repräsentiert die intakte Sequenz. Im Konstrukt cb 13 fehlt das potentiell von *Pdx1* erkannte Motiv, bei cb 14 und cb 19 fehlt zusätzlich das intakte E1-Element (*NeuroD*). In cb 16 fehlt selektiv nur das E1-Element und bei cb 17 und cb 18 wurden die Elemente entfernt, für die zwar bisher keine Funktion beschrieben ist, die aber auch im Insulinpromotor vorkommen.

Die Effizienz der Mikroinjektion lag bezüglich transgener Tiere bei diesen Konstrukten zwar etwas höher als die der vorherigen Mikroinjektionen (Tab. 3). Im Durchschnitt blieb sie aber ebenfalls deutlich unter der Zehn-Prozent-Marke. Dieser Umstand führte dazu, daß zum jeweiligen Konstrukt selten mehr als fünf Mauslinien zur Analyse zur Verfügung standen. Zusätzlich ergaben sich bei der Verpaarung einiger Linien zur F1-Generation wie bereits bei der Linie cb 12 Ausfälle, sodaß der in Tabelle 3 angegebene prozentuale Anteil der exprimierenden Linien sehr gering ausfällt. Bei der Linie cb 14 führte darüber

hinaus die Deletion selbst offenbar meist zu einem kompletten Verlust der Expression, sodaß bei der Beurteilung der Gesamteffektivität der Mikroinjektion hinsichtlich exprimierender Linien der prozentuale Durchschnittswert ohne Aussage und demzufolge nicht angegeben ist.

Tabelle 3:

Konstrukt	Tiere insgesamt	Davon Transgene	Transgene mit Expression
<i>cb 13</i>	114	3 (2,6%)	2 (1,8%)(#)
<i>cb 14</i>	100	4 (4,0%)	1 (1,0%)(*)
<i>cb 16</i>	65	2 (3,1%)	2 (3,1%)
<i>cb 17</i>	79	7 (8,9%)	3 (3,8%) (#)
<i>cb 18</i>	49	4 (8,2%)	2 (4,1%) (#)
<i>cb 19</i>	k.A. (+)	k.A. (+)	k.A. (+)

Tab. 3: Effektivität der Mikroinjektionen der Deletionskonstrukte

Die Effektivität transgener Tiere bezogen auf die Gesamtzahl von Tieren liegt zwischen 2,6 Prozent (cb 13) und 8,9 Prozent (cb 17).

(+) Das Konstrukt cb 19 kam nicht mehr zur Injektion, da bereits cb 14 kaum Expression zeigte.

(#) Diese Werte repräsentieren die zur Zeit bereits analysierten Linien.

(*) Die fehlende Expression ist hier offenbar eine Folge der Deletion.

VERSPÄTETE REPORTERGENAKTIVITÄT OHNE PDX1-BINDEMOTIV

Das Reporterkonstrukt, dem das von *Pdx1* erkannte A2-Element fehlt (cb 13), war nicht in der Lage, das Reporter-gen in der frühen Entwicklung der Maus zu aktivieren. Während das natürliche *Pax4*-Signal bereits in heterozygoten Knockout-Tieren des Stadiums E 10,5 deutlich zu sehen ist, taucht die von cb 13 vermittelte Aktivität erst ab dem Stadium E 12,5 auf (Abb. 35).

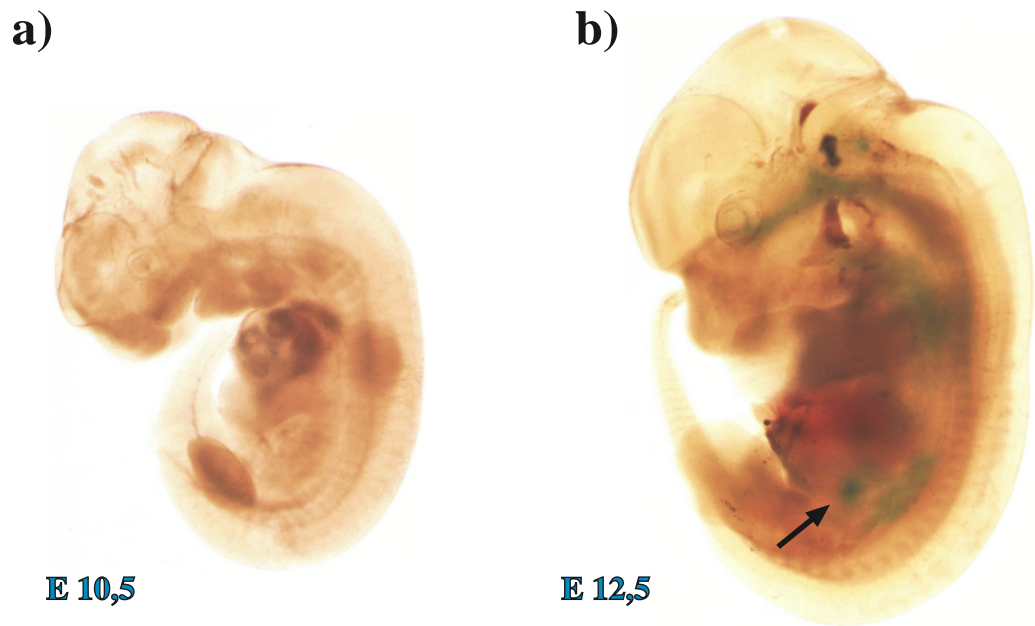


Abb. 35: Verspätetes Einsetzen der Reportergenaktivität mit cb 13

Im Stadium E 10,5, in dem der *Pax4* Promotor normalerweise bereits eine deutliche pankreatische Genaktivität vermittelt (Abb. 13), zeigt sich bei den transgenen Tieren mit dem die *Pdx1*-Erkennungssequenz A2 entbehrenden Promotorkonstrukt cb 13 noch keine Aktivität (a). In späteren Stadien, so wie hier bei einer E 12,5-Maus (b), taucht unter Kontrolle von cb 13 pankreatische Reporterexpression auf.

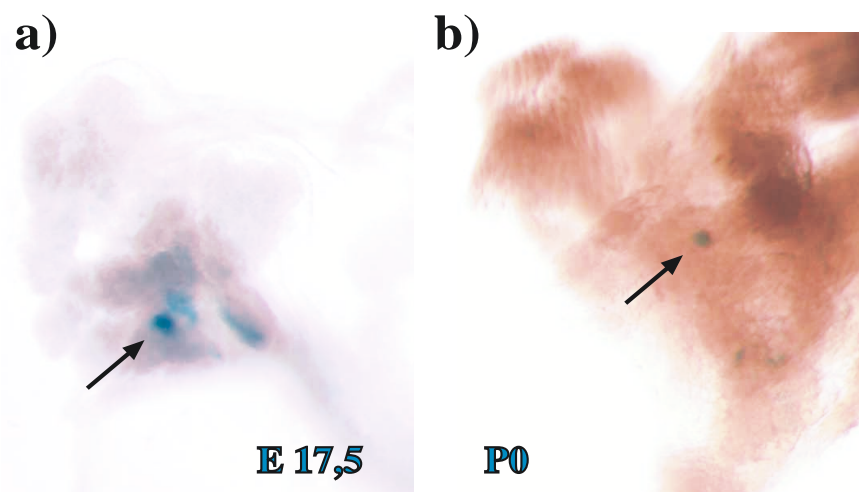


Abb. 36: Reportergenaktivität mit cb 13 in späten Stadien

a) Im embryonalen Stadium E 17,5 zeigt sich eine der natürlichen *Pax4*-Expression gleichwertige Expression in zentralen Bereichen der Bauchspeicheldrüse (Pfeil).

b) Auch im Organ von Neugeborenen zeigen - vergleichbar mit der natürlichen *Pax4*-Expression - zentrale Bereiche des Organs noch deutliche Aktivität (Pfeil).

In den späteren Stadien bleibt diese Aktivität bis zur Geburt erhalten und ist - wie auch die natürliche *Pax4*-Aktivität - ab dem Stadium E 17,5 auf einzelne, zentral im Organ liegenden Inseln beschränkt (Abb. 36).

SCHWACHE REPORTERGENAKTIVITÄT OHNE E1-ELEMENT

Von den Mauslinien mit dem Konstrukt, dem das E1-Element entfernt worden war (cb 16) zeigt eine Linie zwar die Expressionsdynamik, die der Aktivität des *Pax4*-Gens entspricht, allerdings ist die Intensität der Expression des Reportergens hier nur sehr schwach (Abb. 37).

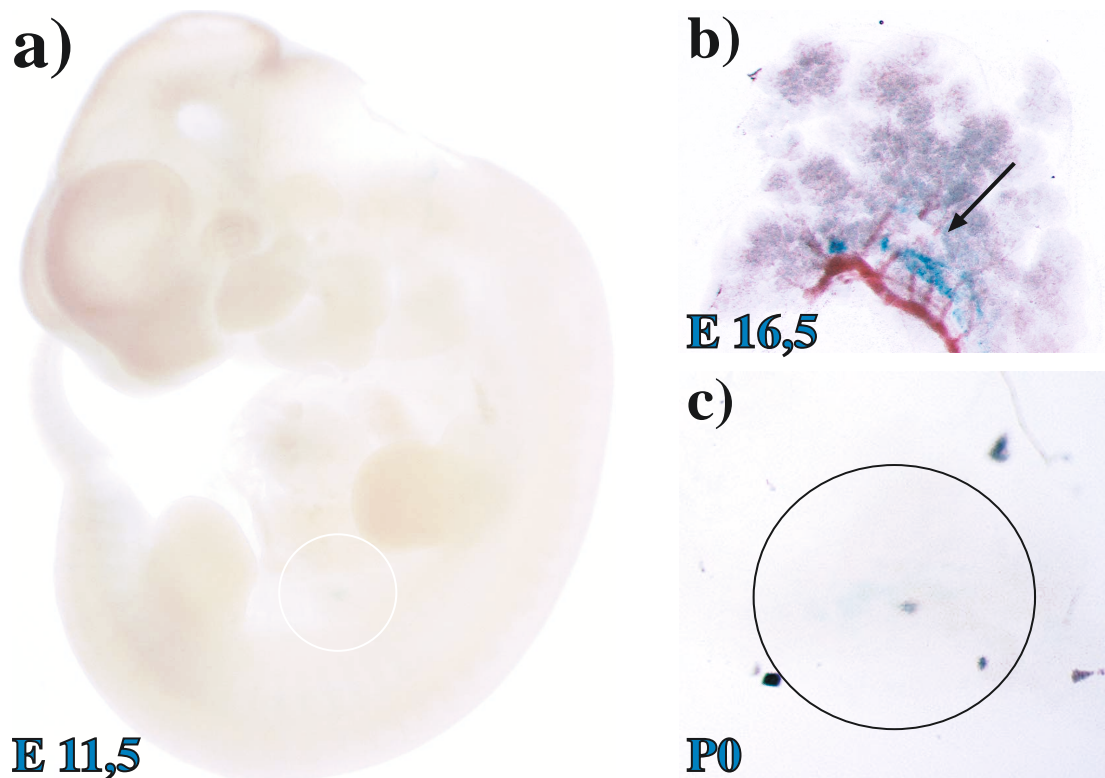


Abb. 37: Reporterexpression der transgenen Mauslinie cb 16b

a) Die Expression des *lacZ*-Gens wird in dieser Linie entsprechend der *Pax4*-Aktivität ebenfalls früh in der Entwicklung angeschaltet. Die pankreatische Expression (Kreis) ist jedoch sehr schwach.

b) Auch im Stadium E 16,5 ist die dem *Pax4*-Expressionsmuster entsprechende, jedoch sehr schwache Aktivität auszumachen.

c) Bei den neugeborenen Embryos ist eine Blaufärbung durch Reporterexpression kaum noch detektierbar.

In einer zweiten für cb 16 transgenen Linie konnte keine Expression beobachtet werden (Abb. 38).

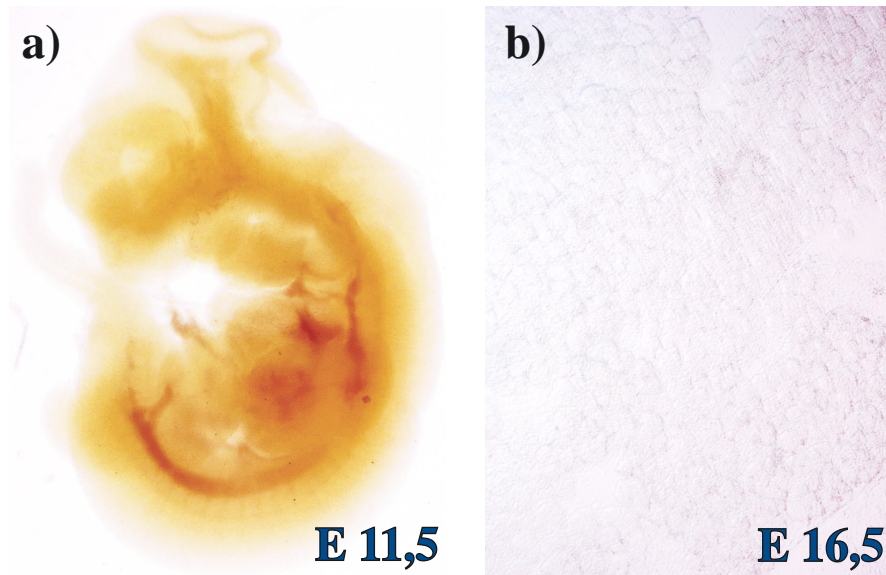


Abb. 38: Keine Expression in der transgenen Mauslinie cb 16a

Weder im Stadium E 11,5 (a) noch in späten Stadien (b, hier E 16,5) ist in der Linie cb 16 a Expression des Reportergens vorhanden.

EXPRESSION NACH ENTFERNEN VON SOWOHL A2- ALS AUCH E1-ELEMENT AUS DEM PAX4 PROMOTOR

Deletion beider Sequenzmotive - sowohl des E1-Elements als auch des A2-Bindemotivs - führte zu einem Verlust der Expression des Reportergens in der Mehrzahl der beobachteten Mauslinien. In Abb. 39 ist ein Beispiel der entsprechenden nicht exprimierenden Linien, die transgen für das Konstrukt cb 14 sind, dokumentiert. In einer Linie (cb 14 b) konnte jedoch eine schwache, spezifische Färbung der Bauchspeicheldrüse beobachtet werden. Diese ähnelt der Expression in der Linie cb 16 b (Abb. 40). Die Reportergenaktivität in dieser Linie ist in späteren Stadien allerdings nicht mehr vorhanden; in neugeborenen Mausembryonen der Linie cb 14 b taucht keinerlei Blaufärbung mehr auf (Abb. 40).

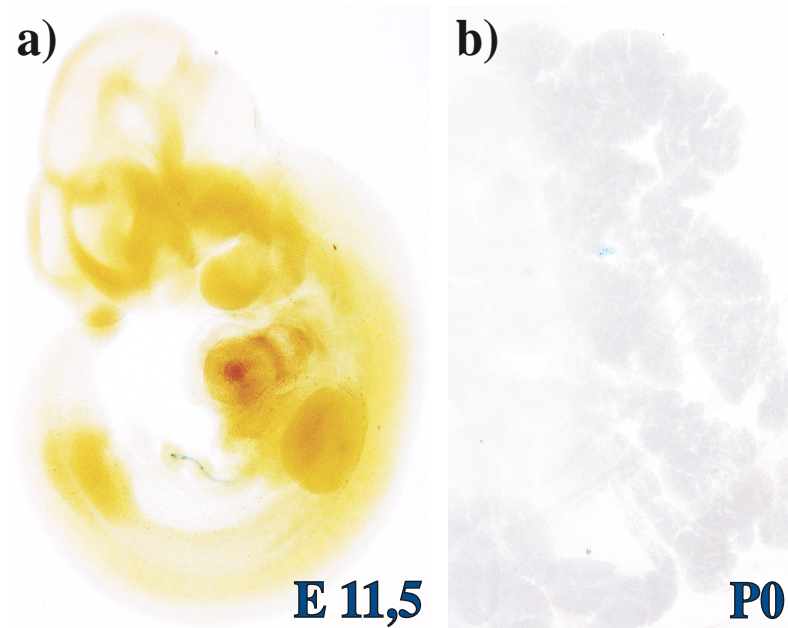


Abb. 39: Keine Expression in der transgenen Mauslinie cb 14 c

Außer unspezifischer Hintergrundfärbung ist weder in E11,5 - Embryonen (a) noch in Organen von Neugeborenen (b) der Linie cb 14 c *lacZ*-Färbung zu erkennen.

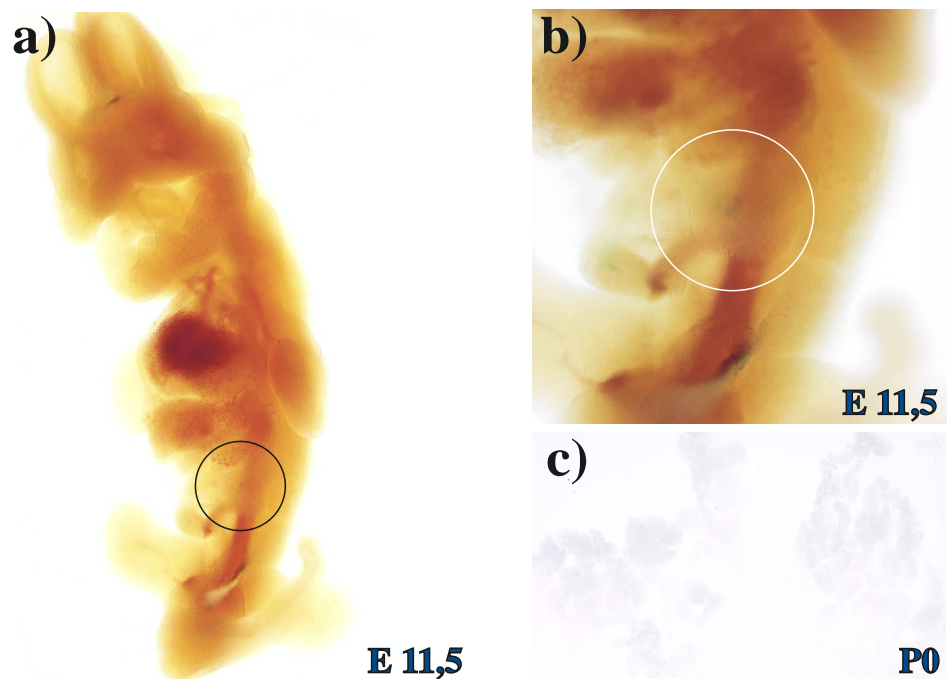


Abb. 40: Expression der Linie cb 14 b

Die Linie cb 14 c zeigt in E 11,5 - Embryos zwar eine schwache Färbung (a, vergrößert in b), diese ist in späteren Stadien jedoch nicht mehr vorhanden (c, P0).

KEINE VERÄNDERUNG DER EXPRESSION DURCH DELETION DER DEM INSULINPROMOTOR IDENTISCHEN SEQUENZEN

Neben dem E1-Element befindet sich eine ebenfalls zu Motiven des Insulinpromotors identische Sequenz von weiteren 18 Basenpaaren im funktionellen *Pax4*-Promotor, für die bisher keine Funktion oder ein daran bindender Faktor beschrieben wurde. Um zu ermitteln, ob diese Bereiche Einfluß auf die *Pax4*-Expression nehmen, wurden Konstrukte hergestellt, denen diese Regionen fehlen und mikroinjiziert. Die Deletion dieser Bereiche (cb 17, cb 18) führte jedoch zu keiner erkennbaren Veränderung des Expressionsmusters (Abb. 41-46).

DELETIONSKONSTRUKT CB 17: SEHR SCHWACHE BIS SEHR STARKE AKTIVITÄT GEMÄß DER EXPRESSIONSDYNAMIK VON PAX4

Mit dem Konstrukt cb 17, bei dem der sich an das E1-Element anschließende Sequenzbereich deletiert ist, zeigen die Linien aufgrund von Insertionseffekten zwar zum Teil nur sehr schwache Expression. Diese, wie auch die Expression von Linien mit stärkerer Reporterogenaktivität, folgte in seiner Dynamik jedoch der natürlichen *Pax4*-Expression. So konnte in allen Fällen eine deutliche Expression im Stadium E 11,5 beobachtet werden. Diese war später in der Bauchspeicheldrüse im Stadium E 16,5 nachweisbar und bei der Geburt auf die Langerhans-Inseln konzentriert (Abb. 41-43). An dieser Stelle sind drei Linien dokumentiert, von denen die Linie cb 17 g eine sehr stark exprimierende Linie darstellt, bei der auch deutliche ektopische Expression zu beobachten ist (Abb. 41). Im Gegensatz dazu zeigt sich in der Linie 17 a eine sehr schwache, kaum detektierbare Expression. Auch diese folgt aber der Dynamik natürlicher *Pax4*-Expression (Abb. 42). In der Linie cb 17 f ist eine deutliche Expression ohne ektopische Effekte vorhanden (Abb. 43).

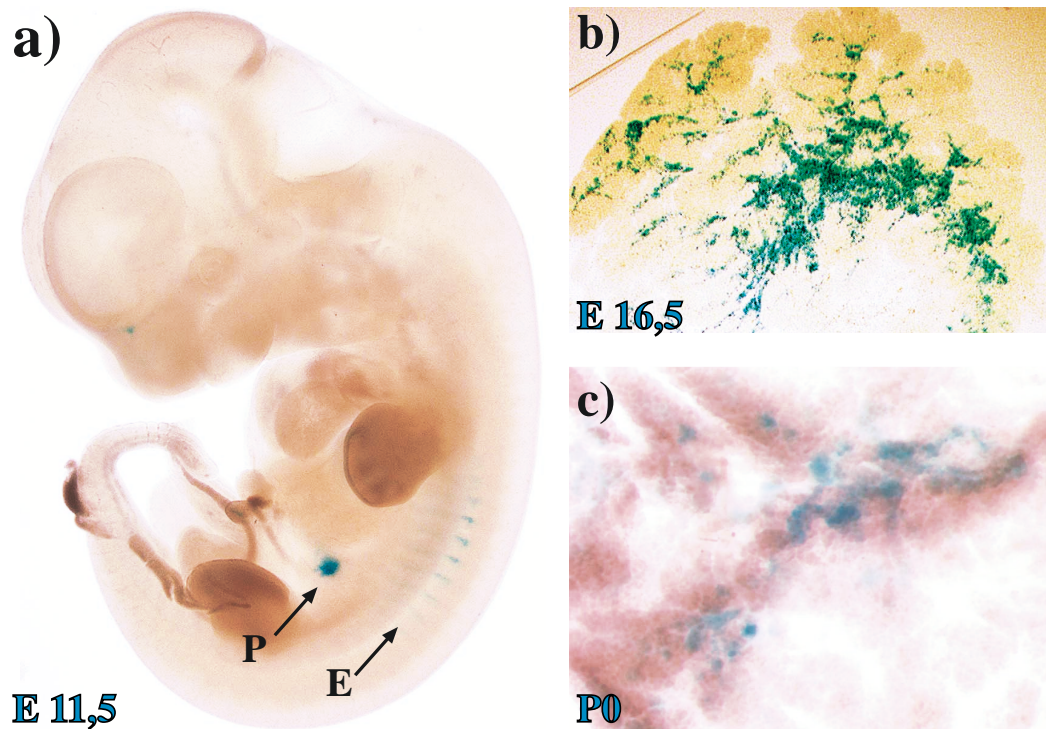


Abb. 41: Starke Expression in der Mauslinie cb 17g

a) Neben ektopischer Expression (E) ist im E 11,5 Embryo eine starke Expression in der Bauchspeicheldrüse (P) zu erkennen. b) Auch in der E 16,5-Bauchspeicheldrüse ist eine starke Expression vorhanden. c) Diese starke Aktivität hält sich bis zum Stadium P0.

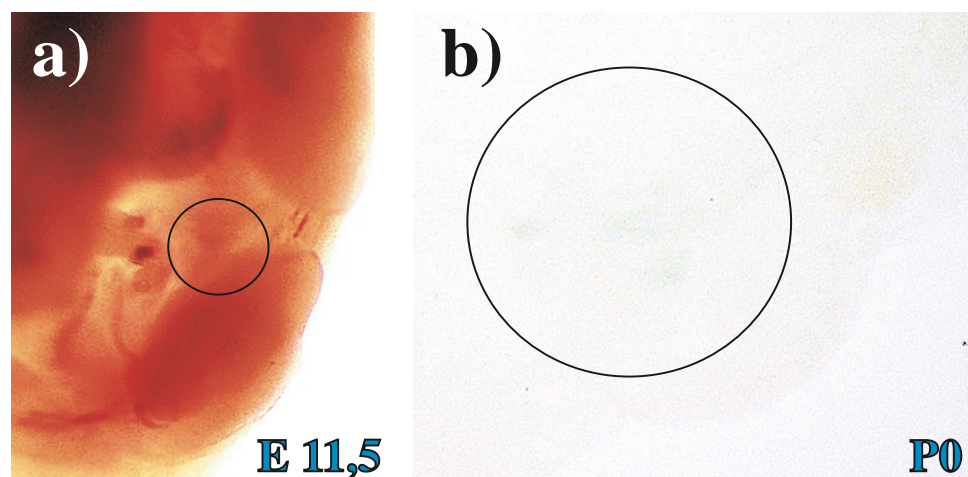


Abb. 42: Schwache Expression in der Linie cb 17a

a) Im E 10,5 Embryo ist eine nur sehr schwache Färbung auszumachen (durch den Kreis markiert). b) Auch im neugeborenen Embryo ist eine -ebenfalls sehr schwache-Färbung zu erkennen.

