

3 Ergebnisse

Ich untersuchte im Rahmen dieser Arbeit die Rolle der Zinkfinger-Transkriptionsfaktors *Insm1* (IA-1) in der Entwicklung des Pankreas. *Insm1* wird während der Entwicklung und im erwachsenen Organ in endokrinen Zellen ausgeprägt. Ich erzeugte mittels genetischer Methoden *Insm1*-mutante Mäuse und untersuchte deren Phänotyp mittels histologischer und molekularbiologischer Methoden. Dafür wurde die Expression von endokrinen Transkriptionsfaktoren und Hormonen in Kontrolltieren und *Insm1*-mutanten Tieren verglichen.

3.1 Homozygote *Insm1^{lacZ}*-Tiere sterben während der Embryogenese

Zu Beginn dieser Arbeit habe ich eine Nullmutation des *Insm1*-Gens mittels homologer Rekombination in ES-Zellen erzeugt. Die kodierende Sequenz des *Insm1*-Gens wurde durch ein *lacZ*-Reporter gen und eine Resistenzkassette ersetzt. Ich konnte ES-Zellklone mit dem mutierten *Insm1*-Allel identifizieren und habe zwei davon zur Herstellung von Chimären verwendet. Männliche Chimäre wurden mit Wildtyp-Weibchen verpaart und Nachkommen ausgewählt, die heterozygot für das *Insm1^{lacZ}*-Allel waren. Die gezielte Mutation des *Insm1*-Gens habe ich mittels Southern-Blot-Analyse und *in situ*-Hybridisierung bestätigt. Das Reporter gen *lacZ* wurde unter der Kontrolle des endogenen *Insm1*-Promotors ausgeprägt und die Expression von *Insm1* und *lacZ* war vergleichbar. Ich beobachtete, dass homozygote *Insm1^{lacZ}*-Mäuse während der Embryonalentwicklung oder bei der Geburt starben.

3.1.1 Mutagenese des *Insm1*-Lokus in ES-Zellen

Die kodierende Sequenz von *Insm1* ist auf Chromosom 2 in einem einzigen Exon lokalisiert (Abb. 3A, Birney et al., 2006; Xie et al., 2002). Ich identifizierte den PAC-Klon L1640, der den *Insm1*-Lokus enthält, in der DNA-Bibliothek RPCI-21 (Osoegawa et al., 2000). Ein 14 kb langer genomischer Subklon mit dem *Insm1*-Lokus wurde mittels homologer Rekombination in Bakterien (Lee et al., 2001a; Yu et al., 2000) erzeugt und gezielt mutiert. Eine *NLS-lacZ*-Reporterkassette wurde an das Startkodon der kodierenden Sequenz von *Insm1* fusioniert. Die inserierte Sequenz enthielt zusätzlich eine sich selbst ausschneidende *Cre-Neo/Kan*-Resistenzkassette (Bunting et al., 1999). In der mutierten Sequenz war die gesamte kodierende Sequenz von *Insm1* außer den letzten 14 bp deletiert

und die Umgebung des Startkodons für eine effiziente Translationsinitiation (Kozak, 1987) optimiert ($G^6CCAACA^{+1}TG$ in $G^6CCACCA^{+1}TG$). Der Plasmidvektor mit dem Subklon enthielt zusätzlich eine Selektionskassette, die für das Fragment A des MC1-Diphtherietoxins kodiert (DTA-Kassette, Yagi et al., 1993)

Der mutierte *Insm1*-Subklon (Abb. 3A) wurde mittels Elektroporation in das Genom von ES-Zellen der Linie E14.1 aus dem Mausstamm 129/Ola (Kühn et al., 1991) eingeführt. Die Positivselektion der ES-Zellklone, die den mutierten Subklon in ihr Genom integriert hatten, erfolgte durch die Zugabe des Antibiotikums G418. ES-Zellen, die den Subklon inklusive *DTA*-Kassette integriert hatten, wurden durch das Diphtherietoxin abgetötet (Yagi et al., 1993). Nach der Selektion wurden 288 ES-Zellklone mit einer Southern-Blot-Analyse auf homologe Rekombination des *Insm1*-Lokus getestet. Dafür wurden Sonden verwendet, die das *Insm1^{lacZNeo}*-Allel vom Wildtypallel unterscheiden konnten (Abb. 3A,B). Auf diese Weise wurden 14 ES-Zellklone identifiziert, die heterozygot für das *Insm1^{lacZNeo}*-Allel waren.

3.1.2 Erzeugung des *Insm1^{lacZ/+}*-Mausstamms

Zur Herstellung von Chimären injizierte die TCF ES-Zellen der Klone CC10, CG11 und CH5 in Blastozysten. Leihmütter trugen diese Blastozysten aus, so dass Mäuse geboren wurden, die chimär für Zellen mit dem *Insm1^{lacZNeo}*-Allel waren. Es wurden vier männliche Chimären mit Zellen von Klon CC10 und zwei männliche Chimäre mit Zellen von Klon CG11 geboren; die Injektion der Zellen von Klon CH5 erzeugte keine Chimären. Jeweils eine männliche Chimäre von Klon CC10 bzw. Klon CG11 wurde mit Wildtyp-Weibchen (C57BL/6) verpaart. Während der Vererbung durch die männliche Keimbahn deletierte sich die *Cre-Neo/Kan*-Resistenzkassette durch die Aktivierung der Cre-Rekombinase in den Spermien selbst (Bunting et al., 1999). Es wurden Nachkommen ausgewählt, die heterozygot für das *Insm1^{lacZ}*-Allel waren, in dem das exogene *lacZ*-Reportergen und eine *loxP*-Sequenz verblieben (Abb. 3A). Nicht-kodierende Sequenzen des *Insm1*-Gens (mit der Ausnahme der Initiationssequenz) wurden durch die Mutagenese nicht verändert. Die erfolgte Deletion der Resistenzkassette im Genom von Embryonen wurde mittels Southern-Blot-Analyse mit der 5'- (Abb. 3C), der 3'- und einer *lacZ*-Sonde (nicht gezeigt) nachgewiesen. Die Beobachtung der heterozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tiere zeigte, dass Körperbau, Überlebensrate und Fertilität dieser Tiere gegenüber Wildtyp-Tieren nicht verändert waren.

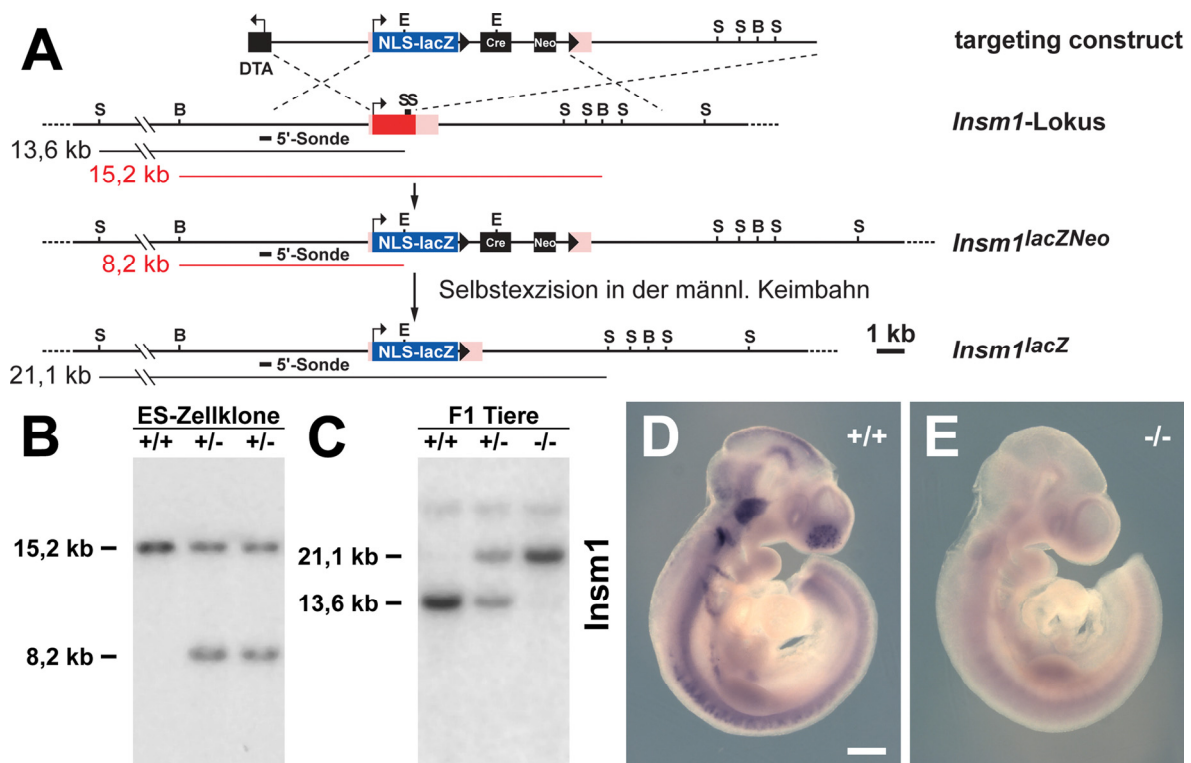


Abb. 3: Mutagenese des *Insm1*-Lokus. (A) Strategie zur Einführung einer gezielten Mutation in den *Insm1*-Lokus in ES-Zellen. Schematisch dargestellt ist das „targeting construct“, der genomische Wildtyp-Lokus von *Insm1*, das *Insm1^{lacZNeo}*-Allel, dass durch homologe Rekombination in ES-Zellen erzeugt wurde, und das *Insm1^{lacZ}*-Allel, das durch Deletion der *Cre-Neo/Kan*-Resistenzkassette in der männlichen Keimbahn entstand (Bunting et al., 1999). Die *DTA*-Kassette zur Negativselektion, die Sequenzen der *Cre*-Rekombinase und der *Neo/Kan*-Kassette sind als schwarze Rechtecke, die nicht-kodierenden Sequenzen von *Insm1* als hellrosa Rechtecke, die *NLS-lacZ*-Sequenz ist als blaues Rechteck, die kodierende Sequenz von *Insm1* als rotes Rechteck und die *loxP*-Sequenzen sind als schwarze Pfeilspitzen dargestellt. Die Restriktionsstellen für *StuI* (S), *BgIII* (B) und *EcoRV* (E) sind eingezeichnet; die erwarteten Fragmentgrößen nach Restriktionshydrolyse mit *StuI* oder *BgIII+EcoRV* sind als schwarze bzw. rote Linien dargestellt und ein schwarzer Balken stellt die 5'-Sonde für die Southern-Blot-Analysen dar. (B) Southern-Blot-Analyse von genomischer DNA aus ES-Zellen, gespalten mit *BgIII+EcoRV* und hybridisiert mit der 5'-Sonde. Gezeigt ist die Autoradiographie eines Wildtypklons und zweier mutanter Klone. (C) Southern-Blot-Analyse von genomischer DNA aus Wildtyp-, *Insm1^{lacZ/+}* und *Insm1^{lacZ/Insm1^{lacZ}}*-Mäusen, gespalten mit *StuI* und hybridisiert mit der 5'-Sonde. (D,E) *In situ*-Hybridisierung auf E9.5 Wildtyp- und homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tieren mit einer Sonde, die die kodierende Sequenz von *Insm1* enthält. Die *Insm1*-kodierende Sequenz ist in homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tieren nicht mehr detektierbar. Abkürzungen: +/+ Wildtyp-Tiere, -/- homozygote *Insm1^{lacZ}*-Tiere. Balken: 400 μ m.

