

**Funktionelle Charakterisierung der Transkriptionsfaktoren Nkx2.2  
und Arx in der Entwicklung der endokrinen Zellen im murinen  
Pankreas**

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

**vorgelegt von  
Simon Kordowich  
aus Ottweiler**

**Göttingen, Juni 2011**

**Referent: Prof. Dr. Ernst Wimmer**

**Koreferent: Prof. Dr. Ahmed Mansouri**

**Tag der mündlichen Prüfung: Juli 2011**

## Inhaltsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| 1. Einleitung.....   | 1  |
| 1.1 Morphologie und Funktion der Bauchspeicheldrüse .....  | 1  |
| 1.2 Die Etablierung der pankreatischen Anlage.....   | 3  |
| 1.3 Spezifizierung der pankreatischen Zelltypen .....  | 6  |
| 1.3.1 Spezifizierung Azinarer- contra Duktus/Endokriner-Zellen .....   | 8  |
| 1.3.2 Spezifizierung des endokrinen Zellstammbaums .....   | 8  |
| 1.4 Transkriptionsfaktoren in der Spezifizierung endokriner Zellsubtypen .....   | 10 |
| 1.4.1 Ngn3 .....   | 10 |
| 1.4.2 Pdx1 .....   | 11 |
| 1.4.3 Nkx2.2 .....   | 11 |
| 1.4.4 Nkx6.1 .....   | 12 |
| 1.4.5 Pax6 .....   | 13 |
| 1.4.6 Pax4 .....   | 14 |
| 1.4.7 Arx .....  | 15 |
| 1.4.8 Brn4 .....   | 15 |
| 1.4.9 MafA.....  | 16 |
| 1.5 Zielsetzung .....  | 18 |
| 2. Ergebnisse .....  | 20 |
| 2.1 Analyse der subzellularen Expression von Arx in Wildtypen, <i>Nkx2.2</i> - und <i>Pax6</i> -Nullmutanten.....  | 20 |
| 2.1.1 Expression von Arx und Brn4 in E16.5 Pankreata von Wildtypen, <i>Nkx2.2</i> - und <i>Pax6</i> -Nullmutanten.....   | 20 |
| 2.1.2 Vergleichende Analyse der Ghrelin-exprimierenden Populationen in embryonalen Pankreata von Wildtypen, <i>Nkx2.2</i> - und <i>Pax6</i> -Nullmutanten.....   | 24 |
| 2.1.3 <i>Nkx2.2</i> <sup>-/-</sup> <i>Arx</i> <sup>-</sup> Pankreata fehlen Alpha- und reife Beta-Zellen und weisen eine hyperplastische Ghrelin <sup>+</sup> /Somatostatin <sup>+</sup> Zellpopulation auf..... | 27 |

|   |    |
|---|----|
| 2.1.4 <i>Nkx2.2<sup>-/-</sup>Arx<sup>-</sup></i> defiziente endokrine Zellen exprimieren iAPP und niedrige Level an Pdx1 und Pax6. ....                                 | 31 |
| 2.1.5 Expression von Pax4 und Nkx6.1 in Pankreata von Wildtypen,.....   | 33 |
| <i>Nkx2.2<sup>-/-</sup>/Arx<sup>-</sup></i> Einfach- und Doppelmutanten.....  | 33 |
| 2.2 Konditionelle Aktivierung von Arx in Pankreata <i>Arx</i> -defizienter Tiere.....   | 36 |
| 2.2.1 Analyse der Transgen-Expression in Pankreata adulter und ungeborener Tiere.....   | 36 |
| 2.2.2 Test der Tamoxifen-Sensibilität von ArxER.....  | 38 |
| 2.2.3 Die Aktivierung von ArxER in <i>Arx</i> -defizienten Pankreata führt zur Bildung Glucagon- sowie PP-exprimierender Zellen.....                                    | 39 |
| 2.2.4 Die Aktivierung von ArxER zu verschiedenen Entwicklungsstadien offenbart unterschiedliche Differenzierungspotenziale Arx <sup>+</sup> Zellen.....                 | 41 |
| 2.2.5 Charakterisierung der induzierten Glucagon <sup>+</sup> und PP <sup>+</sup> Zellen .....  | 43 |
| 2.3 Herstellung einer konditionalen <i>Pax4</i> -Knockout Linie. ....   | 46 |
| 2.3.1 Herstellung des konditionalen <i>Pax4</i> -Konstruktes .....  | 46 |
| 2.3.2 Analyse mutanter ES-Zell Klone.....   | 49 |
| 2.3.3 Verpaarung zur Erzeugung von <i>Pax4</i> -Nullmutanten .....  | 51 |
| 2.3.4 Analyse von <i>CMV-Cre Pax4CKO</i> Tieren. ....   | 53 |
| 2.3.5 Konditionelle Inaktivierung von <i>Pax4</i> in Beta-Zellen. ....  | 55 |
| 3. Diskussion.....  | 58 |
| 3.1.1 Maus-Mutanten mit reduzierter Beta-Zell Population entwickeln mehr Ghrelin <sup>+</sup> Zellen. ....  | 58 |
| 3.1.2 Arx co-lokalisiert mit Beta-Zell spezifischen Markern in <i>Nkx2.2<sup>-/-</sup></i> und.....   | 59 |
| <i>Pax6<sup>-/-</sup></i> Pankreata.....  | 59 |
| 3.1.3 Ghrelin <sup>+</sup> /Somatostatin <sup>+</sup> Zellen in <i>Nkx2.2<sup>-/-</sup>Arx<sup>-</sup></i> Doppelmutanten repräsentieren einen nicht-Delta-Zelltyp..... | 61 |
| 3.2.1 ArxER initiiert die Bildung von Glucagon- sowie PP-exprimierenden Zellen.....   | 63 |



|  |    |
|--|----|
| 3.2.2 Entwicklungsabhängige Kompetenzänderung pankreatischer Zellen.....                           | 64 |
| 3.3.1 <i>Pax4</i> ist nicht essenziell zur Aufrechterhaltung normaler Beta-Zell<br>Funktionen..... | 66 |
| 4. Material und Methoden.....  | 68 |
| 4.1 Molekularbiologische Methoden.....   | 68 |
| 4.1.1 Isolation von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i> .....   | 68 |
| 4.1.2 Extraktion von BAC-DNA aus <i>E.coli</i> .....   | 68 |
| 4.1.3 Ligation von DNA .....   | 68 |
| 4.1.4 Agarosegelelektrophorese .....   | 68 |
| 4.1.5 DNA-Extraktion aus Agarosegel.....   | 69 |
| 4.1.6 Transformation von Plasmid-DNA .....   | 69 |
| 4.1.7 Phenol-Chloroform Extraktion von DNA .....   | 69 |
| 4.1.8 Southern Blot und radioaktive Markierung der Sonden.....                                     | 70 |
| 4.1.9 Isolierung genomischer DNA aus murinem Gewebe.....   | 71 |
| 4.1.10 Polymerase Kettenreaktion.....  | 71 |
| 4.1.11 Total RNA-Isolation, cDNA-Synthese und quantitative-PCR.....                                | 72 |
| 4.2 Mauslinien und Konstrukte .....  | 73 |
| 4.2.1 Herstellung des induzierbaren ArxER-Tansgenkonstrukts .....                                  | 74 |
| 4.2.2 Generierung transgener Mäuse.....  | 75 |
| 4.2.3 Tamoxifenlösung und Injektion.....   | 75 |
| 4.2.4 Herstellung des konditionalen <i>Pax4</i> -Knockout Konstruktes.....                         | 75 |
| 4.2.5 ES-Zell Analyse und Generierung von Pax4CKO-Mäusen .....                                     | 78 |
| 4.2.6 Genotypisierung von Pax4CKO-Mutanten .....   | 79 |
| 4.2.7 Blutzuckermessung.....   | 80 |
| 4.3 Gewebepräparation und Färbungen .....  | 80 |
| 4.3.1 Gewebepräparation zur immunhistochemischen Färbung .....                                     | 80 |
| 4.3.2 Immunfluoreszenzfärbung und verwendete Antikörper.....                                       | 81 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.4 Morphometrische und statistische Analysen..... | 82  |
| 5. Abbildungsverzeichnis.....                      | 84  |
| 6. Literatur.....                                  | 86  |
| 7. Zusammenfassung.....                            | 98  |
| 8. Publikationen .....                             | 100 |
| 9. Curriculum Vitae .....                          | 101 |
| 10. Danksagung.....                                | 103 |

## **1. Einleitung**

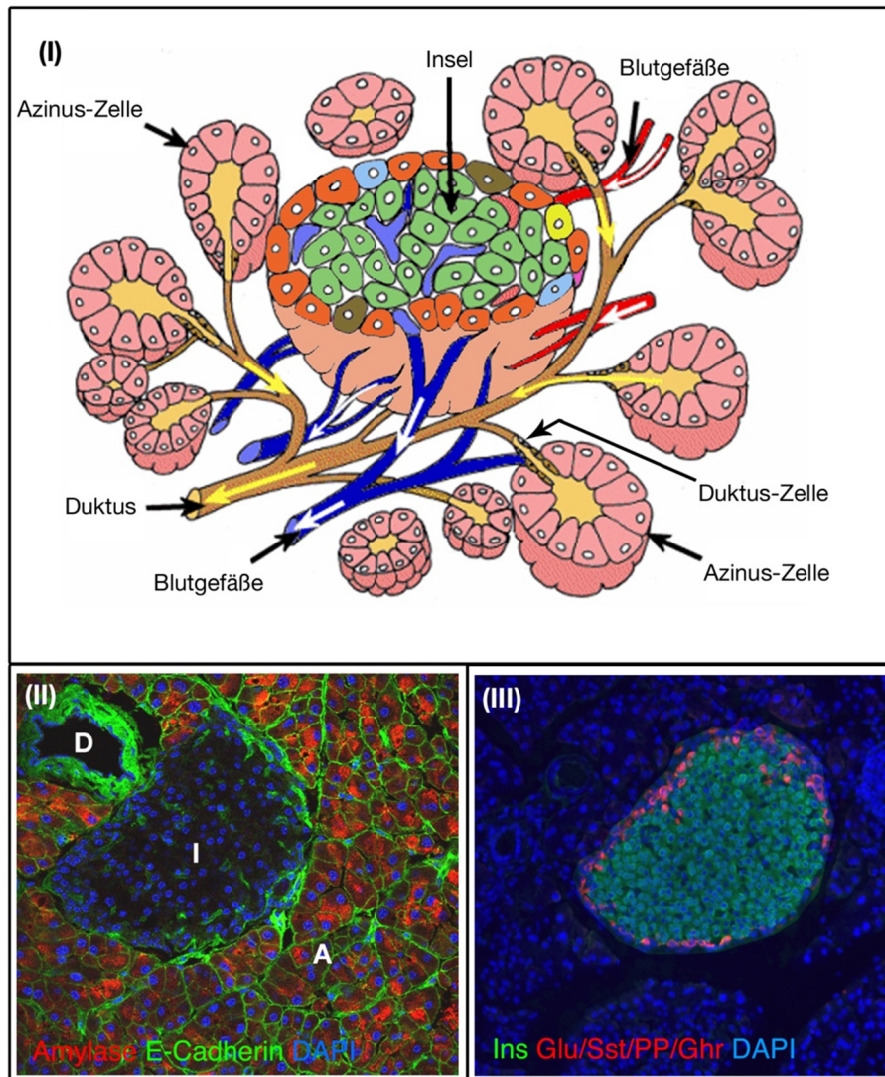
In der Phase der Gastrulation erfolgt die Einteilung der Zellschichten in die drei Keimblätter Mesoderm, Ektoderm und Endoderm. Aus dem Endoderm gehen unter anderem die Organe des Verdauungstraktes wie Darm, Harnblase, Thymus, Schilddrüse, Leber und Pankreas hervor.

Im Folgenden wird auf die zellulären Kompartimente des murinen Pankreas‘ und deren Funktion eingegangen. Es werden grundlegende morphogenetische Mechanismen angesprochen mit einem Schwerpunkt auf der Beschreibung der für die Prankreatogenese relevanten Transkriptionsfaktoren und deren Interaktion.

### **1.1 Morphologie und Funktion der Bauchspeicheldrüse**

Die Bauchspeicheldrüse (das Pankreas) spielt eine entscheidende Rolle in der Nahrungshomöostasis durch die Sezernierung von Hormonen und Verdauungsenzymen. Die Zelltypen aus denen die Bauchspeicheldrüse aufgebaut ist lassen sich gemäß ihrer Eigenschaften in exokrine (Azinus- und Duktus-Zellen) und endokrine Zellen unterteilen. Exokrine Azinus-Zellen produzieren Verdauungsenzyme wie Amylasen, Proteinasen und Lipasen und sezernieren diese in den Duktus pankreatikus, ein verzweigtes Netzwerk aus Ausführungsgängen. Duktus-Zellen produzieren Bikarbonate welche zusammen mit den Verdauungsenzymen durch den Hauptduktus transportiert und schließlich in den Zwölffingerdarm entlassen werden (Githens et al., 1994). Endokrine Zellen aggregieren typischerweise in kugelförmigen Anordnungen die als Langerhans'sche Inseln bezeichnet werden (Abb.1). Diese sind aus fünf verschiedenen endokrinen Zellsubtypen aufgebaut: Beta-, Alpha-, Delta-, PP- und Epsilon-Zellen welche die Hormone Insulin, Glucagon, Somatostatin, Pankreatisches Polypeptid (PP) bzw. Ghrelin produzieren. Insulin und Glucagon wirken in der Kontrolle der Glukose-Homöostasis gegensätzlich. Insulin wird in Folge der Nahrungsaufnahme sezerniert und dient als Signal für periphere Zellen Glukose aus dem Blut aufzunehmen. Zudem induziert Insulin die Lagerung von Glukose in Form von Glykogen in der Leber. Im Gegensatz dazu stimuliert Glucagon in der Leber die Glykogenolyse um niedrigen Blutzuckerkonzentrationen

entgegenzuwirken. Somatostatin und PP hemmen die Sezernierung der anderen endokrinen Hormone sowie die exokriner Enzyme (Adrian et al., 1978, Roncoroni et al., 1983, Csaba und Dournaud, 2001, Wierup et al., 2002 und Heller et al., 2005). Das Hormon Ghrelin besitzt orexigene Eigenschaften und ist an der Glukose-stimulierten Insulinsekretion beteiligt (Dezaki et al., 2006, 2008).



**Abbildung 1: Morphologie des Pankreas.** (I) Schematische Darstellung der pankreatischen Zelltypen. Das Pankreas besteht hauptsächlich aus Azinus-Zellen welche Verdauungsenzyme in den pankreatischen Duktus sezernieren (gelbe Pfeile). Nur ein geringer Anteil des pankreatischen Gewebes besitzt endokrine Eigenschaften (Langerhans'sche Inseln) und sezerniert Hormone in den Blutkreislauf (weiße Pfeile) (modifiziert nach espace-svt.ac-rennes.fr). (II) Das Verdauungsenzym Amylase in den exokrinen Azinus-Zellen (A) ist

angefärbt. In das exokrine Gewebe sind kugelförmige Anordnungen aus endokrinen Zellen (I = Langerhans'sche Insel) eingebettet. Typischerweise ist die Insel in direktem Kontakt mit einem Duktus (D). Die Zellgrenzen sind mittels E-Cadherin angefärbt. Innerhalb der Insel sind Blutkapillaren sichtbar. (III) Färbung der endokrinen Hormone in einer Insel. Der innere Kern aus insulin-exprimierenden Beta-Zellen (grün) ist von den anderen endokrinen Zellsubtypen Alpha, Delta, PP und Epsilon (rot) umgeben. Kernfärbung mit DAPI.

Grundsätzlich lässt sich die murine Pankreasentwicklung in zwei Phasen einteilen, die als "*First Transition*" und "*Second Transition*" bezeichnet werden (Pictet et al., 1972). Die "*First Transition*" beschreibt den Zeitraum zwischen Embryonaltag (E) 8 bis 13. Diese Phase ist maßgeblich durch die Proliferation von pankreatischen Vorläuferzellen und einer ersten Kompartimentalisierung des Epitheliums gekennzeichnet. Die frühesten morphologischen Anzeichen der Pankreasentwicklung sind in der Maus an E 9 durch das Auswachsen der dorsalen Pankreasknospe aus dem primitiven Darmepithelium sichtbar. Zu diesem Stadium sind bereits erste Glucagon-produzierende Zellen detektierbar (Herrera et al., 1991, Teitelmann et al., 1993, Upchurch et al., 1994). Einen Tag später (E10.5) entstehen einige Insulin-produzierende Zellen welche oft Glucagon co-exprimieren (Teitelmann et al., 1993). Zu diesem Stadium sind auch die ersten Ghrelin-exprimierenden Zellen detektierbar (Prado et al., 2004, Heller et al., 2005). An Embryonaltag 13.5 beginnt dann die Hauptwelle der endokrinen Zellentstehung. Während dieser sogenannten "*Second Transition*" bilden sich zahlreiche Insulin-produzierende Beta-Zellen und Glucagon-produzierende Alpha-Zellen. Um E15.5 entstehen die ersten Somatostatin-produzierenden Delta-Zellen (Pictet et al., 1972) gefolgt von PP-exprimierenden PP-Zellen. Beginnend an E13.5 expandiert die Masse der endokrinen Zellen und organisiert sich zunehmend in Inseln, ein Prozess der ungefähr vier Wochen nach der Geburt abgeschlossen ist (Miller et al., 2009).

### **1.2 Die Etablierung der pankreatischen Anlage**

Vor der Organogenese wird das primitive Darmrohr in einer Serie von anterior/posterioren sowie dorsal/ventralen Musterungsvorgängen in unterschiedliche Organregionen unterteilt. Maßgeblich in diese Musterung involviert sind Signalmoleküle wie FGFs, BMPs, Aktivin und Retinsäuren (RS) welche vom

angrenzenden lateralen Mesoderm sezerniert werden (Bayha et al., 2009, Kumar et al., 2003, Dessimoz et al., 2006).

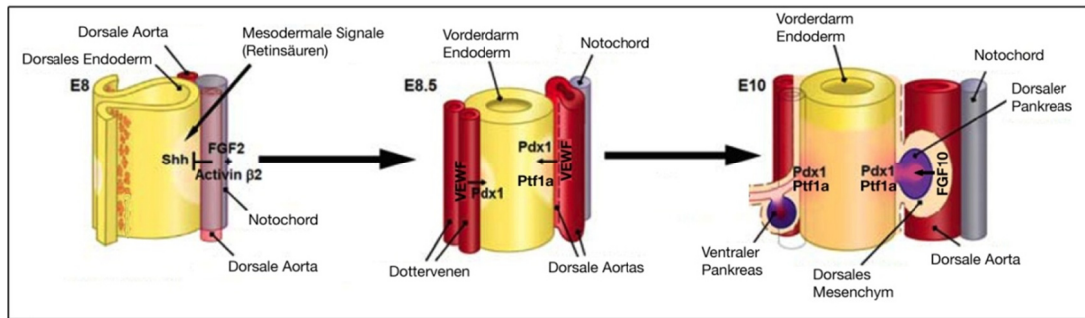
### Prägung der dorsalen Pankreas-Anlage

Retinsäuren sind im Besonderen für die Definition der dorsalen Pankreasdomäne notwendig (Martin et al., 2005, Stafford et al., 2004). An E8.0 kommen induzierende Signale vom angrenzenden Notochord wie FGF2 und Aktivin-beta, welche lokal die Expression von *Sonic Hedgehog (Shh)* im primitiven Darmrohr inhibieren (Hebrock et al., 1998, Kim et al., 1997). Gleichzeitig erfolgt dort die Aktivierung des pro-pankreatischen Gens *Pdx1*. *Pdx1* markiert somit die frühesten pankreatischen Vorläuferzellen. *Pdx1*-defiziente Tiere entwickeln kein Pankreas, die Entwicklung stoppt im frühen Knospenstadium ohne die Bildung Hormon<sup>+</sup> oder Amylase<sup>+</sup> Zellen (Jonsson et al., 1994, Offield et al., 1996). Beginnend mit der Expression von *Pdx1* wird an E8.5 das Notochord durch die Fusion der angrenzenden Aorten vom Endoderm separiert (Slack 1995). Signale von den Endothelzellen der fusionierten Aorta (VEWFs = vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren) sind wiederum notwendig zur Initiierung der endokrinen Entwicklung sowie zur Aktivierung von *Ptf1a*. *Ptf1a* ist ein essenzielles Gen zur Ausbildung des exokrinen Zellstammbaums. (Lammert et al., 2001). In *Flk<sup>-/-</sup>* Knockout-Mäusen, welche keine Endothel-Zellen ausbilden, erfolgt keine Initiierung der *Ptf1a*-Expression im dorsalen Pankreas (Yoshimoto et al., 2004). Ein entscheidender Schritt für die weitere Entwicklung der dorsalen Knospe ist die Akkumulation des lateralen Mesoderms um das dorsale Pankreasepithelium, wodurch die Aorta separiert wird (Wessells et al., 1967). Lösliches FGF10 aus dem Mesenchym fördert die Proliferation der multipotenten Pankreas-Vorläuferzellen und somit das Knospenwachstum (Jacquemin et al., 2006). Mäusen mit beeinträchtigter Mesenchym-Kondensation zeigen massive Defekte in der Ausbildung exokriner und endokriner Zellen (Esni et al., 2001, Martin et al., 2005). Eine wichtige Rolle spielt der Faktor *Isl1*, der sowohl im dorsal gelegenen Mesenchym als auch im pankreatischen Epithelium exprimiert ist. In *Isl1*-defizienten Tieren bleibt die Akkumulation des Mesenchyms aus, mit massiven Defekten in der Entwicklung der exokrinen und endokrinen Zellstammbäume. Interessanterweise kann die Entwicklung exokriner Zellen, jedoch nicht die endokriner Zellen, durch transplantiertes Wildtyp-Mesenchym kompensiert werden (Ahlgren et al., 1997). Dies

zeigt, dass die orchestrierte Interaktion mesenchymaler und epithelialer Faktoren die korrekte Ausbildung der pankreatischen Zelltypen steuert (Abb.2).

### Prägung der ventralen Anlage

Im Gegensatz zur dorsalen Pankreasentwicklung unterliegt die frühe Entwicklung des ventralen Pankreas‘ anderen Signalen, welche hauptsächlich vom angrenzenden lateralen Mesoderm der Herzanlage (FGFs), des Septum transversum (BMPs) sowie von den anliegenden Dottervenen kommen. Das frühe ventrale Endoderm ist bi-potentiell in der Weise, dass ventraler Pankreas und die Leber daraus hervorgehen. FGFs vom Herzmesoderm unterdrücken Pankreas-spezifische Gene (*Pdx1*) im Endoderm durch die Aktivierung von Shh zu Gunsten von Faktoren notwendig zur Leberentwicklung (Deutsch et al., 2001, Rossi et al., 2001). Im Gegensatz zur dorsalen Pankreasentwicklung welche von Mesoderm Signalen abhängt, werden im mesodermfrei-kultivierten ventralen Endoderm pankreasspezifische Gene aktiviert. Deutsch et al schlussfolgerten daraus, dass die Entwicklung des ventralen Pankreas‘ der Standardpfad ventraler Endodermzellen ist und FGFs vom Herzmesoderm in einem Teil dieser Zellen die Leberentwicklung initiieren (Deutsch et al., 2001). Eine Studie von Bort et al offenbarte dass die Expression von *Hex* im ventralen Endoderm entscheidend für die Definition ist welche Zellen einen pankreatischen oder hepatischen Pfad einschlagen (Bort et al., 2004). *Hex* ist zwar im bi-potentiellen Endoderm exprimiert, *Hex*-Knockout Mäusen fehlt jedoch speziell der ventrale Pankreas während sich die Leber zu Beginn normal entwickelt. Weitere Analysen erbrachten, dass *Hex* in einem Teil der Endodermzellen zur Aufrechterhaltung der Proliferation notwendig ist. Durch die Vermehrung dieser Zellen kommt es zu einer Positionsänderung wodurch ein Teil des Endoderms hinter das Herzmesoderm und damit aus dem Einflussbereich der pro-hepatischen FGFs wächst (Bort et al., 2004). Interessanterweise kommt es auch in kultiviertem *Hex*<sup>-/-</sup> ventralem Endoderm zur Aktivierung pankreasspezifischer Gene. Dies zeigt, dass *Hex* eher morphogenetisch wirkt als direkt gewebe-spezifische Programme zu aktivieren (Bort et al., 2004). Zusammengefasst definieren die zwischen E8 und E10 ablaufenden endoderm-mesodermalen Interaktionen die frühen pankreatischen Anlagen, welche sich durch die profunde Expression von *Pdx1* und *Ptfla* vom benachbarten Endoderm abgrenzen (Abb.2).



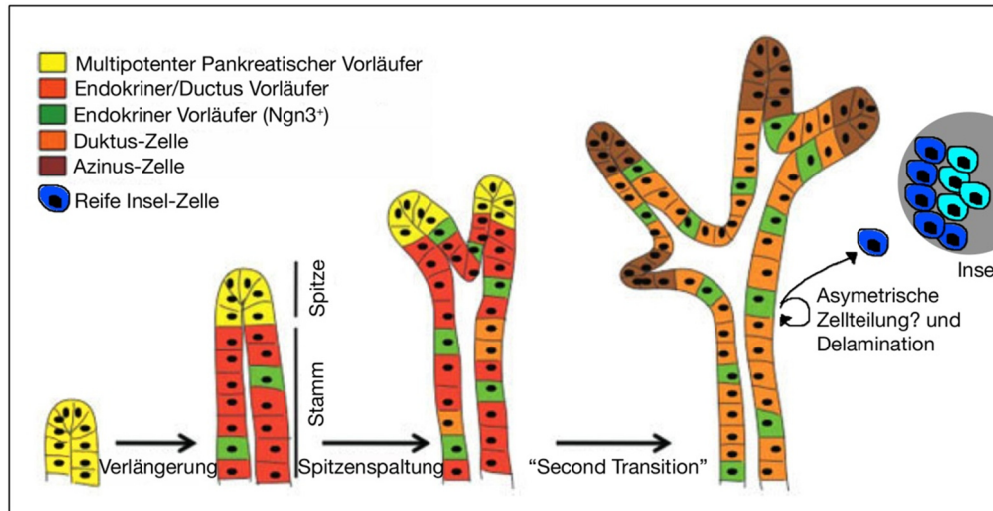
**Abbildung 2: Definierung der pankreatischen Anlage durch mesodermale/endodermale Interaktionen.** Durch morphologisch bedingte Positionsänderungen ist das Darmendoderm zwischen E8 und E10 sequenziell mit Mesoderm, Notochord, Endothelzellen und Mesenchym in Kontakt. Von diesen Geweben ausgehende Signale wie Retinsäuren, FGFs, Activin, VEGFs inhibieren lokal die Expression von Shh im dorsalen und ventralen Darmendoderm und induzieren die pro-pankreatischen Faktoren *Pdx1* und *Ptf1a*. (modifiziert nach Pan et al., 2011).

