

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit habe ich die Rolle des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors *Insm1* bei der Differenzierung der endokrinen Zellen des Pankreas *in vivo* untersucht. Ich erzeugte dafür einen neuen Mausstamm mit einer Nullmutation von *Insm1*. In diesem mutierten Allel ist die kodierende Sequenz von *Insm1* deletiert und stattdessen wird das Reportergen *lacZ* unter der Kontrolle des *Insm1*-Promotors exprimiert. Die Verpaarung heterozygoter Kontrolltiere ergab homozygote *Insm1*-mutante Tiere, deren Phänotyp ich analysierte.

4.1 *Insm1*-Expression in endokrinen Zellen des Pankreas

Ich untersuchte die Expression von *Insm1* im Pankreas während der Embryogenese und in erwachsenen Tieren. Ich beobachtete *Insm1*⁺ Zellen bereits früh in der Entwicklung verstreut im Pankreasepithel. Die Vorläufer der endokrinen Zellen sind ähnlich verteilt und exprimieren den Transkriptionsfaktor *Ngn3*, der essentiell für ihre Entwicklung ist (Gradwohl et al., 2000; Gu et al., 2002). Ich konnte zeigen, dass *Ngn3*⁺ Zellen *Insm1* produzieren, d. h. endokrine Vorläuferzellen exprimieren *Insm1*. Ich beobachtete auch *Ngn3*⁻ Zellen im Pankreas, die *Insm1* ausprägen und untersuchte deshalb sich entwickelnde endokrine Zellen. Die Transkriptionsfaktoren *NeuroD1* und *Isl1* werden in postmitotischen endokrinen Zellen ausgeprägt (Ahlgren et al., 1997; Jensen et al., 2000a; Naya et al., 1997) und ich konnte *Insm1* in *NeuroD1*⁺ und *Isl1*⁺ Zellen nachweisen. *Insm1* war auch in terminal differenzierten, Hormon-produzierenden Zellen während der Embryogenese und im adulten Tier vorhanden. *Insm1* wird also erstmals in endokrinen Vorläuferzellen exprimiert und persistiert in sich entwickelnden und reifen endokrinen Zellen. Eine Analyse der verschiedenen endokrinen Subtypen ergab, dass *Insm1* in α - (*Glukagon*⁺), β - (*Insulin*⁺), δ - (*Somatostatin*⁺), PP- (*PP*⁺) und ϵ -Zellen (*Ghrelin*⁺) und somit in allen endokrinen Zelltypen vorhanden ist. *Insm1* wird aber nicht in exokrinen Zellen ausgeprägt; weder im sich entwickelnden noch im reifen Pankreas. Mellitzer et al. (2006) publizierten kürzlich, dass *Insm1*-Transkripte im reifen Pankreas nicht nachgewiesen werden können und diese Daten widersprechen also meinen Ergebnissen. Eine andauernde Expression von *Insm1* in endokrinen Zellen wird aber durch Expressionsanalysen anderer Labore oder durch die Analyse von EST-Datenbanken untermauert (Su et al., 2004; Zhu et al., 2002).

4.2 *Insm1* ist essentiell für die Entwicklung von β -Zellen

Im Weiteren verglich ich die Entwicklung endokriner Vorläuferzellen in heterozygoten und homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tieren. Die Expression von Ngn3 war in *Insm1^{lacZ}/*Insm1^{lacZ}**- gegenüber *Insm1^{lacZ}/+*-Mäusen unverändert. Zudem konnte ich zeigen, dass die Expression von NeuroD1 und Isl1 in Kontrolltieren und *Insm1*-mutanten Tieren vergleichbar war. Diese Daten zeigen, dass die Spezifizierung und die frühe Entwicklung endokriner Zellen in *Insm1*-mutanten Mäusen normal verlaufen. Mellitzer et al. (2006) zeigten kürzlich, dass im Pankreas von *Ngn3*-mutanten Mäusen, in denen endokrine Zellen spezifiziert werden, *Insm1* nicht exprimiert wird. Zusätzlich wies diese Arbeitsgruppe nach, dass Ngn3 die Expression von *Insm1* direkt kontrolliert. In der Hierarchie von Transkriptionsfaktoren, die die Entwicklung der endokrinen Zellen steuern, ist *Insm1* also dem Faktor Ngn3 nachgeschaltet.