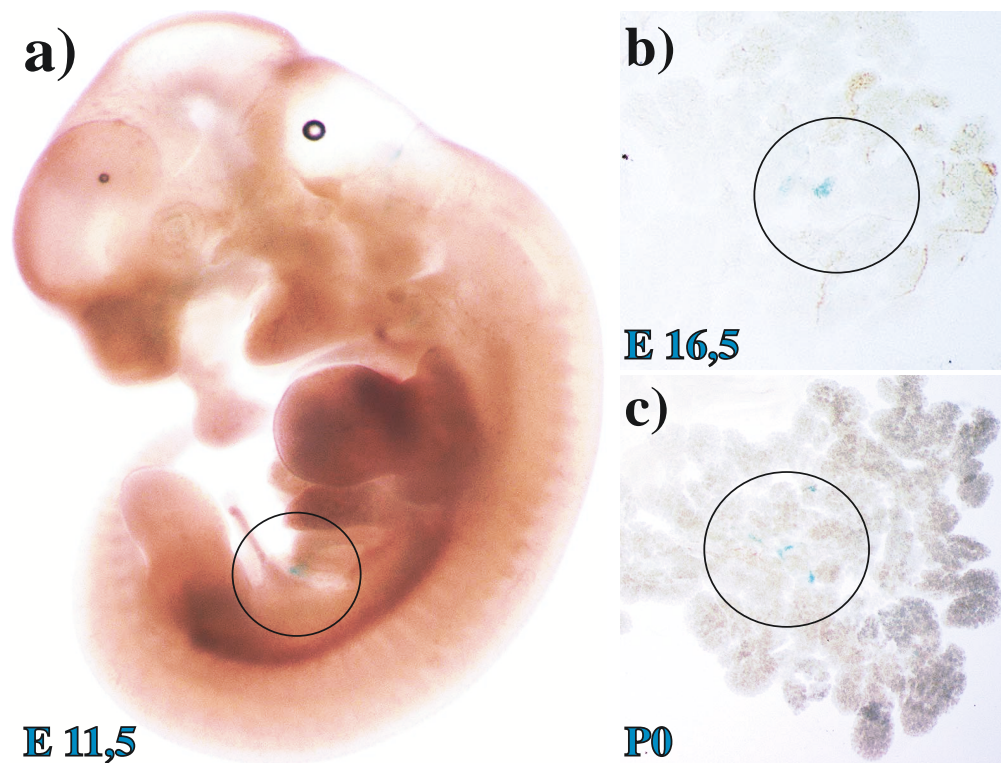


Abb.43: Expression der transgenen Linie cb 17f

a) Eine relativ schwache pankreatische Expression zeigt sich bei der Linie cb 17 f im E 11,5 Embryo (Kreis). b) Auch in transgenen Tieren des Stadiums E 16,5 ist eine relativ schwache Färbung zu erkennen. c) Die schwache Reporterogenaktivität bleibt bis zum Stadium P0 erhalten.

DELETIONSKONSTRUKT CB 18: BEISPIEL FÜR EIN DOPPELTES INSERTIONSEREIGNIS, EXPRESSIONSDYNAMIK WIE PAX4

Auch die Expressionsdynamik des Reportergens in transgenen Mauslinien für das Konstrukt cb 18 folgt derjenigen der natürlichen *Pax4*-Expression.

Bei der Linie cb 18 d konnte darüber hinaus das Phänomen einer (mindestens) doppelten Insertion des Reporterkonstruktes auf offenbar (zumindest) zwei verschiedenen Chromosomen beobachtet werden. Zunächst fiel die Linie bereits durch den überdurchschnittlichen Anteil transgener Tiere in der F1-Generation auf. Nur elf Prozent der Nachkommen waren nicht

transgen. Bei der *lacZ* Färbung konnte dann beobachtet werden, daß zwei verschiedene Expressionsmuster auftraten (Abb. 44).

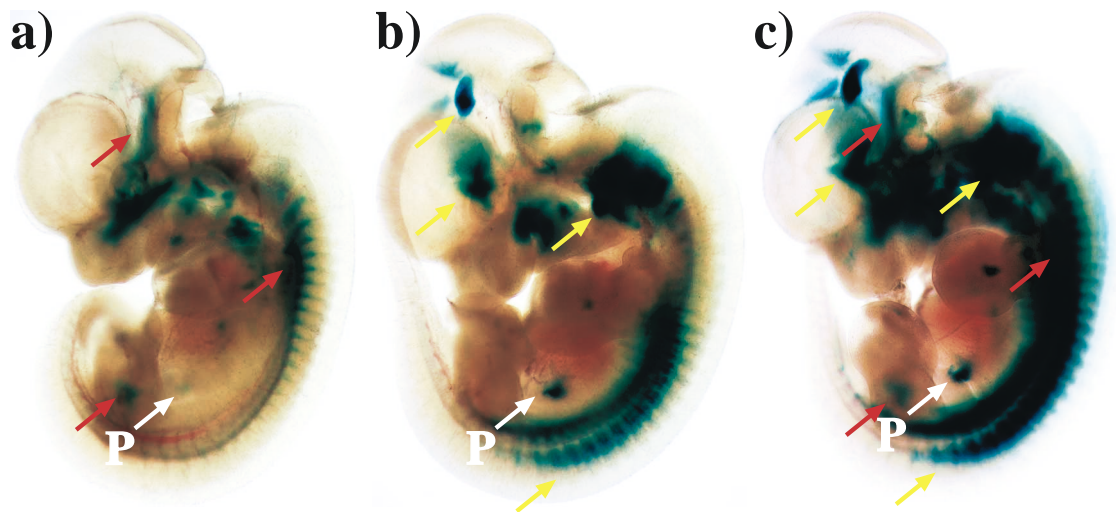


Abb. 44: Expression der transgenen Mauslinie cb 18d im Stadium E 11,5

In der Linie cb 18 d hat offensichtlich die Insertion von zwei Konstrukten auf zwei unterschiedlichen Chromosomen stattgefunden. Die Folge davon sind unterschiedliche Expressionsmuster. a) Eines der Expressionsmuster zeigt eine Reihe von ektopischen Expressionsdomänen (rote Pfeile), aber nur sehr schwache Aktivität in der Bauchspeicheldrüse (P). b) Im zweiten Expressionsmuster zeigt sich neben starker ektopischer Expression (gelbe Pfeile) starke pankreatische Aktivität (P). c) Einige Mäuse vereinen beide Expressionsmuster.

Nur eines davon zeigt starke Aktivität des Reportergens in der Bauchspeicheldrüse. Die meisten der Tiere zeigen jeweils nur eines der Expressionsmuster, während einige wenige beide Muster in sich vereinen (Abb. 44). Dieses Phänomen ist die Folge eines doppelten Insertionsereignisses auf zwei unterschiedlichen Chromosomen.

Bezüglich der Expressionsdynamik des Reportergens war in dieser Linie, wie auch in einer anderen cb 18 - Linie kein Unterschied zu natürlicher *Pax4*-Expression auszumachen (Abb. 45, 46).

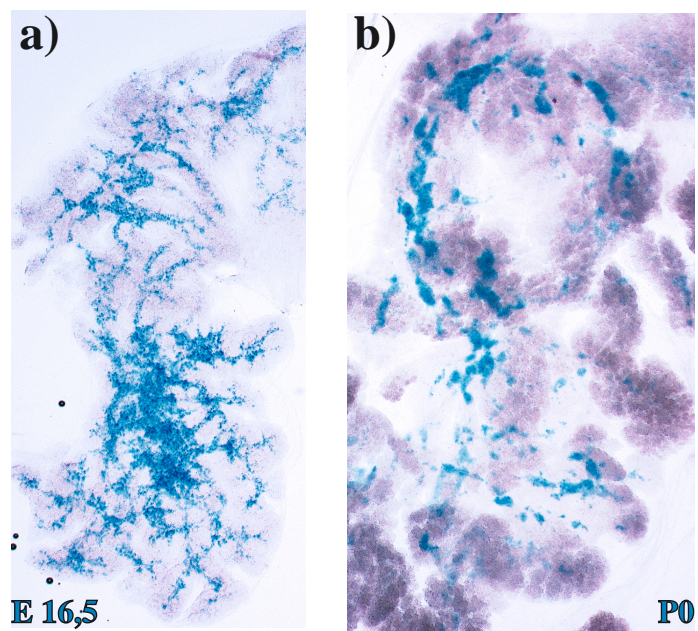


Abb. 45: Expression der transgenen Mauslinie cb 18 d in späten Stadien

a) Im Stadium E 16,5 ist bei den pankreatisch stark exprimierenden cb 18 d - Mäusen das charakteristische Expressionsmuster in intensiver Form zu sehen. b) Auch bei den Neugeborenen folgt das Expressionsmuster der von cb 18 vermittelten Reportergenaktivität der *Pax4*-Expression.

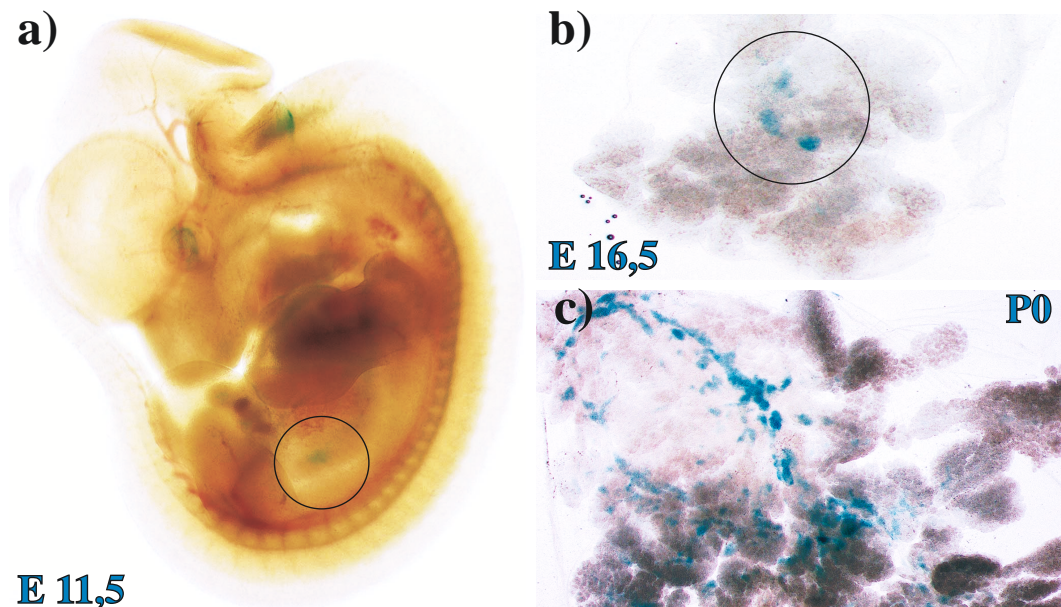


Abb. 46: Reportergenexpression in der transgenen Mauslinie cb 18 c

a) - c) Auch in dieser Linie, in der offensichtlich nur ein Insertionsereignis stattgefunden hat, entspricht das Expressionsmuster der natürlichen *Pax4*-Expression.

HERSTELLUNG EINER TRANSGENEN MAUS MIT *PAX4*-KONTROLLIERTER *CRE*-REKOMBINASE

Das funktionelle genomische Promotorelement aus dem Reporterkonstrukt cb 9 wurde dazu genutzt, eine Transgene Maus herzustellen, bei der die *Cre*-Rekombinase (Brocard et al., 1998) unter der Kontrolle des *Pax4* Promotors aktiviert wird. Mit dieser Maus ist es möglich, durch Verpaarung mit anderen transgenen Mäusen, die ein von loxP-Motiven flankiertes Gen besitzen, dieses spezielle Gen spezifisch in den Zellen auszuschalten, in denen *Pax4* aktiv ist, also bereits in frühen β -Zell-Vorläufern.

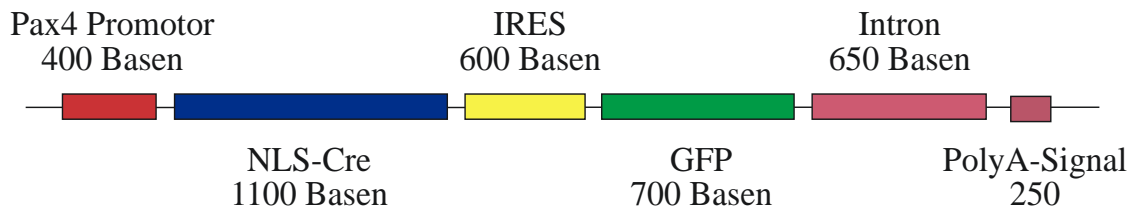


Abb. 47: Aufbau des Rekombinasekonstruktes cb 15

Das genomische 400 Basenpaar-Fragment enthält den *Pax4* Promotor und treibt die *Cre*-Rekombinase an. Als Reporter für die Aktivität der *Cre*-Rekombinase wurde das Reporter-gen GFP nachgeschaltet. Der Intron-Poly-A-Schwanz gewährleistet die korrekte Translation.

Tabelle 4:

Konstrukt	Tiere insgesamt.	Davon Transgene	Transgene mit Expression
<i>cb 15</i>	153	11 (7,2%)	2 (1,3%)

Tab. 4: Effektivität der Mikroinjektion des cb 15 - Konstruktes.

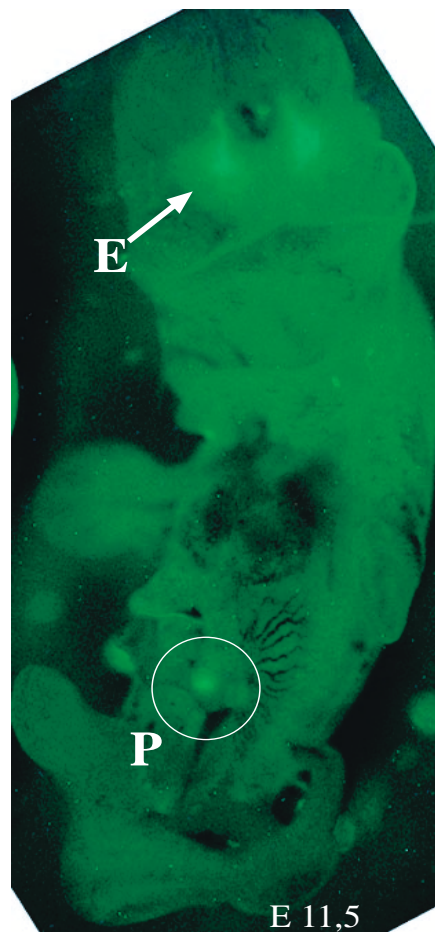


Abb. 48: Expression des Reportergens GFP in der Mauslinie cb 15g

Neben leichter Ektopischer Expression im Gehirnbereich (E) ist deutlich das Signal in der Bauchspeicheldrüse (P) des E 11,5-Embryos zu erkennen.

Zu diesem Zweck wurde das in Abb. 47 dargestellte Konstrukt mikroinjiziert. Die Effektivität der Mikroinjektion dieses Konstruktes ist in Tab. 4 angegeben. Die positiven, exprimierenden Mauslinien, zeigen die in Abb. 48 dargestellte pankreatische Reporteraktivität.

MÖGLICHE *PAX4*-BINDESTELLE IM *PDX1*-PROMOTOR

In zwei kürzlich erschienenen Publikationen werden mögliche DNS-Erkennungssequenzen des *Pax4*-Proteins diskutiert (Smith et al., 1999; Kalousova et al., 1999). Eine mögliche, in beiden Veröffentlichungen übereinstimmend beschriebene Bindesequenz stellt das Palindrom ATTA-TAAT mit drei bis fünf dazwischenliegenden beliebigen Basen dar. Ein derartiges Motiv findet sich im *Pdx1*-Promotor (Abb. 49). Allerdings ist diese Sequenz knapp außerhalb eines Bereiches, der zuvor bereits als Hypersensitive Region beschrieben worden ist (Wu et al., 1997).

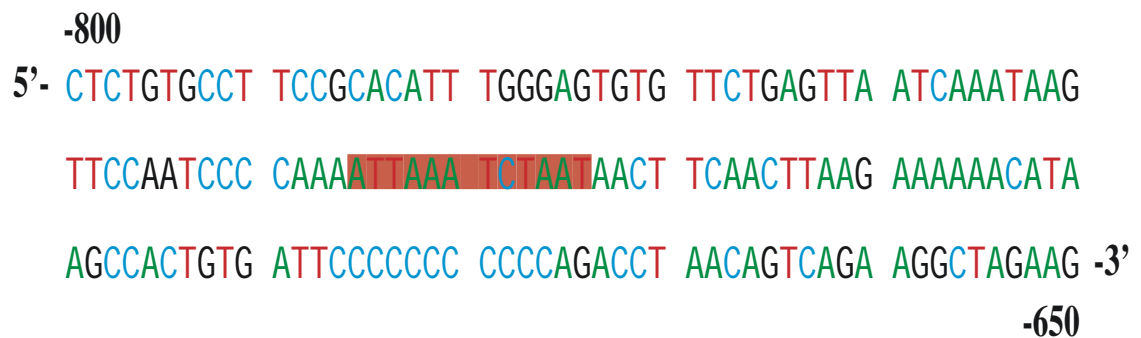


Abb. 49: Mögliches *Pax4*-Bindendes Motiv im Maus-*Pdx1*-Promotor

Im Abstand von 780 Basen stromaufwärts zum Transkriptionsstart von *Pdx1* befindet sich eine mögliche *Pax4*-Bindesequenz (hervorgehoben). Diese liegt allerdings knapp außerhalb einer Region, die zuvor als Hypersensitiver Bereich beschrieben worden ist.

III. DISKUSSION

*"**E**S IST UNS NICHT ERLAUBT, DIE AUGEN VOR DER TATSACHE ZU VERSCHLIEBEN, DAß DIE BIOLOGISCHE GRUNDLAGENFORSCHUNG EINE DER GRÖßTEN HERAUSFORDERUNGEN, WENN NICHT DIE SCHWIERIGSTE PROBLEMSTELLUNG ÜBERHAUPT DARSTELLT, DIE DER MENSCHLICHE INTELLEKT JE ZU LÖSEN VERSUCHT HAT, UND DAß DIESE WISSENSCHAFT - WIE GRUNDLAGENFORSCHUNG INSGESAMT - NIEMALS EINEN ZUSTAND DER VOLLSTÄNDIGEN ERKENNTNIS ERREICHEN WIRD, DA JEDE ERFORSCHTE GRUNDLAGE LEDIGLICH WIEDER NEUE FRAGEN NACH DEN GRUNDLAGEN DIESER GRUNDLAGE AUFWIRFT."*

WILHELM ROUX (1894)

Aufgrund ihrer Bedeutung bei der Regulation des Blutzuckerspiegels spielt die endokrine Bauchspeicheldrüse eine entscheidende Rolle bezüglich wichtiger Lebensfunktionen höherer Organismen. Dementsprechend gravierend wirken sich Fehlfunktionen des endokrinen Pankreas aus. Diabetes und Bauchspeicheldrüsenkrebs beispielsweise sind nicht nur lebensbedrohliche, sondern darüber hinaus auch weitverbreitete Krankheiten unserer Zivilisation. Das Verständnis der Molekularbiologischen Prozesse, die der Entwicklung,

Regeneration und Funktion dieses Organs zugrundeliegen, ist in den vergangenen Jahren verstärkt in das öffentliche Interesse gerückt, da man sich von der Aufklärung dieser Mechanismen Hinweise auf Möglichkeiten zur Therapie der Erkrankungen erhofft. *Pax4* kommt bei diesen Untersuchungen eine Schlüsselrolle zu, da dieser Transkriptionsfaktor offensichtlich am Beginn der Differenzierung von endokrinen Vorläuferzellen zu Insulin-produzierenden β -Zellen steht (Dohrmann et al., 2000). Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse tragen zu einem genaueren Verständnis der *Pax4* regulierenden biochemischen Prozesse, und somit zum Gesamtverständnis der genetischen Interaktionen, die der Entwicklung der Bauchspeicheldrüse zugrunde liegen, bei. Sollte es eines Tages möglich sein, sich dieses Wissen für eine Steuerung der Differenzierung z.B. von Stammzellen oder körpereigenen Pankreaszellen zunutze zu machen, dann wären damit erste Voraussetzungen für einen Therapieansatz geschaffen, bei dem durch gezielte Aktivierung von pankreatischen Genen wie *Pax4* bestimmte endokrine Zellen (re-)generiert werden könnten. Mit Hilfe von Gentherapie oder Zelltherapie könnte man diese Zellen dem Patienten zur Verfügung stellen und es wird unter Umständen auf diese Weise eines Tages möglich sein, eine Krankheit wie Diabetes zu heilen.

DIE ROLLE VON *PAX4* WÄHREND DER PANKREASENTWICKLUNG

Der Verlust von *Pax4*-Expression führt zu einem Verlust der Insulin-produzierenden β -Zellen. Die Langerhans-Inseln bestehen in einer *Pax4*(-/-) - Maus ausschließlich aus Glukagon-exprimierenden α -Zellen (Sosa-Pineda et al., 1997). Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß die Rolle von *Pax4* während der Pankreasentwicklung darin besteht, nach einer ersten Determinierung der endokrinen Zellpopulation innerhalb der Bauchspeicheldrüse durch andere

Gene die meisten dieser Zellen von der ansonsten standardmäßigen Differenzierung zu α -Zellen abzubringen, um sie stattdessen in den Differenzierungsweg zu β - und δ -Zellen oder auch PP-Zellen zu überführen. Diese Aufgabe ähnelt der Rolle von *Pax6* während der Retinaentwicklung des Auges. Hier hat der Verlust dieses Mitglieds aus der *Pax*-Genfamilie ebenfalls eine Einbuße der Zelldiversität zur Folge (Marquardt et al., 2001). Dabei ist es bei *Pax4* - wie auch bei *Pax6* in der Retina - durchaus denkbar, daß das Gen weniger für die Erlangung und den Erhalt einer bestimmten Zellidentität verantwortlich ist, als vielmehr für die Vermittlung des Potentials zur Entwicklung mehrerer verschiedener Zelltypen. *Pax4* ist bereits als Repressor von Transkription beschrieben worden (Fujitani et al., 1999; Smith et al., 1999). Dabei beschränkt sich diese Repression nicht nur auf Glukagon (Petersen et al., 2000), sondern betrifft auch die in β - und δ -Zellen Exprimierten Faktoren Insulin und Amylin-Peptid (Campbell et al., 1999). Diese Tatsache, sowie der im adulten Tier auch ohne *Pax4* mögliche Erhalt von β -Zell-Identität bekräftigen die Hinweise auf eine mögliche Rolle von *Pax4* bei der Aufgabe, endokrine Zellen in einem undifferenzierten Stadium zu halten, bis die - eventuell auf indirektem Wege von *Pax4* selbst initiierte - Aktivierung von für die Differenzierung zu endokrinen nicht- α -Zellen notwendigen Transkriptionsfaktoren abgeschlossen ist. Das würde bedeuten, daß eine sehr frühe Aktivierung von *Pax4* notwendig wäre, um diese Aufgabe erfüllen zu können. Die Expressionsdaten von *Pax4*, die in dieser Studie nachgewiesene frühe Aktivierung durch den ersten Pankreas-Marker *Pdx1* sowie ein von Activin vermittelter positiver Effekt auf *Pax4*-Expression (Ueda, 2000) unterstützen diese Hypothese.

Die sich an eine von *Pax4* vermittelte "Umprogrammierung" der ansonsten der α -Zell-Differenzierung zufallenden Zellen anschließende Determinierung zur Entwicklung von β -, δ - und PP-Zellen und der Erhalt der Identität dieser endokrinen Zellen fällt daraufhin offenbar nachgeschalteten Genen wie z.B. *Nkx2.2* und *Nkx6.1* zu, die selektiv in bestimmten Zellpopulationen der endokrinen Bauchspeicheldrüse aktiv sind und hier eine wichtige Rolle bei deren Differenzierung spielen (Sussel et al., 1998; Sander et al., 2000). Bisher existieren allerdings lediglich Hinweise auf die Einwirkung dieser *Nkx*-Gene

auf *Pax4* (s.u.). Aufgrund ihrer Rolle in der Entwicklung der Bauchspeicheldrüse ist allerdings trotzdem zu erwarten, daß diese Gene letztenendes stromabwärts von *Pax4* in der Regulationskaskade liegen.

Als direkte Regulatoren von *Pax4* kommen dagegen Gene in Frage, die in der frühen Pankreasentwicklung für die Identität der endokrinen Zellen insgesamt oder -zu einem noch früheren Zeitpunkt- für die Determinierung der ersten Pankreasvorläuferzellen verantwortlich sind. Zu diesen Genen gehören neben *Pdx1* und Activin die Faktoren, *HNF-6*, *ngn3* und *NeuroD* (Offield et al., 1996; Jacquemin et al., 2000; Gradwohl et al., 2000; Naya et al., 1997). Für *Pdx1* und *NeuroD* konnten in dieser Studie deutliche Hinweise für einen entsprechenden Einfluß auf *Pax4*-Expression vorgelegt werden.

Während jüngsten Veröffentlichungen zufolge auch *ngn3* -wie bereits *NeuroD*- auf die Regulation des E1-Elements Einfluß nimmt (Smith et al., 2000), ergaben sich für *HNF-6* und *Pax6* anhand der Promotorsequenzen keine Hinweise auf eine direkte Einwirkung auf *Pax4*-Expression. Der funktionelle *Pax4*-Promotor weist weder potentielle *HNF-6*- (Lemaigre, pers. Mitteilung), noch *Pax6*-Bindestellen (Czerny und Busslinger, 1995) auf.

Eine direkte Regulation von *Pax4* durch *Pax6* ist aufgrund des Expressionsverhaltens der beiden Gene nicht zu erwarten, da *Pax6*-Aktivität in adulten Stadien der Maus in allen endokrinen-, also auch β -Zellen, aktiv bleibt, während *Pax4* kurz nach der Geburt abgeschaltet wird (St.Onge et al., 1997).

Zwar ist *Pax6* offensichtlich an der Vermittlung der Zellidentität von α -Zellen beteiligt; die Funktion von *Pax6* im ausgereiften Organ liegt vermutlich aber gleichzeitig in einer Aufrechterhaltung der morphologischen Struktur der Langerhans-Inseln, da in der *Pax6*-Knockout-Situation neben dem Verlust der α -Zellen eine Ausbildung der Struktur von Langerhans-Inseln im Stadium E 17,5 ausbleibt. Aus diesem Grund ist eine Präsenz dieses Gens in allen endokrinen Zelltypen auch im adulten Tier notwendig. Weiterhin konnte bereits eine Wechselwirkung zwischen *Pax6* und *NeuroD* in *Xenopus* nachgewiesen werden. Diese Wechselwirkung könnte auch in der Bauchspeicheldrüse bezüglich der stufenweisen Differenzierung der endokrinen Zellen eine Rolle spielen (diskutiert unter "Der endokrine Zellstammbaum").