### 1.3 Spezifizierung der pankreatischen Zelltypen

Beginnend mit E10.0 expandieren das ventrale und dorsale Pankreasepithelium durch die massive Proliferation pankreatischer Vorläufer. Durch die Drehung des Darmrohrs an E11.5 kommt es zu einer Positionsänderung des ventralen Pankreas<sup>4</sup> nach dorsal. Beginnend mit E12 wächst das bis dahin dicht gepackte Epithelium in verzweigten Strukturen aus, wodurch beide pankreatischen Anlagen miteinander verwachsen (Villasenor et al., 2010). Zudem wächst das Epithelium in zweigartigen Strukturen in das umgebende Mesenchym ein. Einhergehend mit diesem Verzweigungswachstum, wird das bis dato multipotente Epithelium in verschiedene Kompartimente unterteilt (Abb.3). Dabei werden Stamm und Spitze des auswachsenden Epitheliums unterschieden. Die Spitzen-Domäne besteht aus multipotenten Vorläuferzellen, welche durch die Expression von *Pdx1* und *Ptf1a* charakterisiert sind. Das Kompartiment des Stammes ist charakterisiert durch die Expression von *Nkx6.1* und beinhaltet endokrine- und Duktus-Vorläuferzellen (Zhou et al., 2007). Durch die Spaltung der epithelialen Spitzen und die kontinuierliche Proliferation multipotenter Vorläufer expandiert das Epithelium. Beginnend mit E13.5 kommt es zunehmend zur Ausdifferenzierung von Azinus-Zellen im Spitzenepithelium. Gleichzeitig



delaminieren endokrine Vorläuferzellen aus dem epithelialen Stamm ins angrenzende Mesenchym und organisieren sich in Inseln. Während dieses Prozesses erfolgt die Differenzierung in einen endokrinen Subtyp. Die Initiation der Delamination und die damit einhergehende Runterregulierung von *E-Cadherin*, wird maßgeblich durch den pro-endokrinen Faktor Ngn3 gesteuert, wie Überexpressions-Studien gezeigt haben (Gouzi et al., 2011).



**Abbildung 3: Kompartimentalisierung des pankreatischen Epitheliums.** Schematische Darstellung des epithelialen Verzweigungswachstums und der damit einhergehenden räumlichen Anordnung pankreatischer Zelltypen (modifiziert nach Guney, 2009). Aus der Proliferation multipotenter Vorläuferzellen (gelb) resultiert ein "Längenwachstum" welches mit der Differenzierung von Endokrinen/Duktalen Vorläuferzellen (rot) einhergeht. Die Ausdifferenzierung einzelner Zellen in der Spitze bewirkt ein Verzweigungswachstum. Innerhalb der endokrinen/duktalen Vorläuferpopulation initiieren vereinzelte Zellen den pro-endokrinen Faktor Ngn3 (grün) und delaminieren aus dem primitiven Duktus. Während dieses Prozesses differenzieren solche Zellen in einen endokrinen Subtyp und formieren sich im angrenzenden Mesenchym in Inseln. Die Inseln bleiben in der Regel zeitlebens mit ihrem "parentalen" Duktus in Verbindung (siehe auch Abb.1 (II)). Offen ist, ob der Delamination eine asymmetrische Zellteilung vorangeht. Beginnend bei E13.5 kommt es außerdem zunehmend zur Ausdifferenzierung des Spitzenepitheliums in Azinus-Zellen (braun). Somit entsteht ein hochgradig verzweigtes Röhrennetzwerk aus

Duktus-Zellen (orange), wobei jeder Duktus in einem "Kranz" aus Azinus-Zellen mündet.

### 1.3.1 Spezifizierung Azinarer- contra Duktus/Endokriner-Zellen

Wie oben erwähnt ist das frühe pankreatische Epithelium durch die Expression von  $Pdx1^+$  multipotenten Vorläufern charakterisiert. Die weitere Differenzierung dieser Zellen in Richtung eines exokrinen bzw. Duktus/endokrinen Zellpfades wird maßgeblich durch die Faktoren *Ptf1a* und *Nkx6.1* gesteuert. Die Misexpression von *Nkx6.1* unter der Kontrolle des *Pdx1*-Promoters führt zur fast vollständigen Suppression von *Ptf1a* im Epithelium bei gleichzeitiger Zunahme an Zellen die endokrine (*Ngn3*, *Pax6* und *Insulin/Glucagon*) - und Duktus-Marker (*Sox9*, *Hnf1beta*) exprimieren (Schaffer et al., 2010). Der gegenteilige Effekt wird mit einem Transgen erzielt bei dem *Ptf1a* durch den *Pdx1*-Promoter gesteuert wird, und führt zu einer Zunahme Amylase<sup>+</sup> Azinus-Zellen auf Kosten Endokriner-/Duktus-Zellen. Biochemische Analysen offenbarten zudem dass *Nkx6.1* direkt und in repressiver Weise an ein "Enhancer"-Element des *Ptf1a*-Promoters bindet. Interessanterweise führt die Misexpression von *Nkx6.1* in reifen Azinus-Zellen nicht zu einem Pfadwechsel in Richtung des endokrinen oder duktales Schicksals, was zeigt, dass die gegenseitige Repression von *Nkx6.1* und *Ptf1a* auf ein multipotentes Zellstadium begrenzt ist (Schaffer et al., 2010). Weitere Analysen offenbarten, dass die Expression von *Nkx6.1* und *Ptf1a* in multipotenten Vorläufern maßgeblich durch den Notch-Signalweg kontrolliert werden. Die Misexpression der intrazellulären Notch-Domäne (Notch<sup>IC</sup>) (Murtaugh et al., 2003) in  $Pdx1^+$  Vorläufern simuliert einen aktivierten Notch-Weg und führt zur Suppression von *Ptf1a* im Epithelium zu Gunsten  $Nkx6.1^+$  Zellen (Schaffer et al., 2010). Somit initiiert die Notch-kontrollierte Expression von *Nkx6.1* und *Ptf1a* in multipotenten Vorläufern deren Differenzierung in Richtung des duktales bzw. azinaren Pfades (Murtaugh et al., 2003, Schaffer et al., 2010).

### 1.3.2 Spezifizierung des endokrinen Zellstammbaums

Der bHLH ("basic helix-loop-helix") Transkriptionsfaktor *Ngn3* ist der Hauptinitiator der endokrinen Zellpfade. *Ngn3* ist hauptsächlich embryonal exprimiert, mit den

meisten  $\text{Ngn3}^+$  Zellen um E15.5. Im adulten Tier ist  $\text{Ngn3}$  kaum detektierbar. Die genauen Mechanismen der Segregation endokriner Vorläufer aus dem Pool pankreatischer Vorläufer sind bis dato nur teilweise bekannt. Wie bei der Segregation der duktaalen Linie spielt auch hier der Notch-Signalweg mit rein. Einige Studien postulieren das Model der Notch-vermittelten lateralen Inhibition. Dabei induzieren  $\text{Ngn3}^+$  Zellen die Expression von Notch-Liganden (z.B. *Dll* (*Delta-like 1*) und *Jagged*) was in den angrenzenden Zellen zur Aktivierung des Notch-Signalwegs, inklusive der Aktivierung von *Hes1* führt. *Hes1* inhibiert in diesen Zellen die Expression von *Ngn3* und verhindert somit ein endokrines Schicksal dieser Zellen (Apelqvist et al., 1999, Jensen et al., 2000a,b). Offen bleibt ob die Aktivierung der Notch-Liganden durch  $\text{Ngn3}$  erfolgt oder durch einen anderen Faktor, was in der Konsequenz die Initiation von *Ngn3* erlaubt.

Mehrere Studien haben die proendokrine Eigenschaft von  $\text{Ngn3}$  offenbart: In  $\text{Ngn3}^{-/-}$  Tieren entwickelt sich keine endokrinen Zellen wohingegen die Entwicklung von Azinus- und Duktus-Zellen nicht beeinträchtigt ist (Gradwohl et al., 2000). Die Misexpression von *Ngn3* in  $\text{Pdx1}^+$  Vorläufern führt zu einer verfrühten Differenzierung dieser Vorläufer in endokrine-, hauptsächlich Alpha-Zellen (Schwitzgebel et al., 2000, Apelqvist et al., 1999). "Lineage-tracing"-Studien offenbarten, dass alle fünf Inselzellsubtypen von  $\text{Ngn3}^+$  Vorläufern abstammen (Gu et al., 2003). Die Gesamtheit aller  $\text{Ngn3}^+$  Zellen ist somit multipotent. Interessanterweise ergab eine "Lineage-tracing"-Studie einzelner  $\text{Ngn3}^+$  Zellen in vivo, dass diese kaum proliferieren und immer nur in einen endokrinen Zellsubtyp differenzieren, somit unipotent sind (Desgraz et al., 2009). Diese Ergebnisse implizieren, dass das Zellschicksal einer endokrinen Vorläuferzelle mit der Expression von *Ngn3* bereits feststeht. Johansson et al. zeigten, dass die zeitliche Expression von  $\text{Ngn3}$  den entscheidenden Ausschlag für die weitere Entwicklung in einen spezifischen endokrinen Subtyp gibt. Die Autoren kreuzten ein durch den *Pdx1* Promoter kontrolliertes chemisch-induzierbares  $\text{Ngn3}$  in einen *Ngn3*-defizienten Hintergrund und aktivierten  $\text{Ngn3}$  zu verschiedenen Entwicklungsstadien. Dabei zeigte sich, dass frühe  $\text{Ngn3}^+$  Zellen ausschließlich in Glucagon-produzierende Alpha-Zellen differenzieren. Die Aktivierung von  $\text{Ngn3}$  zu späteren embryonalen Stadien offenbarte weitere Kompetenzfenster in denen sich nun hauptsächlich Beta- und PP-Zellen (E11.5-E14.5) oder Delta-Zellen (nach E14.5) entwickelten, wohingegen kaum noch Alpha-Zellen entstanden (Johansson et al., 2007).

Epithelium/Mesenchym Austauschexperimente zeigten, dass dem Epithelium intrinsische Signale für die unterschiedlichen Kompetenzen verantwortlich sind. Eine interessante und aktuelle Frage ist die nach der Identität dieser kompetenz-vermittelnden Signalmoleküle/Kaskaden.

## **1.4 Transkriptionsfaktoren in der Spezifizierung endokriner Zellsubtypen**

Wie bereits angesprochen deuten jüngste Studien an, dass Vorläuferzellen bereits mit der Expression von *Ngn3* auf einen endokrinen Zellsubtyp prädestiniert sind, wobei bisher unbekannte Entwicklungsstadium-abhängige Signale aus dem Epithelium ausschlaggebend sind. *Ngn3* selber steht am Beginn einer Kaskade in der zahlreiche weitere Transkriptionsfaktoren, mit entscheidenden Funktionen in der Ausdifferenzierung einzelner endokriner Zelltypen, aktiviert werden. Mittels transgener Manipulationen und/oder konventionellen/konditionalen Knockout-Modellen sind die Eigenschaften dieser Faktoren näher charakterisiert worden. Im Folgenden sind einige Transkriptionsfaktoren, sowie deren Relevanz in der Spezifizierung und Aufrechterhaltung der verschiedenen endokrinen Zellschicksale beschrieben (Abb.4).

### **1.4.1 Ngn3**

Wie bereits erwähnt spielt *Ngn3* eine entscheidende Rolle in der Initiierung des endokrinen Zellschicksals. Die Expression von *Ngn3* ist deutlich in Vorläuferzellen detektierbar, jedoch kaum in Hormon-produzierenden Zellen (Gradwohl et al., 2000). Dies führte zur Annahme, dass *Ngn3* exklusiv Vorläuferstadien markiert und erlässlich ist für die Aufrechterhaltung differenzierter endokriner Zellen. Mittels stärkerer Nachweismethoden wurde kürzlich von Wang et al. die Expression von *Ngn3* auch in Inseln adulter Tiere nachgewiesen. Die konditionelle Inaktivierung von *Ngn3* in Beta-Zellen adulter Tiere führt zur selektiven Runterregulierung einiger essentieller Beta-Zell Marker und zur Beeinträchtigung normaler Beta-Zell Funktionen in der Maus (Wang et al., 2009). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass *Ngn3* nicht nur für die Initiierung eines endokrinen Zellschicksals essentiell ist,

sondern darüber hinaus auch eine entscheidende Rolle in der Reifung von Inselzellen sowie der Aufrechterhaltung normaler Inselzell-Funktionen spielt.

### **1.4.2 Pdx1**

Wie bereits erwähnt ist *Pdx1* in verschiedenen pankreatischen Zelltypen (multipotenten Vorläuferzellen, frühen Azinus-Zellen, Beta-Zellen) und zu verschiedenen Stadien der Pankreasentwicklung exprimiert. Die unterschiedlichen *Pdx1*-Expressionslevel in diesen Zelltypen werden maßgeblich durch vier hochkonservierte 5' cis-regulatorische Elemente (*Area* I, II, III, IV) gesteuert (Gannon, et al., 2000, Gerrish et al., 2004). Diese Elemente beinhalten Bindestellen für diverse Transkriptionsfaktoren inklusive Pdx1, HNF1alpha, Pax6 und MafA (Gerrish et al., 2001, Marshak et al., 2000, Samaras et al., 2002, 2003). Während *Area* I + II die Expression von *Pdx1* in Inselzellen negativ beeinflussen, ist *Area* III essenziell zur Beta-Zell spezifischen Aktivierung von *Pdx1* (Gannon, et al., 2000). Mit dem Beginn der "*Second Transition*" (E13.5) sind vermehrt Zellen mit deutlich erhöhten *Pdx1*-Expressionsleveln im pankreatischen Kern detektierbar (Jensen et al., 2000). Diese entsprechen entstehenden Beta-Zellen. Neben entstehenden und reifen Beta-Zellen ist *Pdx1* auch in vereinzelt somatostatin-produzierenden Delta-Zellen exprimiert. In diesen Zelltypen fungiert Pdx1 als Aktivator für die Expression von *Insulin* bzw. *Somatostatin* (Leonard et al., 1993, Miller et al., 1994, Ohlsson et al., 1991, 1993). Die konditionelle Inaktivierung von *Pdx1* in reifen Beta-Zellen adulter Tiere führt zum Funktionsverlust der Zellen und in der Konsequenz zu Diabetes (Ahlgren et al., 1998). Zusammengefasst charakterisieren diese Erkenntnisse Pdx1 als entscheidenden Faktor der Pankreatogenese mit spezifischen Funktionen in der Aufrechterhaltung der Beta-Zell Identität.

### **1.4.3 Nkx2.2**

Nkx2.2 gehört zur Familie der NK-Klasse Homöobox-Transkriptionsfaktoren und ist ein Marker des frühen pankreatischen Epitheliums (Sussel et al., 1998, Sander et al., 2000). Bereits an Embryonaltag 8.5 ist *Nkx2.2* in der dorsalen Pankreasknospe und an E9.5 auch in der ventralen Knospe breit exprimiert. Die Expression von Nkx2.2

überlappt in der frühen Entwicklung größtenteils mit der von Pdx1 im pankreatischen Kern, ist jedoch abwesend in den sich entwickelnden Pdx1<sup>+</sup>/Ptf1a<sup>+</sup> Azinus-Zellen. Mit Beginn der "*Second transition*" (E13.5) begrenzt sich die Expression von *Nkx2.2* zunehmend auf endokrine Zellen. In adulten Tieren exprimieren alle Beta-Zellen, 80% der Alpha-Zellen und ein Teil der PP-Zellen diesen Faktor. Es ist keine *Nkx2.2*-Expression in der Population der Delta-Zellen detektierbar. Dem entsprechend entwickeln sich in Pankreata *Nkx2.2*-defizienter Tiere keine Beta-Zellen und nur wenige Alpha- und PP-Zellen, wogegen die Population der Delta-Zellen nicht betroffen ist (Sussel et al., 1998). Alternativ entwickelt sich in solchen Pankreata eine hyperplastische Population an Ghrelin-exprimierenden Zellen (Prado et al., 2004). Weitere Studien haben aufgezeigt, dass *Nkx2.2* Repressor-Aktivität zur Differenzierung der Alpha-Zellen und zur partiellen Differenzierung der Beta-Zellen notwendig ist (Doyle et al., 2007). In reifen Beta-Zellen ist *Nkx2.2* notwendig zur Aufrechterhaltung der Expression von *MafA* (Insulin-Aktivator) und *Glut-2* (Glukose-Transporter) sowie der Expression von *Pax6* (Hormon-Aktivator) (Doyle und Sussel, 2007, Prado et al., 2004, Raum et al., 2006). Zusammengenommen offenbaren diese Daten die grundlegende Rolle von *Nkx2.2* in der Bildung und Aufrechterhaltung fast aller endokriner Zelltypen durch die Aktivierung und Aufrechterhaltung der Expression essentieller Abwärts-Faktoren.

#### 1.4.4 Nkx6.1

*Nkx6.1*, ein weiterer Vertreter aus der NK-Klasse der Homöobox-Faktoren, zeigt in der frühen Pankreasentwicklung ein zu *Nkx2.2* sehr ähnliches spatiotemporales Expressionsmuster. Im frühen Stadium exprimiert ein Großteil der *Nkx2.2*<sup>+</sup> Zellen *Nkx6.1* und alle *Nkx6.1*<sup>+</sup> Zellen exprimieren *Nkx2.2* (Sander et al., 2000). Mit Beginn der "*Second Transition*" begrenzt sich die Expression zunehmend und exklusiv auf entstehende Beta-Zellen (Sander et al., 2000). Der funktionelle Verlust von *Nkx6.1* hat im Gegensatz zu dem Verlust von *Nkx2.2* keine komplette Beta-Zell-Agenesie zur Folge, sondern resultiert in einem Arrest der Beta-Zell Neogenese zwischen Embryonaltag 14.5-16.5. Der Verlust von *Nkx6.1* hat keinen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung der anderen endokrinen Zellsubtypen (Sander et al., 2000). Die Expression von *Nkx6.1* ist deutlich reduziert in *Nkx2.2*-defizienten Pankreata

wogegen die Expression von Nkx2.2 in *Nkx6.1*-defizienten Pankreata unverändert ist, woraus man annehmen kann, dass Nkx2.2 aufwärts von Nkx6.1 im Prozess der Beta-Zell Entstehung wirkt. Diese Annahme wird unterstützt durch die Tatsachen, dass (1) *Nkx2.2/Nkx6.1* Doppelmutanten den gleichen Phänotyp wie *Nkx2.2* Mutanten aufweisen (Sander et al., 2000) und (2) biochemische Studien gezeigt haben, dass Nkx2.2 direkt an den *Nkx6.1* Promoter bindet und die Expression von *Nkx6.1* reguliert (Watada et al., 2000). Neben der frühen Funktion von Nkx6.1 in der Spezifizierung der endokrinen und duktafen Zellpfade, ist Nkx6.1 somit später in der Entwicklung ein exklusiver Marker für mature Beta-Zellen.

#### 1.4.5 Pax6

*Pax6* wird in allen endokrinen Subtypen während der Pankreasentwicklung und danach exprimiert. Eine Ausnahme bilden einige Epsilon-Zellen während der Embryogenese (Prado et al., 2004, St-Onge et al., 1997). In *Ngn3*<sup>-/-</sup> Pankreata ist keine *Pax6*-Expression detektierbar (Gradwohl et al., 2000). Bisherige Analysen führten zu der Annahme, dass Pax6 nicht an der Determinierung endokriner Zellschicksale beteiligt ist, jedoch eine essentielle Rolle in späteren Stadien der endokrinen Differenzierung sowie in der Aufrechterhaltung der Hormonexpression spielt. Pax6 agiert unter anderem als Transkriptionsaktivator von *Insulin*, *Somatostatin* und *Glucagon* (Andersen et al., 1999a,b, Hill et al., 1999, Sander et al., 1997). In Übereinstimmung mit der Annahme einer späteren Funktion von *Pax6*, resultiert dessen konditionelle Inaktivierung nicht in einer Reduktion der endokrinen Zellzahlen, jedoch in der Deaktivierung später endokriner Zellmarker sowie einiger Hormon-kodierender Gene (Ashery-Padan et al., 2004). In konventionellen *Pax6*<sup>-/-</sup> Pankreata ist die Anzahl an Alpha-, Beta-, Delta- und PP-Zellen stark reduziert (Heller et al., 2004, St-Onge et al., 1997). Ähnlich wie in *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> Pankreata besteht die endokrine Population in *Pax6*<sup>-/-</sup> Pankreata größtenteils aus Ghrelin-exprimierenden Zellen (Heller et al., 2004). In *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> Pankreata ist die Expression von *Pax6* stark reduziert, was zum Teil die ähnlichen Phänotypen erklärt und eine *Pax6*-regulatorische Funktion von Nkx2.2 nahe legt (Prado et al., 2004, Wang et al., 2004).

### 1.4.6 Pax4

*Pax4*, ein weiteres Mitglied der Pax-Familie, spielt eine entscheidende Rolle in der Bildung der Beta- und Delta-Zellen (Sosa-Pineda et al., 1997, Wang et al., 2004, Collombat et al., 2009). Während der "*Second Transition*" zeigt *Pax4* eine teilweise überlappende Expression mit *Ngn3* und ist hauptsächlich in hormon-negativen endokrinen Vorläufern aktiv (Wang et al., 2004). Im Gegensatz zu den meisten anderen endokrin-spezifischen Genen ist *Pax4* kaum in reifen Inselzellen zu detektieren (Sosa-Pineda et al., 1997, Wang et al., 2004). Jedoch haben mittlerweile einige Arbeitsgruppen sehr niedrige Level an *Pax4* Transkript und Protein in den Inselzellen von Menschen, Ratten (Brun et al., 2004) sowie Mäusen (Collombat et al., 2009) nachgewiesen. "*Lineage tracing*" Studien *Pax4*<sup>+</sup> Vorläuferzellen offenbarten, dass diese sich in alle endokrine Zellsubtypen entwickeln (Epsilon-Zellen nicht analysiert, Greenwood et al., 2007). In der Abwesenheit funktionalen *Pax4* ist jedoch hauptsächlich die Entwicklung von Beta- und Delta-Zellen verhindert und Vorläuferzellen differenzieren in einen Alpha-Zell-ähnlichen Typ, charakterisiert durch die Co-Expression von Glucagon und Ghrelin (Wang et al., 2008). Interessanterweise ist deren Anzahl gleich der totalen endokrinen Anzahl in Wildtyp Pankreata (Collombat et al., 2005). Daraus kann man schließen, dass *Pax4* maßgeblich an der frühen Initiierung des Beta-Zell Pfades auf Kosten des Alpha-Zellpfades beteiligt ist. Diese Annahme wird durch eine neue Studie unterstützt, welche demonstriert, dass die *in vivo* Misexpression von *Pax4* in pankreatischen/endokrinen Vorläuferzellen größtenteils in der Bildung von Beta-Zellen resultiert (Collombat et al., 2009). *Pax4/Nkx2.2*-doppelmutante Tiere zeigen die gleichen Veränderungen wie sie in *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> Pankreata detektierbar sind, woraus man schließen kann, dass *Pax4* abwärts von *Nkx2.2* agiert (Wang et al., 2004). Diese Annahme wird unterstützt durch die Tatsachen, dass (1) die Expression von *Nkx2.2* unverändert ist in *Pax4*-defizienten Tieren (Wang et al., 2004) und (2) der Tatsache dass *Pax4* im Gegensatz zu *Nkx2.2* durch *Ngn3* aktiviert werden muss (Gradwohl et al., 2000, Smith et al., 2000). Zusammen genommen zeigen diese Erkenntnisse, dass *Pax4* in einem frühen Differenzierungsstadium aktiv ist, an dem endokrine Vorläufer grundsätzlich noch das Potenzial haben verschiedene Pfade einzuschlagen, *Pax4* jedoch hauptsächlich für die Initiierung des Beta-Zell Pfads notwendig ist.



#### 1.4.7 Arx

*Arx* ("aristaless related homeobox gene") ist ein weiterer Transkriptionsfaktor aus der großen Familie der Homöodomäne-Proteine. Mit Beginn der "Second Transition" ist *Arx* vereinzelt in hormon-negativen Zellen und dann zunehmend in entstehenden Alpha- und PP-Zellen exprimiert (Collombat et al., 2003). In Pankreata adulter Tiere ist *Arx* ebenfalls in diesen beiden Zelltypen zu finden. Keine *Arx*-Transkripte sind in *Ngn3*<sup>-/-</sup> mutanten Pankreata detektierbar. Somit ist *Arx* neben *Pax4* und *Pax6* ein weiteres *Ngn3*-abhängiges Gen (Collombat et al., 2003). Interessanterweise zeigen *Arx*-Knockout Mäuse einen den *Pax4*<sup>-/-</sup> Mäusen gegensätzlichen pankreatischen Phänotyp. In *Arx*-Mutanten ist spezifisch die Entwicklung Glucagon-produzierender Alpha-Zellen verhindert, wohingegen die Populationen der Beta- und Delta-Zellen entsprechend vergrößert sind. Die Anzahl der PP- und Epsilon-Zellen ist hingegen unverändert (Collombat et al., 2003, 2005, Heller et al., 2005). Weitere biochemische Analysen offenbarten, dass *Arx* und *Pax4* die Expression des anderen Gens inhibieren und somit maßgeblich an der Spezifizierung der Alpha- contra Beta-/Delta-Zellstammbäume beteiligt sind (Collombat et al., 2005). Dieses Modell wurde durch die forcierte Expression von *Arx* in pankreatischen/endokrinen Vorläufern bestätigt, was in der Bevorzugung der Alpha- aber auch PP-Zellpfade auf Kosten der Beta-/Delta-Zellentwicklung resultiert. Ebenso führt die konditionelle Misexpression von *Arx* in Beta-Zellen adulter Tiere zu deren Transdifferenzierung in Glucagon-produzierende Alpha-Zellen (Collombat et al., 2007). Zusammen zeigen diese Erkenntnisse, dass *Arx* eine entscheidende Rolle in der Spezifizierung endokriner Vorläufer in Richtung eines Alpha-Zell Schicksals spielt.

#### 1.4.8 Brn4

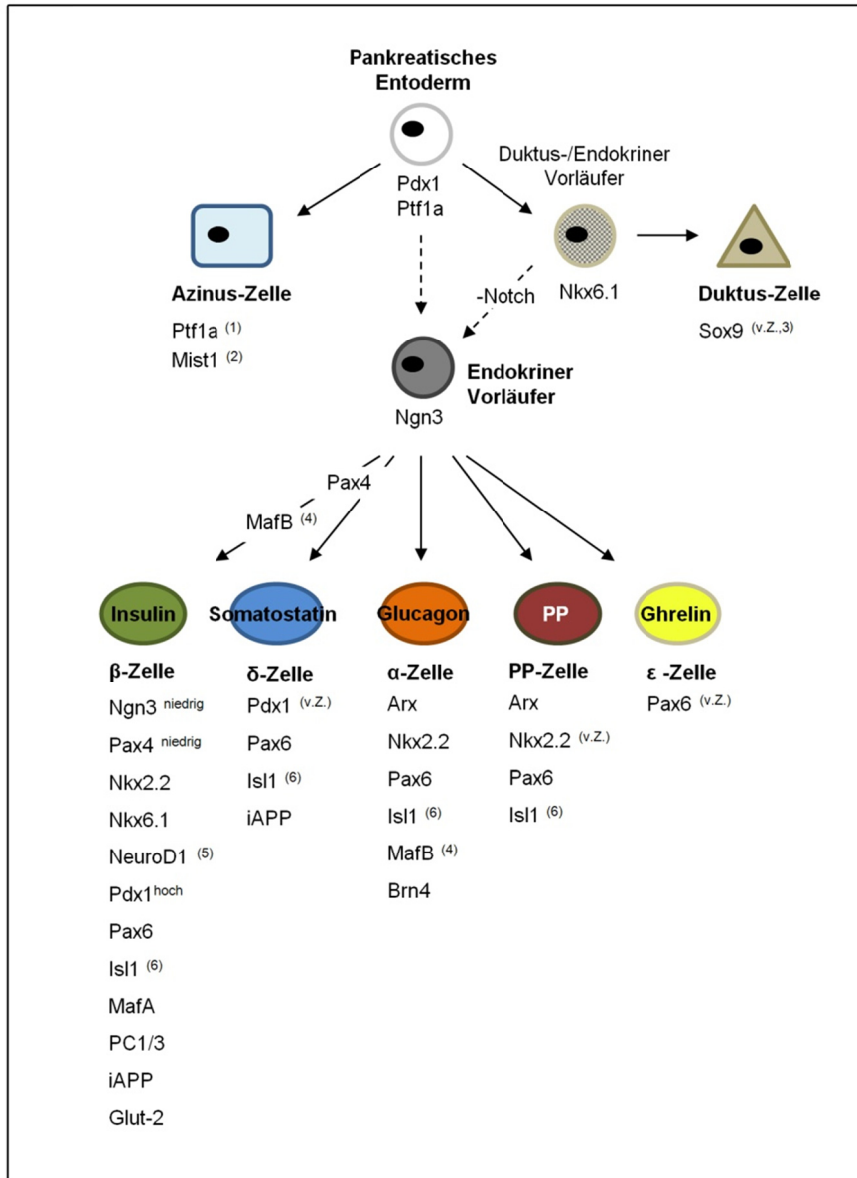
*Brn4* ist ein Mitglied der Klasse 3 POU Homöodomain Faktoren und von E9 an im Pankreas exprimiert. Mit der Bildung endokriner Zellen ist die Expression von *Brn4* mit Alpha-Zellen und vereinzelt PP-Zellen assoziiert. Es wurde demonstriert, dass *Brn4* in aktivierender Art und Weise an den *Glucagon*-Promotor bindet (Hussain et al., 1997). Es ist keine *Brn4*-Expression in Beta- oder Delta-Zellen detektierbar (Heller et al., 2004). Die Misexpression von *Brn4* in *Pdx1*<sup>+</sup> Vorläuferzellen führt zur Bildung von Beta-Zellen, die neben Insulin auch Glucagon produzieren (Hussain et

al., 2002). Dies zeigt, dass *Brn4* nicht die Zellpfad-bestimmenden Eigenschaften wie *Arx* hat und deshalb eher abwärts von *Arx* in der Differenzierung der Alpha-Zelle eine Rolle spielt. Diese Annahme wird unterstützt durch die Tatsache, dass in *Arx*-defizienten Pankreata kein *Brn4* exprimiert ist (Collombat et al., 2003). Interessanterweise haben *Brn4*-Knockout Mäuse jedoch keinen offensichtlichen pankreatischen Phänotyp und entwickeln eine normale Anzahl an funktionalen Alpha-Zellen (Heller et al., 2005). Diese Daten zeigen, dass *Brn4* eher spät während der Alpha-Zellbildung wirkt und *Glucagon* aktiviert, eine Funktion, die jedoch offensichtlich durch andere Faktoren kompensiert werden kann.