Ich untersuchte, ob das *Insm1*-Transkript in homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Mäusen produziert wird. Dazu verpaarte ich heterozygote *Insm1^{lacZ}*-Mäuse und analysierte E9.5 Wildtyp- und *Insm1*-mutante Tiere mittels *in situ*-Hybridisierung (Abb. 3D,E). Die kodierende Sequenz des *Insm1*-Transkripts ließ sich in homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tieren nicht mehr nachweisen. Daraus folgt, dass die kodierende Sequenz durch die gezielte Mutagenese von *Insm1* deletiert worden war und somit eine Nullmutation vorlag.

3.1.3 *Insm1*-Promoter reguliert das *lacZ*-Reporter-gen

Die Expression des mutanten Allels (*lacZ*-Expression) und des Wildtypallels (endogene *Insm1*-Expression) wurden verglichen, um die korrekte Expression des Reportergens zu überprüfen. Dazu wurden E9.0 und E10.5 Wildtyp-Tiere und *Insm1^{lacZ/+}*-Tiere mittels *in situ*-Hybridisierung untersucht (Abb. 4). Die Analyse der Expressionsmuster zeigte, dass *Insm1* im Nervensystem und der Region des Pankreasprimordiums exprimiert wird (s. a. 3.2.1). Zudem gleicht das Expressionsmuster des Reportergens *lacZ* dem des endogenen *Insm1*, so dass heterozygote *Insm1^{lacZ}*-Mäuse als Kontrolltiere verwendet werden konnten.

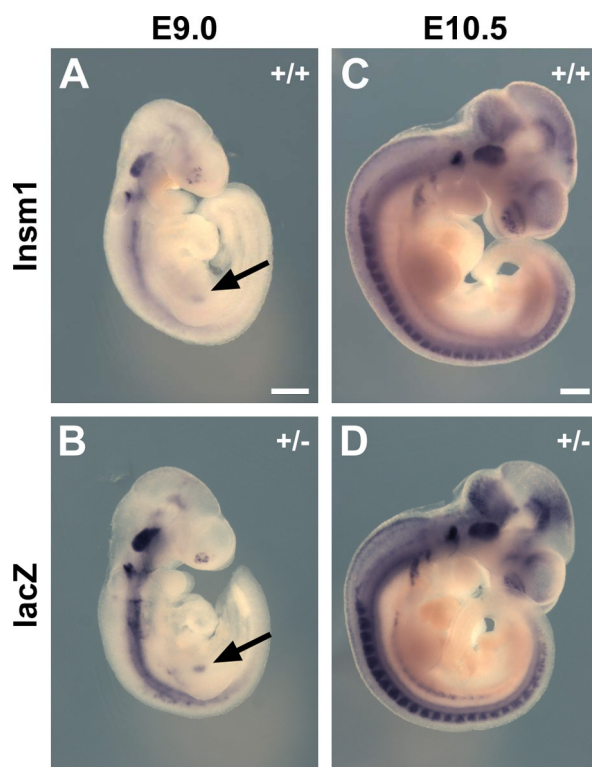


Abb. 4: Das mutante *Insm1*-Allel exprimiert *lacZ* unter der Kontrolle des *Insm1*-Promotors. *In situ*-Hybridisierung auf E9.0 (A,B) und E10.5 (C,D) Wildtyp- und heterozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tieren mit Sonden, die spezifisch für die kodierende Sequenz von *Insm1* oder *lacZ* sind. *Insm1* wird in der Pankreasanlage (Pfeile) und im Nervensystem exprimiert und die Verteilung von *Insm1* und *lacZ* ist vergleichbar. Abkürzungen: +/+ Wildtyp-Tiere, +/- *Insm1^{lacZ/+}*-Tiere. Balken: 400 μ m.

3.1.4 *Insm1^{lacZ}*-Mutation ist homozygot letal

Heterozygote *Insm1^{lacZ}*-Mäuse wurden verpaart, um die Entwicklung von homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Mäusen zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass *Insm1*-mutante Tiere bis einschließlich E12.5 in der erwarteten Frequenz auftraten. Ich beobachtete jedoch weniger als der erwarteten 25 % *Insm1*-mutanten Tiere in späteren Stadien; E18.5 hatten nur noch 5,2 % der Tiere (n = 76) einen *Insm1^{lacZ/Insm1^{lacZ}}*-Genotyp. Die Mehrheit der homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tiere starb im genetisch gemischten 129/Ola-C57BL/6-Hintergrund während der zweiten Hälfte der Embryonalentwicklung und wurde resorbiert. Größe und Gewicht der lebenden E12.5 bis E18.5 *Insm1^{lacZ/Insm1^{lacZ}}*-Tiere waren normal und die

generelle Morphologie schien ebenfalls normal zu sein. Diese Tiere begannen nach der Geburt jedoch nicht zu atmen; sie behielten eine bläuliche Körperfärbung und starben. Ich kreuzte das *Insm1^{lacZ}*-Allel in Tiere eines Auszuchtstamms (CD1) ein und beobachtete ebenfalls nur lebensfähige und fertile *Insm1^{lacZ/+}*-Tiere. Die Proportion von lebenden homozygoten E18.5 *Insm1^{lacZ}*-Tieren auf diesem genetischen Hintergrund erhöhte sich auf 13,3 % der Tiere (n = 451), allerdings starben die homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tiere im CD1-129/Ola-C57BL/6-Hintergrund weiterhin perinatal. Für die hier beschriebene Phänotypanalyse verwendete ich Tiere, die vom ES-Zellklon CC10 abstammen, und auf dem gemischten CD1-129/Ola-C57BL/6-Hintergrund gehalten wurden. Die Ergebnisse der Analyse wurden mit dem Phänotyp von *Insm1*-mutanten Tieren verglichen, die entweder vom Klon CG11 abstammen oder die Mutation auf einen gemischten 129/Ola-C57BL/6-Hintergrund trugen. Dabei ergaben sich keine Abweichungen.

3.2 *Insm1*-Expression im Pankreas

Im Folgenden analysierte ich das Expressionsmuster von *Insm1* in verschiedenen Stadien der Entwicklung. Zuvorderst wies ich die Expression von *Insm1* im Pankreas nach. Zudem sollte geklärt werden, in welchen Zellen *Insm1* exprimiert wird, um die Rolle von *Insm1* in der Pankreasentwicklung einzugrenzen. Deshalb wurde die Verteilung des Proteinprodukts von *lacZ*, der β -Galaktosidase, mit verschiedenen Proteinen der exokrinen und endokrinen Zellen in *Insm1^{lacZ/+}*-Tieren verglichen.

3.2.1 *Insm1* wird während der Morphogenese im Pankreas ausgeprägt

Zuerst wurde die Expression von *Insm1* zu einem frühen Zeitpunkt der Organogenese untersucht. Das Expressionsmuster von *Insm1* wurde in E9.5 und E10.5 *Insm1^{lacZ/+}*-Tieren mittels *in situ*-Hybridisierung analysiert. *Insm1* wurde in den Pankreasprimordien exprimiert, sobald diese morphologisch von der Darmanlage unterscheidbar sind (Abb. 5A-D). E9.5 wurde *Insm1* in vielen Zellen der dorsalen Knospe ausgeprägt (Abb. 5A,B); die ventrale Knospe ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht sichtbar (Pictet and Rutter, 1972; Slack, 1995). E10.5 wurde die Expression von *Insm1* auch in wenigen Zellen der ventralen Knospe nachgewiesen (Abb. 5C,D). Darüber hinaus wurde *Insm1* im Rückenmark im Übergang zwischen Ventrikularschicht und Mantelzone exprimiert, E9.5 in zwei ventralen Domänen und E10.5 über die gesamte dorso-ventrale Achse

(Abb. 5A,C). Zusätzlich beobachtete ich *Insm1* auch in den Spinalganglien und den sympathischen Ganglien.

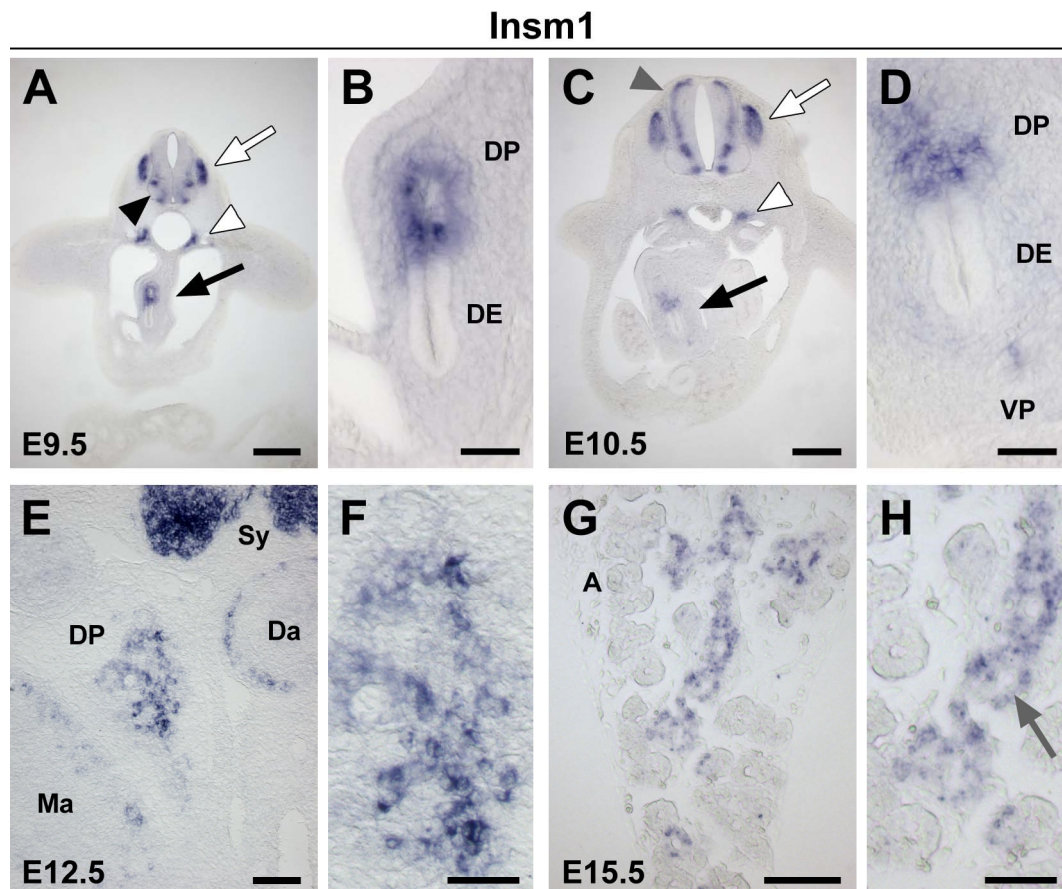


Abb. 5: *Insm1* wird im Pankreas während der Entwicklung exprimiert. *In situ*-Hybridisierung auf heterozygoten *Insm1*^{lacZ}-Tieren mit einer Sonde, die spezifisch für die 3'-UTR von *Insm1* ist. Gezeigt sind histologische Schnitte durch den Bereich der Pankreasanlage von E9.5, E10.5 und E12.5 Embryonen (A-F) und durch das E15.5 Pankreas (G-H). (A-D) *Insm1* wird in der Pankreasanlage exprimiert (schwarze Pfeile). Die vergrößerten Ausschnitte zeigen, dass *Insm1* anfangs im Epithel der dorsalen (B) und später in beiden Pankreasanlagen ausgeprägt wird (D). Im Rückenmark wird *Insm1* im Übergang zwischen Ventrikularschicht und Mantelzone exprimiert, anfangs in zwei ventralen Domänen (schwarze Pfeilspitze) und später in breiten dorsalen und ventralen Domänen (graue Pfeilspitze). Zudem wird *Insm1* in den Spinalganglien (weiße Pfeile) und in den sympathischen Ganglien (weiße Pfeilspitzen) ausgeprägt. (E-H) *Insm1* ist im E12.5 Pankreas, in den Sympathikusanlagen und in einem Ring von Zellen im Magen- und Darmmesenchym exprimiert. *Insm1* wird auch in den endokrinen Zellen und/oder im Pankreasepithel, aber nicht in den exokrinen Acini ausgeprägt (E15.5). Die vergrößerten Ausschnitte zeigen eine verstreute und fadenförmige Expression von *Insm1* im Pankreas (F) und die Lokalisierung von *Insm1*-exprimierenden Zellen in der Nähe von Epithel und Blutgefäßen (grauer Pfeil) (H). Abkürzungen: DP dorsale Pankreasanlage, DE Darmepithel, VP ventrale Pankreasanlage, Sy Sympathikusanlage, Da Darm, Ma Magen, A Acini. Balken: 200 μ m (A,C), 50 μ m (B,D,F), 100 μ m (E,H), 200 μ m (G).