Ich untersuchte deshalb, ob *Insm1* eine Funktion in späteren Phasen der endokrinen Entwicklung innehat, da der Faktor auch während der späten Differenzierung endokriner Zellen ausgeprägt wird. Ich beobachtete, dass der Anteil der Insulin⁺ Zellen in homozygoten im Vergleich zu heterozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tieren um 90 % reduziert ist. Zudem ließ sich der β -Zell-spezifische Faktor Glukosetransporter 2 (Glut2) im Pankreas von *Insm1^{lacZ}/*Insm1^{lacZ}**-Mäusen nicht mehr nachweisen. *Insm1* wird also für eine korrekte Differenzierung der β -Zellen benötigt.

Es stellte sich nun die Frage, ob die Entscheidung endokriner Zellen für das β -Zellschicksal von der *Insm1*-Mutation beeinträchtigt ist. Es ist bekannt, dass die Spezifizierung der endokrinen Subtypen des Pankreas von verschiedenen Transkriptionsfaktoren gesteuert wird. So werden in *Pax4*- und *Nkx2.2*-mutanten Mäusen keine β -Zellen gebildet, stattdessen entwickeln sich zu viele Ghrelin⁺ Zellen (Prado et al., 2004; Sosa-Pineda et al., 1997; Sussel et al., 1998). In homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Mäusen waren die Anteile der endokrinen Subtypen nicht derartig ausgeprägt verschoben. Obwohl ich nur wenige Insulin⁺ Zellen beobachten konnte, war die gesamte Zahl der endokrinen Zellen in *Insm1*-mutanten Tieren nicht entscheidend verändert. Stattdessen waren in *Insm1^{lacZ}/*Insm1^{lacZ}**-Tieren viele Zellen vorhanden, die zwar endokrinen Charakter aufwiesen und z. B. β -Galaktosidase exprimierten, aber kein pankreatisches Hormon produzierten. Viele dieser Zellen exprimierten allerdings Islet amyloid polypeptide (IAPP), ein Protein das normalerweise in β -Zellen vorhanden ist (Cooper et al., 1989; Nishi et al.,

1989). Dies deutet daraufhin, dass β -Zellen in *Insm1*-mutanten Tieren spezifiziert werden und ihre Differenzierung einleiten, diese aber nicht korrekt beenden.

Deshalb untersuchte ich auch die Expression der Transkriptionsfaktoren Pdx1 und MafA, die für die terminale Differenzierung von β -Zellen benötigt werden (Ahlgren et al., 1998; Holland et al., 2002; Zhang et al., 2005). Pdx1 und MafA aktivieren *Insulin*, *IAPP* und *Glut2* direkt (Carty et al., 1997; Cissell et al., 2003; Kataoka et al., 2002; Ohlsson et al., 1993; Olbrot et al., 2002; Waeber et al., 1996; Wang et al., 2007). Ich konnte zeigen, dass Pdx1 und MafA im Pankreas von homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Mäusen vermindert ausgeprägt werden. Pdx1 nimmt eine Schlüsselposition ein, da die Entwicklung und Funktion von β -Zellen vom Niveau der Pdx1-Expression abhängen (Ahlgren et al., 1998; Brissova et al., 2002; Fujitani et al., 2006; Holland et al., 2002). *Insm1* beeinflusst somit das transkriptionelle Netzwerk, das die Differenzierung der β -Zellen und die Insulin-Expression kontrolliert.

Viele Transkriptionsfaktoren, die an der Entstehung von Diabetes beteiligt sind, haben eine Funktion in der Entwicklung der endokrinen Zellen (Bell and Polonsky, 2001; Edlund, 2002; Habener et al., 2005; Jensen, 2004; Wilson et al., 2003). Ich konnte den Einfluss der *Insm1*-Mutation auf die Glukosehomöostase jedoch nicht untersuchen, da homozygote *Insm1^{lacZ}*-Tiere im Verlauf der zweiten Hälfte der Embryonalentwicklung oder bei der Geburt starben. Die konditionelle Inaktivierung von *Insm1* in β -Zellen würde zeigen, ob der Faktor für die Erhaltung und die Funktion von endokrinen Zellen, vor allem der β -Zellen, im adulten Pankreas nötig ist. Hypomorphe Mutationen von *Insm1* könnten die Expression von Insulin und den Glukosemetabolismus verändern. *Insm1* kann also als Kandidatengen betrachtet werden, dessen hypomorphe Mutation Diabetes im Menschen hervorrufen könnte.