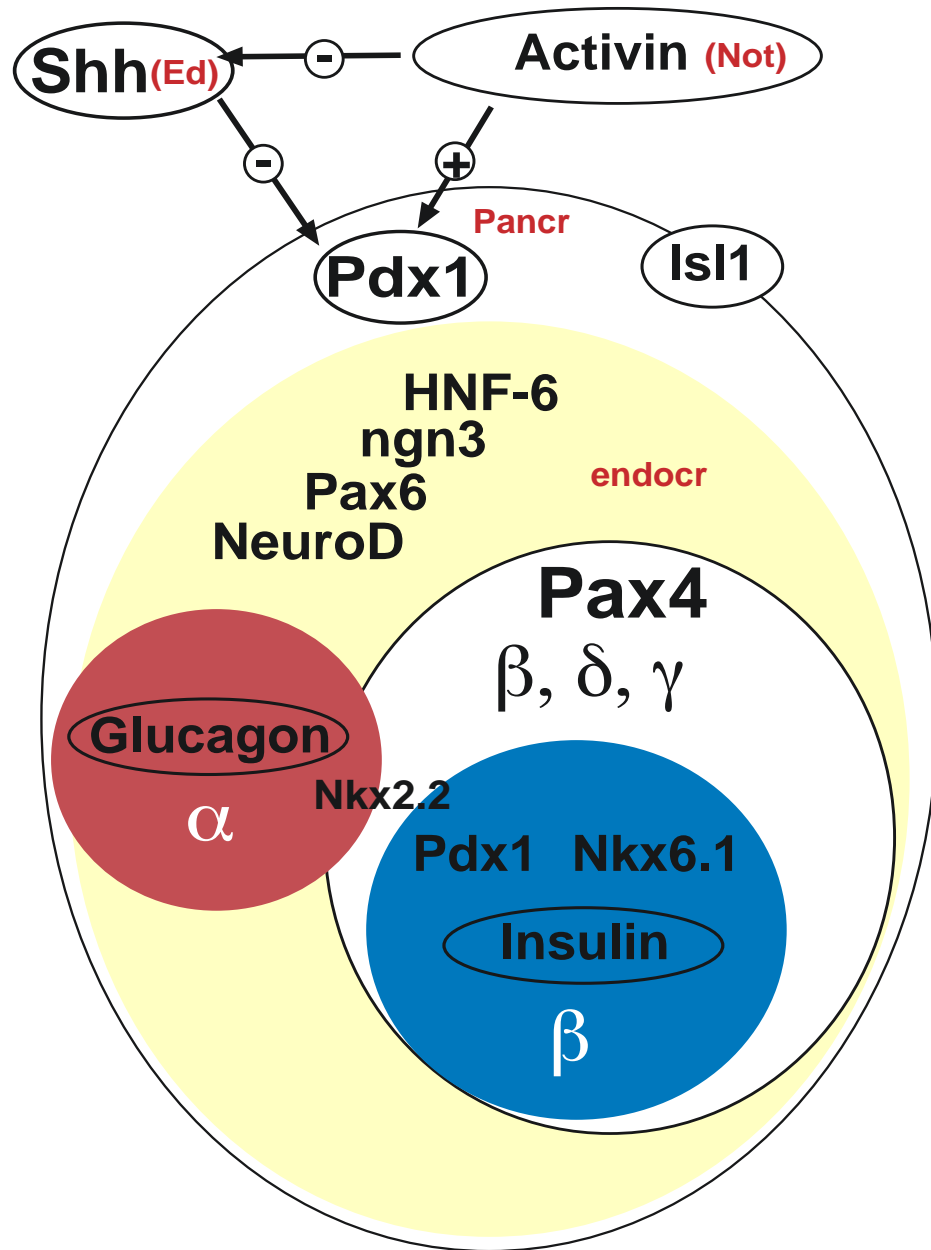


Abb. 50: Genexpression während der Pankreasentwicklung im Überblick

Nach einer von Activin vermittelten Induktion durch die Chorda dorsalis (Not) wird *Sonic hedgehog* (*Shh*) Expression im Endoderm (Ed) zurückgedrängt und ermöglicht in diesen Bereichen *Pdx1*-Expression. Aus den *Pdx1*-exprimierenden Zellen entwickelt sich die Bauchspeicheldrüse (Pancr). Auch *Isl1* spielt bei der frühen Entwicklung des dorsalen Organs eine Rolle. Für die Identität und Determinierung der endokrinen Zellen (endocr) sind die Gene *HNF-6*, *ngn3*, *Pax6* und *NeuroD* verantwortlich. Während *Pax6* die Identität der Glukagon-produzierenden α -Zellen vermittelt, ermöglicht *Pax4* einem Teil der Zellen einen davon abweichenden Entwicklungsweg - einer davon ist die Differenzierung zu Insulin-produzierenden β -Zellen. *Nkx6.1* und *Pdx1* in späteren Stadien sind innerhalb der Bauchspeicheldrüse nur in β -Zellen aktiv.

PAX4* EXPRESSION *IN-VIVO* UND *IN-VITRO

Pax4-Expression folgt einer streng regulierten Dynamik. In der frühen Pankreasentwicklung, am Tag E 9,5 der Ontogenese der Maus, beginnt auch *Pax4*-Aktivität. Diese erreicht ein Maximum zwischen E 13,5 und E 15,5. Kurz nach der Geburt ist die *Pax4*-Aktivität nicht mehr nachweisbar (Sosa-Pineda et al., 1997).

EIN GENOMISCHER BEREICH VON NUR 254 BASENPAAREN REGULIERT PAX4 IN-VIVO

In einer begrenzten Phase der Entwicklung gelingt es *Pax4*, den Aufbau der benötigten Population von β - und δ -Zellen zu vermitteln. Der spätere Erhalt der Identität dieser Zellen ist von *Pax4* unabhängig, was das Abschalten von *Pax4* bei der Geburt beweist. Noch nicht eindeutig geklärt ist in diesem Zusammenhang, ob eine Neogenese von endokrinen Pankreaszellen der Aktivität von *Pax4* bedarf. Die Rolle von *Pax4* im Zusammenhang mit Regenerationsprozessen innerhalb der Bauchspeicheldrüse ist zur Zeit ein Feld intensiver wissenschaftlicher Forschung (Krakowski et al., 2000). Man vermutet, daß die Langerhans-Inseln in der Lage sind, aus einzelnen Gang-Zellen zu regenerieren, in denen eine der embryologischen Pankreas- und β -Zell-Entwicklung zugrundeliegende Genkaskade ähnliche genetische Aktivität initiiert wird (Kritzik et al., 2000).

Die Expressionsdynamik von *Pax4* während der Pankreasentwicklung der Maus konnte bis hin zum Promotorkonstrukt 0,9 kb anhand des Reportergens *lacZ* in allen Einzelheiten nachvollzogen werden. Bei den für die kleineren Fragmenten transgenen Tieren untersuchten Entwicklungsphasen entsprach die Reportergenaktivität ebenfalls der natürlichen *Pax4*-Expression. Das bedeutet, daß vermutlich ein Bereich von lediglich 254 Basen, maximal aber von 0,9 kb, ausschlaggebende Elemente enthält, die das komplexe Ein- und Ausschalten von *Pax4* steuern.

PAX4-REPRESSION

Über den Mechanismus, der für das Abschalten von *Pax4* verantwortlich ist, ist bisher nur sehr wenig bekannt. Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten beinhalten keine Hinweise auf eine Veränderung der von den Reporterkonstrukten vermittelten Expression nach der Geburt. Die untersuchten transgenen Mauslinien mit den Deletionskonstrukten wurden allerdings nur bis zum Stadium P1 untersucht, in dem auch in der natürlichen Situation noch eine - wenn auch schwache - *Pax4*-Expression zu beobachten ist. Das endgültige Abschalten der *Pax4*-Expression ist im 7,8 kb-Konstrukt nachgewiesen worden. Dieses enthält zwei in der Literatur beschriebene Repressorelemente (Smith et al., 2000; Xu und Murphy, 2000). Eines davon liegt 4,2 kb bis 4,6 kb stromaufwärts des Transkriptionsstarts und bindet *Pax4*-Protein. Mit einem diesen Bereich beinhaltenden Reporterkonstrukt gelang eine Repression des *Pax4*-Promotors durch Überexpression von *Pax4*-Protein in einer α -Zelllinie, was auf eine in diesen Zellen ablaufenden negativen autoregulativen Mechanismus hinweist (Smith et al., 2000). Ein weiteres, nicht genauer untersuchtes Repressorelement findet sich 135 bis 420 Basen stromaufwärts des Transkriptionsstarts. Dieser Bereich vermittelt ein Herabregulieren von *Pax4*-Aktivität in β HC3-Zellen (Xu und Murphy, 2000). Diese Region enthält unter anderem den Bereich der CTC-Wiederholungen und ein TAATAAT-Motiv. Das Reporterkonstrukt 0,9 kb und die kleineren sich anschließenden Konstrukte enthalten keinen dieser beiden DNS-Bereiche.

PAX4-EXPRESSION IN-VITRO

Angesichts der *in-vivo*-Expressionsdaten des 7,8 kb Reporterkonstruktes überrascht das Ergebnis, daß bei den entsprechenden *in-vitro* Experimenten in pankreatischen Zelllinien - insbesondere bei denjenigen, für die eine *Pax4*-Expression durch Northern-Blot nachgewiesen werden konnte (β TC-1b, St.Onge, pers. Mitteilung) - eine nur unbefriedigende Aktivität -selbst des umfassenden 7,8 kb Promotorfragments- beobachtet werden konnte. Zwar läßt sich den *in-vivo* Expressionsdaten entsprechend eine Expression von *Pax4* in

einer aus einem adulten Tumor gewonnenen Zelllinie nicht unbedingt erwarten; man geht bei der Transformation von Zellen zu Tumoren jedoch allgemein davon aus, daß die Expression von mehreren Hundert Genen verändert wird (Aoyama und Klemenz, 1993).

Hinsichtlich der *Pax4*-Expression in Tumorzelllinien gelang der Nachweis, daß bei der Transformation der Gang-Zelllinie AR42J zu Insulin-produzierenden Zellen auch *Pax4* aktiviert wird. Diese Transformation der von pankreatischen Gangzellen abstammenden Linie wurde durch Behandlung der Zellen mit Activin und β -Zellulin erreicht (Zhang et al., 2001). Eine starke Überexpression von *Pax4* in dieser Zelllinie allein führte jedoch nicht zur Transformation zur Insulin-produzierenden Zelle. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß - trotz seiner induktiven Rolle während der Pankreasentwicklung - *Pax4* in Tumorzelllinien auch zu denjenigen Genen gehören kann, die lediglich infolge einer Reihe von genetischen Umstrukturierungen der transformierten Zelle in ihrer Expression verändert werden. Die Mechanismen dieser Aktivierung sind im Einzelnen unbekannt. Ein in manchen Fällen von der natürlichen genetischen Regulation von *Pax4* deutlich abweichender Mechanismus ist demnach als Ursache für die Aktivität des Gens in einigen Tumorzelllinien denkbar.

KOMPLEXE BIOCHEMISCHE VORGÄNGE STEuern PAX4-EXPRESSION

Der in Cos-Zellen fehlgeschlagene Nachweis einer direkten Aktivierung von *Pax4* durch *Pdx1*, *NeuroD* und *Isl1* ist auf die mangelnde Komplexität des methodischen Ansatzes zurückzuführen. Bereits die geringe Größe des funktionellen *Pax4*-Promotors mit nur 254 Basen läßt vermuten, daß weniger die Einwirkung vieler verschiedener Einzelfaktoren auf unterschiedliche Promotorelemente (wie z.B. beim 2,5 kb großen *even-skipped*-Promotor in *Drosophila*; Stanojevic et al., 1991), als vielmehr die wechselnde Zusammensetzung von umfangreichen Proteinkomplexen und deren durch die Bindung an wenige genomische Sequenzen vermittelte Einwirkung auf die Polymeraseaktivität für die Kontrolle von *Pax4*-Transkription verantwortlich ist. Für den an das E1-Element des Insulinpromotors bindenden Proteinkomplex

zum Beispiel konnte tatsächlich gezeigt werden, daß dieser aus einer Reihe verschiedener Proteinen besteht, wobei einige davon ubiquitär exprimiert sind und andere, in ihrer Expression auf β -Zellen beschränkte Faktoren, die spezifische Aktivierung durch den Proteinkomplex in dieser Zellpopulation vermitteln (Robinson et al., 1994). *NeuroD* ist ein an der Zusammensetzung des an das E1-Element im Insulinpromotor bindenden Proteinkomplexes beteiligtes Gen (Sharma et al., 1997). Auch für das E1-Element des *Pax4*-Promotors gelang der Nachweis, daß *NeuroD* an das E1-Element bindet (Smith et al., 2000).

Für *Pdx1* konnte ebenfalls eine Bindung an den *Pax4*-Promotor nachgewiesen werden (Smith et al., 2000). Und auch für *Pdx1* stellte sich heraus, daß es ein Komplex mehrerer Faktoren ist, der eine verstärkend auf Transkription wirkende Bindung an spezifische DNS-Sequenzen vermittelt (Liu et al., 2001)

Da aber in einer nicht-pankreatischen Zelllinie -wie der Cos-Zelllinie- die zur Erkennung von β -Zell-spezifischen Promotorelementen notwendigen Kofaktoren fehlen, ist die Einflußnahme jeweils nur eines einzigen Faktors auf die vom Promotor vermittelte Aktivität des Reportergens unwahrscheinlich.

PAX4 BESITZT KEINEN KLASSISCHEN MINIMALPROMOTOR

Die Untersuchungen zur Ermittlung des Transkriptionsstarts von *Pax4* deuten darauf hin, daß die Initiation der *Pax4*-Transkription ohne die aus anderen Promotoren bekannten Motive wie TATA- oder Sp1-box und ohne bereits bekannte Initiatorelemente (Smale, 2001; Kollmar und Farnham, 1993; O'Shea-Greenfield und Smale, 1992; Kadonaga et al., 1988) auskommt. Durch Analyse der genomischen Sequenzen und durch Vergleich mit den ermittelten cDNS-Sequenzen konnte der Transkriptionsstart in einen Bereich kartiert werden, der weder TATA-, noch Sp1- oder Initiatorsequenzen aufweist.

Darüber hinaus wird durch den Promotor eine von dem natürlichen Transkriptionsstart abweichende Initiation der Transkription ermöglicht, ohne daß dazu ein im Reporter-gen vorhandener Minimalpromotor genutzt wird. Das eingesetzte *lacZ*-Gen besitzt keine Motive zur Initiation der Transkription. Die vom 5,3 kb Promotorkonstrukt vermittelte Expression, die dem *Pax4*-Expressionsmuster entspricht, obwohl dem Konstrukt der Bereich des natürlichen Transkriptionsstarts fehlt, beweist die Nutzung eines von der natürlichen Initiation abweichenden Ansatzes der Polymeraseaktivität. Die zunächst naheliegende Vermutung, daß dies der Hinweis auf ein weiteres, kleines Exon stromaufwärts des vermuteten Transkriptionsstarts sein könnte, konnte nicht bestätigt werden. Der Versuch, mit Hilfe entsprechender Primer den aufgrund seiner DNS-Motive in Frage kommenden Bereich als Minimalpromotor durch PCR nachzuweisen, schlug fehl. Es handelte sich dabei um einen genomischen DNS-Bereich, der neben einer TATA-box zusätzlich ein ebenfalls häufig in Promotoren vorhandenes Sp1-Motiv aufweist und demnach die am stärksten Transkription initiiierende Kombination von DNS-Motiven darstellt, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft des *Pax4*-Gens befindet. Trotz dieser Motive handelt es sich hierbei jedoch nicht um den Minimalpromotor von *Pax4*, sondern um ausschlaggebende, die spezifische pankreatische Expression von *Pax4* vermittelnde DNS-Bereiche, wie die sich anschließenden Deletionsanalysen zeigten. Der funktionelle, 254 Basen umfassende *Pax4*-Promotor weist neben den von *Pdx1* und *NeuroD* erkannten Sequenzen keine weiteren häufig in der Nähe des Transkriptionsstarts auffindbaren Sequenzmotive auf. Daher ist davon auszugehen, daß die verwendeten Konstrukte einen vermutlich zufälligen ektopischen Transkriptionsstart innerhalb des Konstruktes vermitteln.

Durch Primer-Extension-Versuche, gelang einer anderen Arbeitsgruppe die Kartierung des Transkriptionsstarts in die Nähe des Bereichs, der sich bereits aus der Sequenzanalyse ergeben hatte (Xu und Murphy, 2000). Auch diese Ergebnisse unterstützen also die Annahme, daß der ermittelte Transkriptionsstart tatsächlich dem natürlichen Transkriptionsstart entspricht, auch wenn hier kaum Elemente eines klassischen Minimalpromotors vorhanden sind.

PDX1* IST DER HAUPTAKTIVATOR VON *PAX4

Mit einer durch Activin vermittelten Induktion der Chorda dorsalis wird die Entwicklung der Bauchspeicheldrüse initiiert (Hebrok et al., 2000). Expression von *Sonic hedgehog* wird dabei zurückgedrängt und dadurch *Pdx1*-Aktivität in einem definierten Bereich des Duodenums ermöglicht, aus dem sich später die Bauchspeicheldrüse entwickelt. *Pdx1* ist somit der erste bekannte Transkriptionsfaktor während der Mausentwicklung, der den Bereich markiert, aus dem sich das Organ bilden wird. Das Ausschalten der Aktivität des *Homöo-Box*-Gens *Pdx1* hat eine frühe Blockade der Entwicklung des Pankreas zur Folge. Diese Beobachtung läßt vermuten, daß *Pdx1* für die Aktivierung aller wichtigen frühen Regulatorgene während der Organogenese der Bauchspeicheldrüse verantwortlich ist. Bezüglich *Pax4* konnte durch die hier präsentierten Ergebnisse diese Hypothese bekräftigt werden. Nach entfernen des vom *Pdx1*-Protein erkannten Sequenzmotivs (Smith et al., 2000), bleibt eine frühe Aktivierung des Reportergens in der Bauchspeicheldrüse aus. In späteren Stadien ab Tag E 12,5 der Embryonalentwicklung kann jedoch trotz fehlenden *Pdx1*-Bindemotivs Reporterogenaktivität beobachtet werden und diese verhält sich daraufhin der natürlichen *Pax4*-Expression entsprechend. *Pdx1* ist demnach auf direktem Wege für die frühe Aktivierung von *Pax4* verantwortlich. In späteren Stadien kann allerdings - offensichtlich durch Einwirken anderer Faktoren - auch in den für das entsprechende Deletionskonstrukt transgenen Tieren Reportergen-Expression einsetzen. Dabei ist durchaus denkbar, daß es sich hierbei ebenfalls um eine von *Pdx1* eingeleitete, allerdings von anderen Transkriptionsfaktoren vermittelte Aktivierung handelt.

Bezüglich der Interaktion zwischen *Pdx1* und *Pax4* ist weiterhin von Bedeutung, daß nach einer frühen Expression von *Pdx1* in Pankreas-Vorläuferzellen die Aktivität des Gens auf endokrine β -Zellen beschränkt wird und hier eine Rolle bei der Regulation des Insulins übernimmt (Macfarlane et al., 2000). Von einem ubiquitären Aktivator wird *Pdx1* im Laufe der

Mausentwicklung auf diese Weise zu einem spezifischen Regulator eines speziellen Hormons in einer definierten Zellpopulation. Jüngste Ergebnisse deuten weiterhin darauf hin, daß *Pdx1* an dem Erhalt der Zellidentität von β -Zellen beteiligt ist und α -Zell-typische Genexpression unterdrückt (Ahlgren et al., 1998); es aktiviert *Nkx6.1*-Expression und unterdrückt die Synthese von Glukagon (Wang et al., 2001). Dabei ist es denkbar, daß wiederum *Pax4* selbst, das ursprünglich von *Pdx1* eingeschaltet worden ist, zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung in den gereiften β -Zellen an einer Stabilisierung der *Pdx1*-Expression teilnimmt. Eine sich in der Promotorsequenz von *Pdx1* befindende potentielle *Pax4*-Bindestelle läßt einen derartigen Mechanismus zumindest vermuten und die Unfähigkeit von *Pdx1* in späten Entwicklungsstadien *Pax4* zu aktivieren (Wang et al., 2001), verhindert eine Rückkopplung.

Darüber hinaus gehört *Pdx1* neben *Nkx6.1* zu den wenigen bisher bekannten Transkriptionsfaktoren, die in reifen Bauchspeicheldrüsen spezifisch in β -Zellen exprimiert werden. Für *Nkx6.1* findet sich innerhalb des von *Pdx1* erkannten A2-Elements eine dem *Nkx6.1*-Bindemotiv ähnliche, jedoch keine perfekt übereinstimmende potentielle Bindesequenz (Mirmira et al., 2000). Somit könnten *Nkx6.1* und *Pdx1* Faktoren sein, die innerhalb des im Rahmen dieser Arbeit isolierten *Pax4*-Promotors eine direkte Funktion beim Herabregulieren der *Pax4*-Aktivität in der adulten Maus übernehmen. In den bisher analysierten Entwicklungsstadien der transgenen Mäuse für das Konstrukt cb 13, die Hinweise auf einen solchen Mechanismus geben könnten, ergab sich nach deren Geburt jedoch keine deutliche Veränderung der Reporterogenaktivität nach Entfernen des *Pdx1*-Bindemotivs. Ein erster Versuch, die Expression von *Pax4* durch Einwirkung von *Nkx6.1* zu beeinflussen, schlug zwar fehl (Jorgensen et al., 1999), die Analyse wurde jedoch in einer von α -Zellen abstammenden Tumorzelllinie durchgeführt. Neben der Nutzung der beschriebenen Repressorelemente (Smith et al., 2000; Xu und Murphy, 2000) ist bezüglich des Abschaltens von *Pax4* bei der Geburt also ein weiterer, die Zusammensetzung des an die im 254 Basenpaar-Promotor enthaltenen Motive bindenden Proteinkomplexes betreffender Mechanismus denkbar.

DAS E1-ELEMENT

Im *ngn3*-Knockout bilden sich keine endokrinen Zellen in der Bauchspeicheldrüse aus (Gradwohl et al., 2000). Durch Inaktivierung des *NeuroD*-Gens ist die Population aller endokriner Zelltypen reduziert (Naya et al., 1997). Beide Proteine nehmen Einfluß auf die Regulation des E1-Elements (Smith et al., 2000). In den in dieser Studie durchgeführten Experimenten zeigte sich nach Entfernen des E1-Elements aus dem *Pax4*-Promotor keine oder eine nur schwache Expression des Reportergens. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß das E1-Element eine Entscheidende Rolle für die Vermittlung von *Pax4*-Expression spielt und lassen vermuten, daß *NeuroD* und *ngn3* die Expression von *Pax4* über das E1-Element direkt beeinflussen.

Das E1-Element ist ein Motiv, das mehrfach im Zusammenhang mit β -Zell spezifischer bzw. auf die endokrine Bauchspeicheldrüse eingegrenzter Expression auftaucht. Ursprünglich wurde es im Insulinpromotor entdeckt (Whelan et al., 1989). Neben der hier dargelegten Rolle im *Pax4*-Promotor spielt es auch eine Rolle bei der Regulation von *NeuroD* durch *ngn3* (Huang et al., 2000). Biochemische Analysen des an das E1-Element des Insulinpromotors bindenden Proteinkomplexes deckten eine Reihe von Faktoren auf, die in der Lage sind, durch Anlagerung an E1 die Expressionsrate des jeweiligen Gens zu beeinflussen. Dabei handelt es sich um die offenbar gegenseitig redundanten E2A- und HEB- kodierte Proteine, die ubiquitär exprimiert sind (Sharma et al., 1997) und um das an *NeuroD* bindende und auf von bHLH-Faktoren vermittelte Aktivierung stimulierend wirkende Protein p300 (Qiu et al., 1998). In Abhängigkeit von der Zusammensetzung des an E1 bindenden Proteinkomplexes wird demnach eine starke oder schwache Aktivierung der Transkription des nachgeschalteten Gens vermittelt. *Ngn3*-Genprodukt und p300 wirken dabei offenbar als positiv auf Transkription einwirkende Faktoren. Über das E1-Element ist somit eine von den daran bindenden Faktoren abhängige Möglichkeit der präzisen Regulation von *Pax4* denkbar.

WEITERE REGULATIONSMÖGLICHKEITEN VON *PAX4*

Während die Entfernung von E1- und A2- Motiv aus dem *Pax4*-Promotor deutliche Effekte bezüglich der Reporter-genaktivität hervorrief und sich deshalb eine wichtige Rolle beider Elemente für die Regulation des Gens ergeben, führte die Deletion weiterer Sequenzen, die identisch zu Motiven aus dem Insulinpromotor sind (in den Konstrukten cb 17 und cb 18), zu keinem erkennbaren Ergebnis. Diese Motive spielen bei der Regulation von *Pax4* demnach keine oder eine nur untergeordnete Rolle. Bisher konnte für diese deletierten Sequenzmotive allerdings auch noch kein daran bindendes Protein beschrieben werden.

Trotzdem müssen neben den in dieser Arbeit ermittelten auf *Pax4*-Expression einwirkenden Regulationsmechanismen offensichtlich noch weitere Einflußmöglichkeiten von anderen Transkriptionsfaktoren existieren. Diese nehmen offenbar über im isolierten *Pax4*-Promotor vorhandene cis-regulatorische Elemente Einfluß auf *Pax4*-Aktivität. Einen deutlichen Hinweis darauf gibt die Reporter-genexpression in einer der transgenen Mauslinien, denen sowohl A2- als auch E1-Element fehlen, sowie die verspätet einsetzende Expression ohne A2-Element. Es müssen also ein oder mehrere weitere, *Pax4*-Expression aktivierende Mechanismen existieren, die in der Lage sind, eventuell durch Begünstigung von dem im Genom verankerten Reporterkonstrukt benachbarten Enhancern, Reporter-genexpression in der Bauchspeicheldrüse einzuschalten. Faktoren wie *HNF-6*, *HNF3 β* oder auch *Isl1* sind Transkriptionsfaktoren, die aufgrund ihrer Expression und Funktion neben *Pdx1*, *ngn3* und *NeuroD* für eine Einflußnahme auf *Pax4*-Expression in Frage kämen. Das Ineinandergreifen mehrerer Regulationsmechanismen hat für die Entwicklung der Bauchspeicheldrüse offenbar eine besondere Bedeutung, da es sich um einen sehr dynamischen und transparenten Vorgang handelt. Das zeigt zum Beispiel die Tatsache, daß in der frühen Entwicklungsphase

Vorläuferzellen vorhanden sind, die sowohl Insulin, als auch Glukagon exprimieren (Upchurch et al., 1994). Erst später in der Entwicklung folgt eine eindeutige Trennung beider Zelllinien. Ein anderer Hinweis auf mehrere miteinander verbundene Regulationsstränge zeigt auch die Tatsache, daß im Knockout des am Beginn der endokrinen Pankreasentwicklung stehenden Faktors *HNF-6* mit einiger Zeitverzögerung die Ausbildung von Langerhans-Inseln zu beobachten ist, die allerdings in ihrer Funktion für das Überleben der Tiere nicht ausreichen (Jacquemin et al., 2000).

GENETISCHE INTERAKTIONEN WÄHREND DER PANKREASENTWICKLUNG

Basierend auf den in dieser Studie gewonnenen Erkenntnissen und unter Einbeziehung bereits publizierter Daten über die bisher bekannten an der Pankreasentwicklung beteiligten Gene kann eine vorläufige Zusammenfassung der im Laufe der Organogenese der Bauchspeicheldrüse ablaufenden genetischen Interaktionen vorgenommen werden. Diese soll im Folgenden als Grundlage für eine Diskussion des der Pankreasentwicklung zugrundeliegenden Zellstammbaums und darauf basierenden Therapieansätzen für Diabetes dienen.

PDX1

Die bezüglich *Pdx1* in der Entwicklung der Bauchspeicheldrüse nachgewiesenen genetischen Wechselwirkungen sind in Abb. 51 zusammengefaßt.