Das Expressionsmuster von *Insm1* in späteren Stadien wurde mittels *in situ*-Hybridisierung verfolgt. *Insm1* wurde E12.5 und E15.5 im Pankreas exprimiert und die *Insm1*⁺ Zellen waren verstreut oder fadenförmig angeordnet (Abb. 5E-H). Während der zweiten Umwandlung des Pankreas entwickeln sich die exokrinen Azini (Pictet and Rutter, 1972; Slack, 1995), in denen *Insm1* nicht ausgeprägt wurde. Das Expressionsmuster deutete

daraufrin, dass *Insm1*-Transkripte nur in endokrinen und/oder epithelialen Zellen des Pankreas vorkamen (Abb. 5G,H). Zudem wurde *Insm1* E12.5 stark in sympathischen Ganglien exprimiert und ließ sich in ringförmig angeordneten Zellen im Magen- und Darmmesenchym nachweisen (Abb. 5E). Dort entwickelt sich das enterische Nervensystem, das wie die sympathischen Ganglien aus Neuralleistenzellen entsteht (Le Douarin, 1982).

3.2.2 Expression von *Insm1* persistiert im adulten Pankreas

Ich verglich die Expression des *Insm1*-Transkripts, des Reporterproteins β -Galaktosidase und der endokrinen Hormone in E18.5 und erwachsenen Tieren. *In situ*-Hybridisierungen auf Gewebe von *Insm1^{lacZ/+}*-Tieren bestätigten, dass *Insm1* nicht in exokrinen Azini exprimiert wurde (Abb. 6A,C). Die Expression von *Insm1* war vielmehr klar auf die runden Langerhans'schen Inseln beschränkt; in der späten Embryonalentwicklung und im erwachsenen Tier sind die endokrinen Zellen in diesen Inseln angeordnet (Pictet and Rutter, 1972; Slack, 1995).

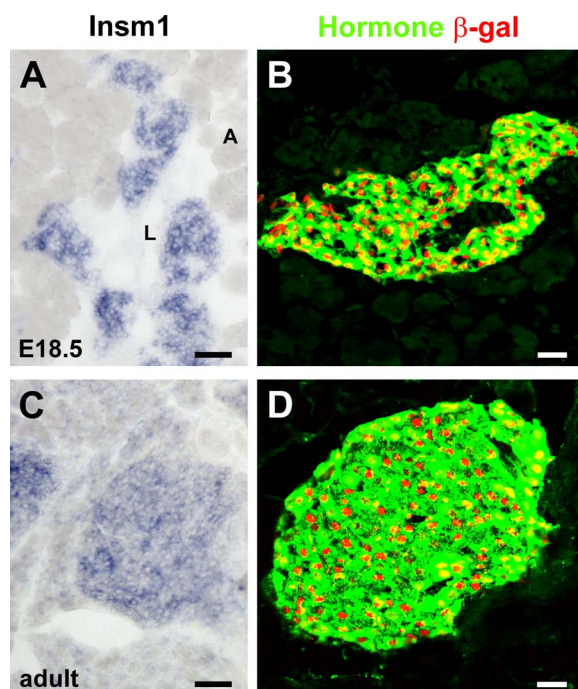


Abb. 6: *Insm1* wird in perinatalen und adulten Tieren in endokrinen Zellen ausgeprägt. (A,C) *In situ*-Hybridisierung mit einer *Insm1*-spezifischen Sonde auf Schnitten durch das Pankreas von E18.5 (A) und adulten (C) heterozygoten *Insm1^{lacZ/+}*-Tieren. Die Expression von *Insm1* persistiert in den endokrinen Langerhans'schen Inseln, aber *Insm1* wird nicht in den exokrinen Acini exprimiert. (B,D) Immunhistologische Analyse von β -Galaktosidase und endokrinen Hormonen auf Schnitten durch das Pankreas von E18.5 (B) und adulten (D) *Insm1^{lacZ/+}*-Mäusen. Fluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen β -Galaktosidase (rot) und einem Gemisch von Antikörpern gegen Insulin, Glukagon, Somatostatin, PP und Ghrelin (alle grün). Es kann beobachtet werden, dass β -Galaktosidase⁺ Zellen endokrine Hormone enthalten. Abkürzungen: A Acini, L Langerhans'sche Insel. Balken: 50 μ m (A,C), 20 μ m (B,D).

Die immunhistologischen Färbungen von heterozygoten *Insm1^{lacZ/+}*-Tieren zeigten, dass die β -Galaktosidase⁺ Zellen in den Langerhans'schen Inseln organisiert waren und Hormone produzierten (Abb. 6B,D). E18.5 exprimierten 97,6 % der β -Galaktosidase⁺ Zellen ein Hormon (n = 3) und in erwachsenen Tieren 99,5 % (n = 4). *Insm1* ist also bereits zu

Beginn der Organogenese im Pankreas nachweisbar und die Expression persistiert in den adulten Langerhans'schen Inseln.

3.2.3 *Insm1*-Expression ist im Pankreas auf die endokrinen Zellen beschränkt

Die weitere Analyse der Expression von β -Galaktosidase, endokrinen und exokrinen Proteinen sollte zeigen, ob die Expression von *Insm1* in der Entwicklung des Pankreas ausschließlich auf die endokrinen Zellen beschränkt ist. Ab E9.5 können bereits einzelne endokrine Zellen verstreut im Pankreasepithel nachgewiesen werden (Teitelman et al., 1993). Das Pankreasepithel und die angrenzenden Teile des Darmepithels exprimieren während der ersten Umwandlung den Transkriptionsfaktor *Pdx1* (Guz et al., 1995; Offield et al., 1996). Es zeigte sich, dass viele verstreute β -Galaktosidase⁺ Zellen im Pankreasepithel E10.75 und E12.5 zu finden waren (Abb. 7A,B). β -Galaktosidase⁺ Zellen wurden E10.75 vor allem in der dorsalen Pankreasknospe beobachtet (Abb. 7A). E12.5 konnten viele β -Galaktosidase⁺ Zellen in der dorsalen und ventralen Pankreasanlage nachgewiesen werden, die *Pdx1* ausprägten (Abb. 7B).

Ich verglich im Weiteren die Expression von β -Galaktosidase, verschiedenen Transkriptionsfaktoren und Hormonen (Abb. 7C-H). Der proendokrine Transkriptionsfaktor *Ngn3* ist essentiell für die Spezifizierung endokriner Zellen und wird vorübergehend in allen endokrinen Vorläuferzellen produziert (Gradwohl et al., 2000; Gu et al., 2002). Meine immunhistologischen Analysen zeigten, dass viele β -Galaktosidase⁺ Zellen *Ngn3* exprimierten (Abb. 7C). Der Transkriptionsfaktor *NeuroD1* wird später als *Ngn3* in postmitotischen endokrinen Zellen ausgeprägt und für ihre Entwicklung benötigt (Jensen et al., 2000a; Naya et al., 1995). Fast alle *NeuroD1*⁺ Zellen ko-exprimierten β -Galaktosidase (Abb. 7D). Der Transkriptionsfaktor *Isl1* ist essentiell für die Entwicklung des Pankreas und wird ebenfalls in postmitotischen endokrinen Zellen ausgeprägt (Ahlgren et al., 1997). Alle *Isl1*⁺ Zellen exprimierten auch β -Galaktosidase (Abb. 7E). E12.5 können einige endokrine Zellen beobachtet werden, die Insulin oder Glukagon produzieren (Slack, 1995; Teitelman et al., 1993). Alle Zellen, die eines dieser Hormone exprimierten, waren auch β -Galaktosidase⁺ (Abb. 7F,G). Diese Experimente zeigten, dass β -Galaktosidase (und also *Insm1*) in den differenzierenden endokrinen Zellen ausgeprägt wird. Der Transkriptionsfaktor *Ptf1a* wird ab E12.5 nur in den exokrinen Zellen exprimiert (Asayesh et al., 2005; Krapp et al., 1996) und wurde nicht in β -Galaktosidase⁺ Zellen beobachtet (Abb. 7H).

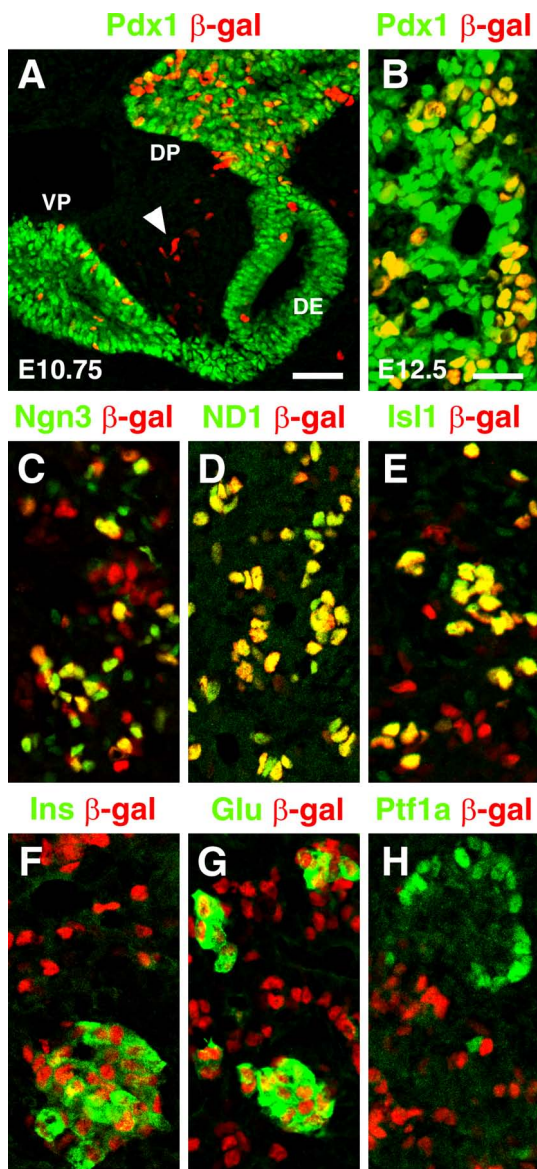


Abb. 7: *Insm1* wird ausschließlich in den endokrinen Zellen des Pankreas exprimiert. Immunhistologische Analyse von β -Galaktosidase, Transkriptionsfaktoren und endokrinen Hormonen in E10.75 und E12.5 heterozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tieren. Schnitte durch die gesamte Pankreasanlage (A) und die dorsale Pankreasanlage (B-H) wurden mit Antikörpern gegen β -Galaktosidase (rot), Pdx1 (A,B), Ngn3 (C), NeuroD1 (D), Isl1 (E), Insulin (F), Glukagon (G) und Ptf1a (H) (alle grün) gefärbt. Die Überlagerung der roten und grünen Signale ergibt ein gelbes Signal. (A,B) In *Insm1^{lacZ}/+*-Tieren finden sich viele β -Galaktosidase⁺ Zellen verstreut im Pdx1⁺ Pankreasepithel. β -Galaktosidase⁺ Zellen außerhalb der Pdx1⁺ Domäne sind ringförmig im Darmmesenchym lokalisiert (Pfeilspitze). (C-G) β -Galaktosidase⁺ Zellen exprimieren die endokrin-spezifischen Transkriptionsfaktoren Ngn3, NeuroD1 und Isl1 sowie Insulin und Glukagon. (H) β -Galaktosidase und der exokrinspezifische Faktor Ptf1a sind nicht ko-exprimiert. Abkürzungen: DP dorsale Pankreasanlage, DE Darmepithel, VP ventrale Pankreasanlage; ND1 NeuroD1, Ins Insulin, Glu Glukagon. Balken: 80 μ m (A), 20 μ m (B).