4.3 *Insm1* reguliert die Differenzierung von α -Zellen

Die Differenzierung der α -Zellen ist ebenfalls durch die *Insm1*-Mutation beeinträchtigt. Ich beobachtete, dass die Zahl der frühen Glukagon⁺ Zellen in *Insm1*-mutanten Tieren verringert ist, die Proportion reifer α -Zellen sich aber bei der Geburt normalisiert hat. Zusätzlich ist das Expressionsniveau von Glukagon in allen Stadien reduziert. Das α -Zellschicksal wird endokrinen Zellen vom Transkriptionsfaktor Arx zugewiesen (Collombat et al., 2003) und Arx wird in homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tieren in geringeren Mengen exprimiert. Die Menge von Arx, die in *Insm1*-mutanten Tieren vorhanden ist, scheint aber

auszureichen, um α -Zellen zu spezifizieren. Pax6 und MafB aktivieren das *Glukagon*-Gen direkt und werden für die Entwicklung der α -Zellen benötigt (Artner et al., 2006; Sander et al., 1997; St-Onge et al., 1997). Pax6 und MafB sind in *Insm1^{lacZ}/Insm1^{lacZ}*-Tieren deutlich reduziert ausgeprägt und dies könnte für die Veränderungen in der Expression von Glukagon verantwortlich sein.

4.4 *Insm1* steuert die Expression genereller endokriner Proteine

Ich analysierte die genomweite Genexpression im Pankreas von Wildtyp- und *Insm1^{lacZ}/Insm1^{lacZ}*-Tieren, um weitere Faktoren zu identifizieren, die aufgrund der *Insm1*-Mutation dereguliert sind. Diese Untersuchungen zeigten eine stark reduzierte Expression pankreatischer Hormone: Die beiden *Insulin*-Gene wurden in *Insm1*-mutanten Mäusen stark reduziert ausgeprägt und *Glukagon* sowie *Somatostatin* wurden ebenfalls verringert produziert. Damit bestätigten sich die Ergebnisse meiner immunhistologischen Analysen. Zusätzlich ergänzte die genomweite Expressionsanalyse meine Befunde zur Differenzierung der β -Zellen, da neben *Glut2* zwei weitere Faktoren des Glukosemetabolismus, die Insel-spezifische *Glucose-6-Phosphatase (G6pc2)* und die *Glukokinase (Gck)*, in *Insm1*-mutanten Tieren deutlich schwächer ausgeprägt sind. Die Untersuchung der genomweiten Genexpression offenbarte zudem, dass Faktoren für die Hormonsekretion und -prozessierung im Pankreas von *Insm1^{lacZ}/Insm1^{lacZ}*-Mäusen massiv reduziert ausgeprägt werden. Zum Beispiel werden die beiden Prohormonkonvertasen PC1/3 und PC2 in stark verringerter Menge produziert. Besonders offensichtlich waren auch die Veränderungen in der Expression von Graninen, einer Proteinfamilie, die mit sekretorischen Vesikeln assoziiert sind und die Hormonsortierung, -prozessierung und -sekretion steuern (Karlsson, 2001; Taupenot et al., 2003). Die Expression von Chromogranin A und B sowie Sekretogranin II, III und V war verändert. Dabei sind die Unterschiede des Expressionsniveaus dieser Graningene zwischen Wildtyptieren und *Insm1*-mutanten Mäusen ausgeprägter als die aller anderen Gene. Meine immunhistologischen Untersuchungen bestätigten, dass PC1/3, PC2 und Chromogranin A in allen endokrinen Zellen verringert exprimiert werden (diese Arbeit und Gierl et al., 2006). *Insm1* ist also nicht nur für die Produktion bestimmter Hormone wichtig, sondern auch für die Expression von Faktoren, die eine generelle endokrine Funktion ausüben.

Der Phänotyp der homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tiere im Pankreas unterscheidet sich somit wesentlich von allen bisher beschriebenen Phänotypen anderer Mausmutanten. So ist die

Spezifizierung endokriner Vorläufer durch den Notch-Signalweg und Ngn3 von der *Insm1*-Mutation nicht betroffen. Des Weiteren ist die Entscheidung für ein bestimmtes Subtypschicksal nicht beeinträchtigt. Solche Phänotypen waren zuvor in *Pax4*- und *Arx*-mutanten Mäusen beobachtet worden. In den *Insm1*-mutanten Mäusen sind vielmehr die terminale Differenzierung und die Expression von Genen, die in allen endokrinen Zellen vorkommen, gestört.