Pdx1 ist der erste Transkriptionsfaktor, der das entstehende Organ markiert. Deshalb ist zu vermuten, daß *Pdx1* nach seiner Induktion in der frühen Entwicklung die meisten, wenn nicht alle für die Entwicklung der

Bauchspeicheldrüse entscheidenden Gene im Endoderm direkt oder indirekt aktiviert. Später reduziert sich die Expressionsdomäne des Gens auf endokrine β -Zellen, wo *Pdx1* offenbar an der Regulation von Insulin und dem Erhalt der β -Zell-Identität beteiligt ist (s.o.). Für *Pdx1* konnte zum aktuellen Zeitpunkt unter anderem eine Interaktion mit folgenden Promotoren bereits nachgewiesen werden: *Pax4* (Smith et al., 2000), *Nkx6.1* (Watada et al., 2000), Insulin (Glick et al., 2000) und Somatostatin (Andersen et al., 1999). In β -Zellen wird *Pdx1* von *HNF3 β* aktiviert (Wu et al., 1997) und vermutlich von *Pax4* reguliert (siehe Diskussion unter "*Pdx1* ist der Hauptaktivator von *Pax4*").

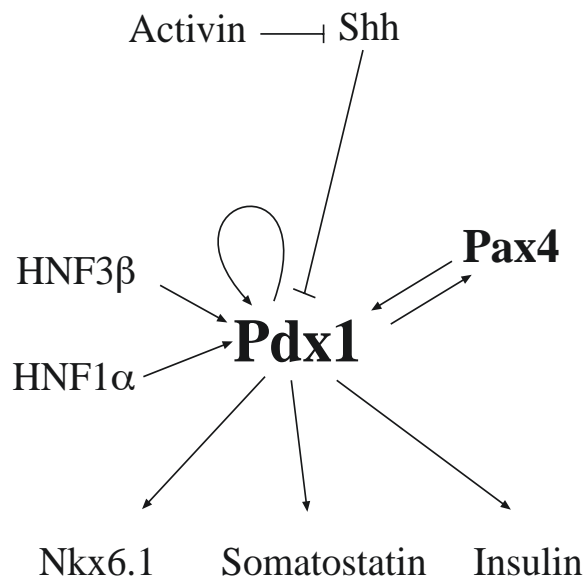


Abb. 51: Regulation hinsichtlich des *Pdx1*-Gens

In frühen Entwicklungsstadien reguliert *Pdx1* *Pax4*, später ist auch eine Aktivierung von *Pdx1* durch *Pax4* denkbar. Ein positiver Einfluß von *HNF3 β* auf *Pdx1* in β -Zellen und dessen Bindung an den *Pdx1*-Promotor sowie Bindung von *HNF1 α* wurde bereits direkt nachgewiesen (Gerrish et al., 2001). Die frühe Aktivierung von *Pdx1* erfolgt durch die von *Activin* vermittelte Induktion durch die Chorda dorsalis, wobei *Shh*-Expression zurückgedrängt und damit *Pdx1*-Aktivität ermöglicht wird. *Pdx1* selbst aktiviert *Nkx6.1*, Somatostatin, Insulin und andere β -Zell-Faktoren.

NGN3

Ngn3-Expression gilt als Kennzeichen für endokrine Vorläuferzellen (Jensen et al., 2000). Die bisher bekannten genetischen Wechselwirkungen bezüglich *ngn3* sind in Abb. 52 dargestellt.

HNF-6 und *ngn3* sind für die Ausbildung aller endokrinen Zellen verantwortlich. Dabei wird *ngn3* von *HNF-6* direkt reguliert (Naya et al., 1997; Jacquemin et al., 2000). Weitere *ngn3*-Expression beeinflussende Faktoren sind *HNF-1*, *HNF-3* und das *Notch*-kontrollierte *Hes1* (Lee et al., 2001). Für *Hes1* konnte bei Bindung an den *ngn3*-Promotor eine Blockade der Expression nachgewiesen werden. Diese Beobachtung stützt die in jüngerer Vergangenheit diskutierte Möglichkeit, daß laterale Inhibition über *Notch-Delta* auch bei der Determinierung von pankreatischen Zellschicksalen eine Rolle spielt (Apelqvist et al., 1999; Jensen et al., 2000). *Ngn3* kontrolliert den ebenfalls für die Genese aller endokrinen Zellen wichtigen Faktor *neuroD*. *NeuroD* und *ngn3* sind in der Lage, *Pax4*-Expression über das E1-Element zu beeinflussen (Smith et al., 2000).

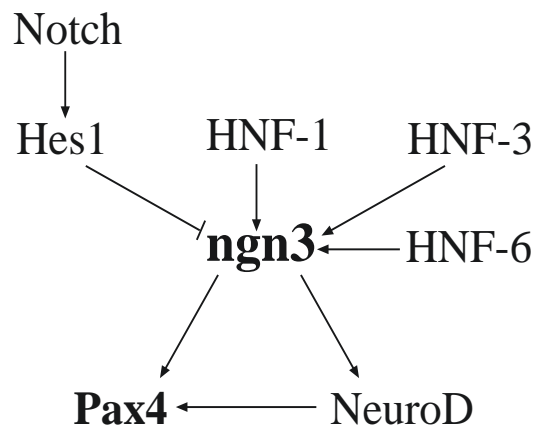


Abb. 52: Regulation hinsichtlich des *ngn3*-Gens

Der am Beginn der Entwicklung aller endokrinen Zellen stehende Faktor *ngn3* wird durch verschiedene *HNFs* und *Hes1* reguliert. Über *Hes1* besteht die Verbindung zum *Notch*-Gen, was vermuten läßt, daß laterale Inhibition an der Determinierung endokriner Zellen beteiligt ist.

PAX4

Bezüglich der Regulation von *Pax4* sind neben der dieser Arbeit zugrundeliegenden Veröffentlichung (Brink et al., 2001) zwei weitere wissenschaftliche Abhandlungen erschienen (Smith et al., 2000; Xu und Murphy, 2000). Die Ergebnisse dieser Publikationen sind in Abb. 53 zusammengefaßt.

Als mögliche Regulatoren für *Pax4* werden die Gene *Pdx1*, *ngn3* und *NeuroD* diskutiert sowie darüber hinaus *HNF3β*, *Nkx2*-Gene und außerdem eine Autoregulation durch *Pax4* selbst. Für Activin konnte *in-vitro* eine aktivierende Wirkung auf *Pax4*-Expression nachgewiesen werden (Ueda et al., 2000). Sequenzmotive lassen darüber hinaus eine mögliche Rolle von *Nkx6.1* bezüglich der Regulation von *Pax4* vermuten (s.o.). Für *Nkx6.1* konnte eine Regulation durch *Pdx1* und *Nkx2.2* nachgewiesen werden (Watada et al., 2000). Als mögliche Ziele von *Pax4* sind bisher Insulin, Amylin-Peptid und aufgrund der Promotorsequenz *Pdx1* (s.o.) bekannt (Campbell et al., 1999).

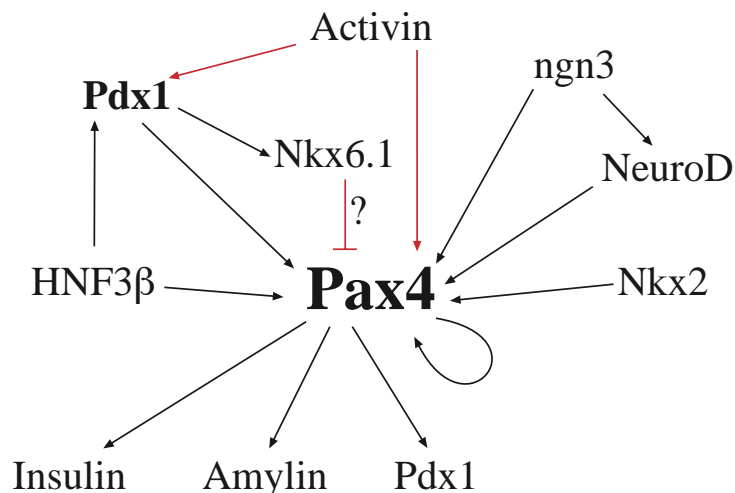


Abb. 53: Regulationen hinsichtlich *Pax4*

Die roten Pfeile stehen für Effekte, für die es noch keine Hinweise auf Direkte Interaktionen gibt. Die Hypothese der Einflußnahme von *Nkx6.1* auf *Pax4* beruht lediglich auf einer Ähnlichkeit zwischen A2-Element und den von *Nkx6.1* erkannten Sequenzen.

DER ENDOKRINE ZELLSTAMMBAUM

Von besonderer Bedeutung im Hinblick auf mögliche zukünftige Therapieansätze zur Heilung von Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse sind Erkenntnisse über den Zellstammbaum, der der pankreatischen Organogenese zugrunde liegt. Sollte es eines Tages möglich sein, diesen Zellstammbaum *in-vitro* oder im Patienten selbst durch Gentherapie nachzuvollziehen, so eröffnete sich dadurch die Möglichkeit einer wirksamen Behandlungsmöglichkeit von Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse durch kontrollierte Formen der Zellerneuerung. Die zuvor dargelegten Schlußfolgerungen aus den Erkenntnissen über genetische Regulationen während der Pankreasentwicklung bilden die Grundlage der aktuellen Theorien über die Abstammung und den Werdegang der einzelnen Zellgruppen des ausgereiften Organs (Abb. 54).

Allgemein akzeptiert ist mittlerweile, daß endodermale, *Pdx1*-exprimierende Zellen die Vorläufer für alle pankreatischen Zellen darstellen. Bezüglich endokriner α - und β - Zellen konnte gezeigt werden, daß beide Zellpopulationen in einem Vorläuferstadium *Pdx1* exprimieren (Herrera, 2000). Allerdings stellte sich heraus, daß die Insulin- und Glukagon-exprimierenden Zellen der adulten Bauchspeicheldrüse nicht von einem zu einem früheren Zeitpunkt beide Hormone exprimierenden Vorläufer abstammen, wie es aufgrund der Entdeckung von Insulin und Glukagon koexprimierenden Zellen in der frühen Pankreasentwicklung ursprünglich vermutet worden war (Teitelmann et al., 1993). Stattdessen konnte gezeigt werden, daß alle endokrinen Zelltypen der adulten Bauchspeicheldrüse außer die α -Zellen, also die β -, δ -, und PP-Zellen, während früher Entwicklungsstadien pankreatisches Polypeptid exprimieren (Herrera et al., 1994). Es ist demzufolge anzunehmen, daß die adulten α - und β -Zellen nicht von einem Insulin und Glukagon exprimierenden, sondern von einem Pankreatisches Polypeptid produzierenden - und dieses unter Umständen also parallel zu Glukagon oder Insulin koexprimierenden -

Vorläufer abstammen. Dieses ist insofern erstaunlich, als die PP-Zellen als späteste endokrine Zellpopulation im Stadium E 17,5 parallel zur Langerhans-Insel-Formation ausdifferenzieren.

Mit der Entdeckung der Rolle von *ngn3* für die Pankreasentwicklung tauchte ein Faktor auf, der möglicherweise einen frühen Marker für die Population endokriner Vorläuferzellen darstellt (Gradwohl et al., 2000). In einer Studie über die Genexpression in Pankreas-Vorläuferzellen konnte dieser Verdacht erhärtet werden (Jensen et al., 2000). Es zeigte sich, daß ein Teil der frühen *Pdx1*-exprimierenden Pankreas-Vorläuferzellen *ngn3* koexprimiert.

Die nächste Station auf dem Weg zur Differenzierung der einzelnen endokrinen Zelltypen stellt daraufhin die Entscheidung bezüglich der *Pax4*-Expression dar. Es ist anzunehmen, daß *Pax4* nicht nur für die Differenzierung von β - und δ -Zellen verantwortlich ist (Sosa-Pineda et al., 1997), sondern auch für die PP-Zellen. Das unterstreicht das Ergebnis bezüglich PP-Expression in β -, δ - und PP-Zellen (Herrera et al., 1994). Ohne *Pax4*-Expression reduziert sich die Zelldiversität der Langerhans-Inseln auf α -Zellen. In *Pax6*-exprimierenden Zellen konnte gezeigt werden, daß diese während der Koexpression mit *ngn3* proliferieren, wohingegen bei einer sich mit dieser Population nicht überschneidenden Gruppe von *Pax6*-positiven und gleichzeitig *neuroD* exprimierenden Zellen ein Arrest des Zellzyklus eingetreten ist (Jensen et al., 2000). Einhergehend mit der bereits dargelegten Vermutung, daß *Pax4* für die Aufrechterhaltung eines undifferenzierten Status von endokrinen Zellen verantwortlich ist, der diesen ermöglicht, einen nicht der Differenzierung zu α -Zellen folgenden Weg zu beschreiten, kann man also darüber spekulieren, ob Zellen, die *ngn3*, *Pax6* und *Pax4* - aber nicht *neuroD* - exprimieren, die gemeinsame Vorläuferpopulation der β -, δ - und PP-Zellen bilden. Da *NeuroD* für die Entwicklung aller endokriner Zellen eine Rolle spielt (Naya et al., 1997), ist ein während der Entwicklung der endokrinen Zellen ablaufender Mechanismus denkbar, bei dem die Differenzierung der einzelnen Zelltypen von dem Zeitpunkt abhängig ist, in dem *NeuroD* die Zelle im Zellzyklus arretiert.

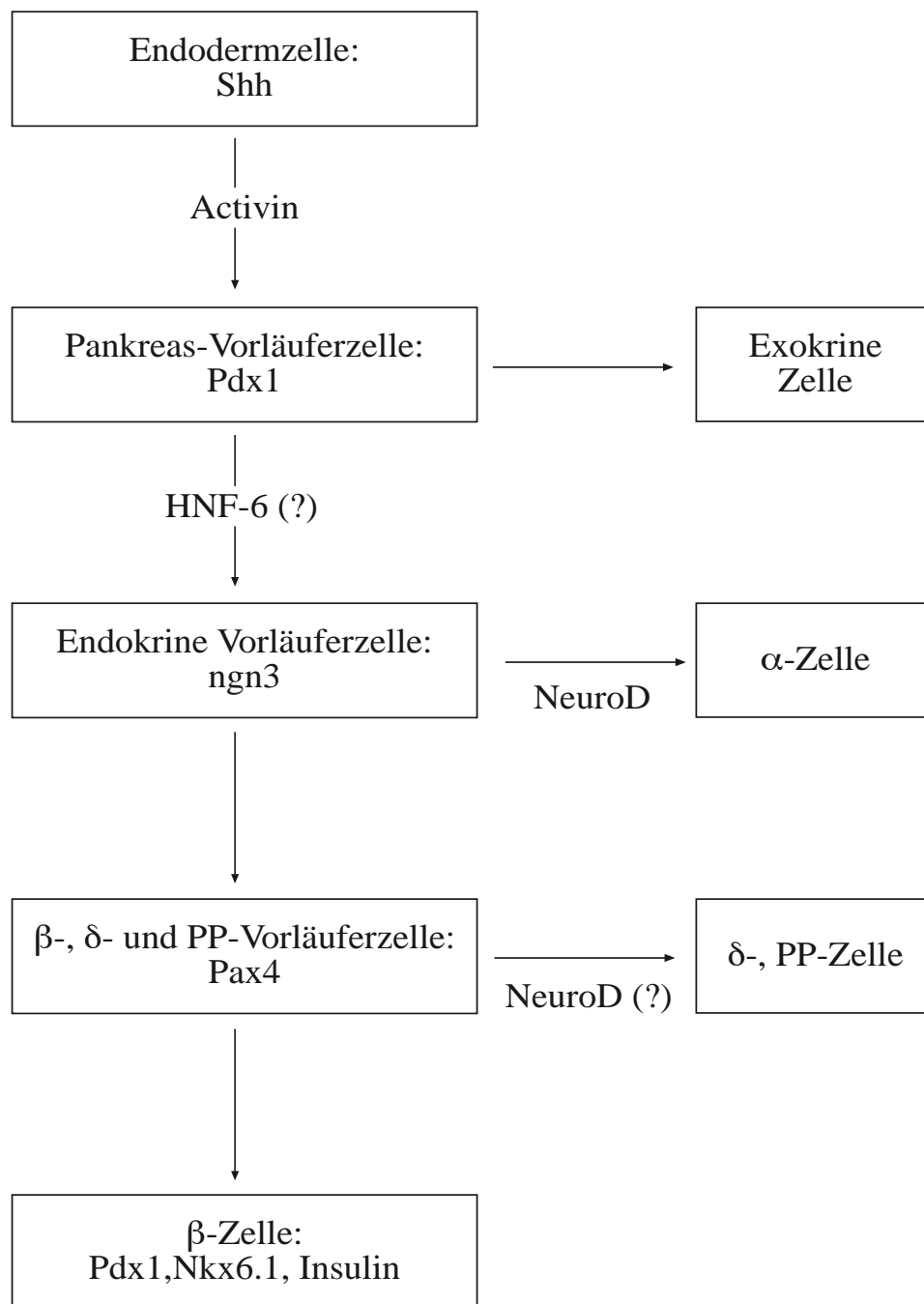


Abb. 54: Zellstammbaum der endokrinen Zell-Entwicklung

Die Abbildung stellt das in diesem Kapitel diskutierte Modell der endokrinen Pankreasentwicklung anhand der bisher gewonnenen Daten zusammen. Die Kästen repräsentieren definierte Zellpopulationen. Darin ist die entsprechende Zellgruppe und die sie markierende Genexpression benannt. An den Pfeilen stehen die Faktoren, die die entsprechende Transformation bewirken. Fragezeichen markieren dabei die Interaktionen, für die es noch keinen konkreten wissenschaftlichen Hinweis gibt.

Somit würde eine sich teilende endokrine Pankreaszelle im Laufe der Entwicklung ein festgelegtes genetisches Programm nach einem vorgegebenen Zeitplan durchlaufen, und die Aufgabe von *NeuroD* - eventuell im Wechselspiel mit *Pax6* - bestünde darin, eine Subpopulation dieser Zellen durch Anhalten des Zellzyklus in Richtung ihrer Differenzierung zu lenken. Der Zelltyp, den eine solche Zelle nach Anschalten von *NeuroD* schließlich ausbildet, hingemzufolge von dem genetischen status quo ab, in dem sich die Zelle zum Zeitpunkt der *NeuroD*-Initiation befindet.

Die Beobachtung (Teitelmann et al., 1993), daß α -Zellen als erstes in der Bauchspeicheldrüse auftauchen (E 9,5), dicht gefolgt von β -Zellen und später dann von δ -Zellen (E 14,5) und PP-Zellen (E 17,5), unterstützt die Annahme eines derartigen Mechanismus. Darüber hinaus könnte der in anderem Zusammenhang beschriebene negative Einfluß von *NeuroD* auf *Pax6*-Expression (Hirsch und Harris, 1997) auch in der Bauchspeicheldrüse zum dargelegten Regulationsmechanismen beitragen.

AUSBLICK: THERAPIEMÖGLICHKEITEN

Die Möglichkeit der Verwendung menschlicher (embryonaler) Stammzellen für Forschung und Therapie ist zur Zeit ein Feld intensiver Diskussionen. Die mögliche Therapie von Diabetes und anderer auf Fehlfunktionen der Bauchspeicheldrüse beruhender Krankheiten unter Ausnutzung des hier dargelegten Wissens stellt hinsichtlich der Abwägung von Vor- und Nachteilen der Stammzell-Technologie ein Beispiel dafür dar, wie sich eine medizinische Nutzung von (embryonalen) Stammzellen darstellen könnte.

Bezüglich der Therapie von Diabetes, die hier wegen des Bezugs zum *Pax4*-Gen als Beispiel dienen soll, sind in diesem Zusammenhang zwei Ansätze denkbar. Eine erste Möglichkeit bietet die Gentherapie. Sollte es eines Tages

möglich sein, zum Beispiel mit Hilfe von Viren, gezielt Zellen in der Bauchspeicheldrüse genetisch umzuprogrammieren und diese in einen Differenzierungsstatus zu versetzen, von dem aus sie als Stammzelle für die Ausbildung neuer Langerhans-Zellen dienen können, so würde nach der Gabe der dazu notwendigen Faktoren bzw. deren kodierender Sequenzen ein Regenerationsprozeß direkt im Patienten in Gang gesetzt werden, durch den er selbst in der Lage ist, seine eigenen Insulin-produzierenden β -Zellen zu generieren. Nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft besitzen Faktoren wie *Pax4*, *ngn3* oder auch *Pdx1* - einzeln oder in Kombination und parallel zu einem Herabregulieren von *NeuroD* - das Potential, Zellen in eine entsprechende Richtung umzuprogrammieren. Entsprechend dem vorgeschlagenen Modell müßte dabei ein besonderes Augenmerk auf die Regulation von *NeuroD* gelegt werden.

Die Gentherapie steckt jedoch hinsichtlich einer zuverlässigen therapeutischen Anwendung noch in den Kinderschuhen (Übersichtsartikel: Anderson, 1998).

Die zweite Möglichkeit stellt die Zelltherapie dar. Es wurden bereits erfolgreiche Versuche unternommen, Diabetes-Patienten durch die Gabe Insulin-Produzierender β -Zellen zu behandeln. Größtes Problem ist dabei die Beschaffung einer ausreichenden Menge von transplantierbaren β -Zellen. Wenn die beschriebene Beeinflussung der Differenzierung von Zellen durch geeignete Faktoren wie *Pax4* bei entsprechenden Stammzellen gelingt, so könnten auf diesem Wege ausreichende Mengen des zu transplantierenden Materials hergestellt werden (Jüngster Übersichtsartikel: Demeterco und Levine, 2001). Hier könnte beispielsweise der Einsatz embryonaler Stammzellen den Schlüssel zu einer solchen medizinischen Anwendung darstellen.

Es ist davon auszugehen, daß den *Pax4*-regulierenden Faktoren und *Pax4* selbst bezüglich derartiger Therapieansätze zur Behandlung von Diabetes eine entscheidende Rolle zufallen wird.

IV. MATERIAL UND METHODEN

*"**T**UE ERST DAS NOTWENDIGE, DANN DAS
MÖGLICHE, UND PLÖTZLICH SCHAFFST DU DAS
UNMÖGLICHE."*

FRANZ VON ASSISI (1182 - 1226)

IV.1. ORGANISMEN

IV.1.1 MAUSSTÄMME

NMRI-(Weibchen) und FVB-Mäuse stammen von der Versuchstierzucht Harlan- Winkelmann GmbH, Borcheln. Zur Erzeugung von Embryonen erfolgte Verpaarung ü.N. Der Tag des Vaginalpfropfes zählte als Tag 0,5 post coitum der Embryonalentwicklung (E0,5).

IV.1.2 BAKTERIEN

Transformationen zur Amplifikation von DNS-Konstrukten wurden mit dem E. coli-Stamm DH5 α (Hanahan, 1985) durchgeführt.

IV.2 MATERIALIEN

IV.2.1 ZELLINIEN

Es wurden folgende Zelllinien mit freundlicher Genehmigung von Dr. Gerhard Christofori, Wien, benutzt:

- β -HC -13T,
- β -TC -1-B,
- α -TC-1-9,
- cos.

IV.2.2 CHEMIKALIEN

Chemikalien stammen von den Firmen Sigma (München), Merck (Darmstadt), BRL (Bethesda Research Laboratories, Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Fluka (Buchs, Schweiz), J.T. Baker (Deventer, Holland), Roth (Karlsruhe), Biomol (Ilvesheim) und Gibco Laboratories (Detroit, USA). Phenol lieferte die Firma Amresco (Solan, Ohio). Alle Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad "p.a." (zur Analyse).

IV.2.3 RADIOCHEMIKALIEN

32 P-dCTP stammte von der Firma Amersham-Buchler (Braunschweig).

IV.2.4 VERBRAUCHSMATERIAL

Das Plastikmaterial wurde von den Firmen Falcon, Greiner, Eppendorf, Sarstedt und Nunc bezogen.

IV.2.5 MEMBRANEN

Für Hybridisierungen und DNS-Transfer wurde mit Nylon-Membranen der Firma Qiagen (Düsseldorf) gearbeitet.

IV.2.6 FILME

Alle Farbfotografien wurden mit den Kunstlichtfilmen, Extrachrome 320 T und 64T der Firma Kodak gemacht. Die Autoradiogramme wurden auf XAR-3 oder BIOMAX-Filmen (beide von der Firma Kodak) exponiert.

IV.2.7 PHOTOARBEITEN UND SEQUENZBEARBEITUNG

Die Photos der Embryonen bzw. Schnitte wurden mit Zeiss-Mikroskopen (Binokular und Axiophot) aufgenommen und digital weiterverarbeitet. DNS-Sequenzbearbeitung wurden mittels der Computerprogramme Sequencher, GCG (Genetics Computer Group Inc.) und BLAST (NCBI) durchgeführt.

Die Genbank-Nummer (Accession number) der bearbeiteten *Pax4*-Sequenz lautet: *AF304868*.

IV.2.8 REAKTIONSETS ("KITS")

Kit	Hersteller
GeneAmp RNA PCR Kit	Perkin Elmer Corporation
Multiprime DNS labelling system	Amersham Life Science
pGEM-T easy Vector System I	Promega
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Nucleotide Removal Kit	Qiagen

IV.2.9 MEDIEN, NÄHRBÖDEN, STANDARD-LÖSUNGEN

Alle Lösungen wurden mit Wasser angesetzt, welches über eine „Millipore-Anlage“ gereinigt war und danach autoklaviert oder sterilfiltriert wurde (vorhandene Ausnahmen werden bei der jeweiligen Methode erwähnt). Die folgenden Lösungen sind Bestandteil verschiedener Methoden und werden daher vorangestellt und bei der einzelnen Methode nur noch mit Namen erwähnt.

IV. MATERIAL UND METHODEN

LB (Luria-Bertani)- Medium:

10 g NaCl
10 g Bacto-Trypton
5 g Bacto-Hefe-Extract
in 1 l VE-Wasser, pH 7,0

Nährböden enthielten zusätzlich 1,5 % Agar; Topagar(-ose) 0,7 % Agar(-ose).

SOC-Medium:

2 g Trypton, 0,5 g Hefeextrakt, 1 ml 1M NaCl, 0,25 ml 1M KCl. 100 ml dH₂O; 20 Min. autoklavieren, anschließend erfolgt die Zugabe folgender sterilfiltrierter Lösungen: 1 ml 1M MgCl₂, 1 ml 1M MgSO₄, 1 ml 2M Glukose.

NZY-Topagar (Topagar):

21 g NZY-broth
7 g Agarose
in 1 l VE-Wasser

Zellkulturmedien

Medien stammten von den Firmen Gibco (Paisley, England), Flow Laboratories (Irvine, England) und Boehringer (Mannheim).

1x SSC:

0,15 M NaCl
15 mM NaCitrat, pH 7,0

10 x TBE:

108 g Tris base
40 ml 0,5M EDTA, pH 8,0
55 g Borsäure
ad 1.000 ml H₂O

TBST:

10 mM Tris-HC., pH8 (pH6 für Färbelösung)
150 mM NaCl
0,5% Tween

Hybridisierungslösung:

7 % SDS
0,5 M Na₂HPO₄ pH 7,2

Waschpuffer

Hybridsierungen:

1 % SDS
40 mM Na₂PO₄ pH 7,2

TE:

10 mM Tris/HCl, pH 7,5
1 mM EDTA

Proteinase K:

Proteinase K (Boehringer) wurde mit einer Endkonzentration von 20 mg/ml in H₂O gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

EtBr-Lösung:

100 mg Ethidiumbromid in 10ml H₂O gelöst und im Dunkeln aufbewahrt; verwendete Konzentration betrug 2mg/ml.