#### **1.4.9 MafA**

*MafA* ist ein Vertreter der v-maf Familie ("*musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene*"). Die Expression von *MafA* ist in embryonalen und adulten Stadien der Pankreasentwicklung auf Beta-Zellen beschränkt. Auf zellulärer Ebene erfolgt die Aktivierung von *MafA* relativ spät, nach der von *Pax6* und *Pdx1<sup>hoch</sup>* (Nishimura et al., 2006). *MafA* ist maßgeblich und direkt an der Glukose-stimulierten Aktivierung von *Insulin* beteiligt (Kataoka et al., 2002, Matsuoka et al., 2004, Zhao et al., 2005).

Weitere Gene, welche zu den physiologischen Grundfunktionen der Beta-Zelle beitragen sind: der membranständige Glukosetransporter Typ2 (*Glut-2*) welcher als Glukose-Sensor fungiert (Jörns et al., 1996) sowie die zur Proteolyse von Präinsulin in die aktive Form notwendigen Prohormon-Konvertasen 1/3 (*PCI/3*) (Zhu et al., 2002). Neben Insulin sezernieren Beta-Zellen auch das Peptidhormon iAPP ("*islet amyloid polypeptide*") welches in synergistischer Art und Weise mit Insulin an der glykämischen Kontrolle beteiligt ist (Pittner et al., 1994).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Transkriptionsfaktoren die in der Spezifizierung und Aufrechterhaltung pankreatischer Zelltypen involviert sind.** Runde Zellen repräsentieren Vorläuferstadien. Quadratische, dreieckige und ovale Zellen repräsentieren ausdifferenzierte Azinus-, Duktus- bzw. endokrine Zellen. Zelltyp- und Stadium-spezifische Transkriptionsfaktoren/Markergene sind jeweils darunter angegeben. MafB ist in entstehenden Beta-Zellen nur transient exprimiert. PC1/3, iAPP und Glut-2 sind keine Transkriptionsfaktoren. (v.Z. =nur in vereinzelt Zellen exprimiert). <sup>1</sup> (Krapp et al., 1996, 1998, Obata et al., 2001), <sup>2</sup> (Pin et al., 2001), <sup>3</sup> (Seymour et al., 2007), <sup>4</sup> (Artner et al., 2006, Nishimura et al., 2006), <sup>5</sup> (Ahlgren et al., 1997), <sup>6</sup>(Naya et al., 1997).

## 1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, weitere Einsichten in das Zusammenspiel der Transkriptionsfaktoren *Nkx2.2* und *Arx* in der Entwicklung des murinen Pankreas‘ zu erhalten. In *Nkx2.2*-defizienten Pankreata bilden sich keine Beta- und kaum Alpha-Zellen wohingegen ein Ghrelin-exprimierender Zelltyp vornehmlich gebildet wird. Interessanterweise ist die Expression des Alpha-Zell Spezifizierers *Arx* in *Nkx2.2*-defizienten Pankreata im Vergleich zu Wildtyp Pankreata fünf-fach erhöht, was eine regulatorische Einflussnahme von *Nkx2.2* auf *Arx* nahe legt (Chao et al., 2007). Um eine solche Einflussnahme einem endokrinen Zellsubtypen zuzuordnen, wurde die Expression von *Arx* in Relation zu zahlreichen Alpha- und Beta-Zell Marker-Genen in *Nkx2.2*-defizienten Pankreata untersucht. Durch die Generierung und Analyse von *Nkx2.2/Arx*-Doppelknockout Mäusen sollten zusätzliche Einsichten in das Zusammenspiel dieser Faktoren erhalten werden. Ein weiteres Charakteristikum von *Nkx2.2*-defizienten Pankreata ist, neben der übermäßigen Expression von *Arx*, eine deutlich verminderte Expression des Transkriptionsfaktors *Pax6* (Prado et al., 2004). *Pax6*-defiziente Tiere weisen zudem einen sehr ähnlichen pankreatischen Phänotyp wie *Nkx2.2*-defiziente Tiere auf, mit stark reduzierten Beta- und Alpha-Zell Populationen und einem Übermaß an Ghrelin-exprimierenden Zellen (St-Onge et al. 1997, Heller et al., 2005). Dadurch war eine ähnliche Funktion von *Pax6* und ein Einfluss auf die Expression von *Arx* naheliegend. Zur Klärung dieser Frage wurde die subzelluläre Expression von *Arx* in *Pax6*-Mutanten untersucht.

Collombat et al zeigten, dass die forcierte Expression von *Arx* in *Pdx1*<sup>+</sup> pankreatischen Vorläuferzellen in der Bildung zahlreicher Glucagon- und PP-exprimierender Zellen resultiert (Collombat et al., 2007) woraus geschlossen werden kann, dass *Arx*<sup>+</sup> Vorläuferzellen bipotentiell sind. Eine Studie von Johansson et al offenbarte, dass multipotente pankreatische Vorläuferzellen, je nach dem zu welchem Entwicklungsstadium sie auftreten, in verschiedene endokrine Zellsubtypen differenzieren (Johansson et al., 2007). Aus diesen beiden Studien ergab sich die Fragestellung ob die Differenzierung von *Arx*<sup>+</sup> Zellen in entweder Glucagon- oder PP-exprimierende Zellen ebenfalls einer temporalen Kontrolle unterliegen. Zur Beantwortung dieser Frage wurde eine transgene Mauslinie generiert, mit Hilfe derer *Arx* chemisch induziert werden konnte. Durch die Rückkreuzung dieses Transgens in

einen *Arx*-defizienten Hintergrund und die anschließende Aktivierung von *Arx* zu verschiedenen Entwicklungsstadien wurde das entwicklungsabhängige Differenzierungspotenzial von *Arx* ermittelt.

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war welche Rolle dem Transkriptionsfaktor *Pax4* in Inselzellen adulter Tiere zukommt. In embryonalen Stadien ist die Expression von *Pax4* deutlich detektierbar, wogegen in Inseln adulter Tiere nur geringe Mengen an *Pax4* produziert werden. *Pax4* ist essenziell für die Bildung von Beta-Zellen: In Pankreata von konventionellen (globalen) *Pax4*-Knockout-Mäusen entwickeln sich keine Insulin-produzierenden Zellen und einige Beta-Zell relevante Gene werden nicht aktiviert (Sosa-Pineda et al., 1997, Wang et al., 2004). Zahlreiche Studien an Menschen haben zudem ergeben das Mutationen auf *Pax4* der Grund für verschiedene Ausprägungen des Diabetes Mellitus sind. Da *Pax4*-Knockout Tiere nach der Geburt sterben, und somit bisher nur die Funktion im embryonalen Pankreas bestimmt werden konnte, wurde eine konditionale *Pax4*-Knockout Linie erzeugt. Zur Bestimmung der Funktion von *Pax4* in Beta-Zellen wurde *Pax4* mittels einer Insulin-Cre Linie konditionell deaktiviert.

## 2. Ergebnisse

### 2.1 Analyse der subzellularen Expression von *Arx* in Wildtypen, *Nkx2.2*- und *Pax6*-Nullmutanten

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass *Arx* eine entscheidende Rolle in der Spezifizierung endokriner Vorläuferzellen in Richtung eines Alpha-Zell Pfades spielt (Collombat et al., 2003, 2005, 2007). In *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> Pankreata ist die Anzahl an Alpha-Zellen, trotz deutlich erhöhter *Arx*-Transkripte, im Vergleich zu Wildtyp Pankreata stark reduziert (Sussel, et al., 1997, Chao et al., 2007). Um dieses scheinbare Paradox aufzuklären wurde eine genaue Analyse der subzellularen Expression von *Arx* in Pankreata *Nkx2.2*-defizienter Tiere durchgeführt. Zusätzlich wurde die Expression von *Arx* in *Pax6*<sup>-/-</sup> Mausmutanten analysiert. Pankreata *Pax6*-defizienter Tiere weisen einen ähnlichen Phänotyp wie *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> Pankreata auf: Alpha- und Beta-Zellmengen sind reduziert, wohingegen sich überwiegend Ghrelin-produzierende Zellen bilden.

#### 2.1.1 Expression von *Arx* und *Brn4* in E16.5 Pankreata von Wildtypen, *Nkx2.2*- und *Pax6*-Nullmutanten.

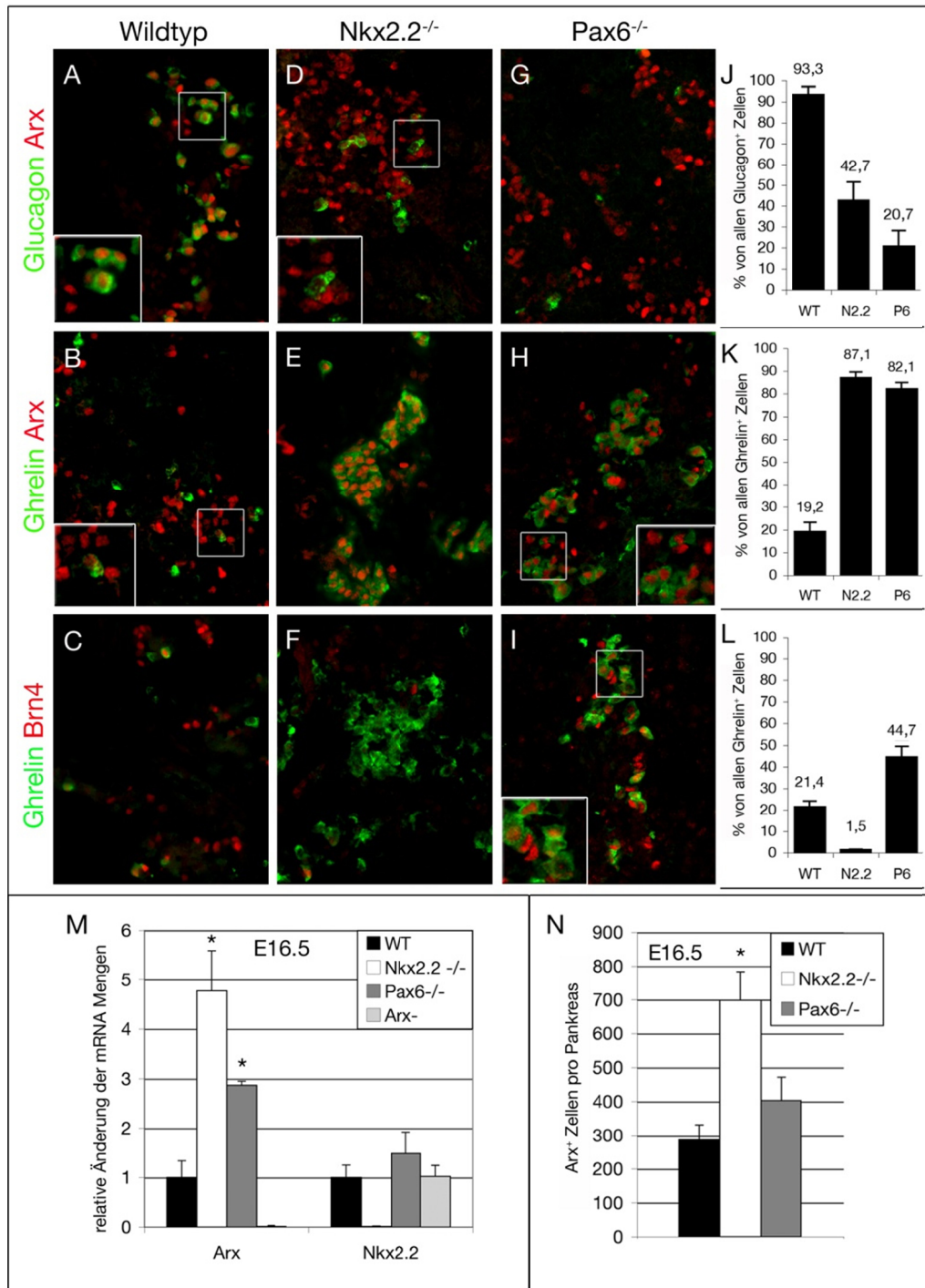
In Wildtyp Pankreata co-exprimieren die meisten *Arx*<sup>+</sup> Zellen Glucagon (Abb. 5A). Daneben sind vereinzelte *Arx*<sup>+</sup>/*Glucagon*<sup>-</sup> Zellen detektierbar, welche wahrscheinlich Alpha-Zell Vorläufer repräsentieren, die noch keine Glucagon-Produktion initiiert haben. Nur wenige *Arx*<sup>+</sup> Zellen exprimieren Ghrelin (Abb. 5B). Beachtenswerterweise geht in *Nkx2.2*-defizienten Pankreata die Reduktion der Beta- und Alpha-Zellmengen mit einer 5-fachen Erhöhung der *Arx*-Transkripte einher (Chao et al., 2007, Abb. 5D, M). Die Anzahl *Arx*-positiver Zellen ist in *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> Pankreata im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyp Mäusen 2,4 fach erhöht, woraus man schließen kann, dass eine erhöhte *Arx*-Produktion auf zellulärer Ebene stattfindet (Abb. 5N). Um einen möglichen gegenseitigen Effekt der *Nkx2.2*- und *Arx*-Aktivitäten zu ermitteln wurden die Menge an *Nkx2.2* Transkripten in Pankreata *Arx*-defizienter Tiere ermittelt. Die Menge an *Nkx2.2*-Transkripten war jedoch im Vergleich zu Pankreata von Wildtypen nicht signifikant verändert, was andeutet, dass die Transkription von *Nkx2.2* nicht von *Arx* reguliert wird (Abb. 5M). Weitere

Analysen zeigten, dass der Großteil der  $Arx^+$  Zellen in  $Nkx2.2^{-/-}$  Pankreata das Hormon Ghrelin exprimiert. Ungefähr 90% der  $Ghrelin^+$  Zellen exprimierten  $Arx$  (Abb. 5E, K). Dies zeigt, dass der Verlust von  $Nkx2.2$  in einer erhöhten Anzahl  $Ghrelin^+$  Zellen resultiert, welche offensichtlich mehr  $Arx$  produzieren als Wildtyp Alpha-Zellen. Neben der Population an  $Ghrelin^+/Arx^+$  Zellen waren in diesem Genotyp nur vereinzelte  $Arx^+/Ghrelin^-$  und  $Ghrelin^+/Arx^-$  Zellen detektierbar. Überraschenderweise exprimierten die meisten der verbliebenen  $Glucagon^+$  Zellen in  $Nkx2.2$ -defizienten Pankreata kein  $Arx$  (Abb. 5 D Einsatz, J). Um die Population der  $Ghrelin^+/Arx^+$  Zellen genauer zu charakterisieren wurde zudem die Expression des Alpha-Zell Markers  $Brn4$  untersucht. Vorherige Analysen von  $Nkx2.2^{-/-}$  Pankreata offenbarten, dass die Anzahl  $Brn4$  positiver Zellen deutlich reduziert ist und mit der Anzahl  $Glucagon$ -positiver Zellen korreliert (Sander et al., 2000). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen war keine  $Brn4$  Expression in der hyperplastischen  $Ghrelin^+/Arx^+$  Population in diesem Genotyp detektierbar (Abb. 5F, L). Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass in der Abwesenheit von  $Nkx2.2$  die Beta- und Alpha-Zelldifferenzierung zugunsten eines  $Ghrelin^+/Arx^+/Brn4^-$  Zelltyps verhindert ist. Angesichts der essentiellen Rolle von  $Arx$  in der Alpha-Zellentwicklung, ist es vorstellbar, dass solche Zellen Alpha-Zell Vorläufer repräsentieren, die nicht alle Alpha-Zell Charakteristika ausbilden. Jedoch ist die Anzahl der  $Ghrelin^+/Arx^+$  Zellen in  $Nkx2.2^{-/-}$  Pankreata vergleichbar mit der an Beta-Zellen in Wildtyp Pankreata. Dies lässt alternativ die Hypothese zu, dass solche Zellen korrekt einen Beta-Zell Pfad eingeschlagen haben, jedoch nicht weiter differenzieren und ektopisch  $Arx$  und Ghrelin exprimieren.

In  $Nkx2.2^{-/-}$  Pankreata ist die Expression von  $Arx$  erhöht und die des Transkriptionsfaktors  $Pax6$  deutlich vermindert (Prado et al., 2004, Sander et al., 2000, Wang et al., 2004). Daher wurden zudem Pankreata  $Pax6$ -defizienter Tiere auf die Expression von  $Arx$  hin untersucht mit der Absicht weitere Einsichten in das mögliche Zusammenspiel dieser drei Faktoren zu erhalten. In  $Pax6$  Knockout Mäusen ist die Anzahl  $Glucagon^+$  Zellen stark reduziert (Abb. 1G, St-Onge et al., 1997, Heller et al., 2004). Zudem entwickeln sich deutlich weniger Beta-Zellen in solchen Mutanten, wohingegen die Anzahl Ghrelin-exprimierender Zellen 5,6 fach erhöht ist (St. Onge et al., Heller et al., 2005). Die Menge an  $Nkx2.2$ -Transkripten sowie das  $Nkx2.2$ -Expressionsmuster sind in  $Pax6^{-/-}$  Pankreata im Vergleich zu Wildtypen unverändert (Abb. 5M und Heller et al., 2004). Überraschenderweise war jedoch eine

2,9 fach erhöhte Menge an *Arx*-Transkripten bei gleicher Anzahl an  $Arx^+$  Zellen in E16.5 Pankreata im Vergleich zu Wildtypen detektierbar. Dies zeigt, dass die Abwesenheit von *Nkx2.2* oder *Pax6* zu einer ähnlichen Erhöhung der *Arx*-Transkripte auf zellulärer Ebene führt (Abb. 5M, N). Ähnlich wie die Population der  $Arx^+$  Zellen in *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> Pankreata, exprimierten die Mehrheit der *Pax6*<sup>-/-</sup>  $Arx^+$  Zellen das Hormon Ghrelin (Abb. 5H, Einsatz). Ungefähr 80% der Ghrelin<sup>+</sup> Zellen exprimierten *Arx*. Zudem waren vereinzelte  $Arx^+$ /Ghrelin<sup>-</sup> und  $Arx^-$ /Ghrelin<sup>+</sup> Zellen detektierbar (Abb. 5K). Die Expression von *Brn4* war in *Pax6*<sup>-/-</sup> Pankreata bei E14.5 und E16.5 unverändert im Vergleich zu Wildtypen (Heller et al., 2004 bzw. Abb. 5I). Aus technischen Gründen war keine *Arx*/*Brn4* Co-Detektion möglich. Jedoch die Tatsache, dass ungefähr 45% der Ghrelin<sup>+</sup> Zellen *Brn4* exprimierten, lässt den Schluss zu, dass zumindest eine partielle Überlappung mit der Expression von *Arx* besteht (Abb. 5L). Neben der Ghrelin<sup>+</sup> Zellpopulation war *Brn4* auch außerhalb Ghrelin-gefärbter Bereiche detektierbar (Abb. 5I). Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass der Verlust von *Nkx2.2* oder *Pax6* in einer Verminderung der Alpha- und Beta-Zell Mengen resultiert, wohingegen eine hyperplastische Population an Ghrelin<sup>+</sup> Zellen auftritt, welche zudem *Arx* exprimieren.





**Abbildung 5: Expression von Arx und Brn4 in E16.5 Pankreata von Wildtyp, *Nkx2.2*- und *Pax6*-Nullmutanten.** (A, B) Arx ist in Wildtyp Glucagon<sup>+</sup> Zellen exprimiert. (A, Einsatz) Darüberhinaus sind Arx<sup>+</sup>/Glucagon<sup>-</sup> Zellen detektierbar. (B, C, Einsatz) Einige Wildtyp Ghrelin<sup>+</sup> Zellen exprimieren Arx und Brn4. (D, Einsatz) Einige der verbleibenden Glucagon<sup>+</sup> Zellen in *Nkx2.2*-mutanten Pankreata exprimieren kein Arx. (E, F) Der Großteil der *Nkx2.2*-defizienten Ghrelin<sup>+</sup> Zellen exprimiert Arx aber nur selten Brn4. (G, H) Arx ist in *Pax6*-defizienten Pankreata exprimiert und co-lokalisiert mit den meisten Ghrelin<sup>+</sup> Zellen.

Vereinzelte  $Arx^+/Ghrelin^-$  und  $Arx^-/Ghrelin^+$  Zellen sind detektierbar. (I, Einsatz) In *Pax6*-defizienten Pankreata ist *Brn4* teilweise in  $Ghrelin^+$  Zellen exprimiert und markiert zudem eine Population Ghrelin-negativer Zellen (Originalvergrößerung 400x, Einsätze 2x). (J-L) Die Prozentualen Anteile an  $Arx^+/Glucagon^+$ ,  $Arx^+/Ghrelin^+$  und  $Brn4^+/Ghrelin^+$  co-positiven Zellen innerhalb der gesamten  $Glucagon^+$  bzw.  $Ghrelin^+$  Zellpopulationen in Wildtyp (WT), *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> (N2.2) und *Pax6*<sup>-/-</sup> (P6) Pankreata ist dargestellt. (M) Quantitative RT-PCR der *Arx*- und *Nkx2.2*-Transkripte in E16.5 Pankreata von Wildtyp, *Arx*<sup>-</sup>, *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> und *Pax6*<sup>-/-</sup> Mäusen. n=3 Pankreata/Genotyp, p-Werte <0,05 im Vergleich zu Wildtypen wurden als statistisch signifikant angesehen.

### 2.1.2 Vergleichende Analyse der Ghrelin-exprimierenden Populationen in embryonalen Pankreata von Wildtypen, *Nkx2.2*- und *Pax6*-Nullmutanten.

Um die in *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> und *Pax6*<sup>-/-</sup> Pankreata auftretenden  $Ghrelin^+/Arx^+$  Populationen genauer zu charakterisieren wurden des Weiteren die Expression verschiedener Beta-Zell Marker, inklusive Insulin, iAPP, PC1/3 und Pdx1 untersucht. Die meisten dieser Markergene wurden bereits in beiden Mutanten detektiert, ihre relative Expression zu *Arx* und Ghrelin jedoch nicht beschrieben (Prado et al., 2004, Heller et al., 2005, Nishimura et al., 2008).

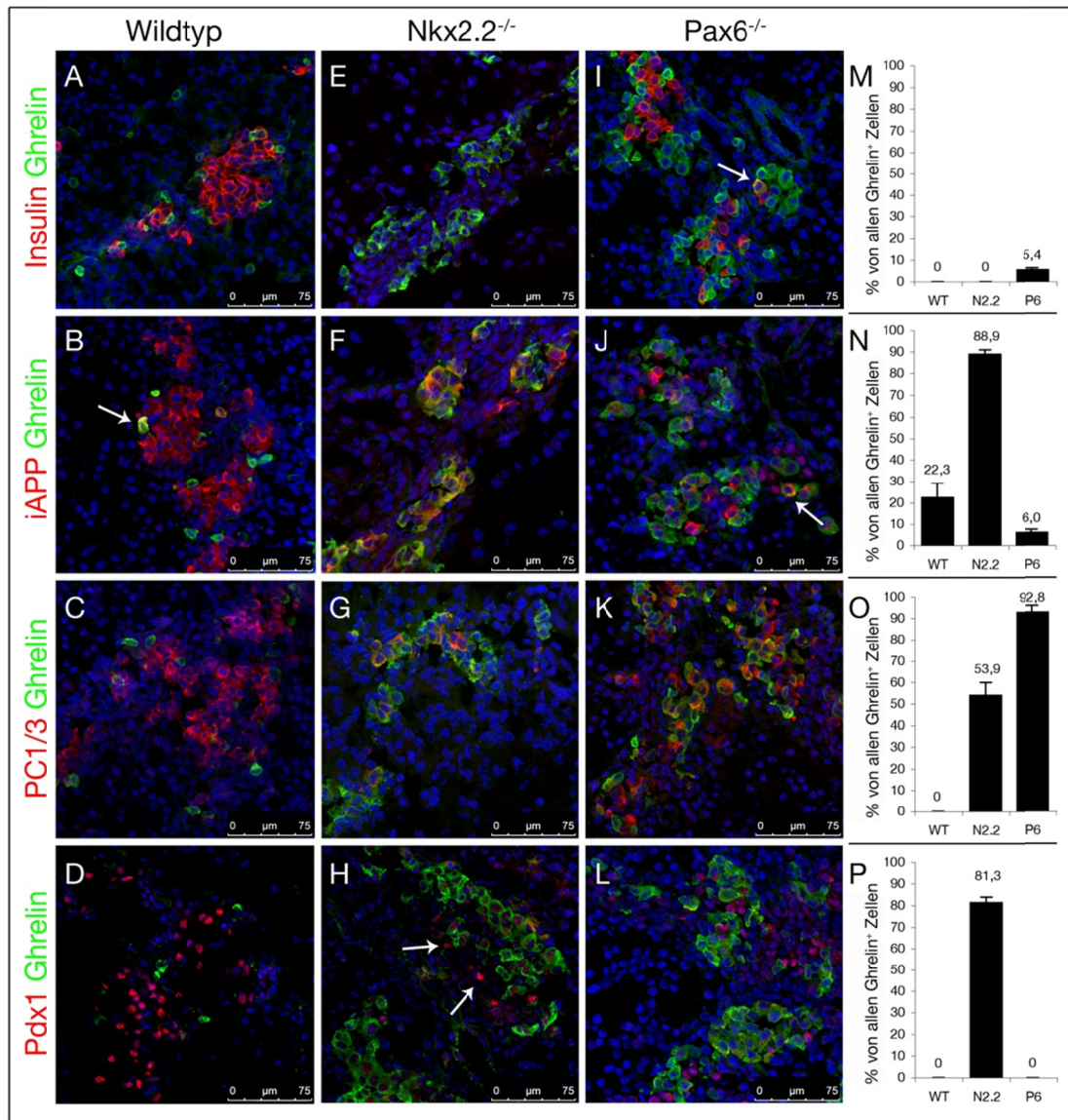
Die Population der  $Ghrelin^+$  Zellen in Wildtyp Pankreata ist in  $Glucagon^+/Ghrelin^+$  Alpha-Zellen und  $Glucagon^-/Ghrelin^+$  Epsilon-Zellen unterteilbar. Nur ein kleiner Teil der Alpha-Zellen exprimiert zu diesem Entwicklungsstadium Ghrelin.  $Glucagon^+/Ghrelin^+$  Alpha-Zellen exprimieren zudem *Arx* und *Brn4* (Abb. 5B, C, Prado et al., 2004, Heller et al., 2004). In der folgenden Analyse der Wildtyp Pankreata wurde aus technischen Gründen nicht zwischen diesen beiden  $Ghrelin^+$  Populationen unterschieden. Keine der Wildtyp  $Ghrelin^+$  Zellen exprimierte Insulin, PC1/3 oder Pdx1 (Abb. 6A-D). Ungefähr 20% exprimierten jedoch iAPP bei E17.5 (Abb. 6B Pfeil, N).