3.3 *Insm1* ist essentiell für die Differenzierung endokriner Zellen

Im Folgenden wurde die Entwicklung des Pankreas in *Insm1^{lacZ}/+*- und *Insm1^{lacZ}/Insm1^{lacZ}*-Mäusen verglichen, um den Phänotyp der Mutation zu bestimmen. Dabei wurden die Organogenese, die Spezifizierung der endokrinen Zellen und deren Differenzierung anhand der Expression von Transkriptionsfaktoren und Hormonen analysiert.

3.3.1 Endokrine Zellen werden in homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tieren korrekt spezifiziert

Ich untersuchte zuerst, ob die frühe Organogenese des Pankreas und die Spezifizierung des endokrinen Kompartiments durch die Mutation von *Insm1* beeinträchtigt ist. *In situ*-Hybridisierungen mit einer *Pdx1*-spezifischen Sonde zeigten, dass das Epithel der dorsalen

und ventralen Knospe in *Insm1^{lacZ/+}*- und *Insm1^{lacZ/Insm1^{lacZ}}*-Tieren (E12.5) eine vergleichbare Größe aufwiesen (Abb. 8A,B). Die immunhistologische Analyse der dorsalen Knospe von heterozygoten und homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Mäusen zeigte eine ähnliche Verteilung von β -Galaktosidase⁺ Zellen im Pankreasepithel (Abb. 8C,D). Ich beobachtete keinen Unterschied in der Expression der Transkriptionsfaktoren Ngn3, NeuroD1, Isl1 und Ptf1a in E12.5 heterozygoten Kontrolltieren und *Insm1*-mutanten Tieren (Abb. 8E-L).

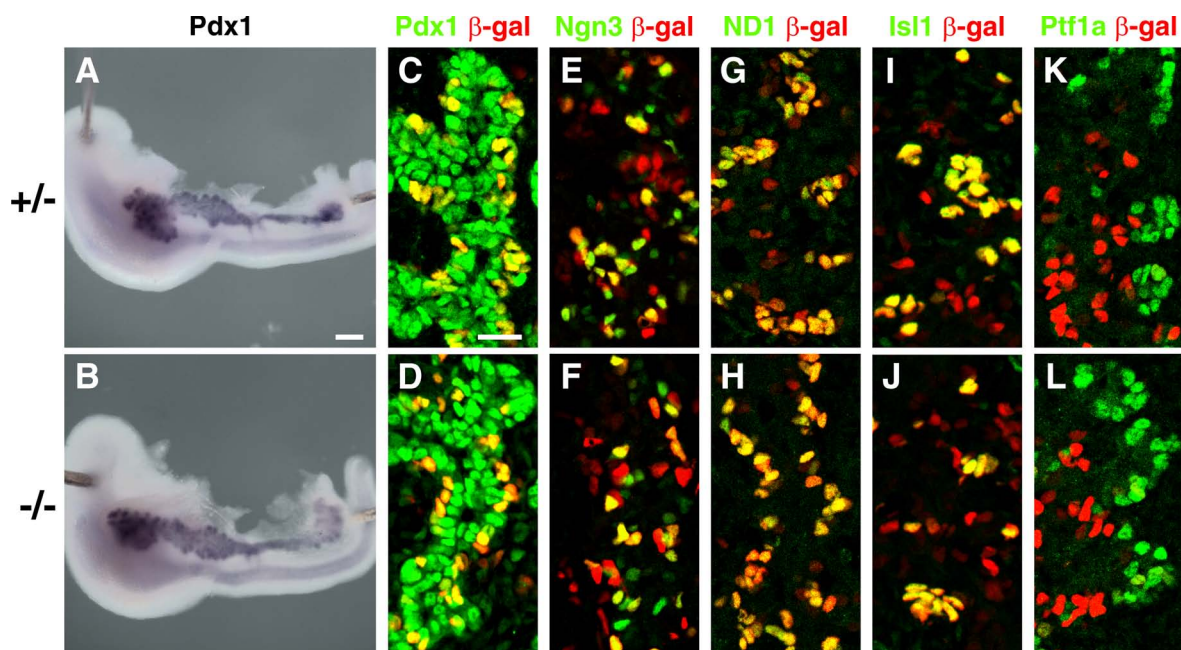


Abb. 8: Korrekte Spezifizierung von endokrinen Zellen in E12.5 *Insm1*-mutanten Tieren. (A,B) *In situ*-Hybridisierung mit einer *Pdx1*-spezifischen Sonde auf E12.5 *Insm1^{lacZ/+}*- und *Insm1^{lacZ/Insm1^{lacZ}}*-Tieren. Gezeigt ist angefärbtes endodermales Gewebe im Bereich der Pankreasanlage. Die starke Expression von *Pdx1* markiert das Pankreasprimordium, eine schwache Expression wird in Teilen des Magens und Duodenums beobachtet. Die Größe des Pankreasepithels ist in heterozygoten und homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tieren vergleichbar. (C-L) Immunhistologische Analyse von β -Galaktosidase, endokrinen und exokrinen Transkriptionsfaktoren auf Schnitten durch die dorsale Pankreasanlage von E12.5 heterozygoten und homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tieren. Fluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen β -Galaktosidase (rot), *Pdx1* (C,D), *Ngn3* (E,F), *NeuroD1* (G,H), *Isl1* (I,J), *Ptf1a* (K,L) (alle grün). Die Expression von *Pdx1*, *Ngn3*, *NeuroD1*, *Isl1* und *Ptf1a* ist im Pankreas von heterozygoten Kontrolltieren und homozygoten *Insm1*-mutanten Tieren vergleichbar. Abkürzungen: +/- *Insm1^{lacZ/+}*-Mäuse, -/- *Insm1^{lacZ/Insm1^{lacZ}}*-Mäuse, ND1 *NeuroD1*. Balken: 400 μ m (A), 20 μ m (C).

Ein Vergleich der β -Galaktosidase⁺ Zellen im Pankreas zeigte ähnliche Zellzahlen in heterozygoten Kontrolltieren und *Insm1*-mutanten Tieren (E15.5): 355 +/- 82 bzw. 281 +/- 69 Zellen/Schnitt mit $p = 0,2201$, $n = 4$. Die Verteilung von *Ngn3*, *NeuroD1*, *Isl1* und *Ptf1a* war in E15.5 *Insm1^{lacZ/+}*- und *Insm1^{lacZ/Insm1^{lacZ}}*-Tieren ebenfalls vergleichbar (Abb. 9A-F). Des Weiteren war die Expression des Transkriptionsfaktors *Nkx2.2*, der für die Differenzierung der β -Zellen essentiell ist (Sussel et al., 1998), in heterozygoten und

homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Mäusen vergleichbar (Abb. 9G,H). Zusammen zeigen diese Analysen, dass das endokrine Kompartiment im Pankreas von E15.5 *Insm1^{lacZ}/*Insm1^{lacZ}**-Tieren normal spezifiziert wird.

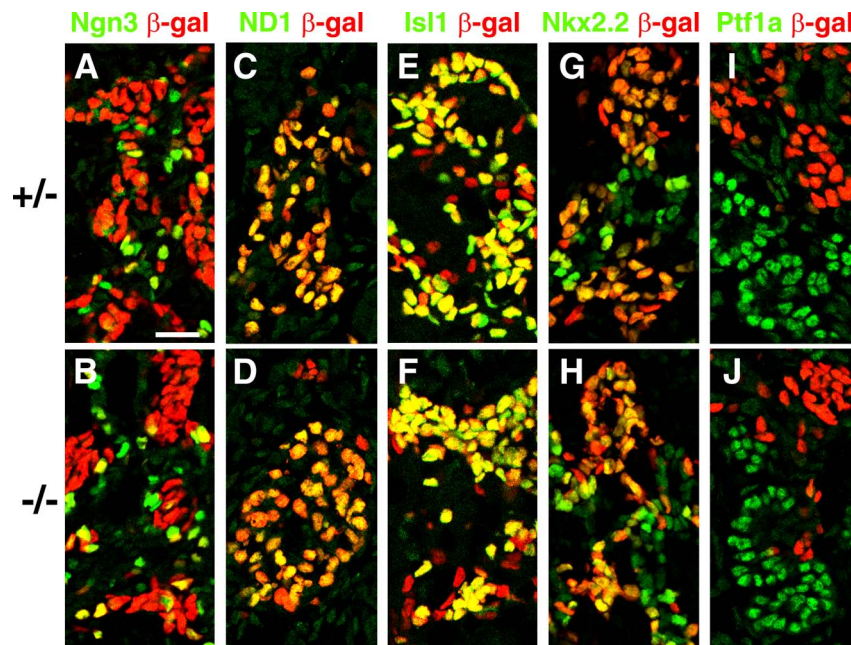


Abb. 9: Expression von Transkriptionsfaktoren in E15.5 *Insm1*-mutanten Tieren. Immunhistologische Analyse von β -Galaktosidase, endokrinen und exokrinen Transkriptionsfaktoren auf Schnitten durch das dorsale Pankreas von E15.5 *Insm1^{lacZ}/+* und *Insm1^{lacZ}/*Insm1^{lacZ}**-Tieren. Fluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen β -Galaktosidase (rot), NeuroD1 (C,D), Isl1 (E,F), Nkx2.2 (G,H), Ptf1a (I,J) (alle grün). (A-F,I,J) Die Expression von Ngn3, NeuroD1, Isl1 und Ptf1a ist im Pankreas von heterozygoten und homozygoten *Insm1*-Mutanten vergleichbar. (G,H) Nkx2.2 wird in heterozygoten Kontrolltieren und *Insm1*-mutanten Tieren schwach im Pankreasepithel exprimiert. Einige β -Galaktosidase⁺ Zellen exprimieren Nkx2.2. Abkürzungen: +/- *Insm1^{lacZ}/+*-Mäuse, -/- *Insm1^{lacZ}/*Insm1^{lacZ}**-Mäuse, ND1 NeuroD1. Balken: 20 μ m.

3.3.2 Reduzierte Zahl Insulin⁺ und Glukagon⁺ Zellen in *Insm1*-mutanten Mäusen

Die terminale Differenzierung endokriner Pankreaszellen ist durch die Expression von Hormonen gekennzeichnet. Die ersten, vereinzelt Insulin⁺ und Glukagon⁺ Zellen lassen sich in der Pankreasanlage ab E9.5 immunhistologisch nachweisen (Slack, 1995; Teitelman et al., 1993). Die immunhistologischen Analysen von E12.5 *Insm1^{lacZ}/+* und *Insm1^{lacZ}/*Insm1^{lacZ}**-Tieren zeigten, dass eine vergleichbare Proportion der β -Galaktosidase⁺ Zellen Insulin produzierten (Abb. 10A-C). Das Expressionsniveau von Glukagon war in den homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Mäusen allerdings niedriger (Abb. 10D,E) und die Proportion der Glukagon-produzierenden Zellen signifikant verringert: 30,8 % aller β -Galaktosidase⁺ Zellen produzierten Glukagon in heterozygoten Kontrolltieren, in *Insm1*-mutanten Tieren konnte ich nur 18,5 % beobachten (Abb. 10F).