10 x Ladepuffer für DNS:

0,25 % Bromphenolblau
0,25 % Xylen Cyanol FF
10x TAE
25% Glycerin
1 % SDS
1 mM EDTA

Phenol/Chloroform/

Isoamylalkohol :

Mischung aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (PCI) im Volumenverhältnis 25:24:1.

RNase A:

10 mg/ml in 10 mM Tris/HCl (pH 7,5), 15 mM NaCl gelöst, zur Inaktivierung der DNSSen für 15 Min. bei 95 °C inkubiert und langsam auf RT abgekühlt; bei -20 °C gelagert

10 x PBS-Puffer:

1,3 M NaCl
70 mM Na₂HPO₄
30 mM NaH₂PO₄ . 2 H₂O pH 7,0

für

Chloroform/Isoamylalkohol (CI):

Mischung aus Chloroform und Isoamylalkohol im Volumenverhältnis 24:1.

Ampicillin:

25 mg/ml in H₂O, steril filtriert, und bei -20 °C gelagert

Mowiol: 9,6 g Mowiol, 24,0 g Glycerol in 24 ml dH₂O, 1 h rühren; 48 ml 0,2 M Tris, pH8,5, 20 Min. rühren; 50°C; Abzentrifugieren, 1000 g; Überstand bei -20°C lagern.

P-30-Suspension: Biogel P-30 (Biorad) in 50 mM HEPES (pH 6,0) suspendiert und autoklaviert.

4% PFA/PBS: 10g PFA in 250 ml 1XPBS gelöst, bei 4°C gelagert.

Saline: 0,86% NaCl in dH₂O.

Fixierungslösung für

Embryonen: 0,2% Glutaraldehyd, 5 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 100 mM KH₂PO₄, pH 7,4.

20X SSPE: 175,3 g NaCl, 27,6 g NaH₂PO₄.H₂O, 7,4 g EDTA, mit ca. 6,5ml/ 1000ml 10N NaOH auf pH 7,4 in 1000 ml dH₂O, autoklavieren.

X-Gal-Lösung: 20 mg/ml in Dimethylformamid, Lagerung bei -20°C.

IV.2.10 ENZYME

RESTRIKTIONSENZYME

Restriktionsenzyme der Firmen Amersham-Buchler (Braunschweig), Boehringer (Mannheim), Gibco-BRL (Karlsruhe), NEB (New England Biolabs, Bad Schwalbach), Pharmacia (Freiburg), SERVA/Promega (Heidelberg) und Stratagene (La Jolla) kamen zum Einsatz.

SONSTIGE ENZYME

RNaseA: RNaseA in 10 mM Tris-HCl pH7,5, 15 mM NaCl auf 10mg/ml gelöst. ProteinaseK: ProteinaseK (Boehringer) auf 10 mg/ml Endkonzentration in dH₂O gelöst, Lagerung bei -20°C. Bovine intestinale Alkaline Phosphatase (Boehringer), T4-DNS-Ligase (konzentriert, Boehringer), Klenow-Fragment (Boehringer).

IV.2.11 VEKTOREN

BASISVEKTOREN

Bluescript II KS+ (Stratagene), pGEM-T oder pGEM-T-Easy (Promega), pCH110 und pSL1180 (Pharmacia), pcDNA1.1/Amp Supercoiled Plasmid (Invitrogen) und p-Beta-gal-Basic von Clontech waren die verwendeten Basisvektoren.

HERGESTELLTE VEKTOREN

7,8 kb: Ein das *lacZ*-Gen enthaltendes 3,7 kb HindIII/BamHI-Fragment aus pCH110 wurde entsprechend dem Leserahmen vor ein genomisches 7,8 kb NotI (aus den Schnittstellen des Vektors Bluescript II KS+)/ NheI (innerhalb des dritten *Pax4*-Exons) - Fragment des *Pax4*-Gens kloniert (Brink, 1998).

5,3 kb: Schneiden von 7,8 kb mit NcoI, Religation.

3,9 kb: Schneiden von 5,3 kb mit Ball/SacII, Religation.

2,8 kb: Schneiden von 3,9 kb mit AvrII, Religation.

0,9 kb: Ligation des genomischen 0,9 kb SmaI/NcoI-Fragments des *Pax4*-Promotors in NheI-geschnittenen p-Betagal-Basic-Vektor.

cb 11: Schneiden von 0,9 kb mit HindIII, Religation.

cb 8: PCR-Amplifikation genomischer *Pax4*-DNS mit den Primern 96sO und HindR2, Amplifikation des Fragments in pGEM-T-easy, Ligation des Fragments in NheI-geschnittenen p-Betagal-Basic-Vektor.

cb 9: Wie cb 8 mit den Primern 96sI und HindR2.

cb 12: Schneiden von cb 9 mit HindIII, Religation.

cb 13: Wie cb 8 mit den Primern cDNA1 und HindR2.

cb 14: Wie cb 8 mit den Primern cDNA2 und HindR2.

cb 16: Wie cb 8 mit den Primern deltaE1 und HindR2.

cb 17: Wie cb 8 mit den Primern deltaC1 und HindR2.

cb 18: Wie cb 8 mit den Primern deltaC1b und HindR2.

cb 15: Der Vektor NLS-*Cre*-IRES-EGFP, freundlicherweise von Dr. Xunlei Zhou zur Verfügung gestellt, mit pSL1180 als Basisvektor und zwischen den Restriktionsschnittstellen XhoI und SacII mit der kodierenden Sequenz von NLS-*Cre* (Rajewsky et al., 1996), gefolgt von der freundlicherweise von Dr. Kamal Chowdhury zur Verfügung gestellten Splice-Acceptor-Sequenz IRES, gefolgt von der kodierenden Sequenz von EGFP (Zernicka-Goetz et al., 1997), wurde mit SmaI und BglII geschnitten. Das ebenfalls mit SmaI und BglII aus dem p-Betagal-Basic-Vektor geschnittene genomische Promotorfragment (cb 9) wurde in diesen Bereich hineinligiert.

IV.2.12 GRÖßENMARKER

a) 1 kb-Marker (Biolabs): 10,0; 8,0; 6,0; 5,0; 4,0; 3,0; 2,0; 1,5; 1,0; 0,5 kb

b) 100 bp-Marker: 1517, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp

c) Lambda-DNS, BstEII-Restriktionsverdau: 0,7-14,1kb: 702, 1264, 1371, 1929, 2323, 3675, 4324, 4822, 5686, 6369, 7242, 8454, 14140 bp

IV.2.13 OLIGONUKLEOTIDE

Alle Oligonukleotide wurden von den Firmen Eurogentec (Köln) oder NAPS (Göttingen) bezogen. Die Oligonukleotide dienten als Sequenzierprimer oder sie wurden zur PCR benutzt.

IV. MATERIAL UND METHODEN

T7: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
T3: 5'-AATTAACCCTCACTAAAGG-3'
lacZ1: 5'-TTGGCGTAAGTGAAGCGAC-3'
lacZ2: 5'-AGCGCTGATGTTGAAC-3'
LF1: 5'-TACTCCATTTTACTGCTCAGTTTGCT-3'
Kpn1: 5'-TTACACACACCACTTCAGCTTG-3'
Kpn2: 5'-TCAGGGTCACCTCCAATAGCCACA-3'
Kpn3: 5'-ATAGCCACAAGCCATGTCAGCCTA-3'
ENs3: 5'-CCCAACACATTAGAAAGGTG-3'
ENs2: 5'-CCAGGAAAGGAACAAC-3'
KpnR4: 5'-AGTCCCCTGGGTTAATCTCTCAG
TTGTT-3'
ENs1: 5'-GAGATTAACCCAGGGGGAAC-3'
KpnR5: 5'-AGATCTTCTAAGCTCCGAAGTCACCA-3'
BamF1: 5'-ACATGATACCCCTTAATAAGTATG-3'
ENas1: 5'-TACTTATTAAGGGTATCAT-3'
ENas2: 5'-CTACTGTGTAAGGCATACA-3'
BamF2: 5'-CAGTAGAAGAATAAGTTAGAAGCT-3'
ENas3: 5'-AGAGCTTCTAATCTTCTT-3'
BamR3: 5'-ATATTCAACATCCATTTCCCAGG
CCAGC-3'
BamR4: 5'-GGTCTATTGCTACCAGGCCAAA
CACTGT-3'
LF2: 5'-GTCCTATAACTAAGTGGATCAGGCA
TGAGC-3'
Eco2: 5'-GGAAATCATGTCTAGGGGAAT-3'
Eco1: 5'-GACCTTTGTGGGGCGGAGAG-3'
Fs: 5'-AAGGTGCCAAGAAGCTCCCGGGAG-3'
96sO: 5'-CACAGCCTCGTTGGCGTGCG-3'
R1: 5'-TCGTTGGCGTGCGACAAGAC-3'
96sI: 5'-CTCCTGAGTTAATGTATAAT-3'
deltaE1: 5'-TCTGAGTTAATGTATAATTGTGGGGG
CTGGCAGCAGCTG-3'
deltaC1: 5'-TCTGAGTTAATGTATAATTGTGAGCAG
ATGGCGCAGCCTGGGGGCTGGGCACAG-3'
deltaC1b: 5'-TCTGAGTTAATGTATAATTGTGA
GCAGATGGCGGGGGCTGGCAGCAGCGGCACAG
TAATGAGGGAGAATT-3'
R2: 5'-TGAGTTAATGTATAATTGTGAGCAGA
TGGCGGGGGCTGGCAG-3'
cDNA1: 5'-AGCAGATGGCGGGGGCTGGC-3'
cDNA2: 5'-ATGGCGGGGGCTGGCAGCAG-3'
cDNA3: 5'-GGGGGCTGGCAGCAGCCTGG-3'
cDNA4: 5'-CTGGCAGCAGCCTGGGGGCT-3'
cDNA5: 5'-AGCAGCCTGGGGGCTGGGCA-3'
cDNA6: 5'-CCTGGGGGCTGGGCACAGCT-3'
cDNA7: 5'-GGGCTGGGCACAGCTAATGA-3'
cDNA8: 5'-GGGCACAGCTAATGAGGGAC-3'
96aI: 5'-CGGGTTTGGGGCTAATTGTC-3'
96aO: 5'-ACTGTCTGACTCTCTAAT-3'
Hind2: 5'-CCGCCAGGGCCCTTTCCCTT-3'
Hind1: 5'-TCTCCCTATCACCTCTGGGTCGA-3'
HindR2: 5'-CAGTTCTTTTCTATAGACAGCT-3'
HindR1: 5'-CCTTATTCTTTCTTTAGATCTGT-3'
Fr: 5'-GAAAGGAATAAGGCAGGGAGACCAA-3'
LF3: 5'-AGAAACATGCATTTCTAGTCATCCT
CAGAC-3'
LF4: 5'-GTCTGAGGATGACTAGAAATGCAT
GTTTCT-3'
LF6: 5'-AGTGTGCATGGGGCTGGCTGACACT
GGCCCT-3'
cb01: 5'-GATGTTACAGGCCATGAGC-3'
cb02: 5'-CTGGGAGTAGCCAGTGATGTC-3'
RT9: 5'-AGCAGAGGGCAGCCTTCTG-3'
P1: 5'-CAGAAGGCTGCCCTCTGCTCCTGAGTGA
AGGCTCTGTAAGCTCTGGACCCCTGGCAGGAC
TGAAGCAGCT-3'
RT8: 5'-TTCCTCAGGAGCAGAGGGC-3'
Exon1: 5'-CCTGAGTGAAGGCTCTGTGAAGCT-3'
Pax4rev3.2: 5'-CTTCACAGAGCCTTCACTCA-3'
cb03: 5'-CAGAGCTTCACAGAGCCTTC-3'
RT7: 5'-GTCCAGAGCTTCACAGAGCC-3'
4Pax4rev2.2: 5'-GGGTCCAGAGCTTCACAGAG-3'
4Pax4rev1.2: 5'-CTGCTTCGGTCTGCCAGGGGGT-3'
RT6: 5'-TGCTTCAGTCTGCCAGGGG-3'
cb04: 5'-CAGCCTCCAGCTGCTTCAG-3'
RT5: 5'-GTCTTGTAACAGCCTCCAGC-3'
P2: 5'-GTTACAAGACCAGACCACCAGCAAAC
CCTGGAGCCTGCACAGGACCCTGAGACCTTCTCC
TGGAATTCCCAC-3'
RT4: 5'-CAGGGTTTGTGCTGGTGGTCTG-3'
Pax4-1: 5'-CCACCAGCAACCCTGGAGCCTGCACAG
ACCCTGAGACCTTCTCTG-3'
RT3: 5'-TCAGGGTCTGTGCAGGCTC-3'
LF5: 5'-AGAGGTCTCAGGGTCTGTGCAGGCTC-3'
Exon2: 5'-CTGCACAGACCCTGAGACCTTCT-3'
cb05: 5'-CAGGAAGAGGTCTCAGGGTC-3'
RT2: 5'-GGGAATTCCAGGAAGAGGTC-3'
E5: 5'-TTTGGATATTGAACCTGTGTTTCACAG-3'
E6: 5'-TAAACCCTTGTGAAGGATTCAGGACTAGG-
3'
exon4F: 5'-AAACCCTTGTAAAGGATTCAGGACT-3'
exon6R: 5'-AGTCCTGAATCCTTAACAAGGGTT-3'
Vorani1: 5'-TAGCACAACCTTCTCCTCCATTTCT-3'
exon5R: 5'-TTGGTATTAAGAAATGGAGGGGGGA
A-3'
Vorani2: 5'-AAATTCAACTTCTTACTGAGTTTCTG
GA-3'
E8: 5'-CATTGAAAAAGGAAAGAATCCCTATCA
AGGATTCCG-3'
Nhe10: 5'-GGTACCCTCTAGGCCGTTC-3'
Nhe9: 5'-AGGGTACACAAAGCCTAAGGTGATG
ACTTCTT-3'
Nhe8: 5'-CCAAATATCAGTCAAAACTTTCTTCA
AAGC-3'
Nhe7: 5'-GTAATCAGTATTTTCTTCTCAAGTGG-3'
E9: 5'-TCCCCGTTTTTAAATGCCCTTATCCC
TAAAT-3'
G1: 5'-GACAGGTAGGGGAGATGGG-3'
Pax4Prime5B: 5'-CCCACCTTTTTCTCCATCCAGT
ACCAGTCCCAAAGAGAAACTTCCAGAAGGAGCT
CTCCGTTTTCAGTTT-3'
RT1: 5'-CTGGATGGAGGAAAAAGGT-3'
G1R2: 5'-AGGGGTCAGGGGGGGGTG-3'
Nhe5: 5'-TGGGACTGGTCTCCACAATAAAAGGTT-
3'
Exon3F: 5'-AATCTCATGCTCAGTTA-3'
E7: 5'-ATGGGGTCTTAAACCCCAACTTTTTT-3'
P3: 5'-ACCAGTCCCAAAGAGAACTTCCAGA
AGGAGTCTCCGTTTTTTCAGTTTGCCAGTTGGCTTC
CTGCTCTCTG-3'
Nhe4: 5'-CAACTGGCAAAACTGAAAACGGAAAA
CTCCT-3'
Pax4Prime5-C: 5'-GCCAGTTGGCTTCTGTCTTC
TGCGAGGAGTACCAGTGTGAAGCATGCAGCAGG
ACGGACTCAGCAGTGTG-3'
Nhe3: 5'-GACATTGTGTTGGTGAAGCCAAGAC-3'
Nhe2: 5'-CCACCTTTTTCCAGGGTCCCCAGA-3'
P4: 5'-GACTCAGCAGTGTGAATCAGCTAGGGG
GACTCTTTGTGAATGGCCGGCCCTTCTCTGGAC
ACCAGGCAGC-3'
Nhe1: 5'-GAGTCCCCTAGCTGATTCACACTGCT-3'

IV.3 METHODEN

Molekularbiologische Standardmethoden wurden nach der Beschreibung von Sambroock oder Ausubel durchgeführt (Sambroock et al., 1989; Ausubel et al., 1987).

IV.3.1 ISOLIERUNG VON PLASMID-DNS AUS BAKTERIEN

PLASMIDPRÄPARATION MIT DEM QIAPREP SPIN MINIPREP KIT

Zur schnellen Gewinnung kleinerer Mengen hochreiner Plasmid-DNS wurde der "QIAprep Spin Miniprep Kit" (Qiagen, 2000) von der Firma Qiagen (Düsseldorf) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine modifizierte Form der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) in Verbindung mit einer Affinitätsaufreinigung an einer Silikongelmembran, die bei hohen Salzkonzentrationen DNS bindet und bei niedrigen eluiert. Die Zusammensetzung der Puffer P1, P2, N3, PB, PE und EB sind in den Herstellerangaben zu finden.

Es wurden 3-5 ml einer *E. coli*-Kultur ü.N. in LB-Medium mit Antibiotikum bei 37°C angezogen. Mit diesen wurde entsprechend den Herstellerangaben verfahren. Die Konzentration der so gewonnenen DNS entspricht zwischen 200-400 ng/ μ l.

PLASMIDISOLATION MIT DEM QIAFILTER MAXIPREP KIT

Zur Aufreinigung größerer Mengen hochreiner Plasmid-DNS wurde der "QIAfilter Plasmid Maxi Kit" (Qiagen, 2000) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Der Kit funktioniert ebenfalls nach einer modifizierten Form der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979), diesmal in Verbindung mit einer Anionen-Austauschersäule. Die jeweiligen Zusammensetzungen der Puffer P1, P2, P3, QBT, QC, QF und TE sind in den Herstellerangaben zu finden.

Mit dieser Methode konnten 50-100 ml *E. coli*-Kultur pro Säule aufgearbeitet werden.

IV.3.2 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN

Die betreffende DNS-Lösung wurde 1:200 in dH₂O verdünnt und die Absorption der Lösung spektroskopisch bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Eine optische Dichte (OD₂₆₀) von 1,0 entspricht einer Konzentration Doppelsträngiger DNS von 50 µg/ml.

Alternativ dazu erfolgte die Konzentrationsbestimmungen durch einen optischen Vergleich der Ethidiumbromidfluoreszenz mit Standard-DNS in Agarosegelen (Sambroock et al., 1989).

IV.3.3 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Bei der Agarosegelelektrophorese (Southern, 1975) werden DNS-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt. DNS wandert aufgrund der negativen Ladungen der Phosphatreste in einem elektrischen Feld zur Anode.

Für analytische und präparative Zwecke wurden Agarosegele angefertigt. Der aufzutrennenden Fragmentgröße entsprechend wurden 0,7 - 3 Prozentige Agarosegele mit jeweils 0,1 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Als Laufpuffer diente 1x TBE. Die eingesetzte DNS-Lösung wurde vor dem Auftragen mit einem zehntel Volumen Ladepuffer versetzt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele bei kurzwelligem UV-Licht (258 nm) fotografiert. Präparative Gele dagegen wurden nur bei langwelligem, energieärmerem UV-Licht (Wellenlänge > 300 nm) fotografiert, um die Bildung von Thymidin-Dimeren und Strangbrüche zu vermeiden.

IV.3.4 GEWINNUNG VON DNS-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN

MIT DEM QIA-QUICK GEL EXTRACTION KIT

Die Gewinnung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des "QIA-quick Gel Extractions Kit" von der Firma Qiagen durchgeführt. Das dabei verwendete "QIAquick Spin-Protokoll" (Qiagen, 2000) arbeitet mit dem Prinzip der selektiven Bindung von DNS an eine Silikon-Gel-Membran. Dabei macht man sich zunutze, daß DNS bei hohen Salzkonzentrationen an der Säulenmatrix haften bleibt, während Kontaminationen gewegewaschen werden. Bei niedrigen

Salzkonzentrationen kann die DNS eluiert werden. Die jeweiligen Zusammensetzungen der Puffer QG, PE und EB sind in den Herstellerangaben zu finden.

Dazu wurde die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten und es wurde entsprechend den Angaben des Herstellers verfahren.

DURCH ELEKTROELUTION

Die entsprechende Bande wurde unter langwelligem UV-Licht mit einem sauberen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und das Agarosegelstück in einen Dialyseschlauch gegeben. Je nach Größe des Gelstücks werden 400-700 μ l TE (pH 8,0) zugegeben. Der Schlauch wurde in eine Elektrophoresekammer eingespannt und die DNS bei 120- 150 mV 30 Min. - 3 h eluiert. Anschließend erfolgte Überführung der Pufferlösung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß. Diese Lösung wurde zweimal mit Phenol und einmal mit Chloroform/Isomylalkohol extrahiert. Schließlich erfolgte eine Ethanolpräzipitation. Das Präzipitat wurde in in ddH₂O oder TE-Puffer aufgenommen.

AUFBEREITUNG VON LINERAREN DNS-KONSTRUKTEN FÜR DIE INJEKTION IN MAUSOOZYTEN

Die DNS für die Mikroinjektion muß besonderen Ansprüchen genügen und wurde daher einer besonderen Reinigungsprozedur unterworfen (siehe Hogan et al., 1994). Das Konstrukt wurde mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen aus dem Vektor geschnitten und durch Agarosegelelektrophorese von der Plasmid-DNS getrennt. Für die spätere Ermittlung der DNS-Konzentration für die Injektion, wurden 5-6 μ l des Restriktionsverdaus vor der Isolierung bei -20°C gelagert. Die Isolierung erfolgte durch Elektroelution. Anschließend wurde die DNS-Lösung wie folgt extrahiert: zweimal Phenolextraktion, einmal Chloroformextraktion, zweifache Extraktion durch Äther (wassergesättigt) zur Entfernung der Chloroformreste, wobei der flüchtige Ätherüberstand mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt wurde. Die DNS wurde im Anschluß wie folgt präzipitiert:

Nach Zugabe von zwei Volumen Isopropanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, 10 Min. Fällung bei Raumtemperatur, 20 Min. Zentrifugation bei 13000 rpm., zweimal waschen mit 70% Ethanol, Trocknen in der Vakuumzentrifuge oder durch Lufttrocknung und Aufnehmen in 50 µl 1/10 TE-Puffer.

Die DNS-Lösung wurde anschließend in eine P-30 Säule gegeben und die Säule in einem Greinerröhrchen 5 Min. bei 1500 rpm zentrifugiert. Die P-30-Säulen wurden wie folgt vorbereitet: in sterilen 1ml-Spritzen wurde der Boden mit Glaswolle ausgestopft und diese autoklaviert. Die gestopften Spritzen wurden mit P-30/TE auf 1 ml aufgefüllt und 5 Min. bei 1500 rpm zentrifugiert; das wurde wiederholt, bis die Spritze bis zur 1 ml-Marke gefüllt war. Vor dem Auftragen der DNS-Lösung erfolgte noch zweimaliges Waschen der so präparierten Säulen mit je 100 µl 1/10TE.

Die Konzentration des DNS-Fragments wurde durch Agarosegelelektrophorese ermittelt, wobei parallel ein definiertes Volumen aus der verdauten Vektor-DNS, deren Konzentration zuvor ermittelt wurde mitlief. Die Injektion erfolgte in einer DNS-Konzentration von 4-6 ng/µl.

IV.3.5 ERZEUGUNG TRANSGENER MÄUSE MITTELS MIKROINJEKTION

Die Mikroinjektion erfolgte nach Hogan, 1994. Superovulation wurde bei FVB-Weibchen wie folgt induziert: Injektion (intraperitoneal) von 0,2 ml (25 IU/ml) PMS (Stutenserum-Gonadotropin, Sigma) und 0,2 ml (25 IU/ml) HCG nach 46 h (humanes chorionisches Gonadotropin). Fertilisierung durch Verpaarung mit FVB-Männchen.

Die Entnahme der befruchteten Mausoozyten erfolgte am nächsten Tag und die Cumuluszellen wurden durch Hyaluronidase (300 mg/ml in M2-Puffer) befreit.

Etwa 2 pl 2-3 ng DNS/0,1XTE wurde mit Hilfe einer ca. 100 µm Glaskapillare in den männliche Pronukleus injiziert.

Injizierte Oocyten wurden in die Ampullae scheinchwangerer NMRI-Rezipientenmäuse eingespült. Die Rezipientenmäuse wurden durch

Verpaarung mit vasktomierten NMRI-Männchen für den Retransfer vorbereitet. Der Tag des Retransfers wurde als d 0,5 definiert.

Bei Analyse der transient transgenen Tiere wurden die Embryonen der F0-Generation des entsprechenden Stadiums in eiskaltem 1X PBS gesammelt und von den embryonalen Membranen befreit. Das Amnion wurde dabei für die Genotypisierung in Eppendorfröhrchen transferiert und auf Eis gelagert.

Zur Analyse der Linien wurden diese in *FVB* gehalten. Embryonen bestimmter Stadien wurden wie folgt gewonnen: Verpaarungen wurden Nachmittags angesetzt und morgens jeweils die Bildung des Vaginalpfropfens überprüft. Der Tag des Vaginalpfropfens als Tag 0,5 der Embryogenese (E0,5) definiert.

INJEKTIONEN

Injektionen erfolgten in die Bauchhöhle (intraperitoneal) mit einer sterilen 1,0 ml Spritze (Terumo, Tokio) und einer 0,4 X 20 mm Injektionsnadel (Terumo). Bei jeder Injektionen wurde zunächst aspiriert, um das Verletzen innerer Organe zu vermeiden.

IV.3.6 RESTRIKTIONSSPALTUNG VON DNS

Das Restriktionsschneiden wurde gemäß den Angaben des Enzymherstellers und nach Sambroock (Sambroock et al., 1989) durchgeführt. Restriktionsansätze mit mehreren Enzymen konnten gleichzeitig erfolgen, wenn die Enzyme kompatible Reaktionsbedingungen erforderten. Unterschieden sich die Reaktionspuffer nur in der NaCl Konzentration, wurde zuerst mit der niedrigeren Salzkonzentration und dem entsprechenden Enzym inkubiert. Anschließend wurde die Salzkonzentration für das zweite Enzym eingestellt und dieses zugegeben. Benötigten die Enzyme unterschiedliche Ionen, erfolgte nach dem ersten Schneiden eine PCI-Extraktion mit anschließender Ethanol-fällung, bevor mit dem anderen Enzym geschnitten werden konnte.

IV.3.7 AUFREINIGUNG VON DNS-LÖSUNGEN

MITTELS PHENOL/CHLOROFORM-EXTRAKTION

Bei der Phenol/Chloroform-Extraktion (Marmur, 1960) wurde zu einem Volumen einer wässrigen DNS-Lösung ein Volumen einer Mischung aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol gegeben (Mengenverhältnis 25 : 24 : 1). Nach intensivem Mischen auf dem Vortexer wurde die Emulsion zur Phasentrennung bei RT mit 13.000 rpm für 5 Min. zentrifugiert. Danach befinden sich denaturierte Proteine, Membranbestandteile und organisch lösliche Moleküle in der unteren Phenol/Chloroform-Phase und in der Interphase. Die DNS befindet sich in der oberen wässrigen Phase.

Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Je nach benötigtem Reinheitsgrad der DNS wurde der Vorgang mehrmals wiederholt. Anschließend erfolgte, um Phenolspuren zu beseitigen, nach obigem Schema eine weitere Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24 : 1). Daraufhin erfolgte Fällung der DNS mit Ethanol.

DURCH DIALYSE

10-50 µl DNS-Lösung wird auf eine Dialyse-Membran gegeben, die auf 3-5 ml dH₂O in einer sterilen Kulturplatte (Nunc) schwimmt. Nach 20 Min. wird die so entsalzte Lösung, unter mehrfachen Auf- und Abpipettieren wieder aufgenommen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

IV.3.8 ETHANOLFÄLLUNG VON DNS AUS WÄSSRIGEN LÖSUNGEN

Zur DNS-Lösung wurde 1/10 ihres Volumens 3M Natriumacetat zugegeben. Danach wurde das 2,5-fache Volumen absoluten (oder 96 %igen) Ethanols zugegeben und gemischt. Die Fällung wurde für ca. 30 Min. bei 4 °C oder 5 Min. bei -20 °C inkubiert. Zum Sedimentieren der gefällten DNS folgten 5 bis 10 Min. Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 rpm und danach Abnahme des Überstands. Um die DNS zu waschen, z.B. um Salzreste zu entfernen, schloß sich Waschen mit 0,5 ml 70 % Ethanol an. Es folgte wieder eine Zentrifugation für 3 - 5 Min.

Der Überstand wurde vorsichtig entfernt. Nach dem Trocknen des Pellets wurde die DNS in Puffer oder Wasser (pH >6.0) aufgenommen.

IV.3.9 ISOPROPANOLFÄLLUNG VON DNS AUS WÄSSRIGEN LÖSUNGEN

Eine Isopropanolfällung hat den Vorteil, daß zur Fällung nur weniger Isopropanol (als Ethanol im Vergleich) zugegeben werden muß und daß die DNS mit weniger Salz ausfällt. Nachteile der Isopropanolfällung sind die geringere Flüchtigkeit des Isopropanols und das weniger feste und durchsichtigere Pellet nach der Zentrifugation.

Anstatt Ethanol wurden 0,7 Volumina Isopropanol zur DNS-Lösung zugegeben. Weiter wurde wie bei der Ethanolfällung verfahren.

IV.3.10 LIGATION VON DNS-FRAGMENTEN

Das Enzym *T4*-DNS-Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-OH-Gruppe am Ende eines DNS-Stranges und der 5'-Phosphatgruppe am Ende eines anderen DNS-Stranges. Zum Ablaufen dieser endergonischen Reaktion ist ATP erforderlich. Die Produkte einer Ligation wurden in *E. coli* transformiert und so vermehrt.

Ligationen wurden mit 20 - 50 ng Vektor und dem 3-fachen molaren Überschuß des entsprechenden Fragments in Ligase-Puffer mit 1 mM ATP und 1 U *T4*-DNS-Ligase angesetzt. Überhang-Ligationen („sticky ends“) wurden 3 h. bei 20 °C oder ü.N. bei 14 °C, Ligationen mit stumpfen Enden („blunt ends“) stets ü.N. bei 14 °C inkubiert.

IV.3.11 „BLUNT END“-KLONIERUNG

Fragmente mit überhängenden 5'- oder 3'- Enden, die in einen „blunt end“-Vektor kloniert wurden, wurden, wurden, wurden mit *T4*- oder Kleenow-Polymerase behandelt:

T4-DNS-POLYMERASE

Die Einzelstrang-DNS-spezifische 3'-5'-Exonukleaseaktivität der *T4*-DNS-Polymerase wurde zum Entfernen von 3'-Einzelstrang-DNS-Überhängen

verwendet. Die Reaktion wird mit 0,05 µg/µl DNS, 1x T4-DNS Polymerase-Puffer, je 100 µM/dNTP und 3 u/µg DNS T4-DNS Polymerase (Boehringer Mannheim) 20 Min. bei 12°C durchgeführt.

Danach wird die Reaktion durch Hitzeinaktivierung für 10 Min. bei 75°C gestoppt und die Polymerase wird durch Phenolextraktion aus dem Ansatz entfernt.

KLENOW-POLYMERASE

Für das Auffüllen der beim Schneiden mit den meisten Restriktionsendonukleasen entstehenden 5'-Einzelstrang-Übehängen wurde das große Klenow-Fragment der DNS Polymerase I aus *E.coli* verwendet. Die Reaktion wurde ohne weitere Aufreinigungsschritte direkt im Anschluß an einen Restriktionsverdau, wie folgt durchgeführt:

0,05 µg/µl DNS, 1x Puffer (der zum Verdau verwendete), je 33 µM dNTP, 1,0-1,5 u/µg DNS Klenow-Polymerase (Boehringer Mannheim); 5 Min. 37°C, 12 Min. RT.

Die Reaktion wird durch Zugabe von EDTA zu einer Endkonzentration von 10 mM beendet und die Polymerase durch Phenolextraktion entfernt.

DEPHOSPHORYLIERUNG VON DNS-ENDEN

Die Entfernung von 5'-Phosphatgruppen von DNS-Enden zur Verhinderung der Religation linearer Vektor-DNS-Fragmente wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

50-100 ng/µl in 1x AP-Puffer, 1 u/pmol DNS-Enden intestinale alkaline Kalbsphosphatase (CIP); die Inkubation erfolgte in 20-50ul für 1 h bei 37°C oder 15 Min. bei 50°C. Anschließend wurde der Ansatz mit dH₂O auf 200 µl aufgefüllt und einer Phenolextraktion unterzogen.

IV.3.12 TRANSFORMATION VON BAKTERIEN

HERSTELLUNG ELEKTROKOMPETENTER BAKTERIEN

Bei der Elektroporation wird eine Mischung aus Bakterien und DNS einem kurzen, aber intensiven elektrischen Feld von 1,8 kV, welches einen

exponentiellen Abfall zeigt, ausgesetzt (Dower et al., 1988). Dies führt zur vorübergehenden Bildung von Poren in der Membran von lebenden Zellen (Calvin und Hanawalt, 1988), durch welche die DNS in die Zelle gelangen kann. Die Porenentstehung ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß sich die Membranmoleküle der Phospholipiddoppelschicht in einem elektrischen Feld als Dipol verhalten und die Struktur der Membran so verändert wird (Neumann et al., 1982).

Zur Herstellung elektrokompenter Bakterien wurden *E. coli* (DH-5- α) auf einer LB-Platte ausgestrichen und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Mit einer Kolonie dieser Platte wurden 5 ml LB-Medium angeimpft und 5 h bis ü.N. bei 37 °C leicht geschüttelt. Mit diesen 5 ml wurde schließlich 1 l LB-Lösung angeimpft und bei 37 °C geschüttelt (300 rpm), bis eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht wurde. Nun folgte das Abstoppen des Wachstums, indem die Bakterien ca. 15 - 30 Min. in einem Eiswasserbad abgekühlt wurden. Die Kultur wurde daraufhin durch 15 Min. Zentrifugieren (4200 rpm, 4 °C) pelletiert. Zum Waschen erfolgte Aufnahme in 1 l eiskaltem ddH₂O und nach dem Lösen wie bereits beschrieben erneutes Zentrifugieren. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt, doch diesmal nur in 0,5 l ddH₂O bzw. beim zweiten Mal in 20 ml 10 % Glycerinlösung. Nach erneuter Zentrifugation wurde das nun erhaltene Pellet in 2 - 3 ml 10 %-Glycerinlösung aufgenommen und gut gemischt. Die Konzentration betrug nun durchschnittlich $3 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml. Danach wurden die Bakterien aliquotiert und bei -70 °C gelagert. Sie konnten so nach Bedarf aufgetaut werden.

TRANSFORMATION DURCH ELEKTROPORATION

Die kompetenten Bakterien (ca. 50 μ l) wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 μ l Ligationsansatz gemischt. Danach wurden die Bakterien in gekühlte Elektroporationsküvetten überführt und der Elektroporationsapparat eingestellt (1,8 kV, 25 mF und 200 W beim Pulscontroller). Nach der Pulsapplikation wurde schnellstmöglich 1 ml SOC-Medium zu den Bakterien gegeben. Die Bakteriensuspension wurde in ein steriles Reaktionsgefäß transferiert und ca. 30 Min. bei 37 °C leicht geschüttelt, bevor sie auf Selektivagar ausplattiert wurde.

BLAU/WEIß-SELEKTION

Bei Ligation in den Bluescript II KS+ Vektor wurden vor dem Ausplattieren 50 µl 1M IPTG-Lösung und 50ul 2% X-Gal-Lösung (in Dimethylformamid) zu der Bakteriensuspension gegeben, diese gemischt, auf LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Rekombinante Bakterienklone können so als weiße Kolonien identifiziert werden.

IV.3.13 SEQUENZIERUNG ("CYCLE SEQUENCING")

Zum Sequenzieren der DNS wurde ein Verfahren benutzt, das auf der kontrollierten Unterbrechung der DNS-Synthese beruht (Sanger et al., 1977). Einzelsträngige DNS dient dabei als Matrize für die Synthese eines neuen Stranges. Es wurde ein Primer zugegeben, der mit der DNS hybridisieren kann. DNS-Polymerasen benötigen für ihre Syntheseaktivität einen kurzen Abschnitt doppelsträngiger DNS. Zusätzlich zu den Desoxyribonukleotiden wurden auch Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) in den Reaktionsansatz gegeben. Diesen fehlt die Hydroxylgruppe am 3'-C-Atom des Zuckers. Werden die ddNTPs in den neuen DNS-Strang eingebaut, so stoppt das Kettenwachstum, da keine weitere Phosphodiesterbindung geknüpft werden kann. Über die unterschiedliche Länge der neu entstandenen DNS-Stränge läßt sich die Basenabfolge nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung ermitteln. Längenunterschiede von einem Basenpaar können aufgelöst werden. Die ddNTPs sind je nach Base unterschiedlich fluoreszenz-markiert, so daß nach einer Gel-Elektrophorese jedes DNS-Fragment mit einer Laserapparatur detektiert werden kann.

Die Bestimmung der Nukleotidsequenzen wurde auf einem ABI PRISM-377 DNS Sequencer durchgeführt. Im Reaktionsansatz wurden 300 - 400 ng DNS, 10 pmol Primer und 4,5 ml Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit-Lösung zugegeben. Die Reaktion fand in einem Gesamtvolumen von 11,5 - 13,5 ml statt. Das Cycle sequencing-Programm (30'' 95 °C, 10'' 50 °C, 4' 60 °C, 25 Zyklen) wurde in einem Biometra Trio-Thermoblock durchgeführt. Nach der Reaktion wurde der Ansatz mit Ethanol gefällt und im Big Dye-Auftragspuffer

aufgenommen. Die Reaktion wurde dann auf das Sequenziergel aufgetragen. Die Integrale werden mit der Computersoftware Sequencer ausgewertet.

IV.3.14 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

(Mullis et al., 1986)

Die Primer wurden als DNS-Lösung oder in lyophilisierter Form geliefert, so daß diese nur noch in H₂O gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt werden mußte. Daraufhin wurde ein Ansatz folgenden Schemas Pipettiert:

- 5 µl 10x Puffer (enthält 25 mM MgCl₂)
- 1 µl dNTPs (je 10 mM)
- 1 µl Primer1 (10 µM)
- 1 µl Primer2 (10 µM)
- 50 ng-1.000 ng DNS-Matrize
- 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)
- x µl H₂O (auf 50 µl auffüllen)
-
- Σ 50 µl

Diese Ansatz wurde folgender Prozedur unterworfen:

REAKTIONSBEDINGUNGEN

1.Schritt:	94°C	2'
2.Schritt:	94°C	20''
3.Schritt:	55 - 65 °C	20''
4.Schritt:	72°C	1-2'
<i>Schritte 2. - 4. 25 - 30 mal wiederholen</i>		
5.Schritt:	4°C Temperatur halten	

Die Bedingungen wurden dabei je nach Primer und amplifizierter Fragmentlänge optimal angepaßt. Zum Genotypisieren wurde meist eine *lacZ*-PCR durchgeführt:

Primer: *lacZ1* + *lacZ2*

Annealingtemperatur: 60°C

Zyklenzahl: 30

Die PCR-Reaktion wurde in einem Biometra Trio-Thermoblock mit Deckelheizung durchgeführt.

IV.3.15 SOUTHERN-BLOT

Die nachfolgend aufgeführte Analyse geht auf die Beschreibung von Southern zurück (Southern, 1975).

Mit Restriktionsenzymen (BamH1) geschnittene DNS wurde in Agarosegelen aufgetrennt, gefärbt und mit einem Längenmaß fotografiert. Das Gel wurde 15 Min. lang unter Schütteln mit 0,25 M HCl behandelt (Depurinisierung; reduziert die Größe der DNS-Fragmente im Gel und verbessert dadurch die Effizienz, mit der große Fragmente auf die Filter transferiert werden können) und anschließend mit VE-Wasser gespült. Da ausschließlich Nylon-Membranen verwendet wurden, konnte der Transfer der DNS unter alkalischen Bedingungen erfolgen („alkalisches Blotting“). Hierzu wurde die DNS für mindestens 30 Min. in Denaturierungslösung denaturiert und anschließend ca. 30 Min. in der Neutralisierungslösung geschwenkt. Zum Blotten wurde der Aufbau nach Southern verwendet. Als Transferlösung diente 20x SSC. Der Transfer dauerte 4 - 24 h, je nach Größe der Fragmente und Menge der DNS in dem Gel. Nach dem Blotten wurde die Membran in 2x SSC geschwenkt und bei 80°C gebacken. Teilweise wurde die DNS anschließend nochmals durch Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (0,3 J/cm²) kovalent auf dem Filter fixiert.

DENATURIERUNGSLSG.:

0,5 M NaOH

1,5 M NaCl

NEUTRALISIERUNGSLSG.:

1,5 M NaCl

0,5 M Tris

HCl (pH 7,2)

IV.3.16 RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON DNS- BLOTS

RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON DNS-FRAGMENTEN

Die radioaktive Markierung von DNS-Fragmenten erfolgte mit dem "Multiprime DNS labelling system" von Amersham. Bei diesem System (Feinberg und Vogelstein, 1983) wird doppelsträngige DNS bei 95°C zu

Einzelstrang-DNS denaturiert. Zu der ssDNS werden Klenow-Enzym, Zufallssequenz-Hexamerprimer, dNTPs und ^{32}P -markiertes dCTP gegeben. Die Primer lagern sich auf der ssDNS-Matrize an, so daß das Klenow-Enzym mit der Polymerisation eines komplementären Stranges beginnen kann. Bei der Polymerisation werden auch ^{32}P -dCTPs in den Strang eingebaut, so daß man eine markierte DNS-Sonde erhält.

Es wurden 50 ng DNS in linearer Form eingesetzt. Mit H_2O wurde das Volumen auf 11,5 μl aufgefüllt. Die DNS wurde für 5 Min. im 95°C -Heizblock denaturiert und sofort 1 Min. auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 5 μl Puffer, 2,5 μl Primern, 5 μl ^{32}P -dCTP (50mCi) und 1 μl Klenow-Polymerase (1U/ μl) wurde die Reaktion für 30 Min. bei 37°C inkubiert.

Um die Reaktion zu stoppen, wurde die Probe auf 50 μl mit TE aufgefüllt. Damit nicht eingebaute Nukleotide entfernt wurden, wurde die Reaktionsmischung über eine *G-50*-Mikrosäule (Sephadex G-50 Probe Quant; Pharmacia) oder eine P-30-Säule gegeben. Die G-50-Säule wurde dazu zunächst kurz auf dem Vortexer geschüttelt und anschließend die Ausflußöffnung geöffnet. Die Säule wurde in ein Eppendorfgesäß gestellt und bei 735 xg eine Min. zentrifugiert. Die Säule wurde dann in ein neues Eppendorfgesäß gestellt, die Reaktionsmischung vorsichtig auf die Säule pipettiert und für zwei Min. bei 735 xg zentrifugiert. Der Durchfluß enthielt die aufgereinigte Sonde, die freien Nukleotide wurden von der Säule zurückgehalten.

Um die Qualität der Sonde zu prüfen, wurden 1 μl von 50 μl Säulendurchfluß für eine Szintillationszählung eingesetzt. Das Gesamtvolumen der Sonde sollte ein Signal von 15 - 25 Millionen counts liefern.

Die Sonde wurde für 10 Min. bei 95°C denaturiert und sofort danach in die Hybridisierungslösung (65°C) gegeben.

HYBRIDISIERUNG DER MEMBRANEN

Die Prähybridisierung, Hybridisierung und das Waschen der Membran erfolgte in Hybridisierungsflaschen, die im 65°C -Schrank kontinuierlich gedreht wurden.

Die Membranen wurden zunächst für mindestens 1 Stunde (meist ca. 2 h) mit 20 ml Hybridisierungspuffer prähybridisiert. Nach der Prähybridisierung wurde die vorbereitete, radioaktiv markierte DNS-Sonde für 10 Min. im Heizblock bei 95°C denaturiert und sofort in 20 ml Hybridisierungslösung (auf 65°C vorgewärmt) gegeben. Die Konzentration der Sonde sollte ungefähr 10⁶ counts/ml betragen. Nach Verwerfen der Prähybridisierungslösung wurde die radioaktive Hybridisierungslösung in die Hybridisierungsflasche gefüllt. Die Hybridisierung wird im 65 °C-Schrank über Nacht durchgeführt. Die Membranen wurden mindestens einmal für 30 Min. bei 65 °C gewaschen.

Waschschritte:

Zeit:	Lösungen:	Temperatur:
2x 15 Min.	2x SSC/0,1 %SDS	RT
1x 30 Min.	0,1x SSC/0,1 %SDS	65°C

Die anschließende Exposition erfolgte mit einem Biomax-Film bei -70 °C. Die Expositionsdauer betrug meistens ein bis drei Tage. Die Entwicklung des Films wurde mit einer Entwicklermaschine durchgeführt.

GENOTYPISIEREN MITTELS SOUTHERN-BLOT ANALYSE

Genomische DNS (aus Schwanz-Biopsie oder Embryonalehülle gewonnen) wurde zum Southern-Blot verarbeitet und mit der radioaktiven Probe hybridisiert. Die nach dem Waschen auf dem Film nachweisbaren Signale konnten nun entsprechend ausgewertet werden.

IV.3.17 IDENTIFIKATION VON PLASMIDKLONEN DURCH KOLONIEHYBRIDISIERUNG

Zunächst wurde die Bakterienkolonien von der Agaroseplatte auf Nitrozellulosemembran-Filter transferiert; dazu wurde diese auf die Kulturplatte gelegt und nachdem die Membranen sichtbar mit der ganzen Fläche aufliegen, wieder abgezogen. Die Filter mußten für die spätere Identifikation von Klonen mit Kreuzen und einer Numerierung beschriftet werden; diese wurden auf die Unterseite der Agaroselatten durchgeschrieben.

Die Membranfilter mit den nun anhaftenden Bakterienkolonien wurden mit den folgenden Lösungen behandelt: 5 Min. 10 % SDS, 5 Min. Denaturierungspuffer, 5 Min. Neutralisierungspuffer), 5 Min. 2X SSC. Diese Behandlung erfolgte auf Whattman-Papier bei RT. Anschließend erfolgte das Fixieren der nun freiliegenden DNS auf der Nitrozellulosemembran. Zu diesem Zweck wurden die Filter 30 Min. bei 80°C inkubiert und die DNS anschließend mit UV-Licht (0,3 J/cm²) kovalent an die Nitrozellulose gebunden. Danach wurden die Filter wie folgt behandelt:

30 Min. 2X SSC; 0,5 % SDS, 65°C, 1-2 h Hybridisierungslösung, 65 °C, ü. N. Hybridisierungslösung mit DNS-Sonde, 65°C.

Nach der Hybridisierung mit der Sonde wurden die Filter wie Southern-Blots gewaschen. Die Filter wurden daraufhin bei 37°C getrocknet und ein Röntgenfilm wurde aufgelegt. Die Position positiver Klone konnten dann anhand der Markierungen auf den Filtern und den Agaroseplatten identifiziert werden.

IV.3.18 PRÄPARATION GENOMISCHER MAUS-DNS

Das Gewebe (ca. 1 cm Schwanz oder embryonales Gewebe) wurde in 500 µl Proteinase K-Puffer, der 10 µl Proteinase K (10 mg/ml) enthielt, gegeben und über Nacht bei 55 °C inkubiert. Die unverdauten Haare und Knochen wurden am nächsten Tag abzentrifugiert (5 Min., 13.000 rpm, Heraeus Biofuge A), die genomische DNS im Überstand mit 500 µl Isopropanol gefällt und erneut zentrifugiert. Das DNS Pellet wurde einmal mit 70 % Ethanol gewaschen und in 100 µl TE gelöst (bei 37 °C unter leichtem Schütteln).

IV.3.19 GEWINNUNG EMBRYONALER RNS

VORBEREITUNGEN FÜR DAS ARBEITEN MIT RNS

Voraussetzung für das erfolgreiche Arbeiten mit RNS ist die Minimierung der RNase-Aktivität sowie die Vermeidung von RNase-Kontaminationen. Zu diesem Zweck wurden bei der Gewebepreparation sowie bei allen anderen Arbeiten mit RNA stets Handschuhe getragen. Das frisch präparierte Gewebe

wurde bei -70 °C aufbewahrt. Die Arbeitsfläche wurde vor Beginn gründlich mit Ethanol gereinigt. Sämtliche Glasgeräte wurden für 2 h bei 220 °C gebacken und das Wasser für alle Lösungen mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt, alle Lösungen autoklaviert. Der Versuchsansatz wurde während der RNS-Präparation, wenn möglich, auf Eis gehalten.

ISOLIERUNG VON GESAMT-RNA AUS EMBRYONALGEWEBE MIT TRIZOL (LIFE TECHNOLOGIES)

Bei dem *TRIZOL*-Protokoll wurde das Gewebe in einer monophasischen Mischung aus saurem Guanidiniumthiocyanat, saurem Phenol und Chloroform homogenisiert (Chomczynski, 1993). Guanidiniumthiocyanat ist ein sehr effektives Mittel zur Proteindenaturierung.

Durch Extraktion mit saurem Phenol und Chloroform wird nach Zentrifugation die effektive Trennung von RNS in der wässrigen Phase und DNS und Protein in der Phenol/Chloroformphase ermöglicht.

Dazu wurden Embryonen des Stadiums E 14,5 präpariert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Gewebe wurde bei -70 °C gelagert. Zur RNS-Präparation wurde eingefrorenes Gewebe direkt aus dem -70 °C-Schrank in ein steriles Greinerröhrchen mit Trizol gegeben. Es wurde 1 ml Trizol pro 50 - 100 mg Gewebe eingesetzt. Das Gewebe wurde solange homogenisiert, bis keine Gewebeteilchen mehr sichtbar waren. Die homogenisierte Probe wurde für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert, um die vollständige Dissoziation von Nucleoproteinkomplexen zu ermöglichen. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro 1 ml Trizol wurde das Röhrchen für 15 Sek. intensiv geschüttelt. Es schloß sich eine Inkubation bei Raumtemperatur für 2 - 3 Minuten an. Die Probe wurde zur Phasentrennung mit 12.000 g bei 4 °C für 15 Min. zentrifugiert. Die farblose obere Phase enthielt die RNS und wurde in ein neues Greinerröhrchen überführt. Die rote untere Phase enthielt DNS und Proteine und wurde verworfen. Zur RNS-Fällung wurden 0,5 ml Isopropanol pro eingesetztem 1 ml Trizol zugegeben. Die Probe wurde für 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 12.000 g bei 4 °C für 10 Min. zentrifugiert. Die ausgefällte RNS bildete ein Pellet am Boden des Röhrchens. Der Überstand wurde entfernt

und das Pellet mit mindestens 1 ml 75 % Ethanol pro 1 ml eingesetztem Trizol gewaschen. Die Probe wurde mit einem Vortexer gemischt und mit 7.500g bei 4 °C für 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet getrocknet. Das Pellet wird in RNase-freiem DEPC-H₂O aufgenommen. Damit sich die RNS besser löste, konnte sie für 10 Min. bei 50 °C inkubiert werden. Die RNS wurde bei -70 °C gelagert.

IV.3.20 NACHWEIS VON β -GALAKTOSIDASE (X-GAL-FÄRBUNG)

Embryonen des gewünschten Alters wurden in 1x PBS präpariert und bei 4°C in Fixierlösung für 30 Min. fixiert. Anschließend wurden die Embryonen zweimal bei RT in 1x PBS für 20 Min. gewaschen. Zum Nachweis der β -Galaktosidase wurden die Embryonen in *X-Gal*-Färbelösung bei 30 °C für mindestens 12 h inkubiert.

FIXIERLÖSUNG

Formaldehyd, 1 %
Glutaraldehyd, 0,2 %
NP-40, 0,02 %
in 1x PBS

X-GAL-FÄRBELOESUNG:

X-Gal, 1 mg/ml
K₃Fe(CN)₆, 5 mM
K₄Fe(CN)₆, 5 mM

Nach erfolgter β -Galaktosidase-Färbung wurden die Embryonen in PBS gewaschen gegebenenfalls ü.N. in 4% PFA in PBS fixiert und anschließend in einer ansteigenden Glycerin/PBS-Reihe (30 %, 50 %, 80 %) eingelegt.

IV.3.21 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

KULTUR DER ZELLEN

Die Zellen wurden unter Standard-Zellkulturbedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Benutzt wurde DMEM-Medium (Seromed) mit 1,5 % Glukose und 10 % fötalem Kälberserum (FCS; Gibco/BRL). Die Zellen wurden in Plastikschalen (Falcon) inkubiert und alle zwei bis drei Tage durch Trypsin-Behandlung gesplittet. Dazu wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit PBS gewaschen und mit 0,05 % Trypsin/EDTA (Flow) inkubiert, bis sich der Zellrasen ablöste und die Zellen keinen Kontakt mehr hatten. Die so

vereinzelt Zellen wurden 1 : 2 bis 1 : 10 verdünnt und mit frischem Medium auf neue Platten ausplattiert.

TRANSFEKTION MITTELS LIPOFECTAMIN (GIBCO,BRL)

Drei Tage vor der Transfektion wurden die Zellen gesplittet, so daß die Schalen 0,2 - 0,3 x 10⁵ Zellen pro Platte aufwies. Das entsprechende Promotorkonstrukt (1 µg) wurde entsprechend den Herstellerangaben transfiziert. Dabei mußten für die β-HC -13T und β-TC -1-B Zellen hohe Mengen (16-20 µl) und für die α-TC-1-9 und die cos-Zellen niedrige Mengen (4-8µl) Lipofectamin eingesetzt werden.