Als nächstes wurde die Expression dieser Marker in der hyperplastischen  $Ghrelin^+$  Population von *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> Pankreata untersucht. Die Expression von Pdx1 wurde in diesen Zellen detektiert, obgleich zu wesentlich niedrigeren Expressionsleveln als in Wildtyp Pankreata (Sussel et al., 1998). Ungefähr 80% der  $Ghrelin^+$  Zellen exprimierten iAPP und niedrige Level an Pdx1 in diesem Genotyp (Abb. 6H, P). Zudem wurden regelmäßig  $Pdx1^+$  Zellen außerhalb der Ghrelin-gefärbten Bereiche

detektiert (Abb. 6H Pfeil). Die Prohormon-Konvertase 1/3 war in ungefähr 54% der Ghrelin<sup>+</sup> Zellen exprimiert (Abb. 6G, O). Somit unterscheiden sich die *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> Ghrelin<sup>+</sup> Zellen signifikant von den Ghrelin<sup>+</sup> Zellen in Wildtyp Pankreata. Die direkte Assoziation dieser Beta-Zell Marker mit Ghrelin und damit auch Arx, zeigt, dass zumindest eine Subpopulation dieser Ghrelin<sup>+</sup>/Arx<sup>+</sup> Zellen festgelegte Beta-Zell Charakteristika aufweisen und nicht aus putativen Alpha-Zell Vorläufern besteht.

Interessanterweise offenbarte die gleiche Analyse der Ghrelin<sup>+</sup> Zellen in *Pax6*<sup>-/-</sup> Pankreata zusätzliche Unterschiede: In *Pax6*<sup>-/-</sup> Pankreata entwickeln sich einige scheinbar normale Beta-Zellen. Diese exprimieren Insulin, Pdx1, Hb9, Nkx6.1 und MafA korrekt (Heller et al., 2005, Nishimura et al., 2008). Außer in sehr vereinzelt Fällen ist in diesen Beta-Zellen kein Ghrelin detektierbar (Abb. 6I Pfeil, M). Ebenso rar waren Ghrelin<sup>+</sup>/iAPP<sup>+</sup> Zellen zu finden; der Großteil der Ghrelin<sup>+</sup> Zellen exprimiert kein iAPP (Abb. 6J, N). Im Gegensatz zu *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> Ghrelin<sup>+</sup> Zellen, war darüberhinaus keine Co-Expression von Pdx1 und Ghrelin in *Pax6*<sup>-/-</sup> Pankreata detektierbar (Abb. 6L, Heller et al., 2005). Überraschenderweise exprimierten jedoch fast alle Ghrelin<sup>+</sup> Zellen PC1/3 (Abb. 6K, O).

Diese Ergebnisse zeigen signifikante Unterschiede im Expressionsprofil der Ghrelin<sup>+</sup> Zellpopulationen in Wildtyp, *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> und *Pax6*<sup>-/-</sup> Pankreata auf. Während die meisten *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> Ghrelin<sup>+</sup> Zellen iAPP und Pdx1 exprimieren, sind *Pax6*<sup>-/-</sup> Ghrelin<sup>+</sup> Zellen negativ für die Expression von iAPP und Pdx1. Beachtenswerterweise ist die Expression von iAPP und Pdx1 nicht grundsätzlich verhindert in *Pax6*<sup>-/-</sup> Pankreata, da sie außerhalb der Ghrelin<sup>+</sup> Bereiche detektierbar sind und höchstwahrscheinlich die verbleibenden Beta-Zellen markieren. Zusammengefasst verstärken diese Daten die Annahme, dass endokrine Vorläuferzellen auch in der Abwesenheit von *Nkx2.2* oder *Pax6* auf einen Beta-Zellpfad festgelegt werden und die Expression einiger Beta-Zell spezifischer Marker initiieren, jedoch kein reifes Beta-Zell Stadium erreichen und Arx eher misexprimieren.



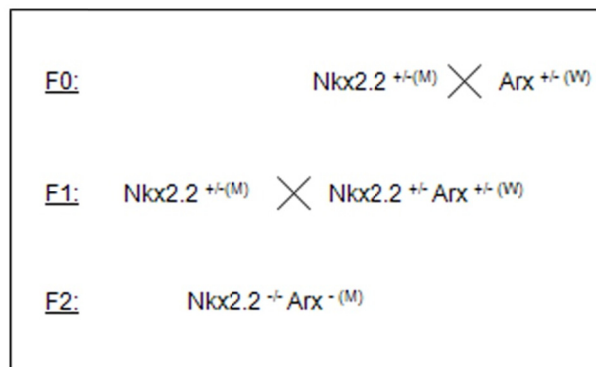
**Abbildung 6: Co-Detektion von Ghrelin und Insulin, iAPP, PC1/3 oder iAPP in E17.5 Pankreata von Wildtypen sowie *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> und *Pax6*<sup>-/-</sup> Nullmutanten.** (A-D) Wildtyp Ghrelin<sup>+</sup> Zellen exprimieren weder Insulin, PC1/3 oder Pdx1. Vereinzelt Ghrelin<sup>+</sup> Zellen exprimieren iAPP. (E-H) Keine Insulin<sup>+</sup> Zellen sind in *Nkx2.2*-mutanten Pankreata detektierbar. Die Mehrheit der Ghrelin<sup>+</sup> Zellen exprimiert iAPP und Pdx1. Vereinzelt iAPP<sup>+</sup>/Ghrelin<sup>-</sup> (F) und Pdx1<sup>+</sup>/Ghrelin<sup>-</sup> (H, Pfeile) Zellen sind detektierbar. (G) Eine Subpopulation der *Nkx2.2*-defizienten Ghrelin<sup>+</sup> Zellen exprimiert PC1/3. (I-L) *Pax6*-defiziente Ghrelin<sup>+</sup> Zellen exprimieren kein Insulin oder iAPP, außer in sehr seltenen Fällen (Pfeile in I+J). Fast alle Ghrelin<sup>+</sup> Zellen exprimieren PC1/3 aber keine produziert Pdx1. (M-P) Die prozentualen Anteile an Insulin<sup>+</sup>/Ghrelin<sup>+</sup>, iAPP<sup>+</sup>/Ghrelin<sup>+</sup>, PC1/3<sup>+</sup>/Ghrelin<sup>+</sup> und Pdx1<sup>+</sup>/Ghrelin<sup>+</sup> co-positiven Zellen innerhalb der gesamten Ghrelin<sup>+</sup> Zellpopulationen in

Wildtyp (WT), *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> (N2.2) und *Pax6*<sup>-/-</sup> (P6) Pankreata ist dargestellt. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen.

### 2.1.3 *Nkx2.2*<sup>-/-</sup>*Arx*<sup>-</sup> Pankreata fehlen Alpha- und reife Beta-Zellen und weisen eine hyperplastische Ghrelin<sup>+</sup>/Somatostatin<sup>+</sup> Zellpopulation auf.

Wie in den vorangegangenen Analysen gezeigt, resultiert der Verlust von *Nkx2.2* in einer fehlerhaften Beta-Zellentwicklung. Um die Frage zu klären, ob der Verlust von *Nkx2.2* dafür verantwortlich ist oder die Misexpression von *Arx* in Folge der *Nkx2.2*-Defizienz, wurden Tiere doppelmutant für *Nkx2.2* und *Arx* generiert (Abb. 7).

*Nkx2.2*<sup>-/-</sup>*Arx*<sup>-</sup> doppelmutante Tiere wurden entsprechend der Mendelschen Vererbungslehre geboren, womit embryonale Lethalität ausgeschlossen werden kann. Im Gegensatz zu *Nkx2.2*- und *Arx*-Einfachmutanten, welche bei P5 bzw. P2 sterben, säugten Doppelmutanten nicht und starben innerhalb weinger Stunden nach der Geburt. Die Messung der Blutzuckerwerte kurz vor dem Tod offenbarte eine starke Hypoglykämie (<20mg/dl in Doppelmutanten im Vergleich zu 79±13mg/dl in Wildtypen).



#### Abbildung 7: Verpaarungsschema zur Generierung von *Nkx2.2*<sup>-/-</sup>*Arx*<sup>-</sup> Doppelmutanten.

Zuerst wurden *Nkx2.2*<sup>+/-</sup> heterozygote Männchen mit *Arx*<sup>+/-</sup> heterozygoten Weibchen verpaart. Zur Generierung von *Nkx2.2*<sup>-/-</sup>*Arx*<sup>-</sup> Doppelmutanten wurden dann *Nkx2.2*<sup>+/-</sup>*Arx*<sup>+/-</sup> doppelheterozygote Weibchen mit *Nkx2.2*<sup>+/-</sup> heterozygoten Männchen verpaart.

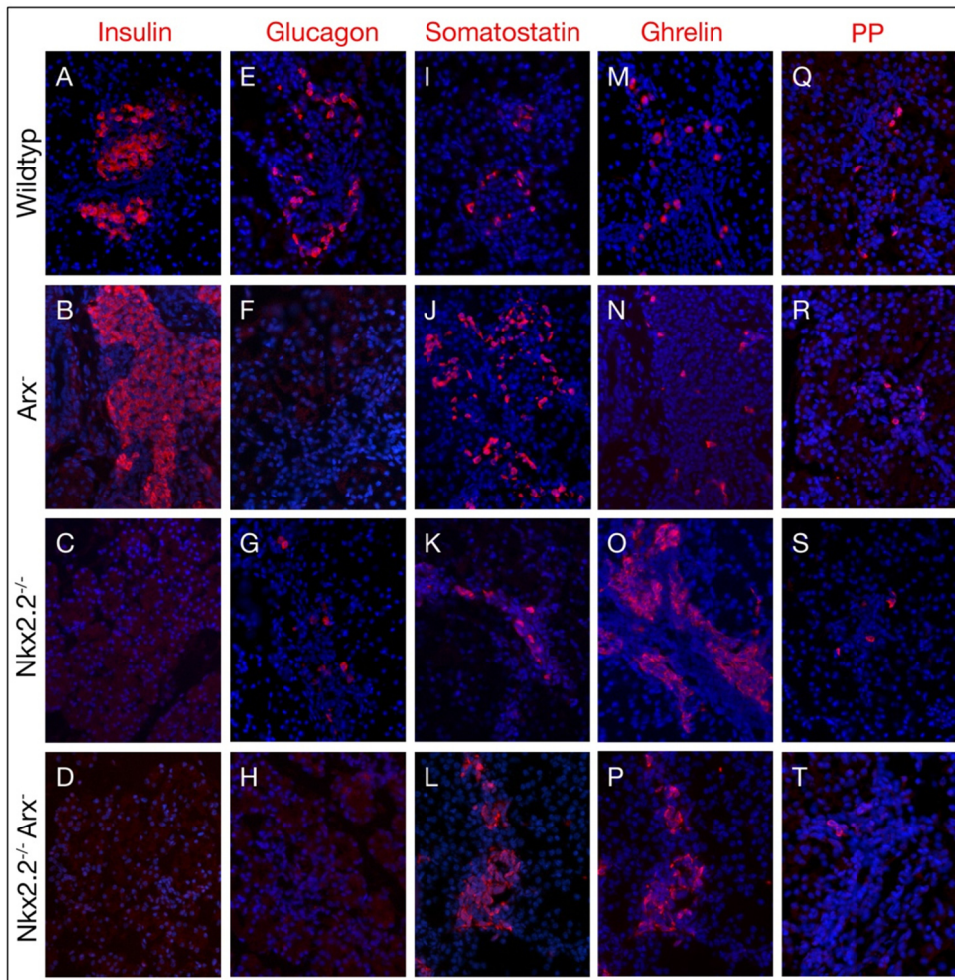
Zuerst wurde mittels Immunfluoreszenz die Präsenz der verschiedenen endokrinen Zellpopulationen in Neugeborenen (P0) untersucht (Abb. 8). Obwohl *Arx*-Einfachmutanten eine leichte Zunahme in der Anzahl der Beta-Zellen aufzeigen

(Collombat et al., 2003), waren keine Insulin<sup>+</sup> Zellen in Pankreata von Doppelmutanten zu detektieren, was die essentielle Rolle von *Nkx2.2* in der Differenzierung der Beta-Zelle bestätigt (Abb. 8A-D). Übereinstimmend mit vorherigen Analysen *Arx*-defizienter Pankreata und der daraus geschlossenen Relevanz von *Arx* für den Alpha-Zellpfad, waren keine Glucagon<sup>+</sup> Zellen in Doppelmutanten zu detektieren (Abb. 8E-H, Collombat 2003, 2005, 2007). PP<sup>+</sup> Zellen waren in allen Genotypen detektierbar, jedoch nur sehr wenig in *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> und *Nkx2.2*<sup>-/-</sup>*Arx*<sup>-</sup> Mutanten (Abb. 8Q-T).

Außerdem wurde die Präsenz somatostatin-exprimierender Delta-Zellen untersucht. Wildtyp Delta-Zellen exprimieren kein *Nkx2.2*. Dementsprechend ist die Anzahl der Delta-Zellen in *Nkx2.2*-defizienten Pankreata unverändert (Abb. 8K, Sussel et al., 1998, Sander et al., 2000). Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass die Anzahl der Delta-Zellen in *Arx*-Mutanten im Vergleich zu Wildtypen 2,4 fach erhöht sind (Abb. 8J, Collombat et al., 2003). Daher war eine ungehinderte Differenzierung der Delta-Zellpopulation in der Abwesenheit beider Faktoren anzunehmen. Übereinstimmend wurden zu allen untersuchten Stadien (E14.5, E18.5 und P0) signifikant erhöhte Mengen an Somatostatin<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zu Wildtyp, *Arx*- oder *Nkx2.2*-defizienten Pankreata detektiert (Abb. 8I-L, Daten nicht gezeigt).

In P0 Wildtyp Pankreata ist eine kleine Population an Ghrelin-exprimierenden Epsilon-Zellen neben einer Population an Glucagon<sup>+</sup>/Ghrelin<sup>+</sup> Alpha-Zellen detektierbar (Heller et al., 2005). Der Verlust funktionalen *Arx* verhindert spezifisch die Differenzierung der Glucagon<sup>+</sup>/Ghrelin<sup>+</sup> Zellen hat aber keinen Einfluss auf die Menge der Epsilon-Zellen (Collombat et al., 2003, Heller et al., 2005). Glucagon<sup>+</sup>/Ghrelin<sup>+</sup> Zellen fehlen ebenfalls in *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> Pankreata (Prado et al., 2004). In *Nkx2.2*<sup>-/-</sup>*Arx*<sup>-</sup> Pankreata, war eine deutlich vergrößerte Menge an Ghrelin<sup>+</sup> Zellen detektierbar, ähnlich wie in *Nkx2.2*-Einfachmutanten (Abb. 9O-P). Unerwarteterweise offenbarte eine Co-Detektion dass ein Großteil der Ghrelin<sup>+</sup> Zellen auch Somatostatin exprimierte (Abb. 9D). Dieses Resultat wurde durch die Benutzung zweier verschiedener Antikörpersets bestätigt. Solche bi-hormonalen Zellen waren weder in Wildtyp noch in *Arx*<sup>-</sup> oder *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> Pankreata zu detektieren (Abb. 9A-C).

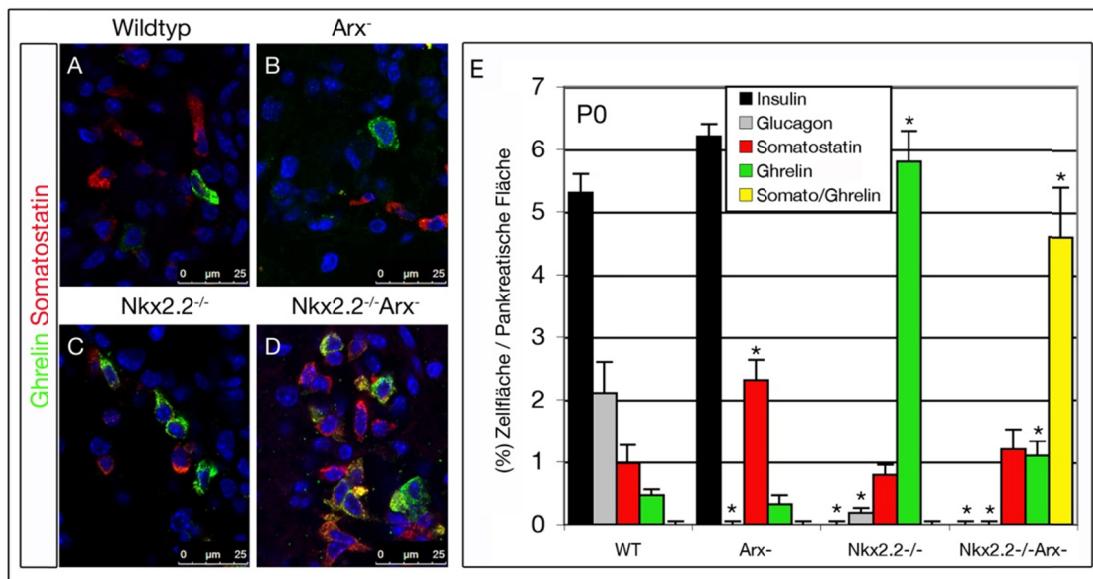




**Abbildung 8: Expression endokriner Hormone in Pankreata von neugeborenen Wildtyp, *Nkx2.2<sup>-/-</sup>/Arx<sup>-/-</sup>* Einfach- und Doppelmutanten.** Immunfluoreszenz-Detektion von Insulin (A-D), Glucagon (E-H), Somatostatin (I-L), Ghrelin (M-P) und Pankreatischem Polypeptid (Q-T) in Neugeborenen. Gegenfärbung mit DAPI. (D, H) Beta- und Alpha-Zellen fehlen in *Nkx2.2<sup>-/-</sup>Arx<sup>-/-</sup>* Doppelmutanten Mäusen. (L, P) Die Populationen Ghrelin<sup>+</sup> und Somatostatin<sup>+</sup> Zellen sind vergrößert (Originalvergrößerung 200x).

Des Weiteren wurden die endokrinen Populationen in P0 Pankreata von Wildtyp und Einfach-/Doppelmutanten quantifiziert (Abb. 9E). In *Nkx2.2<sup>-/-</sup>* Pankreata war die Anzahl der Ghrelin<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zu den Ghrelin<sup>+</sup> Zellen in Wildtyp Pankreata etwa 12 fach erhöht. Interessanterweise war eine ähnliche Zunahme der Ghrelin<sup>+</sup> Zellen im Vergleich von *Nkx2.2*-Einfachmutanten und *Nkx2.2<sup>-/-</sup>Arx<sup>-/-</sup>* Doppelmutanten offensichtlich. 80% der *Nkx2.2<sup>-/-</sup>Arx<sup>-/-</sup>* Ghrelin<sup>+</sup> Zellen co-exprimierten jedoch

Somatostatin. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass *Arx* die Expression von Somatostatin in *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> Ghrelin<sup>+</sup> Zellen unterdrückt. Beachtenswerterweise war die Anzahl der nur Somatostatin<sup>+</sup> Zellen in *Nkx2.2*<sup>-/-</sup>*Arx*<sup>-</sup> Mutanten im Vergleich zu *Nkx2.2*-Einfachmutaten und Wildtypen unverändert. Ebenso interessant war die Tatsache, dass die Menge der Somatostatin<sup>+</sup>/Ghrelin<sup>+</sup> Zellen in *Nkx2.2*<sup>-/-</sup>*Arx*<sup>-</sup> sowie die Menge der Ghrelin<sup>+</sup> Zellen in *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> Pankreata mit der Beta-Zell Menge in Wildtypen vergleichbar war. Diese Tatsache unterstützt die Annahme, dass Beta-Zellen in diesen Genotypen richtig spezifiziert werden, jedoch nicht korrekt differenzieren. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die kombinierte Abwesenheit von *Nkx2.2* und *Arx* die Bildung von Insulin<sup>+</sup> sowie Glucagon<sup>+</sup> Zellen verhindert, aber keinen Effekt auf die Anzahl der nur Somatostatin<sup>+</sup> Zellen hat. Es bildet sich jedoch ein alternativer Zellsubtyp welcher durch die Expression von Ghrelin und Somatostatin charakterisiert ist.



**Abbildung 9: Kombinierte Ghrelin- und Somatostatin-Immunfluoreszenzdetektion in Pankreata neugeborener Wildtypen und *Nkx2.2*<sup>-/-</sup>*Arx*<sup>-</sup> Einfach- und Doppelmütanten.**

(A-D) Somatostatin<sup>+</sup> Zellen und Ghrelin<sup>+</sup> Zellen markieren verschieden Zellpopulationen in (A) Wildtyp , (B) *Arx*<sup>-</sup> und (C) *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> Einfachmutanten. (D) In Pankreata von *Nkx2.2*<sup>-/-</sup>*Arx*<sup>-</sup> Doppelmütanten ist eine Population an Ghrelin<sup>+</sup>/Somatostatin<sup>+</sup> co-positiven Zellen neben Ghrelin<sup>+</sup> oder Somatostatin<sup>+</sup> Zellen detektierbar. (E) Quantifizierung hormon-produzierender Zellen (ohne PP-Zellen) in Pankreata von neugeborenen Wildtyp sowie *Nkx2.2*<sup>-/-</sup>*Arx*<sup>-</sup>

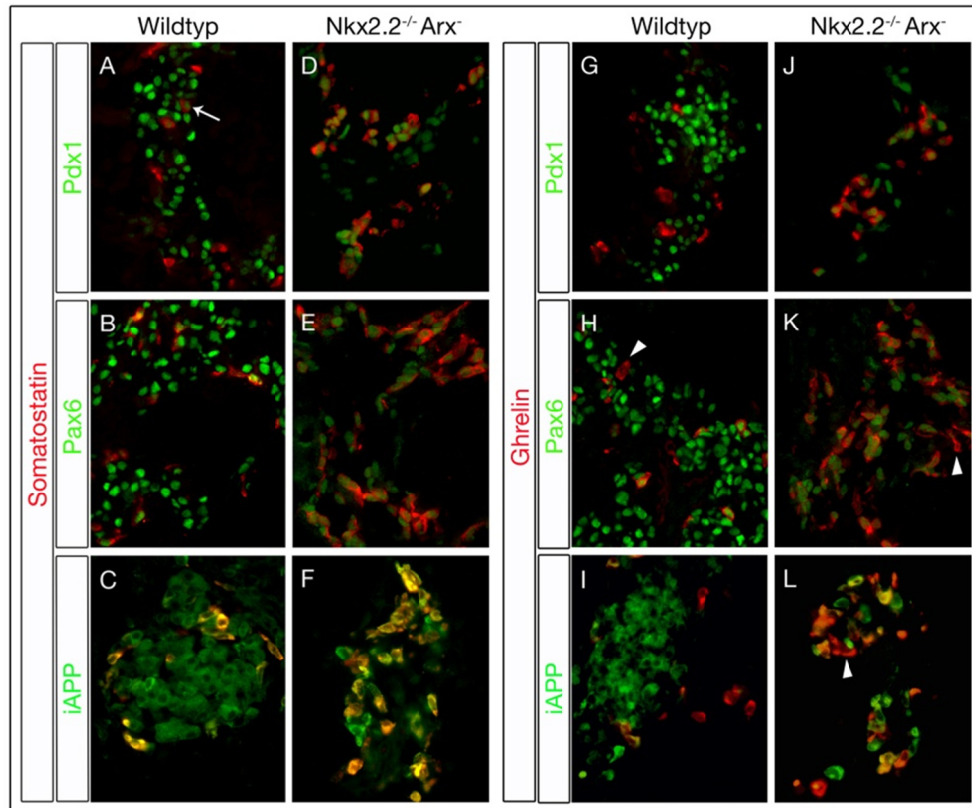


Einfach- und Doppelmutanten. Die Balken repräsentieren den prozentualen Anteil der fluoreszierenden Zellfläche an der gesamten Pankreasfläche. n=3 Pankreata/Genotyp, p-Werte <0,05 im Vergleich zu Wildtypen wurden als statistisch signifikant angesehen.

#### **2.1.4 *Nkx2.2*<sup>-/-</sup>*Arx*<sup>-</sup> defiziente endokrine Zellen exprimieren iAPP und niedrige Level an Pdx1 und Pax6.**

Zur genaueren Einordnung des bi-hormonalen Zelltyps in *Nkx2.2*<sup>-/-</sup>*Arx*<sup>-</sup> Pankreata wurde die Expression von Pdx1 und iAPP innerhalb der Somatostatin<sup>+</sup> und Ghrelin<sup>+</sup> Zellpopulationen bestimmt. Außerdem wurde die Expression des *Nkx2.2*-abhängigen Faktors Pax6 in solchen Mutanten ermittelt (Prado et al., 2004).

Im Gegensatz zu der mosaiken Expression von Pdx1 in Delta-Zellen von Wildtyp, *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> oder *Arx*<sup>-</sup> Mutanten, war die Expression von Pdx1 in fast allen Somatostatin<sup>+</sup> Zellen von *Nkx2.2*<sup>-/-</sup>*Arx*<sup>-</sup> Mäusen detektierbar. Jedoch erschienen die Pdx1-Expressionslevel auf zellulärer Ebene wesentlich geringer als in Wildtyp-Pankreata, aber vergleichbar zu denen in *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> Einfachmutanten (Abb. 10D, Wang et al., 2004). Darüberhinaus exprimierten alle Somatostatin<sup>+</sup> Zellen iAPP und niedrige Level an Pax6 (Abb. 10E). Anschließende Analysen der Ghrelin<sup>+</sup> Zellpopulation offenbarten erwartungsgemäß, dass die große Mehrheit ebenfalls diese Faktoren exprimierte (Abb. 10J-L). Somit erscheinen die Veränderungen der Expressionen von Pdx1 und Pax6 in *Nkx2.2*<sup>-/-</sup>*Arx*<sup>-</sup> Doppelmutanten ähnlich zu denen in *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> Mutanten, was wiederum die Wichtigkeit von *Nkx2.2* in der Aufrechterhaltung normaler Expressionslevel dieser Gene darlegt. Zusammengefasst ist der prominenteste endokrine Zelltyp in *Nkx2.2*<sup>-/-</sup>*Arx*<sup>-</sup> Pankreata durch die Expression von Ghrelin, Somatostatin, iAPP, Pdx1<sup>niedrig</sup> und Pax6<sup>niedrig</sup> charakterisiert. Somit weisen diese Zellen die gleichen Beta-Zell-ähnlichen Eigenschaften wie die Ghrelin<sup>+</sup> Zellen in *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> Pankreata auf, und unterscheiden sich einzig in der Expression von Somatostatin. Angesichts der Tatsache, dass die Population der Ghrelin<sup>+</sup> Zellen in *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> Pankreata vermehrt *Arx* produzieren, ist es vorstellbar, dass der zusätzliche Verlust von *Arx* die ektopische Expression von Somatostatin in solchen Zellen erlaubt.