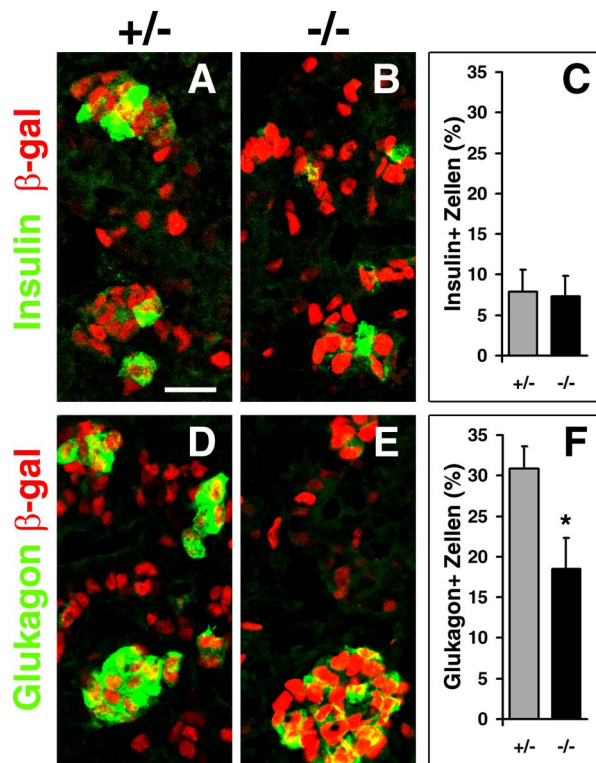


Abb. 10: *Insm1* kontrolliert die Differenzierung endokriner Zellen. Immunhistologische Analyse von β -Galaktosidase und den Hormonen Insulin und Glukagon auf Schnitten durch das dorsale Pankreas von E12.5 heterozygoten und homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tieren. Fluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen β -Galaktosidase (rot), Insulin (A,B) und Glukagon (D,E) (beide grün). Quantifizierung der Anzahl Insulin⁺ (n = 3 dorsale Pankreata, p = 0,8096) (C) und Glukagon⁺ Zellen (n = 3, p = 0,0133) (F). Gezeigt sind die Anteile der β -Galaktosidase⁺ Zellen, die ein Hormon koxprimieren. (A-C) Im Pankreas von heterozygoten und homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tieren werden ähnliche Proportionen von Insulin⁺ Zellen beobachtet. (D-F) Die Proportion der Glukagon⁺ Zellen ist um 40,2 % vermindert und das Expressionsniveau von Glukagon ist in *Insm1^{lacZ}/Insm1^{lacZ}*-Tieren reduziert. Abkürzungen: +/- heterozygote *Insm1^{lacZ}*-Mäuse, -/- homozygote *Insm1^{lacZ}*-Mäuse, * p < 0,05. Balken: 20 μ m.

Die meisten endokrinen Zellen werden während der zweiten Umwandlung produziert und erscheinen nach E13 (Pictet and Rutter, 1972; Slack, 1995). In E15.5 heterozygoten *Insm1^{lacZ}*-Mäusen ließen sich viele Insulin⁺ Zellen nachweisen, in homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Mäusen waren dagegen nur sehr wenige zu entdecken (Abb. 11A,B). Eine starke Abnahme von Insulin-produzierenden Zellen war sowohl im dorsalen als auch im ventralen Teil des Pankreas zu beobachten (Abb. 11C). 18,7 % der endokrinen Zellen des dorsalen Pankreas produzierten Insulin in den heterozygoten Kontrolltieren, aber nur 0,4 % in *Insm1*-mutanten Tieren. In *Insm1^{lacZ}/+/-* und *Insm1^{lacZ}/Insm1^{lacZ}*-Mäusen ließen sich Glukagon⁺ Zellen beobachten, das Expressionsniveau von Glukagon war in *Insm1^{lacZ}/Insm1^{lacZ}*-Mäusen jedoch deutlich niedriger (Abb. 11D,E). Eine Abnahme von Glukagon-produzierenden Zellen war sowohl im dorsalen als auch im ventralen Pankreas zu beobachten (Abb. 11F). 16,1 % der endokrinen Zellen des dorsalen Pankreas produzierten Glukagon in heterozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tieren, und nur 6,8 % in homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tieren. Somit scheint die terminale Differenzierung der β -Zellen im Pankreas von E15.5 *Insm1^{lacZ}/Insm1^{lacZ}*-Mäusen vollständig blockiert und die Differenzierung der α -Zellen beeinträchtigt zu sein.

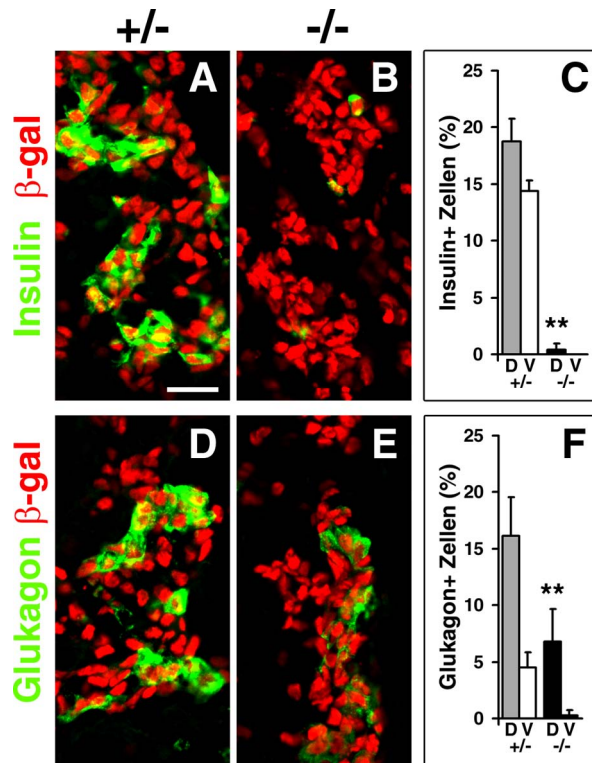


Abb. 11: Differenzierung von α - und β -Zellen während der zweiten Umwandlung des Pankreas.

Immunhistologische Analyse von β -Galaktosidase, Insulin und Glukagon auf Schnitten durch das dorsale Pankreas von E15.5 *Insm1^{lacZ}/+/-* und *Insm1^{lacZ}/Insm1^{lacZ}*-Mäusen. Fluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen β -Galaktosidase (rot), Insulin (A,B) und Glukagon (D,E) (beide grün). Quantifizierung der Analyse Insulin⁺ (n = 3 dorsale Pankreata, p = 0,0027) (C) und Glukagon⁺ Zellen mit (n = 4, p = 0,0062) (F). Gezeigt sind die Anteile der β -Galaktosidase⁺ Zellen, die ein Hormon koexprimieren. (A-C) In homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tieren können nur wenige Insulin produzierende Zellen beobachtet werden. (D-F) Die Proportion der Glukagon⁺ Zellen ist in *Insm1*-mutanten Tieren halbiert und die Glukagonmenge in den Zellen ist reduziert. Abkürzungen: +/- heterozygote *Insm1^{lacZ}*-Mäuse, -/- homozygote *Insm1^{lacZ}*-Mäuse, D dorsaler Pankreas, V ventraler Pankreas, ** p < 0,01. Balken: 20 μ m.

3.3.3 Abnorme Differenzierung von α - und β -Zellen in *Insm1^{lacZ}/Insm1^{lacZ}*-Tieren

Ich beobachtete im Weiteren, dass die Expression mehrerer Transkriptionsfaktoren, die die Differenzierung von β -Zellen steuern, in *Insm1^{lacZ}/Insm1^{lacZ}*-Mäusen verändert war (Abb. 12). Pdx1 kontrolliert die terminale Differenzierung von β -Zellen und ist für die Erhaltung von β -Zellen essentiell (Ahlgren et al., 1998; Cissell et al., 2003; Holland et al., 2002; Ohlsson et al., 1993). E15.5 wird Pdx1 in den differenzierenden β -Zellen stark und in den Zellen des Pankreasepithels nur schwach exprimiert (Guz et al., 1995; Offield et al., 1996). In homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Mäusen gab es nur sehr wenige Zellen, die Pdx1 stark produzierten (Abb. 12A-D). Die schwache Expression im Pankreasepithel war dagegen in heterozygoten Kontrolltieren und *Insm1*-mutanten Tieren ähnlich. Nkx6.1 wird ebenfalls auf hohem Niveau in β -Zellen ausgeprägt und für deren Entwicklung benötigt; es ist auf einem niedrigeren Niveau aber auch in epithelialen Zellen vorhanden (Sander et al., 2000; Wang et al., 2004a). In homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tieren gab es nur sehr wenige Zellen, die Nkx6.1 stark exprimierten (Abb. 12E-H). Die schwache Produktion von Nkx6.1 im Pankreasepithel von *Insm1^{lacZ}/+/-* und *Insm1^{lacZ}/Insm1^{lacZ}*-Mäusen war jedoch vergleichbar. MafA wird für die terminale Differenzierung von β -Zellen benötigt und spezifisch in β -Zellen exprimiert (Kataoka et al., 2002; Olbrot et al., 2002; Zhang et al., 2005). In *Insm1*-

mutanten Tieren fanden sich jedoch keine MafA⁺ Zellen (Abb. 12I-L). Somit waren verschiedene Aspekte der β -Zell-Differenzierung in *Insm1^{lacZ}/Insm1^{lacZ}*-Mäusen verändert.