IV.3.22 IMMUNHISTOCHEMIE

EINBETTEN VON EMBRYONEN UND GEWEBEN IN PARAFFIN

Nach Präparation bzw. *lacZ*-Färbung wurden die Embryonen oder Gewebeteile über Nacht bei 4°C in 4% PFA/PBS fixiert, gründlich in kaltem PBS gewaschen und anschließend für jeweils 1 h bei Raumtemperatur in den folgenden Lösungen inkubiert: PBS, Saline, 50%, 70%-, 80%-, 90%-, 100%-, 100% Ethanol, 100% Toluol. Anschließend wurden die Embryonen 2 mal für jeweils 10-24 h bei 60°C in Paraplast überführt. Die Embryonen wurden auf einer Kühlplatte in Formen in Position gebracht, und diese mit Paraplast aufgefüllt. Die Blöcke wurden abgekühlt und bis zum Anfertigen histologischer Schnitte mit dem Mikrotom bei 4°C gelagert. Histologische Schnitte X-gal-gefärbter Objekte wurden in 6-8 µm Dicke angefertigt.

ANFERTIGEN VON GEFRIERSCHNITTEN

Embryonen wurden in eiskaltem PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte bei 4°C für 1-2h in 4% PFA/1X PBS. Die Embryonen wurden kurz in 30% Sukrose/PBS eingetaucht, in Kryomatrix (Shandon) überführt und auf Trockeneis in Blöcken mit festwerdenden Kryomatrix positioniert, die mit Blöcke Kryomatrix aufgefüllt und in Trockeneis abgekühlt. Die Blöcke wurden bis zum Anfertigen der Schnitte im Kryostat bei -20°C gelagert. Es wurden 10-15 µm Schnitte bei -

20°C angefertigt, auf gelatinisierten Objektträgern oder Fisher *cryofrost*-Objektträgern (Menzel Gläser) gesammelt, 20 Min. - 2 h bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur Antikörperinkubation bei -20°C gelagert.

IMMUNFÄRBUNG DER SCHNITTE:

Bei den Paraffinschnitten erfolgte zunächst die Entparaffinisierung durch jeweiliges Eintauchen der Objektträger für 2 bis 3 Min. in Xylolersatz (2X), 100%, 96%, 90%, 80%, 70%, 50% Ethanol, TBST pH8. Danach wurde folgendermaßen verfahren: Nach Auftragen von Blockierungsreagenz folgten 30 Min. Inkubation in einer feuchten Kammer. Es schloß sich Zugabe des im Verhältnis 1:200 bis 1:1000 in Blockierungsreagenz verdünnten primären Antikörpers (Kaninchen-anti-Insulin, Sigma) und Inkubation in feuchter Kammer über Nacht an. Nach dreimaligem Waschen der Schnitte für 10 Min. mit TBST wurde der zweite Antikörper zugegeben (Ziege-anti-Kaninchen) und wie der erste über Nacht inkubiert. Danach wurde wie zuvor mit TBST gewaschen. Bei Peroxidasefärbung schloß sich nun das Auftragen der Färbelösung an, die Färbeintensität wurde alle 10 Min. kontrolliert und bei ausreichender Intensität mit 5 Min. Eintauchen in PBS gestoppt. Die fertigen Schnitte wurden mit Mowiol eingedeckelt.

BLOCKIERUNGSLÖSUNG

2 ml Blockierungs-Stammlösung
20 ml FCS (Gibco)
78 ml Maleat-Puffer

BLOCKIERUNGS-STAMMLÖSUNG

20 g Blocking-Reagenz
(Boehringer)
200 ml Maleatpuffer

MALEATPUFFER

100 mM Maleinsäure
150 mM NaCl

FÄRBELÖSUNG

25 mg Diaminobenzidin in
0,5 ml DMSO lösen,
mit TBST auf 50 ml auffüllen,
33 µl Wasserstoffperoxid
zugeben

V. ZUSAMMENFASSUNG

Das zur *Pax*-Familie von Transkriptionsfaktoren gehörende Gen *Pax4* spielt eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von Insulin-produzierenden β -Zellen während der Pankreasentwicklung der Maus. In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, den funktionellen Promotor des *Pax4*-Gens auf einen genomischen Bereich von 254 Basen einzugrenzen. Innerhalb dieses Bereiches finden sich Erkennungsmotive für den *Homeo*-Box-Transkriptionsfaktor *Pdx1* (A2-Element), für das *Lim*-Domänen-Protein *Isl1* und für die bHLH-Transkriptionsfaktoren *ngn3* und *NeuroD* (E1-Element).

Die Deletion der cis-regulatorischen Elemente A2 und E1 führte zur Beeinträchtigung von *Pax4*-Expression und gab dadurch Hinweise auf die Bedeutung von *Pdx1*, *ngn3* und *NeuroD* für *Pax4*-Aktivität in der sich entwickelnden Bauchspeicheldrüse. Es konnte demonstriert werden, daß *Pdx1* für die frühe *Pax4*-Aktivität in pankreatischen Vorläuferzellen verantwortlich ist, während *ngn3* und/oder *NeuroD* - gemeinsam mit anderen das E1-Element regulierenden Proteinen - eine Verstärkung von *Pax4*-Expression hervorrufen können. Bei einer gleichzeitigen Deletion beider Elemente des *Pax4*-Promotors ist in der Mehrzahl der untersuchten Fälle keine *Pax4*-Expression im sich entwickelnden Mausembryo mehr nachweisbar. Basierend auf diesen Ergebnissen und im Einklang mit Expressions- und Knockout- Analysen pankreatischer Gene stellen sich *Pdx1*, *ngn3* und *Pax4* als Transkriptionsfaktoren dar, die durch ihre Aktivität in einer Zelle dieser die Identität einer spezifischen Vorläuferzelle verleihen. *Pdx1*-exprimierende Zellen repräsentieren dabei die endodermalen Vorläufer der Bauchspeicheldrüse, *ngn3* Aktivität markiert endokrine Vorläuferzellen und *Pax4* steht am Beginn der Entwicklung von β -, δ - und vermutlich auch PP-Zellen.

Der Transkriptionsstart von *Pax4* besitzt weder ein begleitendes TATA-, noch ein SP1-Motiv, sondern lediglich eine CAAT-ähnliche Sequenz. *Pax4*-Expression ist jedoch von diesem Transkriptionsstart unabhängig; der isolierte Promotor ist in der Lage eine alternative Initiation von Transkription zu vermitteln ohne dabei die Spezifität der Transkription zu beeinträchtigen.

Mit dem isolierten Promotorfragment gelang die Produktion einer transgenen Maus, die eine der *Pax4*-Expression identische, pankreatische Aktivität der *Cre*-Rekombinase ermöglicht.

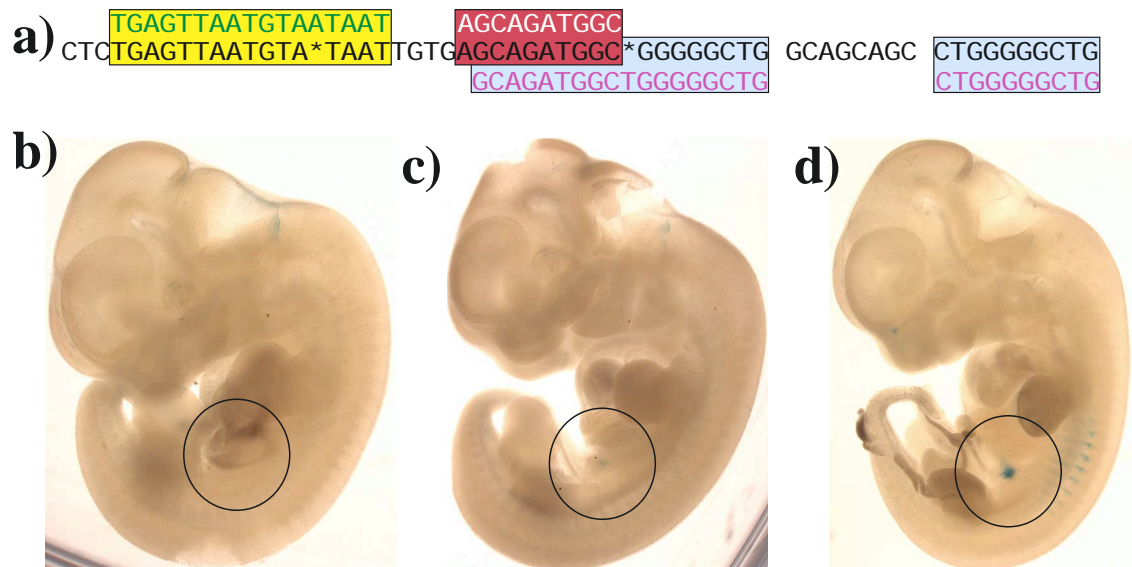


Abb. 55: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

In a) ist ein Teil der Sequenz des funktionellen *Pax4*-Promotors dargestellt (durchlaufende schwarze Sequenz). Die Kästen markieren die Bindemotive für *Pdx1* (A2-Element, gelb), *ngn3* bzw. *NeuroD* (E1-Element, rot) und die zum Insulinpromotor identischen Bereiche (violett). Die darunter abgebildeten E 11,5 - Mäuse repräsentieren die Expression nach der Deletion der entsprechenden Sequenzbereiche: Verlust der frühen Expression nach Deletion des A2-Elements (b), schwache Expression nach Deletion des E1-Elements (c) und normale Expression nach Deletion der violetten Bereiche (d).

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Adams, C. C. und Workman, J. L., 1993: Nucleosome displacement in transcription. *Cell* 72: 305-308.

Ahlgren, U., Jonsson, J., Jonsson, L., Simu, K. und Edlund, H., 1998: beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipfl/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev.* 12: 1763-1768.

Ahlgren, U., Pfaff, S. L., Jessel, T. M., Edlund, T. und Edlund, H., 1997: Independent requirement for *ISL1* in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature* 385: 257-260.

Amann, E., Brosius, J. und Ptashne, M., 1983: Vectors bearing a hybrid *trp-lac* promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene* 25: 167 f.

Andersen, F. G., Jensen, J., Heller, R. S., Petersen, H. V., Larsson, L. I., Madsen, O. D. und Serup, P., 1999: Pax6 and Pdx1 form a functional complex on the rat somatostatin gene upstream enhancer. *FEBS Lett.* 445: 315-320.

Anderson, W. F., 1998: Human Gene Therapy. *Nature*. 392(6679 Suppl S): 25-30.

Apelqvist, A., Ahlgren, U. und Edlund, H., 1997: *Sonic hedgehog* directs specialized mesoderm differentiation in the intestine and pancreas. *Curr. Biol.* 7: 801-804.

Apelqvist, A., Li, H., Sommer, L., Beatus, P., Anderson, D. J., Honjo, T., Hrabe de Angelis, M., Lendahl, U. und Edlund, H., 1999: Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature*. 400: 877-881.

Ashery-Padan, R. und Gruss, P., 2001: *Pax6* lights-up the way for eye development. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 13: 706-714.

Ashery-Padan, R., Marquardt, T., Zhou, X. und Gruss, P., 2000: *Pax6* activity in the lens primordium is required for lens formation and for correct placement of a single retina in the eye. *Genes Dev.* 14: 2701-2711.

Auerbach, R., 1954: Analysis of the developmental effects of a lethal mutation in the house mouse. *J. Exp. Zool.* 127: 305-329.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. und Struhl, K., 1987: Current protocols in molecular biology I+II. John Wiley & Sons, New York.

- Balczarek, K. A., Lai, Z. C. und Kumar, S., 1997:** Evolution of functional diversification of the *paired* box (Pax) DNA-binding domains. *Molecular Biology & Evolution* 14: 829-842.
- Barr, F. G., 2001:** Gene fusions involving *PAX* and *FOX* family members in alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene* 20: 5736-5746.
- Beato, M., 1989:** Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56: 335-344.
- Benezra, R., Davis, R. L., Lockshon, D., Turner, D. L. und Weintraub, H., 1990:** The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 61: 49-59
- Bielinska, A., Krasnow, S. und Nabel, G. J., 1989:** NF-kappa B-mediated activation of the human immunodeficiency virus enhancer: site of transcriptional initiation is independent of the TATA box. *Journal of Virology* 63: 4097-4100.
- Birnboim, H. C. und Doly, J., 1979:** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1512-1523.

- Blout, E. R., de Lozé, G., Bloom, S. M. und Fasman, G. D., 1960:** The dependence of the conformation of synthetic polypeptides on amino acid composition. *J. Amer. Chem. Soc.* 82: 3787-3789.
- Bopp, D., Burri, M., Baumgartner, S., Frigerio, G. und Noll, M., 1986:** Conservation of a large protein domain in the segmentation gene *paired* and in functionally related genes of *Drosophila*. *Cell* 47: 1033-1040.
- Bray S., 1998:** Notch signalling in *Drosophila*: three ways to use a pathway. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9: 591-957
- Breitling R. und Gerber J. K., 2000:** Origin of the *paired* domain. *Dev. Genes. Evol.* 210: 644-650.
- Brink, C., 1998:** Promotor-/Enhancerelemente des *Pax4*-Gens. Diplomarbeit.
- Brink, C., Chowdhury, K., und Gruss, P., 2001:** *Pax4* regulatory elements mediate β cell specific expression in the pancreas. *Mech. Dev.* 100: 37-43.
- Brocard, J, Feil R., Chambon, P. und Metzger, D., 1998:** A chimeric *Cre* recombinase inducible by synthetic, but not by natural ligands of the glucocorticoid receptor. *Nucleic Acids Res.* 26: 4086-4090.

- Callaerts P., Halder G. und Gehring W. J.**, 1997: *PAX-6* in development and evolution. *Annu. Rev. Neurosci.* 20: 483-532.
- Calvin, N. M. und Hanawalt, P. C.**, 1988: High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J. Bacteriol.* 170: 2796-2801
- Campbell, S. C., Cragg, H., Elrick, L. J., Macfarlane, W. M., Shennan, K. I. und Docherty, K.**, 1999: Inhibitory effect of *pax4* on the human insulin and islet amyloid polypeptide (IAPP) promoters. *FEBS Lett.*, 463: 53-57.
- Carcamo, J., Maldonado, E., Cortes, P., Ahn, M. H., Ha, I., Kasai, Y., Flint, J. und Reinberg, D.**, 1990: A TATA-like sequence located downstream of the transcription site is required for expression of an RNA polymerase II transcribed gene. *Genes & Development* 4: 1611-1622.
- Carty, M.D., Lillquist, J.S., Peshavaria, M., Stein, R. und Soeller, W.C.**, 1997: Identification of cis- and trans-active factors regulating human islet amyloid polypeptide gene expression in pancreatic β cells. *J. Biol. Chem.* 272: 11986-11993.
- Chen, R., Amoui, M., Zhang, Z. und Mardon, G.**, 1997: *Dachshund* and *eyes absent* proteins form a complex and function synergistically to induce ectopic eye development in *Drosophila*. *Cell* 91: 893-902.

Chien, A., Edgar, D. B. und Trela, J. M., 1976: Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. J. Bacteriol. 127: 1550f.

Child, C. M., 1941: Patterns and problems of development. Chicago.

Chomczynski, P., 1993: A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. Biotech. 15: 532-536.

Comai, L., Tanese, N. und Tjian, R., 1992: The TATA-binding protein and associated factors are integral components of the RNA polymerase I transcription factor, SL1. Cell 68: 965-976.

Crick, F. H. C., 1966: The genetic code III. Sci. Amer. 214/4: 55-62.

Czerny, T. und Busslinger, M., 1995: DNA-binding and transactivation properties of *Pax-6*: three amino acids in the *paired* domain are responsible for the different sequence recognition of *Pax-6* and BSAP (*Pax-5*). Mol. Cell. Biol. 15: 2858-2871.

Darnell, J., Lodish, H. und Baltimore, D., 1986: Molecular cell biology. Freeman, New York.

Dawid I. B., Toyama R. und Taira M., 1995: *LIM* domain proteins. C. R. Acad. Sci. III 318: 295-306

Davidson, E. H., 1991: Spatial mechanisms of gene regulation in metazoan embryos. *Development* 113: 1-26.

Demeterco, C. und Levine, F., 2001: Gene therapy for diabetes. *Frontiers in Bioscience*. 6: D175-D191.

Diamond, M. I., Miner, J. N., Yoshinaga, S. K., und Yamamoto, K. R., 1990: Transcription factor interactions: selectors of positive and negative regulation from a single DNA element. *Science* 249: 1266-1272.

Dohrmann, C., Gruss, P. und Lemaire, L., 2000: *Pax* genes and the differentiation of hormone-producing endocrine cells in the pancreas. *Mech. Dev.* 92: 47-54.

Dower, W. J., Miller, J. F. und Ragsdale, C. W., 1988: High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16: 6127f.

Dressler, G. R., Deutsch, U., Balling, R., Simon, D., Guénet, J.-L. und Gruss, P., 1988: Murine genes with homology to *Drosophila* segmentation genes. *Development* 104 (Supplement): 181-186.

Driesch, H., 1892: Der Werth der beiden ersten Furchungszellen in der Echinodermatenentwicklung. Experimentelle Erzeugung von Theil- und Doppelbildungen. Z. Wiss. Zool. 53: 160-178.

Dynan, W. S., 1989: Modularity in promoters and enhancers. Cell 58: 1-4.

Dynlacht, B. D., Hoey, T. und Tjian, R., 1991: Isolation of cofactors associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. Cell 66: 563-576.

Eberhard, D., Jimenez, G., Heavey, B. und Busslinger, M., 2000: Transcriptional repression by Pax5 (BSAP) through interaction with corepressors of the Groucho family. EMBO Journal. 19: 2292-2303.

Edlund, H., 1998: Transcribing pancreas. Diabetes 47: 1817-1823.

Feinberg, A. P. und Vogelstein, B., 1983: A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 132: 6-13.

Felsenfeld, G., 1992: Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. Nature 355: 219-224.

Flam, F., 1994: Hints of a language in junk DNA. *Science* 266: 1320.

Fujitani, Y., Kajimoto, Y., Yasuda, T., Matsuoka, T. A., Kaneto, H., Umayahara, Y., Fujita, N., Watada, H., Miyazaki, J. I., Yamasaki, Y. und Hori, M., 1999: Identification of a portable repression domain and an E1A-responsive activation domain in Pax4: a possible role of Pax4 as a transcriptional repressor in the pancreas. *Mol Cell Biol.* 19: 8281-8291.

Gehring, W.J., 1996: The master control gene for morphogenesis and evolution of the eye. *Genes Cells* 1:11-15.

German, M., Ashcroft, S., Docherty, K., Edlund, H., Edlund, T., Goodison, S., Imura, H., Kennedy, G., Madsen, O., Melloul, D., Moss, L., Olson, K., Permutt, M.A., Pilippe, J., Robertson, R.P., Rutter, W.J., Serup, P., Stein, R., Steiner, D., Tsai, M-J. und Walker, M.D., 1995: The insulin gene promoter. A simplified nomenclature. *Diabetes* 44: 1002-1004.

Gerrish, K. E., Cissell, M. A. und Stein, R., 2001: The role of hepatic nuclear factor 1a and PDX-1 in transcriptional regulation of the pdx-1 gene. *J. Biol. Chem.* im Druck.

Gittes, G.K. und Rutter, W.J., 1992: Onset of cell-specific gene expression in the developing mouse pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 1128-1132.

Glick, E., Leshkowitz, D. und Walker, M. D., 2000: Transcription factor BETA2 acts cooperatively with E2A and PDX1 to activate the insulin gene promoter. *J. Biol. Chem.* 275: 2199-2204.

Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M. und Guillemot, F., 2000: Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 1607-1611.

Grindley, J. C., Davidson, D. R. und Hill, R. E., 1995: The role of *Pax-6* in eye and nasal development. *Development* 121: 1433-1442.

Hanahan, D., 1983: Studies on Transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166: 557-580.

Hanahan, D., Jessee, J. und Bloom, F. R., 1991: Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods in Enzymology* 204: 63-113.

Hanahan, D. J., 1985: Techniques for transformation of *E.coli*. In: Glover, D. M. (Hrsg.): DNA cloning I, S. 109-135. Oxford: IRL Press.

Hann B und Balmain A., 2001: Building 'validated' mouse models of human cancer. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 13: 778-784

Harrison, R. G., 1933: Some difficulties of the determination problem. *Am. Nature* 67: 306-321.

Hebrok, M., Kim, S. K., St. Jacques, B., McMahon, A. P. und Melton, D. A., 2000: Regulation of pancreas development by hedgehog signaling. *Development* 127: 4905-4913.

Herr, W., Sturm, R. A., Clerc, R. G., Corcoran, L. M., Baltimore, D., Sharp, P. A., Ingraham, H. A., Rosenfeld, M. G., Finney, M., Ruvkun, G. und Horvitz, H. R., 1988: The *POU* domain: a large conserved region in the mammalian *Pit-1*, *Oct-1*, *Oct-2* and *Caenorhabditis elegans unc-86* gene products. *Genes Dev.* 2: 1513-1516.

Herrera, P. L., 2000: Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages. *Development*. 127:2317-2322.

Herrera, P. L., Huarte, J., Zufferey, R., Nichols, A., Mermillod, B., Philippe, J., Muniesa, P., Sanvito, F., Orci, L. und Vassalli, J. D., 1994: Ablation of islet endocrine cells by targeted expression of hormone-promoter-driven toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91: 12999-13003.

Hill, R. E., Favor, J., Hogan, B. L. M., Ton, C. C. T., Saunders, G. F., Hanson, I. M., Prosser, J., Jordan, T., Hastie, N. D. und van Heyningen, V., 1991: Mouse

Small eye results from mutations in a *paired*-like homeobox-containing gene. Nature 354: 522-525.

Hirsch, N. und Harris, W. A., 1997: *Xenopus Pax-6* and retinal development. J. Neurobiol. 32: 45-61.

Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F. und Lacy, E., 1994: Manipulating the mouse embryo. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Hörstadius, S., 1939: The mechanics of sea urchin development studied by operative methods. Biol. Rev. 14: 132-179.

Horwitz, J. P., Chua, J., Curby, R. J., Tomson, A. J., DaRooge, M. A., Fisher, B. E., Mauricio, J. und Klundt, I., 1964: Substrates for cytochemical demonstration of enzyme activity. I. Some substituted 3-indolyl- β -D-glycopyranosides. J. Mec. Chem. 7: 574 f.

Huang, H. P., Liu, M., El-Hodiri, H. M., Chu, K., Jamrich, M. und Tsai, M. J., 2000: Regulation of the pancreatic islet-specific gene *BETA2 (neuroD)* by *neurogenin 3*. Mol. Cell. Biol. 20: 3292-3307.

Huang, H. P. und Tsai, M. J., 2000: Transcription factors involved in pancreatic islet development. J. Biomed. Sci. 7: 27-34.

Inoue, H., Nomiya, J., Nakai, K., Matsutani, A., Tanizawa, Y. und Oka, Y., 1998: Isolation of full-length cDNA of mouse *PAX4* gene and identification of its human homologue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243: 628-633.

Jacob, F. und Monod, J., 1961: Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3: 318-356.

Jacquemin, P., Durviaux, S.M., Jensen, J., Godfraind, C., Gradwohl, G., Guillermot, F., Madsen, O.D., Carmeliet, P., Dewerchin, M., Collen, D., Rousseau, G.G. und Lemaigre, F.P., 2000: Transcription factor hepatocyte nuclear factor 6 regulates pancreatic endocrine cell differentiation and controls expression of the proendocrine gene *ngn3*. *Mol. Cell. Biol.* 20: 4445-4454.

Jensen, J., Heller, R. S., Funder-Nielsen, T., Pedersen, E. E., Lindsay, C., Weinmaster, G., Madsen, O. D. und Serup, P., 2000: Independent development of pancreatic alpha- and beta-cells from neurogenin3-expressing precursors: a role for the notch pathway in repression of premature differentiation. *Diabetes.* 49: 163-176.

Jensen, J., Pedersen, E.E., Galante, P., Hald, J., Heller, R.S., Ishibashi, M., Kageyama, R., Guillemot, F., Serup, P. und Madsen, O.D., 2000: Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nature Genet.* 24: 36-44.

- Johnson, P. F. und McKnight, S. L.**, 1989: Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. Annual Review of Biochemistry 58: 799-839.
- Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T. und Edlund, H.**, 1994: Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. Nature 371: 606-609.
- Jorgensen, M. C., Vestergaard Petersen, H., Ericson, J., Madsen, O. D. und Serup, P.**, 1999: Cloning and DNA-binding properties of the rat pancreatic beta-cell-specific factor Nkx6.1. FEBS Lett. 461: 287-294.
- Kadonaga, J. T., Courey, A. J., Ladika, J. und Tjian, R.**, 1988: Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation. Science 242: 1566-1570.
- Kalousová, A., Benes, V., Paces, J., Paces, V. und Kozmik, Z.**, 1999: DNA binding and transactivating properties of the *paired* and homeobox protein *Pax4*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 259: 510-518.
- Kammandel, B., Chowdhury K, Stoykova A, Aparicio S, Brenner S. und Gruss, P.**, 1999: Distinct cis-essential modules direct the time-space pattern of the *Pax6* gene activity. Dev. Biol. 205: 79-97
- Kappen, C. und Ruddle, F. H.**, 1993: Evolution of a regulatory gene family: HOM/HOX genes. Curr. Opin. Genet. Dev. 3: 931-938.

Kaptejn, R., 1992: Zinc-finger structures. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2: 109-115.

Karlsson, O., Thor, S., Norberg, T., Ohlsson, H. und Edlund, T., 1990: Insulin gene enhancer binding protein *Isl-1* is a member of a novel class of proteins containing both a homeodomain and a Cys-His domain. *Nature* 344: 879-883.

Kaufmann, E. und Knöchel, W., 1996: Five years on the wings of *fork head*. *Mech. Dev.* 57: 3-20.

Kessel, M., 1992: Respecification of vertebral identities by retinoic acid. *Development* 115: 487-501.

Kim Y. und Nirenberg M., 1989: *Drosophila* NK-homeobox genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 86: 7716-7720.

Kim, S.K., Hebrok, M. und Melton D.A., 1997: Notochord to endoderm signaling is required for pancreas development. *Development* 124: 4243-4252.

Klenow, H. und Hennigsen, I., 1970: Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* B by limited proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 65: 168f.

Kollmar, R. und Farnham, P. J., 1993: Site-specific initiation of transcription by RNA polymerase II. *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine* 203: 127-139.

Koshland, D. E. jr., 1973: Protein shape and biological control. *Sci. Amer.* 229/4: 52-64.

Krakowski, M., Yeung, B., Abdelmalik, R., Good, A., Mocnik, L., Sosa-Pineda, B., St-Onge, L., Gruss, P. und Sarvetnick, N., 2000: IFN- γ overexpression within the pancreas is not sufficient to rescue *Pax4*, *Pax6*, and *Pdx-1* mutant mice from death. *Pancreas* 21: 399-406.

Kritzik, M. R., Krahl, T., Good, A., Krakowski, M., St-Onge, L., Gruss, P., Wright, C. und Sarvetnick, N., 2000: Transcription factor expression during pancreatic islet regeneration. *Mol. Cell. Endocrinol.* 164: 99-107.

Krumlauf, R., 1993: *Hox* genes and the pattern formation in the branchial region of the vertebrate head. *Trends Genet.* 9: 106-111.