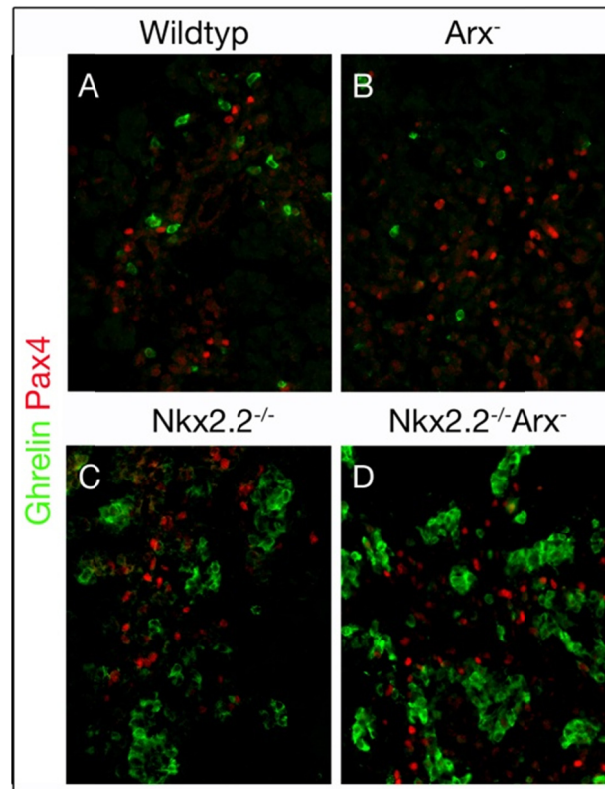


**Abbildung 10: Expression von Pdx1, iAPP und Pax6 in Pankreata von Wildtyp und *Nkx2.2<sup>-/-</sup>Arx<sup>-/-</sup>* Mäusen.** (A) Vereinzelt Wildtyp Delta-Zellen exprimieren Pdx1 (Pfeil), der Großteil exprimiert kein Pdx1. (B, C) Wildtyp Delta-Zellen exprimieren iAPP und Pax6. (D) Fast alle Somatostatin<sup>+</sup> Zellen in *Nkx2.2<sup>-/-</sup>Arx<sup>-/-</sup>* Pankreata exprimieren niedrige Level an Pdx1. (E, F) *Nkx2.2<sup>-/-</sup>Arx<sup>-/-</sup>* Somatostatin<sup>+</sup> Zellen exprimieren iAPP und niedrige Level an Pax6. (G) Wildtyp Epsilon-Zellen exprimieren kein Pdx1. (H, I) Pax6 und iAPP sind in einer Subpopulation der Wildtyp Ghrelin<sup>+</sup> Zellen detektierbar; einige Zellen sind negativ für Pax6 (Pfeilspitze) oder iAPP. (J, K) Die Mehrheit der Ghrelin<sup>+</sup> Zellen in *Nkx2.2<sup>-/-</sup>Arx<sup>-/-</sup>* Pankreata exprimieren niedrige Level an Pax6 und Pdx1; vereinzelt Ghrelin<sup>+</sup> Zellen exprimieren kein Pax6 (Pfeilspitze). (L) iAPP ist in der Mehrheit der Ghrelin<sup>+</sup> Zellen detektierbar; vereinzelt Ghrelin<sup>+</sup> Zellen sind negativ für iAPP (Pfeilspitze). Um die Expression von Pdx1 und Pax6 zu verdeutlichen wurden die Bilder in D, E, J und K mit doppelter Belichtungszeit im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollbildern aufgenommen (Originalvergrößerung 400x).

### **2.1.5 Expression von Pax4 und Nkx6.1 in Pankreata von Wildtypen, *Nkx2.2*<sup>-/-</sup>/*Arx*<sup>-/-</sup> Einfach- und Doppelmutanten.**

Um aufzuklären zu welchem Entwicklungsstadium die Beta-Zell Differenzierung in *Nkx2.2*<sup>-/-</sup>/*Arx*<sup>-/-</sup> Mutanten verhindert ist, wurde die Expression des endokrinen Vorläufermarkers Pax4 analysiert (Sosa-Pineda et al., 1997, Greenwood et al., 2007). Die Expression von Pax4 ist in embryonalen Pankreata bei E16.5 deutlich zu detektieren. Sie nimmt allerdings in den folgenden Tagen ab und ist in Pankreata Neugeborener kaum vorhanden (Wang et al., 2004). Mehrere Studien haben die essenzielle Rolle von *Pax4* in der Bildung von Beta- und Delta-Zellen aufgezeigt (Sosa-Pineda et al., 1997, Wang et al., 2004, Collombat et al., 2009).

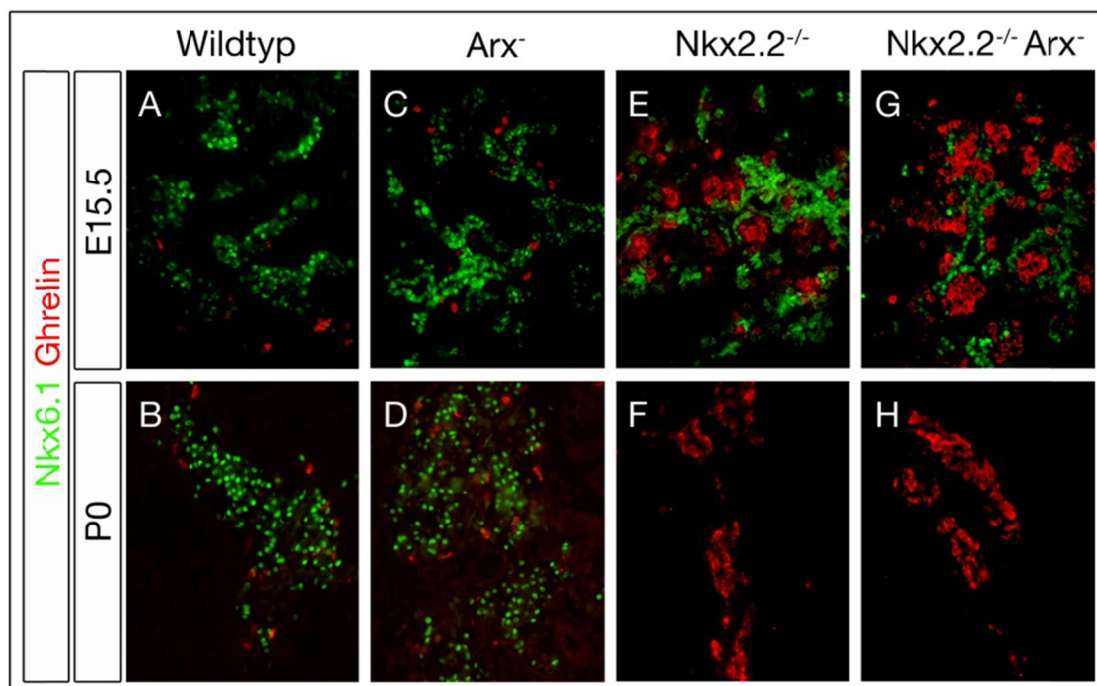
In Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien, welche die Präsenz von *Pax4* Transkripten in *Arx*- und *Nkx2.2*-defizienten Pankreata beschrieben haben, wurden zahlreiche Pax4<sup>+</sup> Zellen in E16.5 Pankreata solcher Mutanten mittels Immunhistochemie detektiert (Abb. 11B-C , Collombat et al., 2003, Wang et al., 2004). Zudem haben frühere Studien gezeigt, dass *Arx* in repressiver Weise an den *Pax4*-Promoter bindet, was in der Konsequenz die Spezifizierung des Alpha- contra den Beta-Zellpfad einleitet (Collombat et al., 2005, 2007). In E16.5 *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> Pankreata war jedoch eine normale Anzahl Pax4<sup>+</sup> Zellen trotz deutlich erhöhter *Arx*-Transkripte detektierbar. Daraus kann man schließen, dass in diesem Genotyp die Expression von *Pax4* nicht durch *Arx* runterreguliert wird. Die kombinierte Defizienz von *Nkx2.2* und *Arx* hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Anzahl Pax4-positiver Zellen, was anzeigt das deren Bildung weder von *Nkx2.2* noch von *Arx* abhängig ist (Abb. 11D). In keinem Genotyp war Pax4 in Ghrelin<sup>+</sup> Zellen exprimiert.



**Abbildung 11: Expression von Pax4 in E16.5 Pankratak von Wildtypen,  $Nkx2.2^{-/-}/Arx^{-/-}$  Einfach- und Doppelmутanten.** (A-D) Pax4<sup>+</sup> Zellen sind deutlich detektierbar in E16.5 Pankratak von Wildtyp,  $Nkx2.2^{-/-}/Arx^{-/-}$  Einfach- und Doppelmутanten. Pax4 ist nicht in Ghrelin<sup>+</sup> Zellen in Wildtyp oder mutanten Pankratak exprimiert (Originalvergrößerung 200x).

Anschließend wurde die zeitliche Expression von Nkx6.1 in Pankratak aller Genotypen untersucht (Abb. 12). Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass Pax4 und Nkx2.2 für die Aufrechterhaltung der *Nkx6.1* Expression in differenzierenden Beta-Zellen essenziell sind (Sander et al., 2000, Wang et al., 2004). In Abwesenheit von einem der Faktoren nimmt die Anzahl der Nkx6.1<sup>+</sup> Zellen ab E15.5 an ab, sodass fast keine Nkx6.1<sup>+</sup> Zellen in Pankratak Neugeborener detektierbar sind. Das Fehlen von *Arx* hat keinen Einfluss auf die Aufrechterhaltung und korrekte Expression von *Nkx6.1* (Abb. 12D, Collombat et al., 2003). In  $Nkx2.2^{-/-}/Arx^{-/-}$  Doppelmутanten war eine zu *Nkx2.2*-Einfachmutanten vergleichbare zeitliche Änderung der Nkx6.1 Expression detektierbar. Häufig vorhanden im undifferenzierten pankreatischen Epithelium bei E15.5, war die Anzahl Nkx6.1<sup>+</sup> Zellen bei E18.5 drastisch reduziert und es waren keine Nkx6.1<sup>+</sup> Zellen bei P0 detektierbar (Abb. 12E-H).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass *Nkx2.2* und *Arx* für die Bildung Pax4<sup>+</sup> Zellen nicht notwendig sind. Darüberhinaus erscheinen die Veränderungen in der Expression von Pdx1, Nkx6.1 und Pax6 in *Nkx2.2*<sup>-/-</sup>*Arx*<sup>-</sup> Doppelmutanten vergleichbar zu denen in *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> Mutanten, was darauf hindeutet, dass die fehlerhafte Beta-Zell Differenzierung und die ektopische Expression von Ghrelin einzig auf den Verlust von *Nkx2.2* zurückzuführen ist. Angesichts der drastischen Reduktion der Alpha-Zell Population in *Nkx2.2*-defizienten Pankreata, wo *Arx* verstärkt exprimiert ist, erscheint es offensichtlich, dass *Nkx2.2* ebenfalls für eine korrekte Initiierung des Alpha-Zellpfades essentiell ist.



**Abbildung 12: Abnehmende Expression von Nkx6.1 in der Abwesenheit von *Nkx2.2*.** (A, C, E, G) In E15.5 Wildtyp und mutanten Pankreata sind Nkx6.1<sup>+</sup> Zellen zahlreich detektierbar. (B, D) Die Expression von Nkx6.1 bleibt in neugeborenen Wildtyp Pankreata und *Arx*-defizienten Pankreata aufrechterhalten. (F, H) In der Abwesenheit von *Nkx2.2* oder *Nkx2.2* und *Arx* nimmt die detektierte Anzahl an Nkx6.1<sup>+</sup> Zellen von E15.5 stetig ab, sodass keine Nkx6.1<sup>+</sup> Zellen in Pankreata Neugeborener zu detektieren sind. In keinem Genotyp ist zu den untersuchten Stadien eine Co-Expression von Nkx6.1 oder Ghrelin detektierbar (Originalvergrößerung 200x).

## **2.2 Konditionelle Aktivierung von Arx in Pankreata *Arx*-defizienter Tiere.**

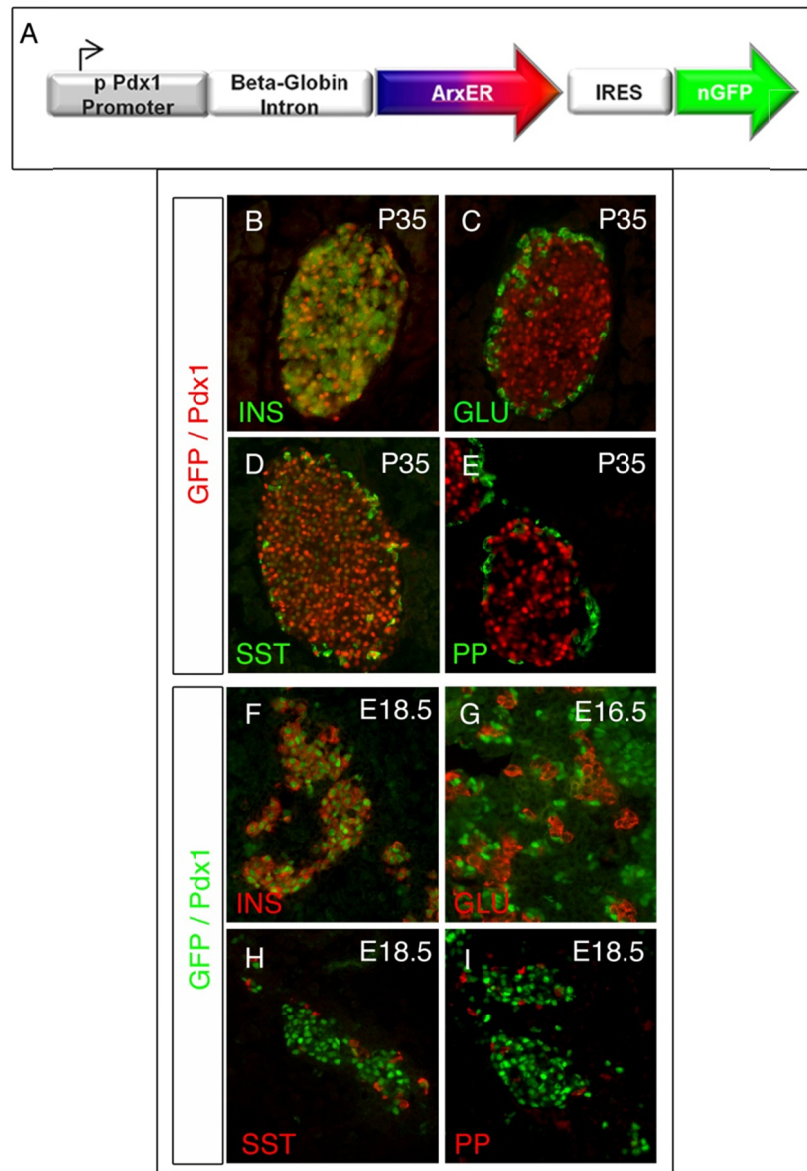
Mehrere Studien haben die wichtige Rolle von *Arx* in der Spezifizierung von Alphazellen aufgezeigt. *Arx*-Mutanten entwickeln keine Glucagon-produzierenden Alphazellen wohingegen die creLoxP basierte Überexpression von *Arx* in pankreatischen Vorläuferzellen zu einem Übermaß an Alpha- aber auch PP-Zellen im Vergleich zu Wildtypen führt (Collombat et al., 2003, 2005, 2007). Um die Frage zu klären ob *Arx* ausreichend ist um die Alpha- und PP- Zell Differenzierungsprogramme zu initiieren und um Informationen zu erhalten in welchem spatio-temporalen Kontext diese Initiierungen erfolgen, wurde eine transgene Mauslinie generiert. Das integrierte Transgen erlaubt die konditionelle Aktivierung von *Arx* in pankreatischen Vorläuferzellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Pankreasentwicklung.

Dazu wurde ein Fusionsprotein aus *Arx* und der mutierten Liganden-Binde-Domäne des ERs (Estrogen Rezeptor) vor ein unabhängig translatierbares GFP (nGFP) kloniert (Hayashi und McMahon, 2002, Johansson et al., 2007). Beide kodierenden DNAs unterliegen der Steuerung des *Pdx1*-Promoters, was die Expression in frühen pankreatischen Vorläuferzellen erlaubt (Abb. 13A). Als intrazellulärer Rezeptor ist ER natürlicherweise im Cytosol lokalisiert. Die Bindung von Estrogen (Estradiol) an ER führt zur Rekrutierung weiterer Cofaktoren und letztendlich zur Migration des ERs in den Zellkern. Die in diesem Transgen verwendete mutierte Form des ERs (ER<sup>TM</sup>) ist spezifisch sensitiv für die Bindung des Estrogenanalogons Tamoxifen jedoch nicht mehr für die endogenen Estrogens (Feil et al., 1996). Durch die Fusion von nukleär aktiven Proteinen mit ER ist es somit möglich deren Wirken durch die Injektion von Tamoxifen zu kontrollieren.

### **2.2.1 Analyse der Transgen-Expression in Pankreata adulter und ungeborener Tiere**

Die detaillierte Klonierung des Transgens ist im Methodenteil einzusehen. Es wurden drei, das Transgen transmittierende, Gründertiere identifiziert. Adulte sowie embryonale Pankreata transgener Tiere wurden immunhistochemisch auf die korrekte Expression des Transgens hin untersucht (Abb. 13). In allen drei Linien rekapitulierte

die Expression von GFP das natürliche Expressionsmuster von Pdx1. Dementsprechend war GFP in allen Beta-Zellen sowie einzelnen Delta-Zellen, jedoch nicht in Alpha- und PP- oder exokrinen Zellen adulter Pankreata zu detektieren (Abb. 13B-D). Ein vergleichbares Expressionsmuster zeigte sich auch bei der Analyse embryonaler Pankreata (Abb. 13F-I).

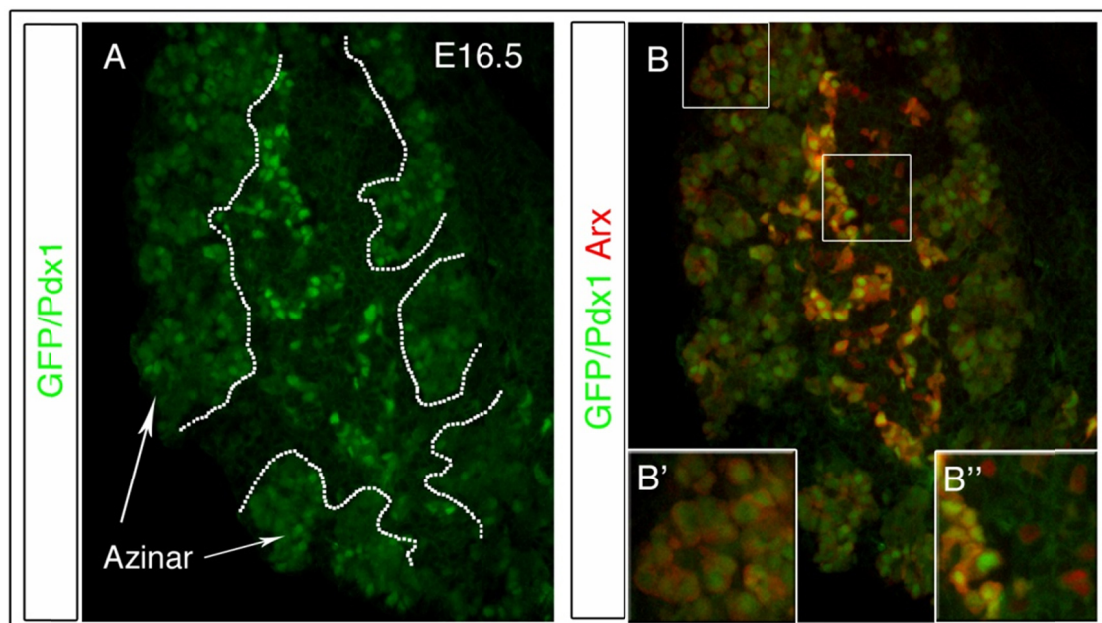


**Abbildung 13: Expressionsanalyse transgener Pankreata.** Repräsentativ für alle drei transgenen Linien. (A) Schematische Darstellung des zur Vorkerninjektion verwendeten Konstrukts. (B) GFP ist in Beta-Zellen und (D) in vereinzelt Delta-Zellen, jedoch nicht in (C) Alpha- (E) PP- Zellen oder exokrinen Zellen adulter Tiere exprimiert, und rekapituliert somit das natürliche Expressionsmuster von Pdx1. Auch in embryonalen Stadien ist GFP in



(F) Beta-Zellen und (H) vereinzelt Delta-Zellen exprimiert. (G, I) Embryonale Alpha- und PP-Zellen exprimieren kein GFP.

In embryonalen Stadien war GFP zudem in Vorläuferzellen der sich entwickelnden azinaren Läppchen detektierbar, welche zu dem Stadium ebenfalls *Pdx1* exprimieren (Abb. 14A). Eine Färbung mit einem anti-Arx Antikörper offenbarte die Präsenz des ArxER Fusionproteins im Cytoplasma GFP-positiver (Abb. 14B') azinärer sowie endokriner Zellen (Abb. 14B''). Darüberhinaus war die Expression von endogenem Arx in GFP-negativen Zellen detektierbar (Abb. 14B'').



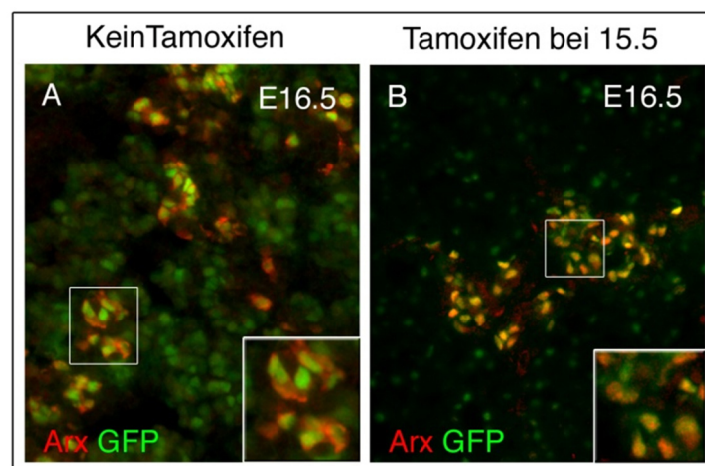
**Abbildung 14: Expression von Arx in transgenen Pankreata.** A und B sind die gleichen Schnitte. (A) Die gestrichelte Linie grenzt azinare Bereiche (außen) vom "Pankreatischen Kern" (innen) ab. In embryonalen E16.5 Pankreata ist das Transgen sowohl in endokrinen Zellen (innen) wie auch in azinaren Zellen exprimiert. (B) Das ArxER Fusionsprotein ist im Cytoplasma GFP-positiver Zellen detektierbar. (B') ArxER im Cytoplasma azinärer Zellen. (B'') ArxER im Cytoplasma endokriner Zellen. Darüberhinaus ist (B''') die Expression von endogenem Arx im Kern GFP-negativer Zellen detektierbar.

### 2.2.2 Test der Tamoxifen-Sensibilität von ArxER



Tamoxifen so wie die metabolisch aktive Form 4-Hydroxytamoxifen haben eine Plasmahalbwertszeit von ungefähr 6-12 Stunden (Robinson et al., 1991). Frühere Studien haben offenbart, dass die Tamoxifen-abhängige nukleäre Translokation des ERs bei einer Injektion von 5µg Tamoxifen/g Körpergewicht maximal 48 Stunden anhält (Gu et al., 2002, Krull et al., 2003).

Zum Test der cytosol-nukleären Translokation von ArxER wurde schwangeren Mäusen Tamoxifen zum Embryonalstadium E15.5 injiziert. 20 Stunden nach der Injektion wurden embryonale Pankreata (E16.5) immunhistochemisch untersucht. Wie erwartet führte die Administration von Tamoxifen zur Lichtung des ArxER-Signals im Cytoplasma und zu einer Anreicherung im Kern GFP-positiver Zellen (Abb. 15).



**Abbildung 15: Nukleäre Translokation des ArxER-Fusionsproteins nach Tamoxifeninjektion.** (A, Einsatz). In nicht-induzierten transgenen Pankreata ist ArxER im Cytoplasma GFP-positiver Zellen lokalisiert. (B, Einsatz) Die Administration von Tamoxifen führt zur Anreicherung von ArxER im Nukleus transgener Zellen.

### 2.2.3 Die Aktivierung von ArxER in Arx-defizienten Pankreata führt zur Bildung Glucagon- sowie PP-exprimierender Zellen.

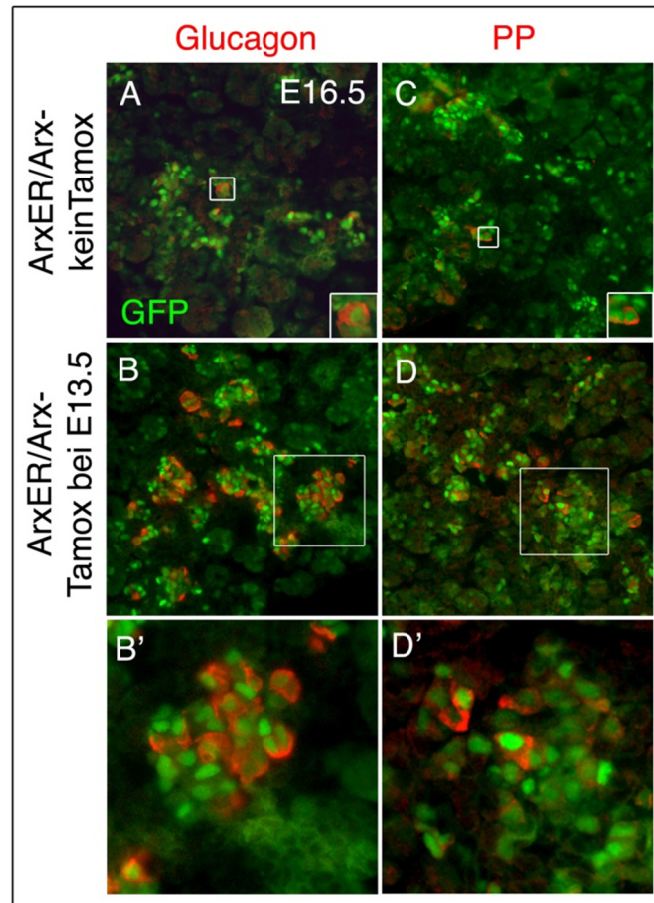
Wie bereits angesprochen ist die Entwicklung Glucagon-produzierender Alpha-Zellen in *Arx*-defizienten Pankreata vollständig verhindert, wohingegen die Anzahl PP-exprimierender Zellen im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtypen nicht signifikant verändert ist (Collombat et al., 2003). Der Verlust der Alpha-Zellen resultiert in einer starken postnatalen Hypoglykämie welche 2 Tage nach der Geburt den Tod der Tiere

zur Folge hat (Collombat et al., 2003). Um einen möglichen Effekt des ArxER Fusionsproteins zu ermitteln wurde dieses in einen *Arx*-defizienten Hintergrund gekreuzt. Dazu wurden transgene Männchen mit *Arx*<sup>+/-</sup> Weibchen verpaart (Abb. 16). Da *Arx* auf dem X-Chromosom lokalisiert ist können aus dieser Verpaarung in der F1 Generation transgen-tragende männliche *Arx*-Nullmutanten hervorgehen (im folgenden *ArxER/Arx*<sup>-</sup>).



**Abbildung 16: Verpaarungsschema zur Einkreuzung von ArxER in einen *Arx*-defizienten Hintergrund.** (M= männlich, W=weiblich).

Zuerst wurde Tamoxifen zum Embryonalstadium E13.5, also mit Beginn der generellen endokrinen Zellentstehung ("*Second transition*") injiziert. Es wurden alle drei transgenen Linien auf einen möglichen Effekt hin untersucht. Bei zwei der drei transgenen Mauslinien resultierte die Aktivierung von ArxER bei E13.5 tatsächlich in der Bildung Glucagon<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> sowie PP<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> Zellen wie bei der drei Tage später folgenden Analyse (E16.5) zu sehen war (Abb. 17B,B',D,D'). Bei einer transgenen Linie hatte die Aktivierung von ArxER keinen sichtbaren Effekt, daher wurde diese nicht weiter analysiert. Als Kontrolle wurden Pankreata von *ArxER/Arx*<sup>-</sup> Embryos analysiert, deren Muttertiere kein Tamoxifen injiziert bekommen hatten. In solchen Pankreata waren vereinzelte Glucagon<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> und PP<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> Zellen zu detektieren, was wahrscheinlich auf eine teilweise "Undichtigkeit" der cytoplasmatischen ER-Rückhaltemaschinerie zurückzuführen ist (Abb. 17A,C, Einsatz). Diese Ergebnisse zeigen, dass *Arx* ausreichend ist um die Differenzierung von Pdx1<sup>+</sup> Vorläuferzellen zu Glucagon- bzw. PP-exprimierenden Zellen zu aktivieren.