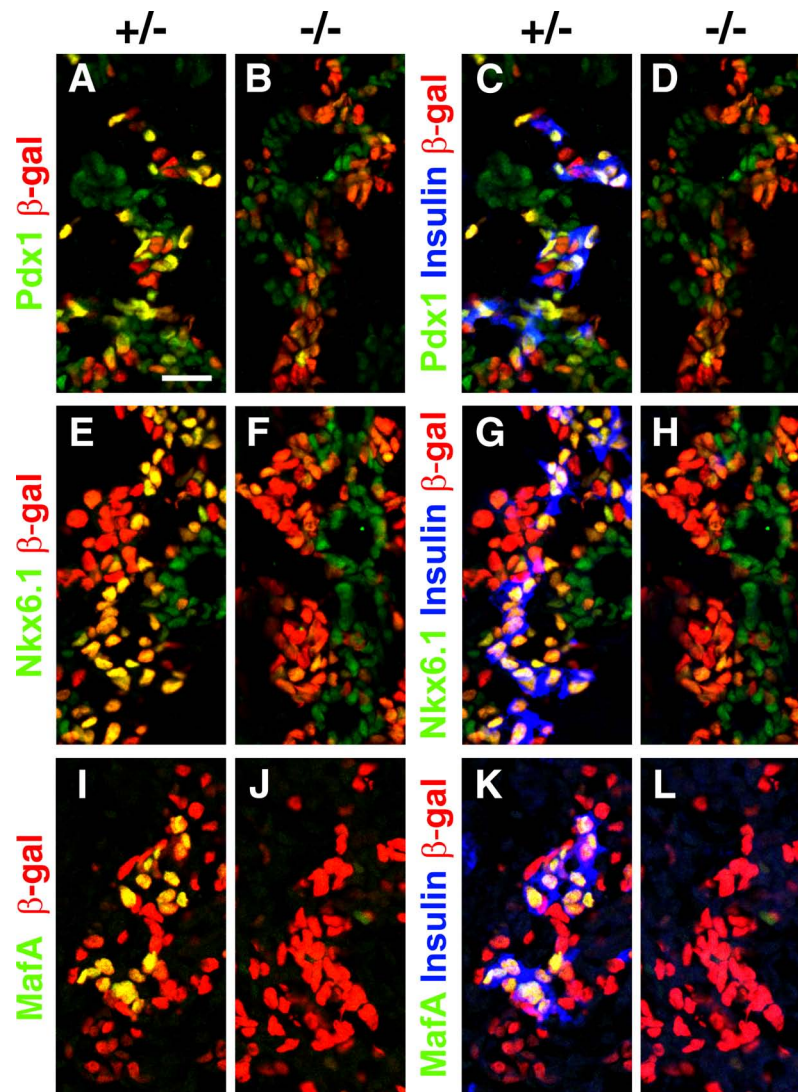


Abb. 12: Differenzierung von β -Zellen in *Insm1*-mutanten Mäusen. Immunhistologische Analyse von β -Galaktosidase und β -Zell-spezifischen Faktoren auf Schnitten durch das dorsale Pankreas von E15.5 *Insm1^{lacZ}/+/-* und *Insm1^{lacZ}/Insm1^{lacZ}*-Tieren. Fluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen β -Galaktosidase (rot), Pdx1 (A-D), Nkx6.1 (E-H), MafA (I-K) (alle grün) und Insulin (C,D,G,H,K,L) (blau). (A-D) Pdx1 wird in homozygoten und heterozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tieren schwach im Pankreasepithel exprimiert (Pdx1^{niedrig}). Zellen, die Pdx1 stark exprimieren (Pdx1^{hoch}) sind in heterozygoten Kontrolltieren positiv für β -Galaktosidase. Einige β -Galaktosidase⁺, Pdx1^{hoch} Zellen sind in *Insm1^{lacZ}/+/-*-Tieren zudem positiv für Insulin. Im Gegensatz dazu gibt es fast keine Pdx1^{hoch} oder Insulin⁺ Zellen in *Insm1^{lacZ}/Insm1^{lacZ}*-Tieren. (E-H) Nkx6.1 wird in homozygoten wie in heterozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tieren schwach im Pankreasepithel exprimiert (Nkx6.1^{niedrig}). Zellen, die Nkx6.1 stark exprimieren (Nkx6.1^{hoch}) sind in heterozygoten Kontrolltieren positiv für β -Galaktosidase. Fast alle β -Galaktosidase⁺, Nkx6.1^{hoch} Zellen sind in *Insm1^{lacZ}/+/-*-Tieren zudem positiv für Insulin. Im Gegensatz dazu gibt es kaum Nkx6.1^{hoch} oder Insulin⁺ Zellen in *Insm1^{lacZ}/Insm1^{lacZ}*-Tieren. (I-K) MafA⁺ Zellen ko-exprimieren Insulin und β -Galaktosidase in heterozygoten Kontrolltieren, aber MafA⁺ Zellen können in *Insm1*-mutanten Tieren nicht beobachtet werden. Abkürzungen: +/- heterozygote *Insm1^{lacZ}*-Mäuse, -/- homozygote *Insm1^{lacZ}*-Mäuse. Balken: 20 μ m.

Ich untersuchte auch die Expression von Transkriptionsfaktoren, die in α -Zellen exprimiert werden. Der Transkriptionsfaktor Arx wirkt als Repressor von Pax4 und kontrolliert so die Entwicklung von α -Zellen (Collombat et al., 2003). In heterozygoten Kontrolltieren wird Glukagon vornehmlich in Arx⁺ Zellen produziert (Abb. 13C). In homozygoten *Insm1*-mutanten Tieren war die Anzahl von Arx⁺ Zellen drastisch reduziert; zudem beobachtete ich Glukagon auch in Arx⁻ Zellen (Abb. 13A-D). MafB wird in differenzierenden α -Zellen exprimiert (Artner et al., 2006). In homozygoten *Insm1*^{lacZ}-Mäusen fanden sich weniger MafB⁺ Zellen als in heterozygoten *Insm1*^{lacZ}-Mäusen (Abb. 13E-H), somit sind auch verschiedene Aspekte der Differenzierung von α -Zellen in *Insm1*^{lacZ}/*Insm1*^{lacZ}-Tieren verändert.

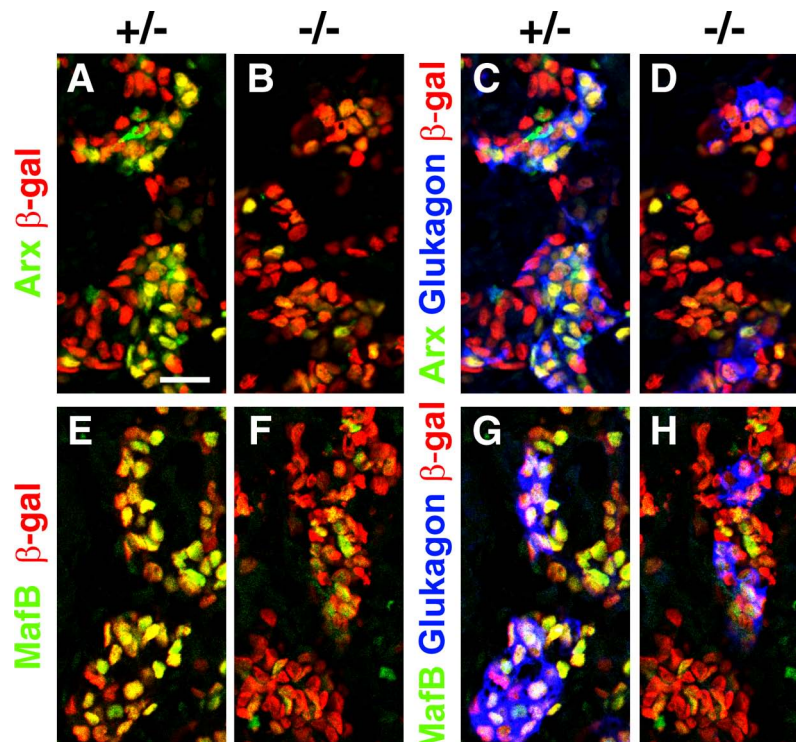


Abb. 13: Differenzierung von α -Zellen in *Insm1*-mutanten Mäusen. Immunhistologische Analyse von β -Galaktosidase und α -Zell-spezifischen Faktoren auf Schnitten durch das dorsale Pankreas von E15.5 *Insm1*^{lacZ/+}- und *Insm1*^{lacZ/Insm1}^{lacZ}-Tieren. Fluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen β -Galaktosidase (rot), Arx (A-D), MafB (E-H) (beide grün) und Glukagon (C,D,G,H) (blau). (A-D) Arx⁺ Zellen ko-exprimieren Glukagon und β -Galaktosidase in heterozygoten *Insm1*^{lacZ}-Tieren. In homozygoten *Insm1*^{lacZ}-Tieren werden deutlich weniger Arx⁺ Zellen beobachtet und einige der Glukagon⁺ Zellen exprimieren Arx nicht. (E-H) MafB⁺ Zellen ko-exprimieren Glukagon und β -Galaktosidase in heterozygoten Kontrollen und es sind deutlich weniger MafB⁺ Zellen in homozygoten Mutanten vorhanden. Abkürzungen: +/- *Insm1*^{lacZ/+}-Mäuse, -/- *Insm1*^{lacZ/Insm1}^{lacZ}-Mäuse. Balken: 20 μ m.

3.3.4 Entwicklung von β -Zellvorläufern in homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Mäusen blockiert

Die endokrinen Langerhans'schen Inseln finden sich verteilt im exokrinen Pankreas und ein Vergleich von heterozygoten Kontrolltieren und *Insm1*-mutanten Tieren zeigte eine Veränderung in der Morphologie der Inseln. Auffällig war, dass die Zellkerne in homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Mäusen dichter gepackt waren (Abb. 14A,B).

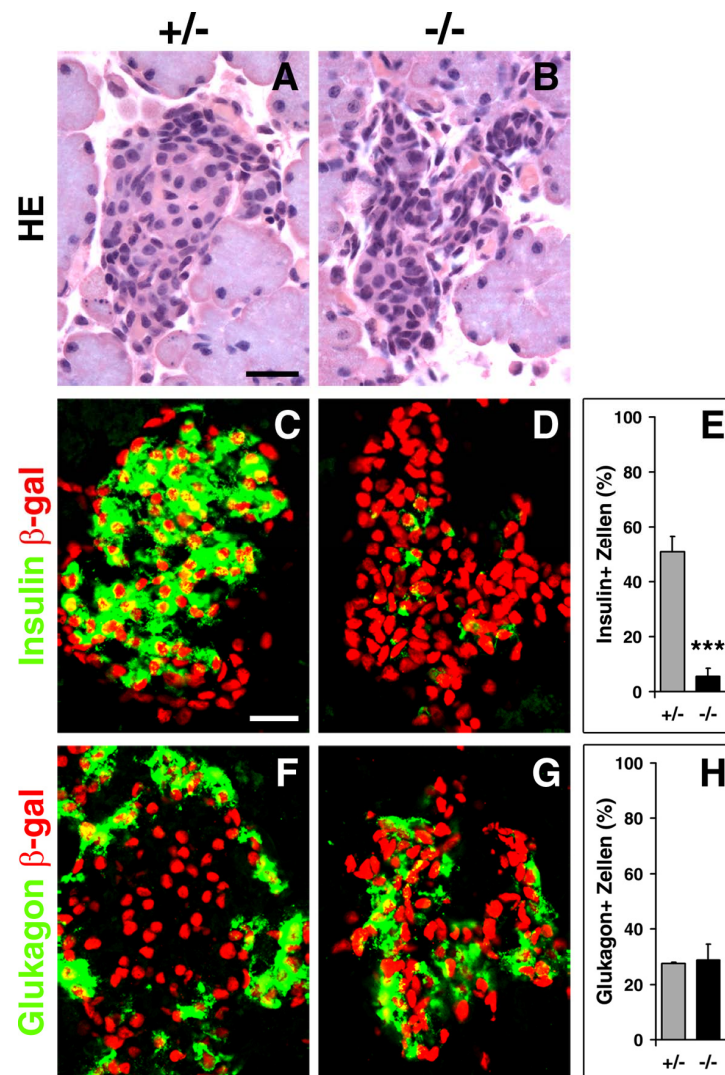


Abb. 14: Veränderte Proportionen endokriner Zelltypen in perinatalen *Insm1*-mutanten Tieren. (A,B) Analyse der Pankreasmorphologie von E18.5 *Insm1^{lacZ}/+* und *Insm1^{lacZ}/Insm1^{lacZ}*-Tieren auf histologischen Schnitten, die mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt wurden. In beiden sind klar begrenzte Langerhans'sche Inseln zu erkennen, die in das exokrine Pankreas eingebettet sind. Die Kerne der Inselzellen sind in den homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Mäusen jedoch dichter gepackt. (C-H) Immunhistologische Analyse von β -Galaktosidase, Insulin und Glukagon auf Schnitten durch das Pankreas von E18.5 heterozygoten und homozygoten *Insm1^{lacZ}* Tieren. Fluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen β -Galaktosidase (rot), Insulin (C,D) und Glukagon (F,G) (beide grün). Quantifizierung der Analyse Insulin⁺ (n = 3 Pankreata, p = 0,0014) (E) und Glukagon⁺ Zellen (n = 4, p = 0,6742) (H). Gezeigt sind die Anteile der β -Galaktosidase⁺ Zellen, die ein Hormon ko-exprimieren. (C-E) Die Proportion Insulin⁺ Zellen ist im Pankreas von homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tieren 89,2 % kleiner als in heterozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tieren. (F-H) Die Proportion Glukagon⁺ Zellen ist im Pankreas der heterozygoten Kontrolltieren und *Insm1*-mutanten Tieren vergleichbar. (Fortsetzung (Abb. 14I-Q) siehe unten).