Es ist bekannt, dass dieselben Gene die Entwicklung endokriner Zellen im Pankreas und im Magen-Darm-Trakt steuern. So ist Ngn3 auch im Magen und Darm essentiell für die Bildung aller endokrinen Zellen und NeuroD1, Pax4 und Pax6 regulieren die Differenzierung der verschiedenen endokrinen Zelltypen (Jenny et al., 2002; Larsson et al., 1998; Lee et al., 2002a; Naya et al., 1997). Mein Kollege Nikos Karoulis hat parallel zu meiner Analyse des Pankreas von *Insm1*-mutanten Mäusen deren Darm untersucht und beobachtet, dass die Differenzierung der endokrinen Zellen im Darm beeinträchtigt war (Gierl et al., 2006). Dabei wurden im Darm und im Pankreas ähnliche Phänotypen beobachtet. Auch im Darm fehlten bestimmte Hormone wie Substanz P und Neurotensin ganz, andere wurden reduziert exprimiert, z. B. Sekretin und Cholezystokinin. Chromogranin A, das in den meisten enteroendokrinen Zellen ausgeprägt wird (Rindi et al., 2004), wurde im Darm von *Insm1^{lacZ}/Insm1^{lacZ}*-Tieren nicht exprimiert. *Insm1* steuert also die Differenzierung endokriner Zellen im Pankreas und Darm.

4.5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit hat klar gezeigt, dass die Expression von *Insm1* früh in allen endokrinen Zellen des Pankreas beginnt und in den endokrinen Zellen des erwachsenen Organs andauert. Meine Analysen von *Insm1*-mutanten Mäusen legen nahe, dass *Insm1* nach der Spezifizierung der endokrinen Subtypen agiert. *Insm1* ist insbesondere essentiell für die Bildung von β -Zellen. Zusätzlich reguliert es allgemeine endokrine Eigenschaften wie die Hormonsekretion und -prozessierung in allen endokrinen Zelltypen. *Insm1* scheint also in ein generelles endokrines Differenzierungsprogramm zu kontrollieren.

Es bleibt zu klären, welche Gene direkt durch den Transkriptionsfaktor *Insm1* reguliert werden. Biochemische Analysen haben gezeigt, dass der Zinkfinger-Faktor *Insm1* als Repressor agieren kann (Breslin et al., 2003; Breslin et al., 2002). Da die meisten Gene im Pankreas von *Insm1*-mutanten Tieren reduziert ausgeprägt waren, könnte *Insm1* auch als transkriptioneller Aktivator wirken. *Insm1* könnte alternativ eine frühe Derepression von

Genen bewirken, die die terminale Differenzierung der endokrinen Zellen stören. Die erhöhte Expression dieser Gene hätte ich nicht beobachten können, da die genomweite Expressionsanalyse nur an späteren Entwicklungsstadien durchgeführt wurde. Weitere Analysen werden deshalb zeigen müssen, welche Promotoren von *Insm1* direkt reguliert werden.

Die Letalität der *Insm1*-Mutation kann nicht von Defekten im endokrinen Pankreas und Darm hervorgerufen werden: Andere mutante Mäuse, wie z. B. *Ngn3*^{-/-}-Mäuse, die keine endokrinen Zellen im Pankreas und Darm bilden, sterben erst einige Tage nach der Geburt an Diabetes (Gradwohl et al., 2000). Das bedeutet, dass Veränderungen in anderen Geweben für die embryonale Letalität der *Insm1*-Mutation verantwortlich sind. Die embryonale Sterblichkeit der *Insm1*^{lacZ}/*Insm1*^{lacZ}-Mäuse ist vergleichbar mit der Noradrenalin-defizienter Mäuse (Thomas et al., 1995; Zhou et al., 1995). Noradrenalin wird in sympathischen Ganglien und den Nebennieren produziert, in beiden Geweben wird *Insm1* ausprägt (diese Arbeit und Mellitzer et al., 2006). Gemeinsam mit meinem Kollegen Hendrik Wildner konnte ich kürzlich zeigen, dass das Noradrenalin-niveau in *Insm1*-mutanten Tieren reduziert war und eine Gabe von Noradrenalin-Vorstufen die Überlebensrate von *Insm1*-mutanten Embryonen wesentlich verbesserte. Bei der Untersuchung der Nebennieren von *Insm1*^{lacZ}/*Insm1*^{lacZ}-Mäusen zeigte sich interessanterweise, dass die Expression von Graninen auch in diesem Gewebe stark reduziert war. Weitere genetische Studien zur Entwicklung des peripheren Nervensystems und der chromaffinen Zellen der Nebenniere werden die Rolle von *Insm1* in der Differenzierung dieser Gewebe aufklären.