**Abbildung 17: Aktivierung von ArxER in *Arx*-defizienten Pankreata.** Repräsentativ für 2 transgene Linien (A, B, Einsätze) In nicht-induzierten E16.5 *ArxER/Arx<sup>-</sup>* Pankreata sind nur vereinzelte  $\text{Glucagon}^+/\text{GFP}^+$  and  $\text{PP}^+/\text{GFP}^+$  Zellen detektierbar was auf eine teilweise "Undichtigkeit" der ER-Rückhaltemaschinerie zurückzuführen ist. Die Aktivierung von ArxER bei E13.5 resultiert in der ausgeprägten Bildung  $\text{Glucagon}^+/\text{GFP}^+$  und  $\text{PP}^+/\text{GFP}^+$  Zellen in *Arx*-defizienten Pankreata (B, B', D, D').

#### 2.2.4 Die Aktivierung von ArxER zu verschiedenen Entwicklungsstadien offenbart unterschiedliche Differenzierungspotenziale $\text{Arx}^+$ Zellen.

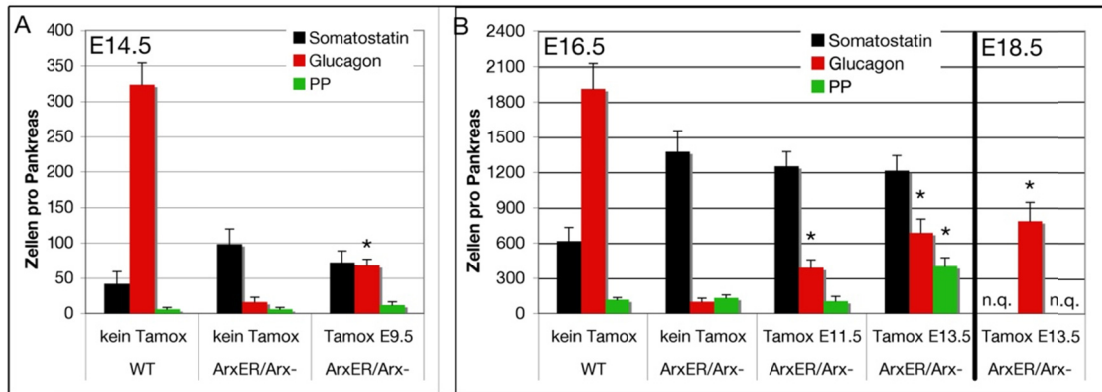
Um weitere Einsichten in das Differenzierungspotential *Arx*-exprimierender Vorläuferzellen zu bekommen und um die Frage zu klären ob solche Zellen zu jedem Entwicklungsstadium des Pankreas' das Potential haben Glucagon und PP-expimierende Zellen zu werden, wurde Tamoxifen zu verschiedenen embryonalen Stadien injiziert und  $\text{Glucagon}^+$  sowie  $\text{PP}^+$  Zellen quantifiziert (Abb. 18). Da die Induktionseffizienz in den zwei funktionierenden Linien vergleichbar war, wurde die

Quantifizierung nur an einer der transgenen Linie durchgeführt. Als Vergleich dienten Pankreata gleichaltriger nicht-induzierter *ArxER/Arx<sup>-</sup>* Tiere sowie Wildtyp Pankreata. Nach der Aktivierung von *ArxER* zum Embryonalstadium 9.5, also einen Tag nach der Ausbildung der dorsalen Pankreasknospe, war bei der Analyse an E14.5 im Vergleich zu nicht induzierten Pankreata eine signifikant erhöhte Anzahl Glucagon-produzierender Zellen detektierbar. Die Menge an Glucagon<sup>+</sup> Zellen entsprach dabei 21% der Glucagon<sup>+</sup> Zellen in gleichaltrigen Wildtyp Pankreata. PP-exprimierende Zellen waren nur vereinzelt detektierbar, in ihrer Anzahl jedoch nicht signifikant über der Anzahl in Kontrolltieren (Abb. 18.A). Die Aktivierung von *ArxER* zum Embryonalstag 11.5 resultierte ebenfalls in einer signifikant erhöhten Anzahl Glucagon<sup>+</sup> Zellen wie bei der Analyse an E16.5 erkennbar war. Ihr Anteil entsprach dabei ungefähr 23% der Glucagon<sup>+</sup> Zellen in E16.5 Wildtyp Pankreata. Vergleichbar zu der Aktivierung von *ArxER* an E9.5 hatte die Aktivierung an E11.5 keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der PP<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zu Kontrollpankcreata. (Abb. 18B). Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass *Arx<sup>+</sup>* Vorläuferzellen die früh in der Pankreasentwicklung auftreten bevorzugt in Richtung einer Alpha-Zell-Identität differenzieren. Die Quantifizierung von E13.5 induzierten Pankreata an Embryonalstag 16.5 offenbarte eine signifikante Erhöhung der Glucagon<sup>+</sup> sowie der PP<sup>+</sup> Populationen im Vergleich zu nicht-induzierten Pankreata. Die Menge an Glucagon<sup>+</sup> Zellen erreichte dabei ungefähr 36% der Alpha-Zell Menge in Wildtyp Pankreata und erschien damit auch größer als die Menge an Glucagon<sup>+</sup> Zellen in E11.5 induzierten/ E16.5 analysierten Pankreata, was sich jedoch aufgrund der geringen Stückzahl (n=3) als nicht signifikant darstellt. Der Zeitraum zwischen Injektion und Analyse hatte keinen Einfluss auf die Menge an Glucagon<sup>+</sup> Zellen wenn E13.5 induzierte Pankreata zu verschiedenen Zeitpunkten (E16.5 bzw. E18.5) analysiert wurden, was wohl auf die zeitlich begrenzte Wirkung des Tamoxifens zurückzuführen ist.

Da vorherige Studien einen umgekehrt proportionalen Zusammenhang von *Arx*-Aktivität und Delta-Zell Menge aufgezeigt haben, wurden zudem Somatostatin<sup>+</sup> Zellen quantifiziert (Collombat et al., 2003, 2007). Deren Anteil erschien in induzierten Pankreata etwas geringer als in nicht-induzierten *ArxER/Arx<sup>-</sup>* Pankreata. Dies war im Vergleich jedoch nicht statistisch signifikant.

Die Quantifizierung der induzierten Zelltypen zeigte auf, dass sich früh in der Pankreasentwicklung auftretende *Arx<sup>+</sup>* Zellen bevorzugt in Richtung einer Alpha-Zell

Identität entwickeln während später auftretende  $Arx^+$  Zellen (nach E13.5) zudem die Kompetenz erlangen zu PP-Zellen zu differenzieren. Weitere Analysen sind notwendig um zu klären auf welche Signale diese unterschiedlichen Kompetenzen zurückzuführen sind.



**Abbildung 18: Quantifizierung hormon-exprimierender Zellen in Wildtypen, induzierten und nicht-induzierten  $ArxER/Arx^-$  Pankreata.** (A, B) Auf der x-Achse sind Genotyp und Zeitpunkt der Tamoxifeninjektion angegeben. Grüne Balken repräsentieren die Anzahl aller  $PP^+$  Zellen, d.h. endogene PP-Zellen ( $GFP^+$ ) und induzierte PP-Zellen ( $GFP^+$ ). (A) Quantifizierung von E14.5 Pankreata. (B) Quantifizierung von E16.5 und E18.5 Pankreata. (n.q.= nicht quantifiziert) Somatostatin<sup>+</sup> und  $PP^+$  Zellen wurden in E18.5 Pankreata nicht quantifiziert. n=3 Pankreata/Genotyp, p-Werte <0,05 im Vergleich zu nicht-induzierten  $ArxER/Arx^-$  wurden als statistisch signifikant angesehen.

### 2.2.5 Charakterisierung der induzierten $Glucagon^+$ und $PP^+$ Zellen

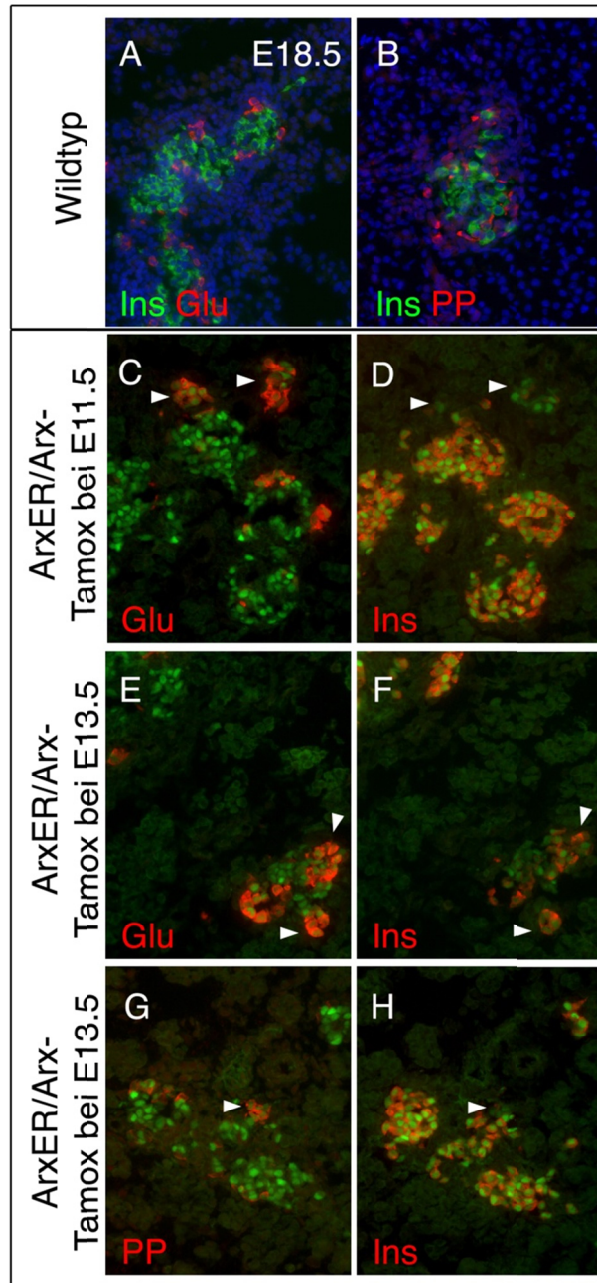
Collombat und Kollegen zeigten dass die ektopische Expression von  $Arx$  in Beta-Zellen zu deren Transdifferenzierung in Alpha- aber auch PP-Zellen führt (Collombat et al., 2007).

Da das  $ArxER$ -Transgen unter der Steuerung des  $Pdx1$ -Promoters läuft ist es nicht nur in Vorläuferzellen sondern auch in entstehenden und reifen Beta-Zellen aktiv. Um auszuschließen, dass induzierte  $Glucagon^+$  oder  $PP^+$  Zellen aus Beta-Zellen hervorgegangen sind wurde die Expression von Insulin und Glucagon- bzw. PP auf angrenzenden Schnitten induzierter Pankreata verglichen. Da induzierte Zellen häufig in "Clustern" auftraten war dies relativ gut möglich. Die Analyse erfolgte jeweils bei E18.5 (Abb. 19).

Wie erwartet exprimierten Wildtyp Alpha- und PP-Zellen kein Insulin (Abb. 19A,B). In *ArxER/Arx<sup>-</sup>* Pankreata waren an E11.5 induzierte Glucagon<sup>+</sup> Zellen größtenteils in Insulin-negativen Bereichen vorhanden, weshalb man annehmen kann, dass diese aus *Pdx1<sup>+</sup>* Vorläuferzellen hervorgegangen sind (Abb. 19C,D). Die Analyse E13.5 induzierter Pankreata jedoch offenbarte, dass die Mehrheit der Glucagon<sup>+</sup> Zellen in Insulin-positiven Bereichen angesiedelt war (Abb. 19E,F). Interessanterweise war die Expression von Insulin in Bereichen induzierter Zellen wesentlich geringer als die in benachbarten Glucagon-negativen Beta-Zellen (Abb. 19F oben). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass ab E13.5, *ArxER* auch in frühen Beta-Zellen aktiviert wird und deren Konvertierung zu Glucagon-exprimierenden Zellen initiiert. Interessanterweise war die Expression von GFP grundsätzlich schwächer in induzierten Zellen im Vergleich zu GFP<sup>+</sup> Zellen welche nicht Glucagon oder PP exprimierten (Abb. 19D,F). Dies lässt sich dadurch erklären, dass Alpha- und PP-Zellen normalerweise kein *Pdx1* exprimieren, und es folglich im Zuge ihrer Differenzierung zu einer verminderten Expression des Transgens und somit von GFP kommt. E13.5 induzierte PP<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> Zellen waren größtenteils in Insulin-negativen Bereichen angesiedelt woraus man schließen kann, dass die Aktivierung von *ArxER* in Insulin<sup>-</sup> Zellen stattgefunden hat und dass diese ab E13.5 vermehrt die Kompetenz erlangen in Richtung PP-Zell Schicksal zu differenzieren.

Um weitere Informationen über die Funktionalität induzierter Zellen zu erhalten wurden E13.5 injizierte Embryonen kurz vor der Geburt (E18.5) per Kaiserschnitt entbunden und Ammenmüttern zur Aufzucht überlassen. Interessanterweise bewirkte die Rekonstitution Glucagon-produzierender Zellen eine Verlängerung der Lebensspanne *ArxER/Arx<sup>-</sup>* Tiere. Bei drei unabhängigen Würfen lebten induzierte Tiere dabei 1, 3 bzw. 7 Tage länger als "normale" *Arx*-Nullmutanten, welche zwei Tage nach der Geburt starben (Collombat et al., 2003). Daraus lässt sich schließen, dass induzierte Zellen nicht nur Glucagon produzieren sondern auch sezernieren.





**Abbildung 19: Charakterisierung Glucagon- und PP-exprimierender Zellen.** (A) Alpha- und (B) PP-Zellen exprimieren kein Insulin in E18.5 Wildtyp Pankreata. (C, D) E11.5 induzierte Glucagon<sup>+</sup> Zellen sind in Insulin-negativen Bereichen angesiedelt (Vergleiche Pfeilspitzen in C und D). (E, F, Pfeilspitzen) E13.5 induzierte Glucagon-Zellen sind größtenteils in Insulin-positiven Bereichen angesiedelt. Die Expression von Insulin erscheint dabei schwächer in Glucagon<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> Bereichen als in Glucagon<sup>-</sup>/GFP<sup>+</sup> Bereichen (F, oben). (G, H, Pfeilspitzen) E13.5 induzierte PP<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> Zellen sind größtenteils in Insulin-negativen Bereichen lokalisiert. Beachtenwerterweise erscheint die Expression von GFP schwächer in Glucagon<sup>+</sup> oder PP<sup>+</sup> Bereichen im Vergleich zu der GFP-Expression in angrenzenden Beta-Zellen. C und D, E und F, G und H sind jeweils angrenzende Schnitte (5µm).

## 2.3 Herstellung einer konditionalen *Pax4*-Knockout Linie.

Der Transkriptionsfaktor Pax4 spielt eine entscheidende Rolle in der Differenzierung endokriner Zellen und ist von Beginn der Pankreasentwicklung zu detektieren. Zum Zeitpunkt der endokrinen Zellentstehung (E15.5) erreicht die Anzahl Pax4<sup>+</sup> Zellen einen Höhepunkt. Mit beginnender Hormonexpression wird die Expression von Pax4 herunter reguliert (Wang et al., 2004). Eine niedrige Expression von Pax4 ist jedoch in Beta-Zellen im adulten Tier zu detektieren (Collombat et al., 2009). "Lineage-tracing" Studien haben offenbart, dass Pax4<sup>+</sup> Zellen in alle vier endokrinen Zelltypen differenzieren können (Greenwood et al., 2007). Zahlreiche Studien haben jedoch eine vorwiegende Rolle von *Pax4* in der Beta- und Delta-Zell Entstehung offenbart: (1) In *Pax4*-defizienten Pankreata entwickeln sich nur sehr wenige Beta-Zellen und gar keine Delta-Zellen, wohingegen eine Population von Glucagon<sup>+</sup>/Ghrelin<sup>+</sup> doppelpositiven Zellen vermehrt auftritt (Sosa-Pineda et al., 1997, Wang et al., 2007). (2) Zudem wurde gezeigt, dass die ektopische Expression von Pax4 in Alpha-Zellen zu deren Transdifferenzierung in insulin-produzierende Beta-Zellen führt (Collombat et al., 2009).

Die Analyse konventioneller Nullmutanten lässt immer nur einen Schluss über die Genfunktion in der frühen Entwicklung zu. Um Einsichten in die potenzielle Funktion von *Pax4* in adulten Beta-Zellen zu gewinnen wurden konditionale *Pax4* Knockout-Mäuse durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES) erzeugt.

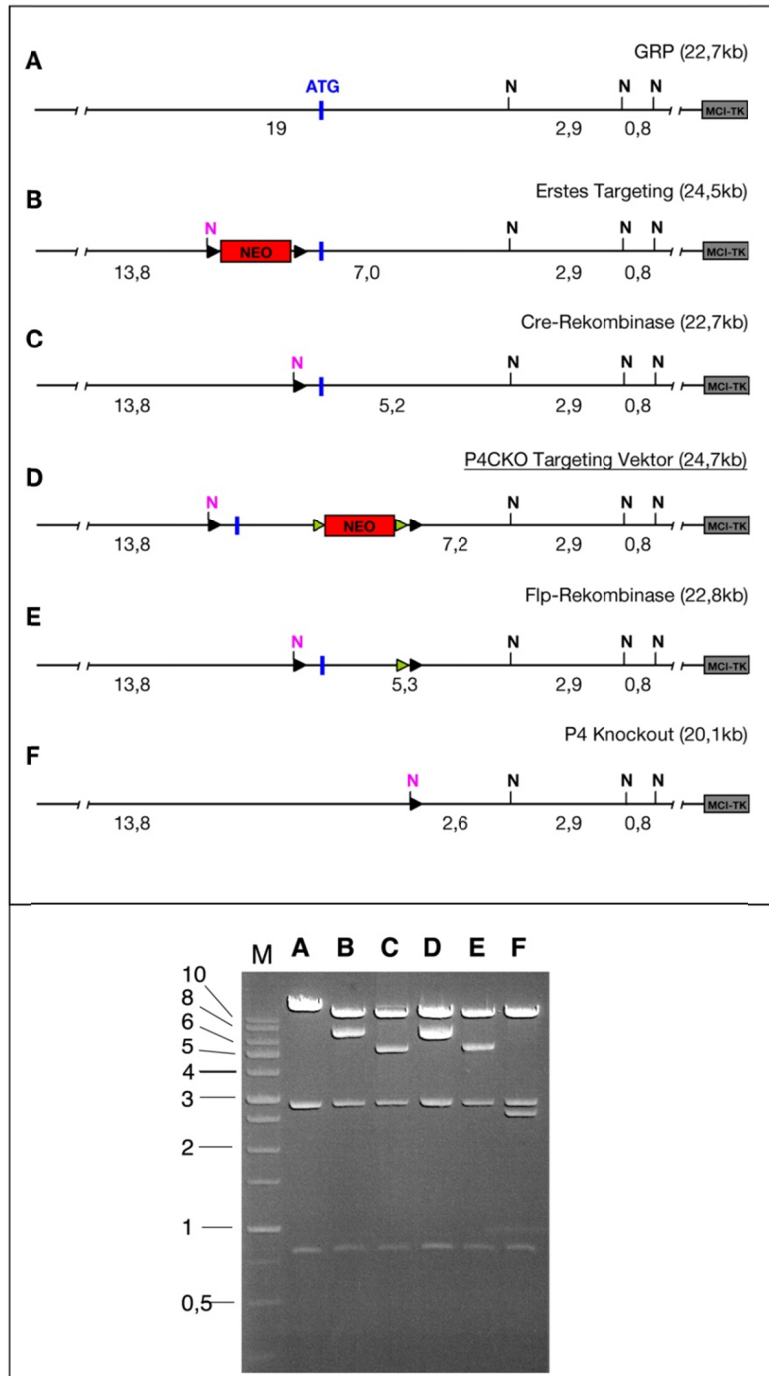
### 2.3.1 Herstellung des konditionalen *Pax4*-Konstruktes

Zur Herstellung des *Pax4* "Targeting"-Konstrukts wurde das Recombineering-Verfahren angewendet (Baudin et al., 1993, Zhang et al., 1998, Muyrers et al., 2001, Copeland et al., 2001, Liu et al., 2003).

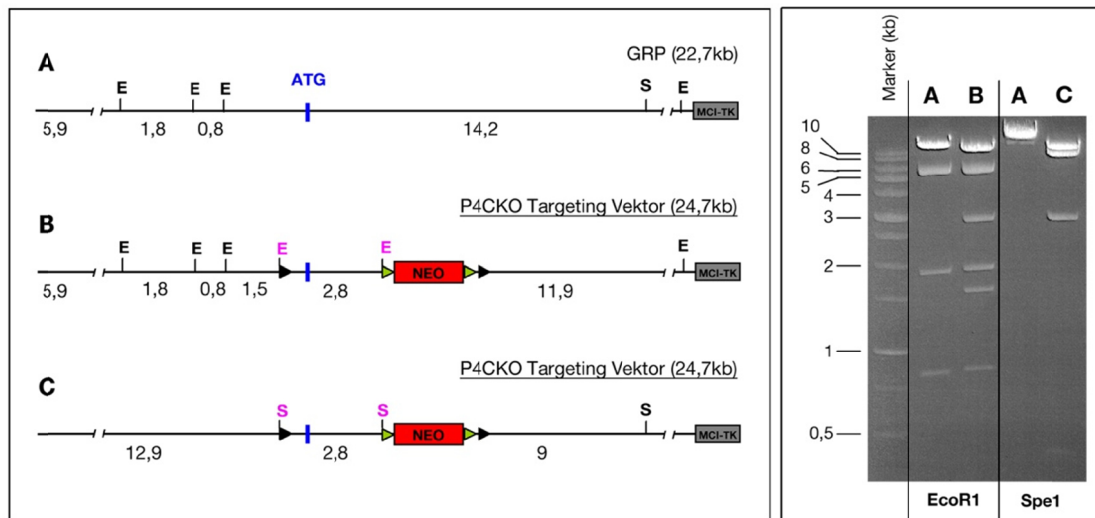
Die Herstellung erfolgte in vier Rekombinationsschritten (Abb. 20) Zuerst wurde der *Pax4*-Lokus von einem BAC ("*Bacterial artificial chromosome*") in den eigentlichen "Targeting" -Vektor rekombiniert. Diesen Schritt nennt man "gap repair" und das dabei entstehende, den *Pax4*-Lokus enthaltende Plasmid "gap repaired plasmid" (im folgenden GRP) (Abb. 20A). Danach erfolgte die Integration einer LoxP-flankierten *Neo*-Kassette (Abb. 20B). Durch die Elektroporation dieses Plasmids in Cre-



exprimierende Zellen wurde in einem weiteren Schritt die *Neo*-Kassette entfernt. Eine Einzelne LoxP-Sequenz bleibt dabei zurück (Abb. 20C). Im nächsten Schritt erfolgte die Integration einer weiteren *Neo*-Kassette welche von zwei Frt-Sequenzen und einer einzelnen LoxP-Sequenz flankiert ist (Abb. 20D). Das Konstrukt in D repräsentiert das fertige "*Targeting*"-Konstrukt, welches zur späteren Rekombination in ES-Zellen eingesetzt wurde. Mittels Cre- und Flp-exprimierender *E. coli*-Stämme wurde zudem die Funktionalität der integrierten LoxP- bzw. Frt-Sequenzen überprüft (Abb. 20E,F). Mit der Integration der LoxP-Sequenzen wurden zusätzlich Restriktionsschnittstellen eingefügt, um die einzelnen Integrationen verfolgen zu können. Das fertige *Pax4*-"*Targeting*"-Konstrukt wurde zudem mittels EcoR1- und SpeI-Verdau überprüft (Abb. 21).



**Abbildung 20: Darstellung der einzelnen Rekombinationsschritte zur Herstellung des Pax4-Targeting-Konstrukts.** (A-D) Dargestellt sind die einzelnen Zwischenschritte zur Konstruktion des fertigen Pax4-Targeting-Konstrukts. (E) Pax4-Targeting-Konstrukt in Gegenwart der Flp-Rekombinase. (F) Pax4-Targeting-Konstrukt in Gegenwart der Cre-Rekombinase. Die bei einem NdeI-Verdau entstehen Fragmentgrößen sind jeweils angegeben. (M=Marker (kb), ATG=Startcodon, N=NdeI, magenta=zusätzlich eingefügte Schnittstelle, grünes Dreieck=Frt-Sequenz, schwarzes Dreieck=LoxP-Sequenz). Gelbild der entsprechenden Schritte nach NdeI-Restriktionsverdau.

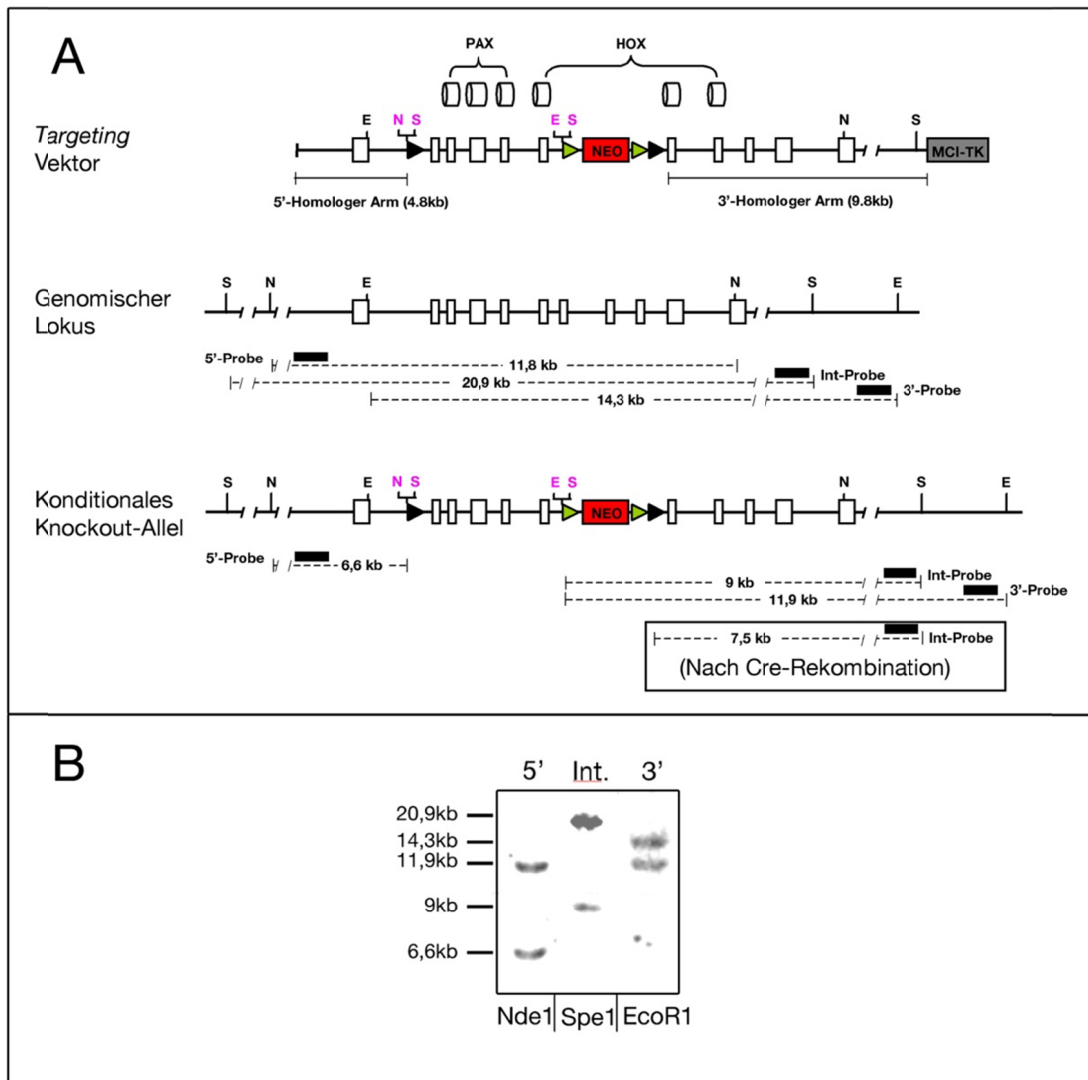


**Abbildung 21: EcoR1 und Spe1-Restriktionsverdau des fertigen *Pax4*-Targeting-Konstrukts.** (A-C) Die bei einem EcoR1 und Spe1-Verdau entstehenden Fragmentgrößen vom GRP (A) und dem fertigen *Pax4*-Targeting-Konstrukt sind dargestellt. (B, C) Gelbild der entsprechenden Restriktionsverdau. (ATG=Startcodon, E=EcoR1, S=Spe1, magenta zusätzlich eingefügte Schnittstellen, grünes Dreieck=Frt-Sequenz, schwarzes Dreieck=LoxP-Sequenz).