Die Zahl der β -Galaktosidase⁺ Zellen war leicht vermindert: 599 +/- 48 bzw. 444 +/- 47 Zellen/Schnitt in *Insm1^{lacZ}/+/-* und *Insm1^{lacZ}/Insm1^{lacZ}*-Tieren mit $p = 0,0160$, $n = 3$. Die Proportionen der β -, δ - und PP-Zellen, sowie der Ghrelin-produzierenden Zellen waren in den *Insm1*-mutanten Tieren signifikant verändert; der Anteil der Insulin-produzierenden Zellen war stark verringert (Abb. 14C-E,I-Q).

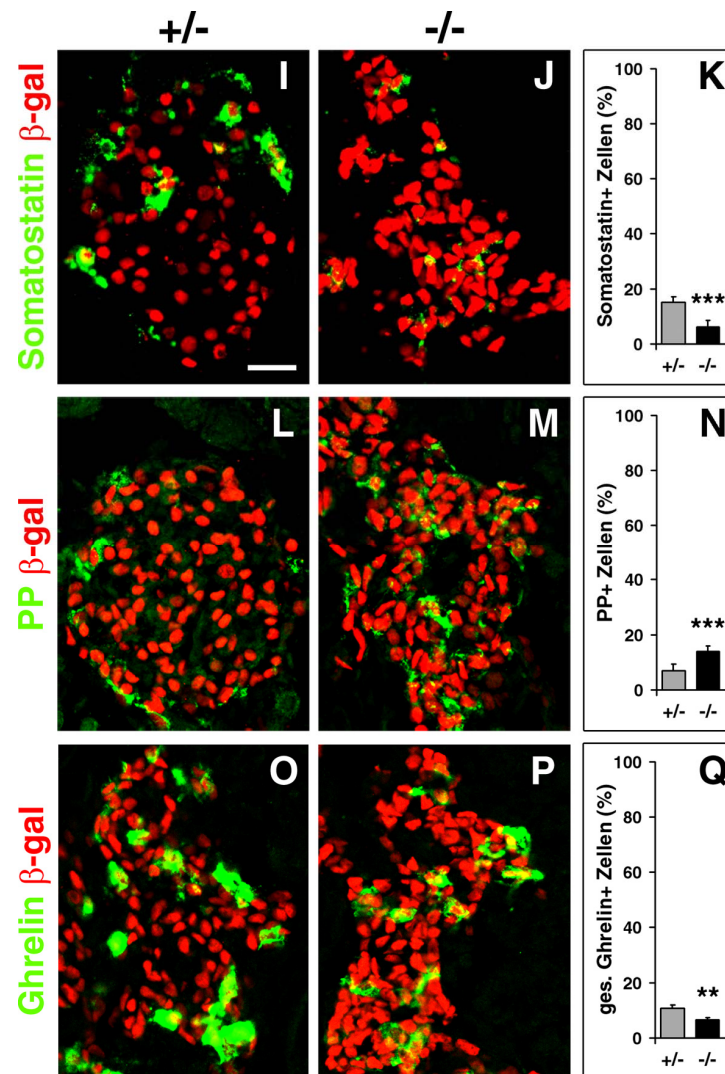


Abb. 14 (Fortsetzung): (I-Q) Immunhistologische Analyse von β -Galaktosidase, Somatostatin, PP und Ghrelin auf Pankreasschnitten von E18.5 *Insm1^{lacZ}/+/-* und *Insm1^{lacZ}/Insm1^{lacZ}*-Tieren. Fluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen β -Galaktosidase (rot), Somatostatin (I,J), PP (L,M) und Ghrelin (O,P) (alle grün). Quantifizierung der Analyse Somatostatin⁺ ($n = 4$ Pankreata, $p = 0,0016$) (K), PP⁺ ($n = 4$, $p = 0,0035$) (N) und Gesamtzahl der Ghrelin⁺ Zellen ($n = 3$, $p = 0,066$) (Q). Gezeigt sind die Anteile der β -Galaktosidase⁺ Zellen, die ein Hormon ko-exprimieren. Die Anzahl der Somatostatin⁺ und Ghrelin⁺ Zellen ist im Pankreas von homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tieren um 59,4 % bzw. 40,0 % kleiner, aber die Anzahl PP⁺ Zellen ist verdoppelt. Abkürzungen: +/- *Insm1^{lacZ}/+/-*-Mäuse, -/- *Insm1^{lacZ}/Insm1^{lacZ}*-Mäuse, HE Hämatoxylin/Eosin, ges. gesamte, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$. Balken: 20 μ m (A,B).

Der Anteil der Somatostatin- und Ghrelin-produzierenden Zellen war reduziert und der Anteil der PP-produzierenden Zellen erhöht. Im Gegensatz zu früheren Stadien war die

Proportion Glukagon-produzierender Zellen in E18.5 *Insm1^{lacZ/+}*- und *Insm1^{lacZ/Insm1^{lacZ}}*-Tieren allerdings vergleichbar (Abb. 14F-H). Diese Analyse zeigte, dass die Differenzierung von β -Zellen in homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Mäusen bis zur Geburt blockiert ist, während sich die Entwicklung von α -Zellen normalisiert hat.

Der massiv verringerte Anteil von Insulin-produzierenden Zellen im Pankreas von *Insm1^{lacZ/Insm1^{lacZ}}*-Tieren lässt sich nicht durch den selektiven Verlust von β -Zellen erklären, da die Zahl der endokrinen (β -Galaktosidase⁺) Zellen nur leicht abnimmt (s. o.). Ich analysierte deshalb, ob alle β -Galaktosidase⁺ Zellen in homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Mäusen Hormone produzieren (s. 3.2.2) und beobachtete, dass der Anteil von β -Galaktosidase⁺ Zellen, die kein Hormon produzieren in *Insm1*-mutanten Mäusen erhöht war (Abb. 15A-C).

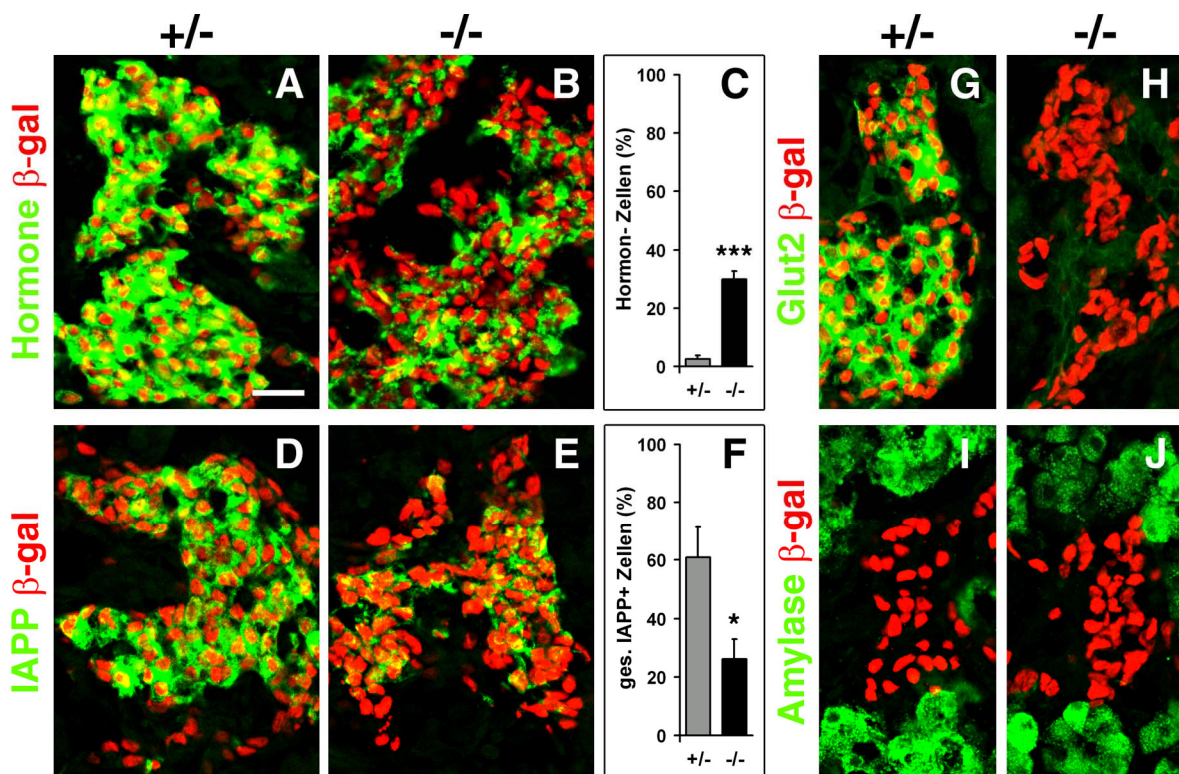


Abb. 15: Blockierte Differenzierung von β -Zellen in *Insm1*-mutanten Tieren. Immunhistologische Analyse von β -Galaktosidase, endokrinen und exokrinen Proteinen auf Pankreasschnitten von E18.5 *Insm1^{lacZ/+}*- und *Insm1^{lacZ/Insm1^{lacZ}}*-Tieren. Fluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen β -Galaktosidase (rot), einem Gemisch von Antikörpern gegen Insulin, Glukagon, Somatostatin, PP und Ghrelin (A,B), IAPP (D,E), Glut2 (G,H) und Amylase (I,J) (alle grün). Quantifizierung der Analyse Hormon⁺ (n = 3 Pankreata, p = 0,0014) (C) und IAPP⁺ Zellen (n = 3, p = 0,0124) (F). Gezeigt sind die Anteile der β -Galaktosidase⁺ Zellen, die ein Hormon ko-exprimieren. (A-C) Es können deutlich weniger Hormon⁺ Zellen im Pankreas von homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tieren beobachtet werden; (D-F) auch die Anzahl der IAPP⁺ Zellen ist verringert und (G,H) Glut2⁺ Zellen können nicht beobachtet werden. (I,J) Die Expression von Amylase ist unverändert. Abkürzungen: +/- *Insm1^{lacZ/+}*-Mäuse, -/- *Insm1^{lacZ/Insm1^{lacZ}}*-Mäuse, ges. gesamte, * p < 0,05, *** p < 0,005. Balken: 20 μ m.

Das Islet amyloid polypeptide (IAPP) wird spezifisch in β -Zellen exprimiert und zusammen mit Insulin in Vesikeln gelagert und sezerniert (Cooper et al., 1989; Nishi et al., 1989). IAPP reguliert die Glukose-induzierte Insulinsekretion und Diabetes Typ 2 ist oft mit Ablagerungen von IAPP verbunden (Cooper et al., 1987; Gebre-Medhin et al., 1998). Der Anteil von IAPP⁺ Zellen ist in *Insm1^{lacZ}/Insm1^{lacZ}*-Mäusen reduziert; allerdings weniger stark als der Anteil der Insulin-produzierenden Zellen (Abb. 15D-F und Abb. 14C-E). Der Glukosetransporter 2 (Glut2) wird im Pankreas spezifisch in β -Zellen ausgeprägt (Orci et al., 1989; Thorens et al., 1988). In homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tieren konnte ich keine Glut2⁺ Zellen beobachten (Abb. 15G,H). Die Expression von Amylase war in *Insm1*-mutanten Mäusen unverändert (Abb. 15I,J), d. h. die Entwicklung der exokrinen Zellen ist durch die Mutation von *Insm1* nicht beeinträchtigt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Pankreas von *Insm1^{lacZ}/Insm1^{lacZ}*-Mäusen fast keine Insulin⁺ und Glut2⁺ Zellen beobachtet wurden. *Insm1*-mutante Zellen exprimierten jedoch Faktoren, die typischerweise in β -Zellen ausgeprägt werden, wie z. B. IAPP. Dies deutet daraufhin, dass die terminale Differenzierung der β -Zellen blockiert ist.