Kumar, V., Green, S., Stack, G., Berry, M., Jin, J.-R., und Chambon, P., 1987: Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 51: 941-951.

- Kundu S., Bandyopadhyay D. und Thakur A. R.**, 2001: Sequence-based structural signatures of genome evolution. *Indian J. Biochem. Biophys.* 38: 104-106.
- Lammert, E., Brown, J. und Melton, D.A.**, 2000: Notch gene expression during pancreatic organogenesis. *Mech. Dev.* 94: 199-203.
- Landschultz, W. H., Johnson, P. F. und McKnight, S. L.**, 1988: The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA-binding proteins. *Science* 245: 635-637.
- Lannoy V. J., Burglin T. R., Rousseau G. G. und Lemaigre F. P.**, 1998: Isoforms of hepatocyte nuclear factor-6 differ in DNA-binding properties, contain a bifunctional homeodomain, and define the new *ONECUT* class of homeodomain proteins. *J. Biol. Chem.* 273: 13552-13562.
- Larsson, L. I., St-Onge, L., Hougaard, D. M., Sosa-Pineda, B. und Gruss, P.**, 1998: *Pax 4* and 6 regulate gastrointestinal endocrine cell development. *Mech. Dev.* 79: 153-159.
- Lee, J. C., Smith, S. B., Watada, H., Lin, J., Scheel, D., Wang, J., Mirmira, R. G. und German, M. S.**, 2001: Regulation of the pancreatic pro-endocrine gene neurogenin3. *Diabetes.* 50: 928-936.

Lewis, E. B., 1978: A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*.
Nature 276: 565-570.

Liu, Y., MacDonald, R. J. und Swift, G. H., 2001: DNA binding and transcriptional activation by a PDX1.PBX1b.MEIS2b trimer and cooperation with a pancreas-specific basic helix-loop-helix complex. J. Biol. Chem. 276: 17985-17993.

Macfarlane, W. M., Campbell, S. C., Elrick, L. J., Oates, V., Bermano, G., Lindley, K. J., Aynsley-Green, A., Dunne, M. J., James, R. F. und Docherty, K., 2000: Glucose regulates islet amyloid polypeptide gene transcription in a PDX1- and calcium-dependent manner. J. Biol. Chem. 275: 15330-15335.

Mansouri A., Chowdhury K. und Gruss P., 1998: Follicular cells of the thyroid gland require *Pax8* gene function. Nat. Genet. 19: 87-90.

Mansouri, A., Goudreau, G. und Gruss, P., 1999: *Pax* genes and their role in organogenesis. Cancer Res. 59(7 Suppl): 1707s-1709s.

Mansouri A., Hallonet M. und Gruss P., 1996: *Pax* genes and their roles in cell differentiation and development. Curr. Opin. Cell. Biol. 8: 851-857.

Mansouri, A., St-Onge, L. und Gruss, P., 1999: Role of *Pax* genes in endoderm-derived organs. Trends Endocrinol. Metab. 10: 164-167.

Mansouri A., Stoykova A. und Gruss P., 1994: *Pax* genes in development. J. Cell. Sci. Suppl. 18: 35-42.

Marmur, J., 1960: A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. J. Mol. Biol. 3: 208-218

Marquardt, T., Ashery-Padan, R., Andrejewski, N., Scardigli, R., Guillemot, F. und Gruss, P., 2001: *Pax6* is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. Cell 105: 43-55.

Marx, J., 1992: Taking a direct path to the genes. Science 257: 744-745.

Matsushita, T., Yamaoka, T., Otsuka, S., Moritani, M., Matsumoto, T. und Itakura, M., 1998: Molecular cloning of mouse *paired*-box-containing gene (*Pax*)-4 from an islet β cell line and deduced sequence of human *Pax-4*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 242: 176-180.

Maulbecker, C. C. und Gruss, P., 1993: The oncogenic potential of *Pax* genes. EMBO J. 12: 2361-2367.

McGinnis, W., Garber, R. L., Wirz, J., Kuroiwa, A. und Gehring, W. J., 1984: A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell*. 37: 403-408.

McGinnis, W., Levine, M. S., Hafen, E., Kuroiwa, A. und Gehring, W. J., 1984: A conserved DNA sequence in homeotic genes of the *Drosophila antennapedia* and *bithorax* complexes. *Nature* 308: 428-433.

Mirmira, R. G., Watada, H. und German, M. S., 2000: β -cell differentiation factor *Nkx6.1* contains distinct DNA binding interference and transcriptional repression domains. *J. Biol. Chem.* 275: 14743-14751.

McMahon, A. P., 2000: Neural patterning: the role of *Nkx* genes in the ventral spinal cord. *Genes Dev.* 14: 2261-2264

Miller, C. P., McGehee, R. E. und Habener, J. F., 1994: *IDX-1*: a new homeodomain transcription factor expressed in rat pancreatic islets and duodenum that transactivates the somatostatin gene. *EMBO J.* 13: 1145-1156.

Moldave, K., 1985: Eukaryotic protein synthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 1109-1149

Müller, M., Affolter, M., Leupin, W., Otting, G., Wüthrich, K. und Gehring, W. J., 1988: Isolation and sequence-specific DNA binding of the Antennapedia homeodomain. *EMBO J.* 7: 4299-4304

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H., 1986: Specific enzymatic amplification of DNA *in-vitro*: the polymerase chain reaction. *Nature* 292: 635-638.

Murre, C., McCaw, P. S., Vaessin, H., Caudy, M., Yan, L. Y., Yan, Y. N., Cabrera, C. V., Buskin, J. N., Hauschka, S. D., Lassar, A. B., Weintraub, H. und Baltimore, D., 1989: Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58: 537-544.

Mutoh, H., Fung, B. P., Naya, F. J., Tsai, M. J., Nishitani, J. und Leiter, A. B., 1997: The basic helix-loop-helix transcription factor *BETA2/NeuroD* is expressed in mammalian enteroendocrine cells and activates secretin gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94: 3560-3564.

Naya, F.J., Huang, H.P., Qiu, Y., Mutoh, H., DeMayo, F.J., Leiter, A.B. und Tsai, M.J., 1997: Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in *BETA2/NeuroD*-deficient mice. *Genes Dev.* 11: 2323-2334.

Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y. und Hofschneider, P. H., 1982:
Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields.
EMBO J. 1: 841-845.

Noll M., 1993: Evolution and role of Pax genes. Curr. Opin. Genet. Dev. 3: 595-605.

Nüsslein-Volhard, C., Frohnhofer, H. G. und Lehmann, R., 1987:
Determination of anterioposterior polarity in *Drosophila*. Science 238: 1675-1681.

O'Shea-Greenfield, A. und Smale, S. T., 1992: Roles of TATA and initiator elements in determining the start site location and direction of RNA polymerase II transcription. Journal of Biological Chemistry 26: 6450.

Offield, M.F., Jetton, T.L., Labosky, P.A., Ray, M., Stein, R.W., Magnuson, M.A., Hogan, B.L.M. und Wright, C.V.E., 1996: *Pdx-1* is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. Development 122: 983-996.

Ohlsson, H., Karlsson, K. und Edlund, T., 1993: *IPF1*, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. EMBO J. 13: 1145-1158.

- Ohlsson, H., Thor, S. und Edlund, T.**, 1991: Novel insulin promoter- and enhancer-binding proteins that discriminate between pancreatic α - and β -cells. *Molecular Endocrinology* 5: 897-904.
- Okayama, H. und Berg, P.**, 1982: High-efficiency cloning of full-length cDNA. *Mol. Cell. Biol.* 2: 161-170.
- Oliver, G. und Gruss, P.**, 1997: Current views on eye development. *Trends Neurosci.* 20: 415-421.
- O'Shea-Greenfield, A. und Smale, S.T.**, 1992: Roles of TATA and initiator elements in determining the start site location and direction of RNA polymerase II transcription. *J. Biol. Chem.* 267: 1391-1402.
- Pabo, C. O. und Sauer, R. T.**, 1992: Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 1053-1095.
- Peters, H., Neubuser, A., Kratochwil, K., und Balling R.**, 1998: *Pax9*-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev.* 12: 2735-2747.
- Petersen, H. V., Jorgensen, M. C., Andersen, F. G., Jensen, J., F-Nielsen, T., Jorgensen, R., Madsen, O. D. und Serup, P.**, 2000: *Pax4* represses pancreatic glucagon gene expression. *Mol. Cell. Biol. Res. Commun.* 3: 249-254.

- Plaza, S., Saule, S. und Dozier, C.**, 1999: High conservation of cis-regulatory elements between quail and human for the *Pax-6* gene. *Dev. Genes. Evol.* 209: 165-173.
- Pugh, B. F. und Tjian, R.**, 1991: Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex. *Genes Dev.* 5: 1935-1944.
- Qiu, Y., Sharma, A. und Stein, R.**, 1998: p300 mediates transcriptional stimulation by the basic helix-loop-helix activators of the insulin gene. *Mol. Cell. Biol.* 18: 2957-2964.
- Quinn, J.C., West, J.D. und Hill, R.E.**, 1996: Multiple functions for *Pax6* in mouse eye and nasal development. *Genes Dev.* 10: 435-446.
- Quiring, R., Walldorf, U., Kloter, U. und Gehring, W. J.**, 1994: Homology of the *eyeless* gene of *Drosophila* to the *Small eye* gene in mice and *Aniridia* in humans. *Science* 265: 785-789.
- Rajewsky, K., Gu, H., Kuhn, R., Betz, U. A., Muller, W., Roes, J. und Schwenk, F.**, 1996: Conditional gene targeting. *J. Clin. Invest.* 98: 600-603.

Rigaud, G., Roux, J., Pictet, R. und Grange, T., 1991: In vivo footprinting of rat TAT gene: dynamic interplay between glucocorticoid receptor and a liver-specific factor. *Cell* 67: 977-986.

Robinson, G. L., Cordle, S. R., Henderson, E., Weil, P. A., Teitelman, G. und Stein, R., 1994: Isolation and characterization of a novel transcription factor that binds to and activates insulin control element-mediated expression. *Mol. Cell. Biol.* 14: 6704-6714.

Rosenberg, U. B., Schröder, C., Preiss, A., Kienlin, A., Côté, S., Riede, I. und Jäckle, H., 1986: Structural homology of the *Drosophila Krüppel* gene with *Xenopus* transcription factor IIIA. *Nature* 319: 336-339.

Roux, W., 1888: Beiträge zur Entwicklungsmechanik des Embryo. V. Über die künstliche Hervorbringung "halber" Embryonen durch Zerstörung einer der beiden ersten Furchungszellen, sowie über die Nachentwicklung (Postgeneration) der fehlenden Körperhälfte. *Virchows Arch.* 114: 419-521.

Roy, S., Qiao, T., Wolff, C. und Ingham, P. W., 2001: Hedgehog signaling pathway is essential for pancreas specification in the zebrafish embryo. *Curr. Biol.* 11: 1358-1363.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A., 1988: Primer directed enzymatic

amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-494.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T., 1989: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2 Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory.

Sanchez-Garcia I. und Rabbitts T. H., 1994: The *LIM* domain: a new structural motif found in zinc-finger-like proteins. *Trends Genet.* 10: 315-320.

Sander, M., Sussel, L., Connors, J., Scheel, D., Kalamaras, J., Dela Cruz, F., Schwitzgebel, V., Hayes-Jordan, A. und German, M., 2000: Homeobox gene *Nkx6.1* lies downstream of *Nkx2.2* in the major pathway of β -cell formation in the pancreas. *Development* 127: 5533-5540.

Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R., 1977: DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.

Sarris, A. und Ford, R., 1999: Recent advances in the molecular pathogenesis of lymphomas. *Curr. Opin. Oncol.* 11: 351-363.

Saxén, L. und Toivonen, S., 1962: *Embryonic induction*. Prentice hall, Englewood cliffs, NJ.

- Schubert, F. R., Nieselt-Struwe, K. und Gruss, P., 1993:** The Antennapedia-type homeobox genes have evolved from three precursors separated early in metazoan evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 143-147.
- Schughart, K., Kappen, C. und Ruddle, F. H., 1988:** Mammalian homeobox-containing genes: genome organization, structure, expression and evolution. British Journal of Cancer -Supplement. 9: 9-13.
- Scott, M. P., Tamkun, J. W. und Hartzell, G. W., 1989:** The structure and function of the homeodomain. Biochim. Biophys. Acta 989: 25-48.
- Scott, M. P. und Weiner, A. J., 1984:** Structural relationships among genes that control development: sequence homology between the *antennapedia*, *ultrabithorax* and *fushi tarazu* loci of *Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 4115-4119.
- Sharma, A., Henderson, E., Gamer, L., Zhuang, Y. und Stein, R., 1997:** Analysis of the role of E2A-encoded proteins in insulin gene transcription. Mol. Endocrinol. 11: 1608-1617.
- Sharma, A., Moore, M., Marcora, E., Lee, J. E., Qiu, Y., Samaras, S. und Stein, R., 1999:** The *NeuroD1/BETA2* sequences essential for insulin gene transcription colocalize with those necessary for neurogenesis and p300/CREB binding protein binding. Mol. Cell. Biol. 19: 704-713.

Sharp, P. A., 1986: On the origin of RNA splicing and introns. *Cell* 42: 397-400.

Shelton, C. A. und Wasserman, S. A., 1993: Pelle encodes a protein kinase required to establish dorsoventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* 72: 515-525.

Slack, J. M. W., 1991: From egg to embryo. Regional specification in early development. Cambridge: Cambridge University Press.

Slack, J. M. W., 1995: Developmental biology of the pancreas. *Development* 121: 1569-1580.

Smale, S.T., 2001: Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation. *Genes Dev.* 15: 2503-2508.

Smale, S. T. und Baltimore, D., 1989: The "initiator" as a transcription control element. *Cell* 57: 103-113.

Smith, S.B., EE, H.C., Conners, J.R. und German, M.S., 1999: *Paired*-homeodomain transcription factor *PAX4* acts as a transcriptional repressor in early pancreatic development. *Mol. Cell. Biol.* 19: 8272-8280.

Smith, S.B., Watada, H., Scheel, D.W., Mrejen, C. und German, M.S., 2000:
Autoregulation and MODY transcription factors control the human *PAX4*
promoter. J Biol Chem. 275: 36910-36919.

Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Torres, M., Oliver, G. und Gruss, P., 1997:
The *Pax4* Gene is essential for Differentiation of Insulin-Producing β -Cells in
the Mammalian Pancreas. Nature 386: 399-402.

Southern, E. M., 1975: Detection of specific sequences among DNA fragments
separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517.

Spemann, H. und Mangold, H., 1924: Über die Induktion von Embryoanlagen
durch Implantation artfremder Organisatoren. Roux Arch. Entwicklunsmech.
100: 599-638.

Stanojevic, D., Small, S. und Levine, M., 1991: Regulation of a segmentation
stripe by overlapping activators and repressors in the *Drosophila* embryo.
Science 254:1385-1387.

Stanojevic, D., Hoey, T. und Levine, M., 1989: Sequence-specific DNA-binding
activities of the gap proteins encoded by *hunchback* and *Krüppel* in *Drosophila*.
Nature 341: 331-335.

- St.Onge, L., Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Mansouri, A. und Gruss, P.,** 1997: *Pax6* is required for differentiation of glucagon-producing α -cells in mouse pancreas. *Nature* 387: 406-409.
- Stoykova, A., Fritsch, R., Walther, C. und Gruss, P.,** 1996: Forebrain patterning defects in *Small eye* mutant mice. *Development* 122: 3453-3465.
- Stoykova, A. und Gruss, P.,** 1994: Roles of *Pax*-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns. *J. Neurosci.* 14: 1395-1412.
- Strome, S. und Wood, W. B.,** 1983: Generation of asymmetry and segregation of germlike granules in early *Caenorhabditis elegans* embryos. *Cell* 35: 15-25.
- Struhl K.,** 1989: Helix-turn-helix, zinc-finger, and leucine-zipper motifs for eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Trends Biochem. Sci.* 14: 137-140.
- Struhl, G., Struhl, K. und MacDonald, P.,** 1989: The gradient morphogen *bicoid* is a concentration-dependent transcriptional activator. *Cell* 57: 1259-1273.
- Sun, H., Rodin, A., Zhou, Y., Dickinson, D. P., Harper, D. E., Hewett-Emmett, D. und Li, W. H.,** 1997: Evolution of *paired*-domains: isolation and sequencing of jellyfish and hydra *Pax* genes related to *Pax5* and *Pax6*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94: 5156-5161.

Sussel, L., Kalamaras, J., Hartigan-O'Connor, D.J., Meneses, J.J., Pedersen, R.A., Rubenstein, J.L.R. und German, M.S., 1998: Mice lacking the homeodomain transcription factor *Nkx2.2* have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic β cells. *Development* 125: 2213-2221.

Taketo, A., 1988: Sensitivity of *Escherichia coli* to viral nucleic acid. 17. DNA transfection of *Escherichia coli* by electroporation. *Biochim. Biophys. Acta* 949: 318f.

Teitelman, G., Alpert, S., Polak, J. M., Martinez, A. und Hanahan, D., 1993: Precursor cells of mouse endocrine pancreas coexpress insulin, glucagon and the neuronal proteins tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y, but not pancreatic polypeptide. *Development*. 118: 1031-1039.

Ueda Y., 2000: Activin A increases Pax4 gene expression in pancreatic beta cell lines. *FEBS Lett.* 480: 101-105.

Underhill D. A., 2000: Genetic and biochemical diversity in the *Pax* gene family. *Biochem. Cell. Biol.* 78: 629-638.

Upchurch, B. H., Aponte, G. W. und Leiter, A. B., 1994: Expression of peptide YY in all four islet cell types in the developing mouse pancreas suggests a common peptide YY-producing progenitor. *Development*. 120: 245-252.

- Vallejo, M., PENCHUK, L. und HABENER, J. F.**, 1992: Somatostatin gene upstream enhancer element activated by a protein complex consisting of *CREB*, *Isl-1*-like and α -*CBF*-like transcription factors. *Journal of Biological Chemistry* 267: 12876-12884.
- Venter, C. und andere**, 2001: The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351.
- Wakayama, T., Perry, A. C., Zuccotti, M., Johnson, K. R. und Yanagimachi, R.**, 1998: Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*. 394: 369-374.
- Walther, C., Guénet, J-L., Simon, D., Deutsch, U., Jostes, B., Goulding, M., Plachov, D., Balling, R. und Gruss, P.**, 1991: Pax: a murine multigene family of *paired* box containing genes. *Genomics* 11: 424-434.
- Wang, H., Maechler, P., Ritz-Laser, B., Hagenfeldt, K. A., Ishihara, H., Philippe, J. und Wollheim, C.B.**, 2001: *Pdx1* level defines pancreatic gene expression pattern and cell lineage differentiation. *J. Biol. Chem.* 276: 25279-25286
- Watada, H., Kajimoto, Y., Kaneto, H., Matsuoka, T., Fujitani, Y., Miyazaki, J. und Yamasaki, Y.**, 1996: Involvement of the homeodomain-containing

transcription factor *PDX-1* in islet amyloid polypeptide gene transcription. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 229: 746-751.

Watada, H., Mirmira, R. G., Leung, J. und German, M. S., 2000: Transcriptional and translational regulation of beta-cell differentiation factor Nkx6.1. *J. Biol. Chem.* 275: 34224-34230.

Wehr, R. und Gruss, P., 1996: *Pax* and vertebrate development. *International Journal of Developmental Biology.* 40: 369-377.

Whelan, J., Poon, D., Weil, P. A. und Stein, R., 1989: Pancreatic beta-cell-type-specific expression of the rat insulin II gene is controlled by positive and negative cellular transcriptional elements. *Mol. Cell. Biol.* 9: 3253-3259.

Wilder PJ, Desler MM, Nowling TK und Rizzino A., 2001: Isolation and characterization of the murine transforming growth factor- β 2 promoter. *Gene* 270: 201-209

Wilkins, A. S., 1993: Genetic analysis of animal development. Wiley-Liss, New York, zweite Ausgabe.

Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. und Campbell, K. H. S., 1997: Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 818-813.

Wolpert, L., 1971: Positional information and pattern formation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 6: 183-224

Wu, K. L., Gannon, M., Peshavaria, M., Offield, M. F., Henderson, E., Ray, M., Marks, A., Gamer, L. W., Wright, C. V. und Stein, R., 1997: Hepatocyte nuclear factor 3 β is involved in pancreatic β -cell-specific transcription of the *pdx-1* gene. *Mol. Cell. Biol.* 17: 6002-6013.

Xu, W., Murphy, L. J., 2000: Cloning of the mouse *Pax4* gene promoter and identification of a pancreatic β -cell specific enhancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* 170: 79-89.

Xu, H. E., Rould, M. A., Xu, W., Epstein, J. A., Maas, R. L. und Pabo, C. O., 1999: Crystal structure of the human *Pax6* paired domain-DNA complex reveals specific roles for the linker region and carboxy-terminal subdomain in DNA binding. *Genes Dev.* 13: 1263-1275.

Yamaoka, T. und Itakura, M., 1999: Development of pancreatic islets. *Int. J. Mol. Med.* 3: 247-261.

Zenzie-Gregory, B., Khachi, A., Garraway, I. P. und Smale, S. T., 1993: Mechanism of initiator-mediated transcription: evidence for a functional

interaction between the TATA-binding protein and DNA in the absence of a specific recognition sequence. *Molecular & Cellular Biology* 13: 3841-3849.

Zenzie-Gregory, B., O'Shea-Greenfield, A. und Smale, S. T., 1992: Similar mechanisms for transcription initiation mediated through a TATA box or an initiator element. *Journal of Biological Chemistry* 267: 2823-2830.

Zernicka-Goetz, M., Pines, J., McLean Hunter, S., Dixon, J. P., Siemering, K. R., Haseloff, J. und Evans, M. J., 1997: Following cell fate in the living mouse embryo. *Development*. 124: 1133-1137.

Ziman, M. R. und Kay, P. H., 1998: A conserved TN8TCCT motif in the octapeptide-encoding region of Pax genes which has the potential to direct cytosine methylation. *Gene*. 223: 303-308.

Zhang, Y. Q., Mashima, H. und Kojima, I., 2001: Changes in the expression of transcription factors in pancreatic AR42J cells during differentiation into insulin-producing cells. *Diabetes* 50 Suppl. 1: S10-14.

VII. ANHANG

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle steht dabei Herr Prof. Dr. Peter Gruss, der mir die Möglichkeit, dieses interessante Thema zu bearbeiten, eröffnet hat und mir während meiner Doktorarbeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Ebenso gilt mein besonderer Dank Frau Prof. Dr. Mireille Schäfer für ihre Anregungen, die moralische Unterstützung und die Begutachtung meiner Arbeit.

Dr. Kamal Chowdhury unterwies mich in den Grundfertigkeiten der Molekularbiologie und beteiligte sich tatkräftig am Gelingen unserer gemeinsamen Publikation, wofür ich ihm herzlich danke.

Ulrich Franke führte mich in die Technik der Mikroinjektion ein und ist an der Produktion der großen Anzahl der notwendigen Mauslinien maßgeblich beteiligt.

Dr. Xunlei Zhou, Dr. Luc St.Onge und Dr. Beatriz Sosa-Pineda danke ich für die Überlassung von Maus-und DNS-Material.

Ich danke Dr. Ahmed Mansouri und meinem Labor, Armin Zülch, Maria Belaoussoff, Nicole Andrejewski und Dr. Guy Goudreau für Anregungen und Diskussionen.

Und auch meiner Familie möchte ich für den Rückhalt während dieser Zeit herzlich danken.

ABKÜRZUNGEN, BEGRIFFE UND SYMBOLE

%	Prozent
Abb.	Abbildung
ad	Auffüllen bis zu (Vol.)
Allel	Zustandsform eines Gens
ATP	Adenosintriphosphat
β-Gal	β-Galaktosidase
Blotting	DNS-Übertragung (auf Membranen)
bzw.	Beziehungsweise
c	Centi (10 ⁻²)
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
cDNS	Komplementäre DNS
CH ₃ COOH	Essigsäure
Ci	Curie, Maßeinheit für Radioaktivität
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cpm	Zählerimpulse pro Minute
Cre	"loxP"-DNS-Sequenzen erkennende Rekombinase
CTP	Cytidintriphosphat
d	Desoxy-
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ds	Doppelsträngig
DTT	1,4 Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
el.	Elektrisch

ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
et al.	.. und Mitarbeiter
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCl	Hydrochlorid (Salzsäure)
H ₂ O	Wasser
IPTG	Isopropyl-thio-β-D-Galaktopyranosid
IRES	Interne ribosomale Verstärkerstelle
J	Joule, Maßeinheit für Energie
KAc	Kaliumacetat, KCH ₃ COO
kb	Kilobasen, 1000 Basenpaare
KCl	Kaliumchlorid
Knockout	Kompletter Verlust von Genaktivität
l	Liter
lacZ	β-Galaktosidase - Gen
λ	Lambda Phage
LB	Luria-Bertani (Medium)
m	1) milli (10 ⁻³) 2) Meter
M	Molar, Mol pro Liter
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
MCS	DNS-Bereich mit vielen Schnittstellen
MgCl	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
Min.	Minuten
n	Nano (10 ⁻⁹)
N	Kennzeichnung für beliebige Basen
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat

Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
nt	Nukleotide
OD ₂₆₀	Optische Dichte bei λ=260 nm
p	Pico (10 ⁻¹²)
³² P	Phosphorisotop, Molgewicht 32g
p.a.	Zur Analyse
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
p.c.	Post coitum
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	Negativer Zehnerlogarithmus der Protonenkonzentration
Primer	Komplementäres Oligonukleotid
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunden
SSC	NaCl/NaCitratlösung
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	In H ₂ O gelöstes Tris mit HCl auf den angegebenen pH-Wert eingestellt
TTP	Thymidintriphosphat
U	Einheit für Enzymaktivität
UV	Ultraviolett
V	Volt, Maßeinheit für el. Spannung
Vol.	Volumen
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D- galaktosid

PUBLIKATIONEN

Christopher Brink, 1998: Promotor-/Enhancerelemente des *Pax4*-Gens. Diplomarbeit.

Christopher Brink, Kamal Chowdhury und Peter Gruss, 2001: *Pax4* regulatory Elements mediate β -cell specific expression in the pancreas. *Mech. Dev.* 100: 37-43.

LEBENS LAUF

Adresse

Privat: Obere Straße 4
37120 Bovenden
Tel.: 05594/606

Dienst: Max-Planck-Institut
für biophysikalische Chemie
Abteilung für molekulare Zellbiologie
Am Faßberg 11
37077 Göttingen
Tel.: 0551/201 1703
Fax: 0551/201 1504
e-mail: cbrink@gwdg.de

Persönliche Daten

Name	Christopher Brink
Geburt	08.10.1970 in Wolfenbüttel
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet, keine Kinder

Ausbildung

1998-2001	Doktorarbeit im Labor von Prof. Dr. P. Gruss
1992-1998	Biologiestudium an der Georg-August-Universität
1990-1992	Bundeswehr, Ausbildung zum Reserveoffizier
Mai 1990	Allgemeine Hochschulreife, Albert Einstein Gymnasium, Hameln