Die Integration der LoxP-Sequenzen erfolgte 543b aufwärts und 2.154b abwärts des *Pax4*-Startcodons. Dadurch wurden die komplette "Paired"-Domäne sowie ein Teil der Homöobox inklusive des Start-Codons flankiert (Exone 2-6), was in der Gegenwart der Cre-Rekombinase zur Entfernung dieses Bereiches und damit zum Funktionsverlust des Gens führt (Abb.22). Die detaillierte Konstruktion des *Pax4*-Targeting-Vektors ist im Methodenteil einzusehen.

### 2.3.2 Analyse mutanter ES-Zell Klone

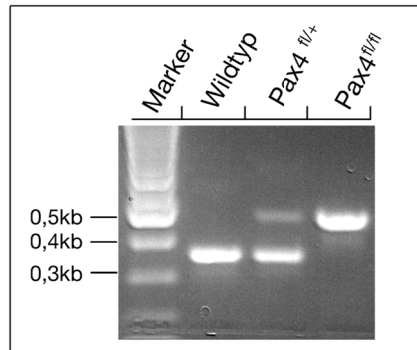
Von 200 stabil transfizierten ES-Zell Klonen, die nach der Antibiotika-Selektion erhalten wurden, erwies sich einer als homolog Rekombinant wie die anschließende Southern Blot-Analyse ergab. Die Korrekte Insertion wurde mit einer externen 5'-sowie einer 3'-Sonde überprüft. Um die Bildung von Konkatemeren auszuschließen wurde zudem eine interne Sonde verwendet (Abb. 22).



**Abbildung 22: Southern Blot-Analyse mutanter ES-Zell Klone.** (A) Schematische Darstellung des linearisierten *Pax4*-Targeting-Konstrukts vor und nach homologer Rekombination in den genomischen *Pax4*-Lokus. Exons 3-5 kodieren für die "Paired"-Domäne (PAX), Exons 6-8 für die Homöodomäne (HOX). Die schwarzen Kästchen repräsentieren die relativen Bindestellen der drei verwendeten Sonden. Die im Southern Blot erwarteten Fragmentgrößen von Wildtyp und konditionalem Allel sind angegeben (E=EcoR1, N=Nde1, S=Spe1, magenta=zusätzlich eingefügte Schnittstellen, MCI-TK=*Herpes simplex virus thymidin kinase gen.*) (B) Ergebnis der Southern Blot Analyse.

Männliche Chimären die aus diesem ES-Zell Klon hervorgegangen sind wurden mit NMRI-Weibchen verpaart, mit erfolgreicher Keimbahn-Transmission. *Pax4*<sup>fl/+</sup> Heterozygote Tiere aus der F1 Generation wurden untereinander verpaart. Die dabei

in der F2-Generation entstandenen *Pax4<sup>fl/fl</sup>* homozygoten Tiere zeigten keine morphologischen Defekte, keinen erhöhten Blutzucker, überlebten und waren fertil. Zur Genotypisierung wurden Primer gegen Bereiche aufwärts und abwärts der ersten LoxP-Sequenz eingesetzt (Abb. 23).

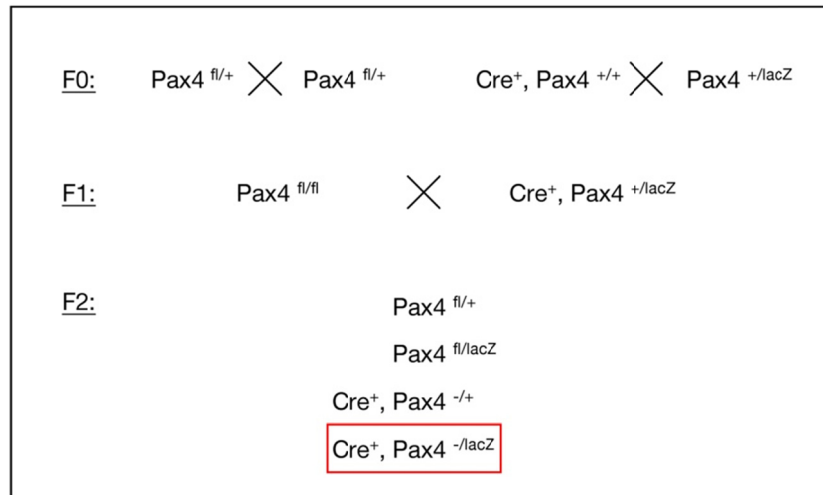


**Abbildung 23: Genotypisierung konditionaler *Pax4*-Mausmutanten mittels PCR.** Die verwendeten Primer flankieren die erste LoxP-Sequenz und erzeugen eine Bande bei 358b (Wildtyp Allel) und eine Bande bei 466b (Konditionales Allel). Primersequenzen sind im Methodenteil einzusehen.

### 2.3.3 Verpaarung zur Erzeugung von *Pax4*-Nullmutanten

Zur ubiquitären Deletion von *Pax4* wurde zunächst eine CMV-Cre Linie eingesetzt. Dabei steuert der CMV-Promoter die Expression der Cre-Rekombinase in allen Zellen des Organismus. Erwartungsgemäß sollten dabei entstehende Nullmutanten den gleichen Phänotyp aufweisen wie konventionelle *Pax4*-Knockout Mutanten (Sosa-Pineda et al., 1997).

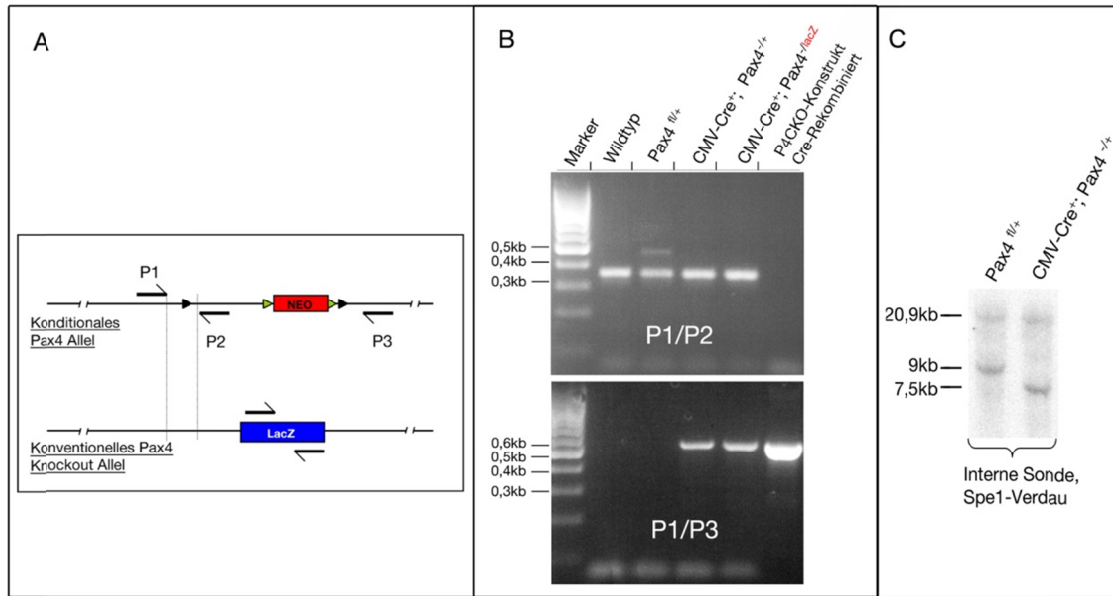
Zur Steigerung der Rekombinationseffizienz wurde zuvor noch ein konventionelles *Pax4*-Knockout Allel eingekreuzt (Exons 2-4 ersetzt durch ein *lacZ*-Gen, Sosa-Pineda et al., 1997). Somit muss pro Zelle de facto nur ein Rekombinationsvorgang ablaufen. Dazu wurden zuerst CMV-Cre Mäuse mit heterozygoten *Pax4<sup>+ / lacZ</sup>* Mäusen verpaart. Aus dieser Verpaarung entstandene *Cre<sup>+</sup>, Pax4<sup>+ / lacZ</sup>* Tiere wurden mit *Pax4<sup>fl/fl</sup>* Tieren verpaart. Aus dieser Verpaarung können dann unter anderem *Pax4*-Nullmutanten hervorgehen (Abb. 24)



**Abbildung 24: Verpaarungsschema zur Generierung von Pax4-Nullmutanten.** Zusätzlich zu dem konditionalen *Pax4*-Allel (fl) wurde ein konventionelles *Pax4*-knockout Allel (*lacZ*) zur Steigerung der Cre-Rekombinationseffizienz eingekreuzt. In der F2-Generation können *Pax4*-Nullmutanten auftreten (Rotes Rechteck). Rekombiniertes konditionales *Pax4*-Allel (-).

Zur Identifizierung des konventionellen *Pax4*-knockout Allels wurden Primer gegen *LacZ* eingesetzt. Die Detektion des nicht-rekombinierten konditionalen *Pax4* Allels erfolgte mittels Primer (P1/P2) gegen Bereiche vor und hinter der ersten LoxP-Sequenz (Abb. 25A). Zur Detektion des rekombinierten konditionalen *Pax4* Allels wurden Primer (P1/P3) gegen Bereiche vor der ersten und hinter der zweiten LoxP-Sequenz eingesetzt (Abb. 25A). Zudem wurden Primer zur Detektion von *Cre* verwendet.

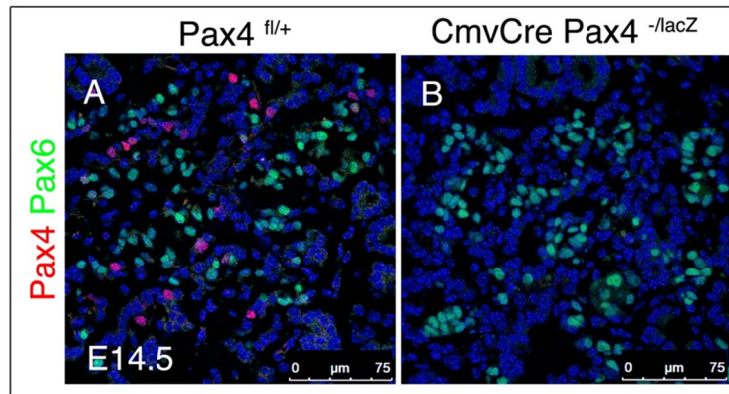
Zur Bestätigung der Allel-Rekombination *in vivo* wurde neben der Verwendung der Primer P1/P3, auch einmalig genomische DNA neugeborener Tiere mittels Southern Blot Analyse untersucht. Durch die Cre-vermittelte Rekombination verkleinert sich die nachweisbare Bande von 9kb auf 7,5kb (Abb. 25C, siehe auch Abb. 22A).



**Abbildung 25: Genotypisierung von CMV-Cre Pax4CKO Tieren.** (A) Schematische Darstellung der Binderegionen von P1, P2 und P3 auf dem konditionalen sowie konventionellen *Pax4* Knockout Allel. (B) Gelbild der Amplifikate nach Genotypisierung mit P1/P2 bzw. P1/P3. Zum Nachweis der verschiedenen *Pax4*-Allele wurden grundsätzlich Primer gegen *lacZ* (konventionelles *Pax4*-Knockout Allel) sowie *Cre* eingesetzt. P1/P2 erzeugen ein 358b Amplifikat (Wildtyp-Allel oder "Pseudo"-Wildtyp Bande vom konventionellen *Pax4*-Knockout Allel) und eine 466b-Amplifikat (konditionales *Pax4*-Allel, nicht rekombiniert). P1/P3 erzeugen nur im Falle eines rekombinierten *Pax4*-Allels ein 515b Amplifikat. Primersequenzen sind im Methodenteil einzusehen. (C) Ergebnis der Southern Blot Analyse zur Bestätigung der Allel-Rekombination: Genomische DNA wurde aus P0 Schwanzbiopsien gewonnen und mit *SpeI* verdaut. Nachweis der Allel-Rekombination mittels Interner Sonde (vergleiche Schema in Abb. 22A).

### 2.3.4 Analyse von CMV-Cre Pax4CKO Tieren.

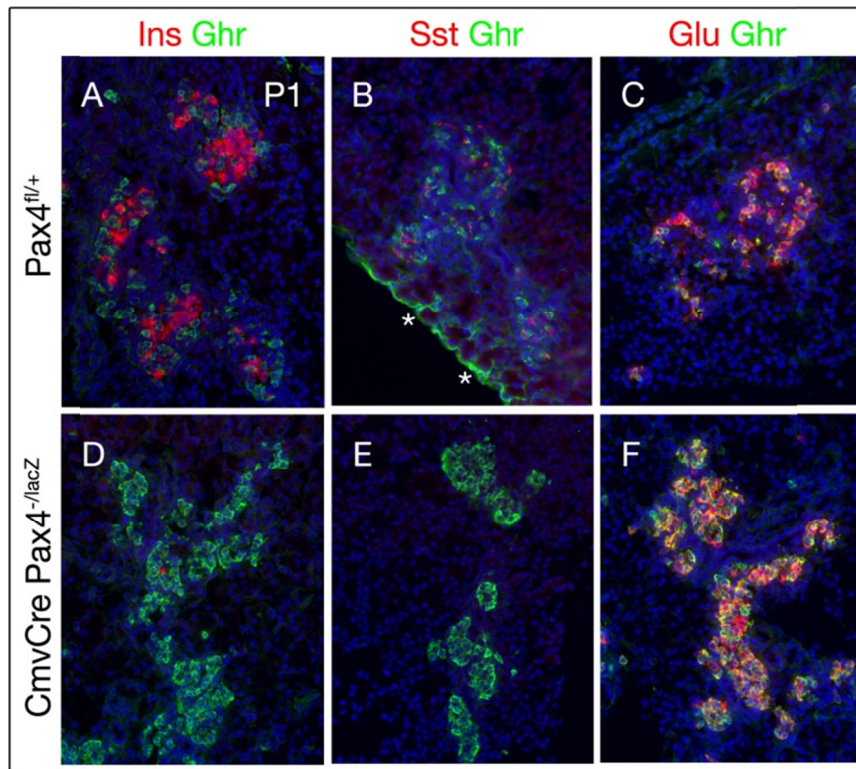
Zunächst wurden E14.5 Pankreata von *CMV-Cre Pax4<sup>-lacZ</sup>* Tieren auf die Expression von Pax4 hin untersucht. In *Pax4<sup>fl/+</sup>* Kontrollpankreatata waren Pax4<sup>+</sup> Zellen im pankreatischen Kern zahlreich detektierbar. Keine Pax4-positiven Zellen waren in E14.5 Pankreata von *CMV-Cre Pax4<sup>-lacZ</sup>* Tieren zu detektieren (Abb. 26).



**Abbildung 26: Expression von Pax4 und Pax6 in E14.5 Pankreata von Kontrolltieren und konditionalen *Pax4*-Nullmutanten.** (A) Pax6- sowie Pax4-exprimierende Zellen sind zahlreich detektierbar in E14.5 Pankreata von *Pax4*<sup>fl/+</sup> Kontrolltieren. (B) Keine Pax4-exprimierenden Zellen sind in Pankreata von *CMV-Cre Pax4*<sup>-/lacZ</sup> Tieren detektierbar. Gegenfärbung mit DAPI.

Neugeborene *CMV-Cre Pax4*<sup>-/lacZ</sup> Mutanten erschienen im Gegensatz zu gleichaltrigen Kontrolltieren schwächlich und starben spätestens drei Tage nach der Geburt. Bereits einen Tag nach der Geburt (P1) wiesen mutante Tiere erheblich erhöhte Glukosewerte im Blut auf (304±68 mg/dl (n=4) im Vergleich zu 76±15 mg/dl (n=8) in Kontrolltieren). Die anschließende Expressionsanalyse endokriner Hormone in Pankreata von *CMV-Cre Pax4*<sup>-/lacZ</sup> Mutanten offenbarte eine drastisch reduzierte Population an Beta-Zellen sowie das Fehlen von Delta-Zellen. Darüberhinaus war eine deutlich vergrößerte Population an Ghrelin<sup>+</sup> und/oder Glucagon<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zu *Pax4*<sup>fl/+</sup> Kontrollpankreatata detektierbar (Abb. 27). Somit wiesen *CMV-Cre Pax4*<sup>-/lacZ</sup> Mutanten exakt den gleichen pankreatischen Phänotyp auf wie konventionelle *Pax4*-Knockout Mäuse (Sosa-Pineda et al., 1997, Wang et al., 2004). Diese Ergebnisse zeigen, dass die CMV-Cre-vermittelte Rekombination des konditionalen *Pax4*-Allels funktioniert und in der Folge kein Genprodukt gebildet wird.





**Abbildung 27: Hormonexpression in P1 Pankreata neugeborener CMV-Cre  $Pax4^{-lacZ}$  Mutanten.** Zahlreiche (A) Beta-Zellen, (B) Delta-Zellen (\*=unspezifische Färbung) (C) Alpha-Zellen sowie (A-C) Ghrelin<sup>+</sup> Zellen sind in  $Pax4^{fl/+}$  Kontrollpankreakta zu detektieren. (D) Die Menge an Insulin-produzierenden Beta-Zellen ist drastisch reduziert und (E) keine Delta-Zellen sind in Pankreata von  $CMV-Cre Pax4^{-lacZ}$  Mutanten detektierbar. (F) Eine hyperplastische Population Glucagon<sup>+</sup>Ghrelin<sup>+</sup> Zellen ist sichtbar. Gegenfärbung mit DAPI. Originale Vergrößerung 200x.

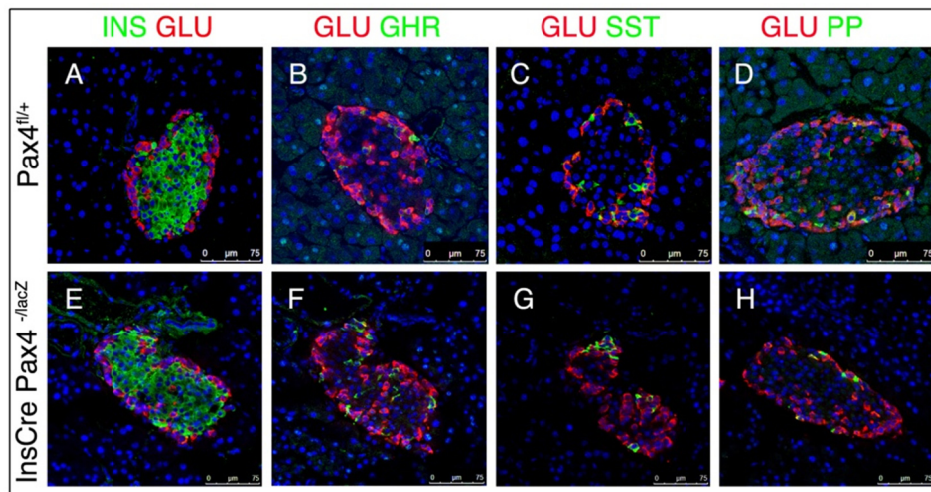
### 2.3.5 Konditionelle Inaktivierung von $Pax4$ in Beta-Zellen.

Zahlreiche Studien haben aufgezeigt, dass die Expression von  $Pax4$  mit beginnender Hormonexpression runterreguliert wird (Sosa-Pineda et al., 1997, Wang et al., 2004, diese Arbeit). Niedrige  $Pax4$ -Expressionslevel sind aber in Beta-Zellen adulter Tiere detektiert worden (Collombat et al., 2009). Um die Frage nach einer putativen Funktion von  $Pax4$  in Beta-Zellen zu klären, wurde im folgenden eine *Insulin-Cre* Linie zur Beta-Zell spezifischen Inaktivierung von  $Pax4$  verwendet (Herrera et al., 2000).

Neugeborene  $InsCre Pax4^{-lacZ}$  Tiere zeigten keinen offensichtlichen Phänotyp, überlebten und waren fertil. Sechs Wochen alte Tiere (P42) zeigten keine Anzeichen

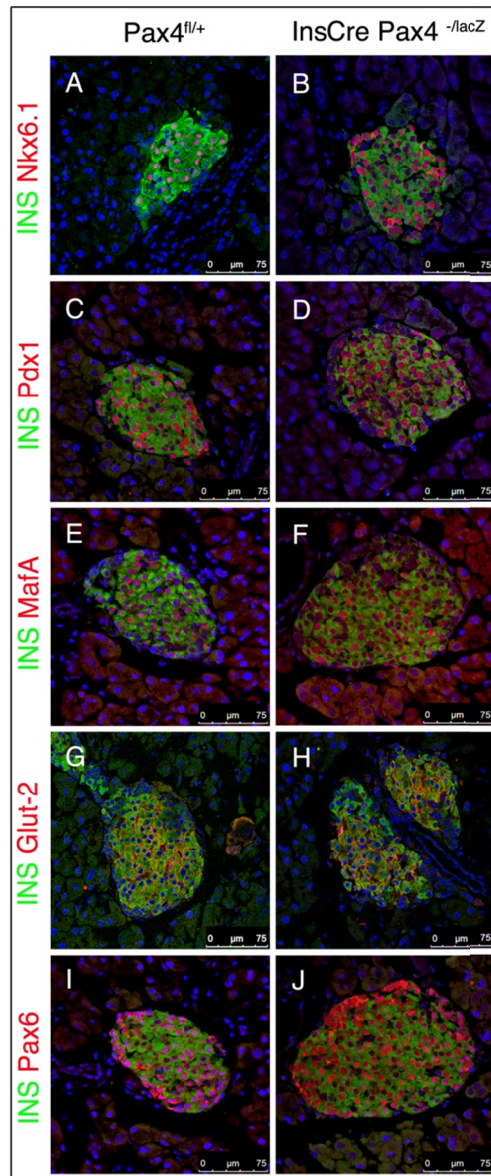
eines Diabetes mellitus oder anderweitige offensichtliche Beeinträchtigungen. Die Blutglukosewerte in adulten *InsCre Pax4<sup>-lacZ</sup>* Tieren ( $145 \pm 15$  mg/dl, n=3) waren im Vergleich zu den in *Pax4<sup>fl/+</sup>* Kontrolltieren gemessenen Werten ( $156 \pm 13$  mg/dl, n=3) nicht signifikant verändert.

Die immunhistochemische Untersuchung adulter Pankreata (P42) auf die Expression endokriner Hormone hin, erbrachte keine offensichtlichen Veränderungen gegenüber gleichaltrigen *Pax4<sup>fl/+</sup>* Tieren. Alle fünf endokrinen Zellsubtypen waren weder in ihrer Menge noch in ihrer subzellularen Lokalisation verändert (Abb. 28).



**Abbildung 28: Expression endokriner Hormone nach *InsCre*-vermittelter *Pax4*-Inaktivierung.** (A-D) Immunfluoreszenzdetektion von Insulin, Glucagon, Ghrelin, Somatostatin und PP in Pankreata adulter *Pax4<sup>fl/+</sup>* Kontrolltiere. (E-H) Es sind keine Veränderungen der endokrinen Hormonkomposition in Inseln von *InsCre Pax4<sup>-lacZ</sup>* Tieren zu detektieren. Gegenfärbung mit DAPI.

In den Insulin-produzierenden Beta-Zellen konnten Beta-Zell spezifische Markergene inklusive *Pdx1*, *MafA*, *Nkx6.1*, *Glut-2* sowie der endokrine Zellmarker *Pax6* immunhistochemisch detektiert werden (Abb. 29). Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass trotz der essenziellen Funktion in der frühen Beta-Zelldifferenzierung, *Pax4* mit beginnender Insulin-Expression eine untergeordnete Rolle in der Aufrechterhaltung normaler Beta-Zell Funktionen spielt.



**Abbildung 29: Expression von Beta-Zell spezifischen Markern in P42 Pankreata von *InsCre Pax4<sup>-/lacZ</sup>* Mutanten.** (A, C, E, G, I) Expression Beta-Zell spezifischer Marker in Kontrollpankreatata. Die Beta-Zell spezifische Inaktivierung von *Pax4* hat keinen Einfluss auf die Expression von (B) *Nkx6.1*, (D) *Pdx1*, (F) *MafA*, (H) *Glut-2* oder (J) *Pax6*. Gegenfärbung mit DAPI.

### 3. Diskussion

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Konsequenzen des Funktionsverlustes von *Pax6*, *Arx* und *Nkx2.2*, sowie die des kombinierten Funktionsverlusts von *Nkx2.2* und *Arx*, untersucht.

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass der Verlust von *Nkx2.2* oder *Pax6* in einer Reduktion von Beta- und Alpha-Zellen und der Entstehung zahlreicher Ghrelin<sup>+</sup> Zellen resultiert (Prado et al., 2004, Wang et al., 2004). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Mehrheit dieser Ghrelin<sup>+</sup> Zellen den Alpha-Zellmarker *Arx* exprimieren. Weitere Expressionsanalysen von Alpha- oder Beta-Zell spezifischen Markergenen lassen jedoch den Schluss zu, dass diese mutanten Ghrelin<sup>+</sup>/*Arx*<sup>+</sup> Populationen zum Teil dem Beta-Zellstammbaum zugeordnet werden können. Der kombinierte Verlust von *Nkx2.2* und *Arx* resultiert ebenfalls in der Bildung zahlreicher Ghrelin<sup>+</sup> Zellen zu Lasten der Alpha- und Beta-Zellmengen, wobei die Mehrheit der Ghrelin<sup>+</sup> Zellen wiederum Beta-Zell-assoziierte Markergene exprimiert. Darüber hinaus ist in diesen Zellen aber auch das Hormon Somatostatin detektierbar, was andeutet, dass der zusätzliche Verlust von *Arx* die ektopische Expression von *Somatostatin* erlaubt.