3.4 *Insm1* reguliert Gene der endokrinen Sekretionsmaschinerie

3.4.1 Genomweite Expressionsanalyse mit Microarrays

Ich führte eine genomweite Expressionsanalyse an Pankreata von E15.5 und E18.5 Wildtyp- und *Insm1^{lacZ}/Insm1^{lacZ}*-Tieren durch. Dafür isolierte ich totale RNA und prozessierte sie für die Hybridisierung auf Affymetrix MOE430 2.0 microarrays, die von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Norbert Hübner (Experimentelle Genetik von Herz-Kreislaufkrankungen, MDC) durchgeführt wurde. Der Vergleich der Expressionsintensitäten von Wildtyp-Tieren und homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Tieren ergab eine Liste differentiell exprimierter Gene, deren Transkriptionsniveau im Pankreas von *Insm1^{lacZ}/Insm1^{lacZ}*-Tieren im Vergleich zu Wildtypen signifikant verändert war ($p < 0,05$) (Tab. 6).

3.4.2 Deregulierung endokriner Gene in *Insm1^{lacZ}/Insm1^{lacZ}*-Tieren

Ich beobachtete eine reduzierte Expression von Hormonen im Pankreas von *Insm1^{lacZ}/Insm1^{lacZ}*-Mäusen. Die Expression von *Insulin I* und *Insulin II* war mehr als 20-fach vermindert. *Glukagon*- und *Somatostatin*-Transkripte waren 3-4-fach reduziert. *PP* wurde stärker und *IAPP* schwächer ausgeprägt.

Tab. 6: Differenziell exprimierte Gene im Pankreas von E15.5 und E18.5 *Insm1^{lacZ}/Insm1^{lacZ}*-Mäusen. Die differentielle Expression bestimmter Gene wurde mit der Immunhistologie der jeweiligen Genprodukte verglichen (entsprechende Gene sind fettgedruckt). Abkürzungen: FV Faktor der Veränderung der Genexpression, nv nicht verändert, p (Transkript) präsent, np (Transkript) nicht präsent, ns nicht signifikant, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$.

| Gen | E15.5 | | E18.5 | |
|--|---------|------|--------|------|
| | FV | p | FV | p |
| <u>Pankreatische Hormone</u> | | | | |
| Insulin I | -103,64 | **** | -25,15 | **** |
| Insulin II | -86,94 | **** | -23,24 | **** |
| Glukagon | -4,20 | **** | -4,78 | **** |
| Somatostatin | -3,38 | **** | -3,11 | ns |
| PP | +1,74 | **** | +1,24 | ns |
| IAPP | -2,58 | **** | -0,85 | ns |
| NPY | -15,05 | **** | -7,20 | **** |
| Ghrelin | nv, p | ns | nv, p | ns |
| <u>Transkriptionsfaktoren</u> | | | | |
| Pdx1 | nv, p | ns | -1,34 | ns |
| Isl1 | nv, p | ns | nv, p | ns |
| Ngn3 | nv, p | ns | +1,87 | ns |
| NeuroD1 | -1,90 | **** | -2,27 | **** |
| Pax4 | nv, p | ns | nv, p | ns |
| Arx | nv, np | - | nv, np | - |
| Nkx2.2 | nv, p | ns | nv, p | ns |
| Nkx6.1 | nv, p | ns | -1,86 | **** |
| Pax6 | -1,84 | **** | -2,33 | ns |
| MafA | nv, np | - | nv, np | - |
| MafB | -3,28 | **** | -2,68 | **** |
| <u>Faktoren im Glukosemetabolismus</u> | | | | |
| Glukose-6-Phosphatase, Insel-spezifisch | -10,30 | **** | -14,22 | **** |
| Glukosetransporter 2 | -1,67 | *** | -3,63 | ns |
| Glukokinase | -2,01 | **** | -1,44 | ns |
| <u>Faktoren für die Hormonprozessierung und -sekretion</u> | | | | |
| Prohormonkonvertase 1/3 | -2,44 | **** | -2,88 | **** |
| Prohormonkonvertase 2 | -4,00 | **** | -3,92 | **** |
| Chromogranin A | -6,16 | **** | -54,56 | **** |
| Chromogranin B | -75,54 | **** | -77,96 | **** |
| Sekretogranin II | -22,64 | **** | -63,17 | **** |
| Sekretogranin III | -28,86 | **** | -22,37 | **** |
| Sekretogranin V | -8,44 | **** | -19,60 | **** |

Der peptiderge Neurotransmitter Neuropeptide Y (NPY) wird in den endokrinen Zellen des Pankreas exprimiert und reguliert die Insulinsekretion (Moltz and McDonald, 1985; Opara et al., 1991; Pettersson et al., 1987; Teitelman et al., 1993). Die Expression des *NPY*-Gens war mehr als 7-fach reduziert. *Ghrelin* wurde hingegen unverändert ausgeprägt. Die

Expressionsanalyse bestätigte zum großen Teil die deregulierte Expression der pankreatischen Hormone in *Insm1*-mutanten Tieren, die ich bereits mittels immunhistologischen Untersuchungen beobachtet hatte.

Die Expressionsanalyse zeigte zudem, dass Faktoren des Glukosemetabolismus in homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Mäusen dereguliert sind. Die Insel-spezifische Glukose-6-Phosphatase (*G6pc2*) wird in den endokrinen Zellen des Pankreas exprimiert und katalysiert den letzten Schritt der Glukoneogenese (Arden et al., 1999). Die Expression von *G6pc2* war in *Insm1*-mutanten Tieren mehr als 10-fach reduziert. Glukokinase (*Gck*) wird in β -Zellen produziert und wirkt als Glukosesensor; Mutationen erzeugen einen MODY 2-Phänotyp (Bali et al., 1995; Froguel et al., 1992; Matschinsky, 1990; Terauchi et al., 1995; Vionnet et al., 1992). *Gck* und *Glut2* wurden in homozygoten *Insm1^{lacZ}*-Mäusen schwächer ausgeprägt.

Im Pankreas von *Insm1^{lacZ}/Insm1^{lacZ}*-Mäusen war zudem eine Gruppe von Genen stark dereguliert, die in der Hormonprozessierung und -sekretion eine Rolle spielen. Die Prohormonkonvertasen (PC) 1/3 und 2 wandeln Prohormone zu funktionellen Hormonen um (Marcinkiewicz et al., 1994). Beide werden in β -Zellen produziert, PC2 ist zusätzlich in α -, δ - und PP-Zellen vorhanden. Die Expression von *PC1/3* und *PC2* war reduziert. Chromogranin A (Chga) und B sowie Sekretogranin II, III und V werden je nach Zelltyp zu verschiedenen Peptiden prozessiert, zusammen mit Hormonen in Vesikeln gelagert und sezerniert (Karlsson, 2001; Taupenot et al., 2003). Die Vorläufer und die prozessierten Peptide regulieren intrazellulär und extrazellulär die Hormonsortierung, -prozessierung und -sekretion. Die Expression der genannten Granine war im Pankreas der *Insm1*-mutanten Tiere stark reduziert.

Ich analysierte die Expression einiger Faktoren für die Hormonprozessierung und -sekretion mittels immunhistologischer Analysen. Diese Untersuchungen zeigten, dass die Expression von Chromogranin A, *PC1/3* und *PC2* in E15.5 und E18.5 *Insm1^{lacZ}/Insm1^{lacZ}*- im Vergleich zu *Insm1^{lacZ}/+*-Mäusen reduziert war (Abb. 16A-L). Die Mutation von *Insm1* führt also zu einer gestörten Expression von Genen, die die Hormonprozessierung und -sekretion steuern.

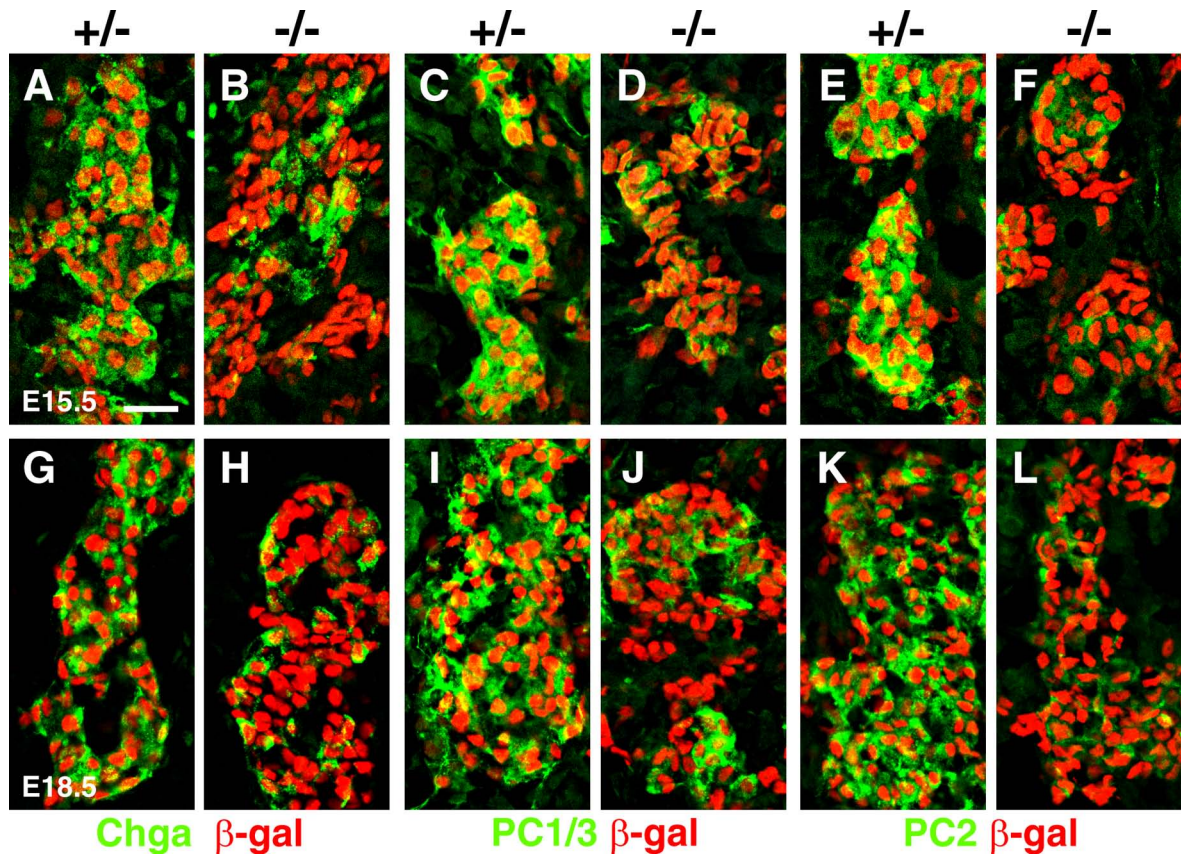


Abb. 16: Veränderte Expression von Proteinen, die die Prozessierung und Sekretion von Hormonen steuern. Immunhistologische Analyse von β -Galaktosidase und von Proteinen, die eine Funktion in der Prozessierung und Sekretion von Hormonen ausüben; benutzt wurden Pankreasschnitte von E15.5 und E18.5 *Insm1^{lacZ/+/-}* und *Insm1^{lacZ/Insm1^{lacZ}}*-Tieren. Fluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen β -Galaktosidase (rot), Chromogranin A (A,B,G,H), PC1/3 (C,D,I,J) und PC2 (E,F,K,L) (alle grün). Die Expression von Chromogranin A, PC1/3 und PC2 ist im Pankreas von *Insm1^{lacZ/Insm1^{lacZ}}*-Mäusen im Vergleich zu *Insm1^{lacZ/+/-}*-Mäusen deutlich vermindert. Abkürzungen: +/- heterozygote *Insm1^{lacZ}*-Tiere, -/- homozygote *Insm1^{lacZ}*-Tiere. Balken: 20 μ m.