#### 3.1.1 Maus-Mutanten mit reduzierter Beta-Zell Population entwickeln mehr Ghrelin<sup>+</sup> Zellen.

Frühere Studien haben gezeigt, dass der Funktionsverlust von *Pax4*, *Nkx2.2* sowie *Pax6* in einer deutlichen Zunahme Ghrelin-exprimierender Zellen bei gleichzeitiger Reduktion der Beta-Zellzahlen resultiert (Prado et al., 2004, Heller et al., 2004, Wang et al., 2008). Beachtenswerter Weise ist aber in jedem der mutanten Genotypen die Expression der anderen beiden Gene unverändert, womit es schwierig ist einem der Kandidaten *Ghrelin*-suppressiven Eigenschaften zuzuordnen. Zumindest für *Pax4* wurden solche *Ghrelin*-suppressiven Eigenschaften in vitro demonstriert, wohingegen *Nkx2.2* *Ghrelin*-aktivierende Funktionen in Zellkulturexperimenten zeigte (Wang et al., 2008, Hill et al., 2010). Die Tatsache, dass die Expression von *Pax4* jedoch in *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> und *Pax6*<sup>-/-</sup> defizienten Pankreata detektierbar ist, zeigt, dass die Unterdrückung von *Ghrelin* komplexerer Natur ist. Interessanterweise sind in allen drei mutanten Genotypen die Transkriptmengen von *Arx* erhöht und *Arx* ist häufig mit

Ghrelin-exprimierenden Zellen assoziiert (Wang et al., 2008, Chao et al., 2007, diese Arbeit). Die Möglichkeit, dass Arx ein putativer *Ghrelin*-Aktivator ist erscheint jedoch unwahrscheinlich angesichts der vergrößerten Ghrelin<sup>+</sup> Zellpopulation in *Nkx2.2*<sup>-/-</sup>*Arx*<sup>-</sup> Doppelmutanten.

### 3.1.2 Arx co-lokalisiert mit Beta-Zell spezifischen Markern in *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> und *Pax6*<sup>-/-</sup> Pankreata.

Um die mutanten Ghrelin<sup>+</sup> Population zu charakterisieren wurde die Co-Expression von Beta- und Alpha-Zell assoziierten Markergenen in Wildtyp, *Pax6*<sup>-/-</sup> und *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> Pankreata untersucht. Der Großteil der *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> Ghrelin<sup>+</sup> Zellen exprimiert Arx, iAPP, PC1/3 und Pdx1 und unterscheidet sich damit signifikant von der Epsilon-Zellpopulation (Ghrelin<sup>+</sup>, Arx<sup>-</sup>, Pdx1<sup>-</sup>, PC1/3<sup>-</sup>) in Wildtypen, womit eine spezifische Vermehrung von Epsilon-Zellen aufgrund von *Nkx2.2*-Defizienz, ausgeschlossen werden kann. Wie bereits früher angenommen, verstärken die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse die Annahme, dass Ghrelin<sup>+</sup> Zellen in *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> Mäusen determinierte Beta-Zellen repräsentieren, die nicht korrekt differenzieren (Sussel et al., 1998, Sander et al., 2000).

Eine Studie von Wang und Kollegen offenbarte, dass die synergistische Aktivität von *Nkx2.2* und *Pax4* in der frühen Beta-Zelletablierung notwendig ist (Wang et al., 2004). In *Pax4*<sup>-/-</sup> Pankreata kommt es ebenfalls zur vermehrten Bildung Ghrelin<sup>+</sup> Zellen auf Kosten der Beta-Zellpopulation. Interessanterweise teilen die Ghrelin<sup>+</sup> Zellen in *Pax4*<sup>-/-</sup> Pankreata einen Großteil der Charakteristika mit den Ghrelin<sup>+</sup> Zellen in *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> Tieren, inklusive der Expression von Arx, iAPP, Pdx1<sup>niedrig</sup> und PC1/3 (Wang et al., 2008, Daten nicht aufgeführt). Im Gegensatz zu den *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> Ghrelin<sup>+</sup> Zellen exprimieren jedoch die Ghrelin<sup>+</sup> Zellen in *Pax4*<sup>-/-</sup> Pankreata zusätzlich das Hormon Glucagon. Deshalb ist es vorstellbar, dass solche Zellen ebenfalls determinierte Beta-Zellen repräsentieren, aber die kombinierte Präsenz von *Nkx2.2* und Arx deren Reifung zu einem Glucagon-exprimierenden Stadium erlaubt. Wang et al. zeigten zudem, dass *Nkx2.2* und *Pax4* für die frühe Beta-Zell Entwicklung durch die Aktivierung entscheidender Beta-Zellfaktoren, inklusive Hb9, *Nkx6.1* und hohen Expressionsleveln an Pdx1 (Pdx1<sup>hoch</sup>), essenziell sind (Wang et al., 2004). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass *Pax4* die Expression von *Arx* unterdrückt (Collombat et al., 2003, 2005). Zusammen mit den in dieser Arbeit gewonnenen Daten, lassen diese

Erkenntnisse den Schluss zu, dass die synergistische Aktivität von *Nkx2.2* und *Pax4* notwendig ist, um die Expression von *Arx* in der frühen Beta-Zellentwicklung zu unterdrücken. Eine strikte Kontrolle der *Arx*-Produktion in Beta-Zellen erscheint essenziell, da *Arx* ausreichend ist um reife Beta-Zellen in Alpha- und PP-ähnliche Zellen zu transdifferenzieren (Collombat et al., 2007). Die Tatsache, dass *Nkx2.2* auch in Alpha-Zellen exprimiert ist und die Alpha-Zell Entwicklung in *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> Pankreata beeinträchtigt ist (Sussel et al., 1998), führt zu der Annahme, dass die Zellpfadbestimmenden Eigenschaften von beiden Faktoren *Arx* und *Pax4* der zusätzlichen Aktivität von *Nkx2.2* bedürfen um wirksam zu werden.

Wie in dieser Arbeit gezeigt resultiert der Funktionsverlust von *Pax6* ebenfalls in der Bildung zahlreicher *Ghrelin*<sup>+</sup>/*Arx*<sup>+</sup> Zellen. *Pax6* wird eine allgemeinere Rolle in der Aufrechterhaltung der Beta-Zellidentität zugesagt. Die Präsenz einiger, anscheinend normaler, Beta-Zellen in *Pax6*-defizienten Pankreata führte sogar zu der Annahme, dass ein alternativer, *Pax6*-unabhängiger Pfad zur Ausbildung reifer Beta-Zellen führt (Nishimura et al., 2008).

Alternativ ist es vorstellbar, dass sich Beta-Zellen in *Pax6*<sup>-/-</sup> Pankreata normal entwickeln, jedoch ab einem gewissen Differenzierungsstadium in *Ghrelin*<sup>+</sup> Zellen umwandeln. Die Präsenz von *Insulin*<sup>+</sup>/*Ghrelin*<sup>+</sup> co-positiven Zellen in diesen Mutanten könnte als Hinweis auf so eine Konvertierung gedeutet werden. Eine "lineage-tracing" Studie der *Insulin*<sup>+</sup> Zellen in *Pax6*<sup>-/-</sup> Pankreata würde sicherlich zur Aufklärung dieses Sachverhalts beitragen. Beachtenswerter Weise exprimieren *Ghrelin*<sup>+</sup> Zellen in *Pax6*<sup>-/-</sup> Pankreata weder *iAPP* noch *Pdx1* und unterscheiden sich damit von den *Ghrelin*<sup>+</sup> Populationen in *Nkx2.2*- oder *Pax4*-defizienten Pankreata. Da die Expression von *iAPP* und *Pdx1* aber in den verbleibenden Beta-Zellen detektierbar ist, erscheint *Pax6* per se nicht notwendig für die Aktivierung von *iAPP* und *Pdx1*. Es ist jedoch vorstellbar, dass *Pax6*-Aktivität für deren Expression notwendig ist, sobald eine Beta-Zelle ein bestimmtes Differenzierungsstadium erreicht hat.



### 3.1.3 Ghrelin<sup>+</sup>/Somatostatin<sup>+</sup> Zellen in *Nkx2.2*<sup>-/-</sup>*Arx*<sup>-</sup> Doppelmutanten repräsentieren einen nicht-Delta-Zelltyp.

Diese Arbeit zeigt, dass der kombinierte Verlust von *Nkx2.2* und *Arx* die Bildung von Alpha- und Beta-Zellen verhindert und bestätigt damit die Notwendigkeit von *Arx* bzw. *Nkx2.2* für die Generierung dieser Zelltypen. Die Anwesenheit von Pax4<sup>+</sup> Zellen zeigt jedoch, dass ein endokrines Vorläuferstadium ohne *Nkx2.2* und/oder *Arx* erreicht wird.

Diese und vorangegangene Studien deuten an, dass *Nkx2.2* für die Aufrechterhaltung hoher Expressionslevel an *Pdx1* und *Pax6* sowie für die Aktivierung von *Nkx6.1* in differenzierenden Beta-Zellen notwendig ist (Wang et al., 2004, Prado et al., 2004, Sussel et al., 1998). Bei einem Vergleich von *Nkx2.2*-Einfach und *Nkx2.2/Arx*-Doppelmutanten erscheinen die Veränderungen in der Expression von *Pdx1*, *Pax6* und *Nkx6.1* ähnlich. Diese Daten bestätigen zum einen, dass *Arx* für den Beta-Zellpfad entbehrlich ist und zeigen zudem dass die korrekte Expression von *Pdx1*, *Pax6* und *Nkx6.1* alleine *Nkx2.2* zugeschrieben werden kann.

Der kombinierte Verlust von *Nkx2.2* und *Arx* resultiert jedoch in der Bildung zahlreicher Ghrelin<sup>+</sup>/Somatostatin<sup>+</sup> co-positiver Zellen. Weder in Pankreata von Wildtypen noch in *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> oder *Arx*<sup>-</sup> Einfachmutanten wurde Ghrelin in somatostatin-produzierenden Delta-Zellen detektiert. Einschließlich der Beobachtung, dass weder *Nkx2.2* noch *Arx* in Wildtyp Delta-Zellen exprimiert sind, lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass Ghrelin<sup>+</sup>/Somatostatin<sup>+</sup> Zellen keine Delta-Zellen sind, sondern eher eine zu den in *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> Pankreata detektierbaren Ghrelin<sup>+</sup> Zellen vergleichbare Population repräsentieren. Die Tatsache, dass Ghrelin<sup>+</sup>/Somatostatin<sup>+</sup> Zellen dieselbe ausgeprägte Expression von *Pdx1*<sup>niedrig</sup> zeigen wie *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> Ghrelin<sup>+</sup> Zellen, unterstützt diese Annahme. Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass ungefähr 80% der Ghrelin<sup>+</sup> Zellen aufgrund des zusätzlichen *Arx*-Verlustes anfangen *Somatostatin* zu exprimieren. Jedoch exprimieren nicht alle Ghrelin<sup>+</sup> Zellen in *Nkx2.2*<sup>-/-</sup>*Arx*<sup>-</sup> Pankreata *Somatostatin*. Dies mag auf deren unterschiedliche Prädeterminierungen zurückzuführen sein und teilweise die Gegenwart von normalen Epsilon-Zellen reflektieren. Jedenfalls implizieren diese Ergebnisse auch, dass *Arx*, oder ein noch nicht identifizierter nachgeschalteter Mediator, einen suppressiven Effekt auf die Expression von *Somatostatin* ausübt. In diesem Kontext haben mehrere Studien aufgezeigt, dass *Arx*-Aktivität der Delta-Zell Bildung entgegenwirkt

(Collombat et al., 2003, 2005, 2007). Ob *Arx* die Expression von *Somatostatin* direkt inhibiert bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

Die im ersten Teil dieser Arbeit gesammelten Daten führen gemeinsam mit früheren Ergebnissen anderer Studien zu der Schlussfolgerung, dass sowohl Pax4 als auch *Arx* der zusätzlichen Aktivität von Nkx2.2 bedürfen, um die in frühen Beta- bzw. Alpha-Zellvorläufern angestoßenen Transkriptionskaskaden aufrechtzuerhalten. Diese Ergebnisse deuten zudem an, dass eine der gekoppelten Funktionen von Nkx2.2 und Pax4 die Suppression von *Arx* in determinierten Beta-Zellvorläufern ist.



### 3.2.1 ArxER initiiert die Bildung von Glucagon- sowie PP-exprimierenden Zellen

Collombat und Kollegen haben gezeigt, dass die künstlich forcierte Expression von Arx in Pdx1<sup>+</sup> pankreatischen Vorläuferzellen zu einer signifikanten Vermehrung Glucagon<sup>+</sup> aber auch PP<sup>+</sup> Zellen auf Kosten der Beta- und Delta-Zellzahlen führt (Collombat et al., 2007). Diese Ergebnisse bestätigten zum einen die Rolle von Arx als "Alpha-Zell Spezifizierer", offenbarten aber auch ein bis dahin unterschätzten Einfluss von Arx auf die Entwicklung der PP-Zelle. Aus diesen Studien leiteten sich die Fragen ab ob (1) Arx ausreichend ist um die Alpha- und PP-Zell Differenzierungsprogramme zu initiieren und (2) ob sich die Kompetenz Arx-positiver Vorläufer in beide Zelltypen zu differenzieren im Laufe der Entwicklung ändert.

Die vorliegende Arbeit zeigt dass die Aktivierung eines ArxER Fusionsproteins auch in Arx-defizienten Pankreata zur Bildung Glucagon<sup>+</sup> sowie PP<sup>+</sup> Zellen führt. Dies zeigt, dass die Aktivität von Arx ausreichend ist um die Prägung dieser Zelltypen zu initiieren. Nur wenige ausschließliche Alpha- oder PP-Zellmarker sind bis dato bekannt, was es erschwert eine Aussage über den Differenzierungsstatus der induzierten Zellen zu treffen. Brn4, als einziger exklusiver Alpha-Zell Marker war weder in den früh- noch in den spät-induzierten Glucagon<sup>+</sup> Zellen zu detektieren (Daten nicht gezeigt). Allerdings haben Knockout-Studien belegt, dass trotz der exklusiven Expression von Brn4 in Alpha-Zellen, dessen Fehlen kein Einfluss auf Entwicklung und Funktion der Alpha-Zelle hat (Heller et al., 2005). Ein Grund für die Nicht-Aktivierung von Brn4 könnte eine mögliche Funktionsbeeinträchtigung von Arx durch die Fusion mit ER sein. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass Arx bifunktionale Eigenschaften in der Transkriptionsregulation hat. Dabei werden repressive Eigenschaften maßgeblich durch N-terminal gelegene Domänen (Okta-Peptid, Poly-Alanin Trakt<sup>AS400-495</sup>) gesteuert (Seufert et al., 2004, McKenzie et al., 2007). Eine entscheidende Funktion in der Transkriptions-Aktivierung kommt der C-terminal gelegenen "aristales"-Domäne (oder auch OAR-Domäne) zu (Furukawa et al., 1997, Seufert et al., 2004, McKenzie et al., 2007). In dem ArxER Fusionsprotein liegt die "aristales"- Domäne nur 20 Aminosäuren (AS) vor dem Beginn der ER-Proteinsequenz. Bisher ist noch wenig darüber bekannt ob die "aristales"-Domäne

auf DNA/Protein- oder Protein/Protein-Ebene interagiert. Jedoch ist in beiden Fällen eine sterische Hinderung durch die Fusion mit ER nicht auszuschließen. Somit ist es vorstellbar, dass ArxER nur repressive oder nur aktivierende Eigenschaften besitzt und in der Folge nicht alle Transkriptionskaskaden initiiert werden.

Die Expression der Alpha- und PP-Zell-typischen Hormone, sowie die verlängerte Lebensspanne der induzierten Tiere, zeigen, dass die zur Hormonproduktion und -sekretion nötigen Mechanismen aktiviert wurden. Die Überlebensdauer 13.5-induzierter Tiere war mit 3-9 Tagen jedoch recht kurz. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Anzahl an Glucagon<sup>+</sup> Zellen stagniert wohingegen Beta-Zellen in ArxER/Arx<sup>-</sup> Tieren kontinuierlich gebildet werden. Somit ist es wahrscheinlich, dass bereits einige Tage nach der Geburt ein deutliches Ungleichgewicht zwischen Glucagon- und Insulin-produzierenden Zellen besteht, was in der Konsequenz zu einer Hypoglykämie und schließlich zum Tod der Tiere führt. Aufgrund des unvorhersehbaren Zeitpunkts des Absterbens war leider keine direkte Analyse der Tiere mit verlängerter Lebensspanne möglich. Zudem ist anzumerken, dass das Transgen im Prinzip selbstdeaktivierende Eigenschaften besitzt. Da weder Alpha- noch PP-Zellen *Pdx1* exprimieren wird die Expression des Transgens und damit auch die von ArxER mit zunehmender Differenzierung runterreguliert. Somit kann man davon ausgehen, dass die Anzahl induzierter Zellen nicht nur stagniert, sondern induzierte Zellen auch mit der Zeit in ihrer Funktion beeinträchtigt sind.

### **3.2.2 Entwicklungsabhängige Kompetenzänderung pankreatischer Zellen**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von ArxER in der frühen Pankreasentwicklung hauptsächlich in der Bildung Glucagon<sup>+</sup> Zellen resultiert, während nach E13.5 zudem PP<sup>+</sup> Zellen gebildet werden. Johansson und Kollegen zeigten bereits, dass multipotente pankreatische Vorläuferzellen zu verschiedenen Stadien der Pankreasentwicklung in verschiedene endokrine Subtypen differenzieren (Johansson et al., 2007). Mittels heterochronischer Mesenchym/Epithelium-Austauschexperimente konnte gezeigt werden, dass dabei hauptsächlich Signale aus dem Epithelium eine Rolle spielen.

Bei der Aktivierung von ArxER an E13.5 werden zahlreiche Glucagon<sup>+</sup> Zellen induziert. Diese sind jedoch größtenteils in Insulin<sup>+</sup> Bereichen angesiedelt, woraus man schließen muss, dass die Aktivierung von ArxER in Insulin-produzierenden Beta-Zellen stattgefunden hat und in der Folge deren Transdifferenzierung eingeleitet wurde. Ähnliches mag auch für die PP<sup>+</sup> Zellen gelten die nach einer E13.5-Aktivierung entstehen. Beachtenswerter Weise ist die Anzahl an PP-Zellen in "normalen" *Arx*-Mutanten im Vergleich zu Wildtypen unverändert (Collombat et al., 2005) was zeigt, dass *Arx* für die Bildung der PP-Zelle grundsätzlich nicht notwendig ist. In Folge der ArxER-Aktivierung an E13.5 treten jedoch vermehrt PP<sup>+</sup> Zellen auf. Ob die induzierten PP<sup>+</sup> Zellen tatsächlich aus Vorläuferzellen hervorgegangen sind lässt sich mit der experimentellen Aufstellung (*Pdx1*-Promoter) nicht eindeutig klären. Tatsache ist, dass um E13.5-E15.5 eine hochgradig heterogene Population an *Pdx1*-exprimierenden Zellen (multipotente Vorläufer sowie alle Zwischenstadien des Beta-Zellpfades bis hin zu reifen Beta-Zellen) präsent ist. Die induzierten PP<sup>+</sup> Zellen sind größtenteils nicht in Insulin<sup>+</sup> Bereichen lokalisiert, womit eine Transdifferenzierung reifer Beta-Zellen unwahrscheinlich ist. Jedoch ist es nicht auszuschließen, dass die ArxER-Aktivierung bei E13.5 in bereits determinierten Beta-Zellvorläufern stattfindet und es dann zu anderen phänotypischen Ausbildungen kommt als es bei einer Aktivierung in multipotenten Vorläufern käme. Da nicht eindeutig auseinander gehalten werden kann in welchem Zelltyp die Aktivierung bei E13.5 stattfindet, bleibt es offen ob die scheinbar bipotentiellen Differenzierungseigenschaften von *Arx* tatsächlich auf verschiedene Stadium-abhängige extrinsische Signale zurückzuführen sind oder nur das Resultat einer ArxER-Aktivierung in unterschiedlichen Zelltypen sind.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse aus der Analyse des ArxER-Transgens das *Arx* während der frühen Pankreatogenese die Alpha-Zell Differenzierung in pankreatischen Vorläuferzellen initiiert.

### 3.3.1 *Pax4* ist nicht essenziell zur Aufrechterhaltung normaler Beta-Zell Funktionen

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde die Relevanz des Transkriptionsfaktors *Pax4* in reifen Beta-Zellen ermittelt. In der frühen endokrinen Zellentwicklung ist *Pax4* essenziell für die Differenzierung von Beta- und Delta-Zellen. Die Deletion von *Pax4* resultiert in einem fast vollständigen Verlust beider Zellpopulation (Sosa-Pineda et al., 1997).  $Pax4^+$  Zellen sind mit Beginn der Pankreasentwicklung (E9.5) zu detektieren. Zwischen E13.5 und E16.5, also der Phase vermehrter endokriner Zellbildung, erreicht ihre Anzahl einen Höhepunkt (Sosa-Pineda et al., 1997, Wang et al., 2004). Auf zellulärer Ebene wird die Expression von *Pax4* mit beginnender Hormonexpression runterreguliert. Ob eine niedrige Expression von *Pax4* in Insel-Zellen adulter Tiere aufrechterhalten bleibt, war lange Zeit Gegenstand einer Kontroverse. Mittlerweile wurden jedoch von verschiedenen Arbeitsgruppen niedrige Level an *Pax4*-mRNA in Inseln adulter Mäuse (Kojima et al., 2003) und Ratten (Brun et al., 2004) detektiert. Im Gegensatz zur murinen Expression ist die Expression von *Pax4* in humanen Inseln sehr offensichtlich (Heremans et al., 2002). Zudem haben genetische Studien an Menschen einen Zusammenhang von Mutationen auf *Pax4* und verschiedenen Ausprägungen des Diabetes Mellitus offenbart (rezensiert in Brun und Gauthier 2008).

Um die Relevanz von *Pax4* in adulten Beta-Zellen genauer zu ermitteln wurde eine konditionale *Pax4*-Knockout Linie erzeugt.

Die konditionelle Inaktivierung von *Pax4* mittels *Insulin-Cre* (Herrera et al., 2001) hatte keinen offensichtlichen Effekt auf die Entwicklung und Funktion der Insel-Zellen in der Maus. Wie bereits erwähnt, ist *Pax4* zur Aufrechterhaltung der *Nkx6.1* Expression, ebenso wie zur Initiierung von  $Pdx1^{\text{hoch}}$  notwendig. Die normale Expression dieser Beta-Zell Marker in Pankreata adulter *InsCre Pax4<sup>-lacZ</sup>* Tiere lässt den Schluss zu, dass deren Aufrechterhaltung mit beginnender Insulin-Produktion von anderen Faktoren übernommen wird und *Pax4* einzig in der frühen Spezifizierung essenziell ist. Einschränkend ist zu sagen, dass aus zeitlichen Gründen keine Reporterlinie mehr eingekreuzt werden konnte, um in jedem analysierten Pankreas die Effizienz der Insulin-Cre-vermittelten Rekombination zu überprüfen.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse an, dass die Rolle von *Pax4*, zumindest in der Maus, auf endokrine Vorläuferstadien begrenzt ist und *Pax4* mit beginnender Insulinproduktion redundant wird.

Mit der hier generierten konditionalen Mauslinie ist es darüberhinaus nun möglich die Rolle von *Pax4* in vielen anderen Zellen/Organen genauer zu untersuchen wie zum Beispiel in den anderen pankreatischen endokrinen Subtypen sowie in den endokrinen Zellen des Gastrointestinalen Traktes (Larsson et al., 1998). Darüber hinaus wurde kürzlich die Expression von *Pax4* in der Epiphyse und den Photorezeptor-Zellen der Retina nachgewiesen (Rath et al., 2009a, b).

## **4. Material und Methoden**

### **4.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **4.1.1 Isolation von Plasmid DNA aus E. coli**

Das Anwachsen von Bakterienkulturen erfolgte in Standard1-Medium (Merck) bei 37°C über Nacht. Selektioniert wurde entweder mit Ampicillin (100ug/ml), Kanamycin (50ug/ml) oder Chloramphenicol (25ug/ml). Die Isolation von Plasmid-DNA erfolgte je nach Menge entweder mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) oder dem Highspeed Plasmid Maxi Kit (Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers.

#### **4.1.2 Extraktion von BAC-DNA aus E.coli**

Aufgrund der Größe der BAC-DNA wurde zur Extraktion das NucleoBond BAC 100 Kit von Macherey-Nagel entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

#### **4.1.3 Ligation von DNA**

DNA-Ligationen erfolgten bei 16°C über Nacht in 10ul Ansätzen bestehend aus:

|     |                               |
|-----|-------------------------------|
| 1ul | T4-Ligase (3u/uL) (Promega)   |
| 1ul | 10x T4-Ligasepuffer (Promega) |
| 2ul | Vektor-DNA (25ng/ul)          |
| 6ul | DNA-Fragment (50ng/ul)        |

#### **4.1.4 Agarosegelelektrophorese**

Je nach Art der Verwendung wurden verschieden prozentige Gele aus Agarose (Roth), 1xTBE-Puffer (89mM Tris/HCL ph 8,3, 2mM EDTA-Na<sub>2</sub>-Salz, 89mM

Borsäure) und 0,5ug/ml Ethidiumbromid (Roth) hergestellt. Als Laufpuffer wurde ebenfalls 1x TBE verwendet.

#### **4.1.5 DNA-Extraktion aus Agarosegel**

Die Extraktion von DNA aus Agarosegel erfolgte mit dem GeneClean Spin Kit (MP Biomedicals) nach den Angaben des Herstellers.

#### **4.1.6 Transformation von Plasmid-DNA**

0,1-50ng Plasmid-DNA wurde zu einer Lösung aus CaCl<sub>2</sub>-kompetenten Bakterien gegeben und 45 min auf Eis inkubiert. Nach 90 Sekunden Hitzeschock bei 42°C erfolgte eine 2 minütige Abkühlphase auf Eis. Die Bakterienlösung wurde dann mit dem 9-fachen Volumen an Standard1-Medium (37°C) ohne Antibiotikum aufgefüllt. Nach einer 30-minütigen Anwuchsphase wurde die Lösung auf Antibiotika-haltigen Agar-Platten ausplattiert. Die Selektion erfolgte über Nacht bei 37°C.

#### **4.1.7 Phenol-Chloroform Extraktion von DNA**

DNA, die zur Herstellung transgener Mauslinien (Vorkerninjektion) oder Knockout-Linien (Elektroporation von ES-Stammzellen) eingesetzt werden sollte, wurde nach der Gelisolation mit einer kombinierten Phenol-Chloroform Extraktion mit anschließender Ethanolfällung aufgereinigt. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

|            |   |  |
|------------|---|--|
| Extraktion | 1 | Zugabe von gleichem Volumen Phenol (Roth)  |
|            | 2 | 1 Minute Mixen   |
|            | 3 | 1 Minute Zentrifugation bei 14.000 rpm   |
|            | 4 | Überführen der wässrige Phase in neues Eppi  |
|            | 5 | Wiederholen der Schritte 1-4 mit Chloroform  |
| Fällung    | 6 | Zugabe von 2 Volumen eiskaltem Ethanol (100%), Mixen und 30 Minuten Lagerung bei -20°C |
|            | 7 | 15 Minuten Zentrifugation bei 14.000 rpm   |
|            | 8 | Verwerfen des Überstandes  |

- 9 Zugabe von 70% Ethanol
- 10 1 Minute Zentrifugation bei 14.000 rpm
- 11 Verwerfen des Überstandes und 5 Minütige Trocknung des Pellets

Anschließend wurde die DNA in 10% TE-Puffer (Qiagen) resuspendiert. Je nach Verwendung wurden DNA-Lösungen mit 100ng/ul (Vorkerninjektion) oder 1ug/ul (ES-Zell-Elektroporation) angesetzt.

#### **4.1.8 Southern Blot und radioaktive Markierung der Sonden**

10ug genomischer DNA wurden 16 Stunden bei 37°C mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und auf einem 0,5%-igen Agarosegel bei einer Spannung von 25V über Nacht aufgetrennt. Das Gel wurde fotografiert und anschließend 15 Minuten in 0,25M HCl und 30 Minuten in einer Mischung aus 0,5M NaOH und 1,5M NaCl denaturiert und anschließend 45 Minuten in einer Lösung aus 0,5M Tris/HCl pH7,5 und 1,5M NaCl neutralisiert. Der Transfer der DNA erfolgte mittels Kapillar-Blot System über Nacht auf eine Nitrozellulosemembran (GeneScreen). Transferierte DNA wurde mittels UV-Strahlung (0,3J/cm<sup>2</sup> bei 320nm) kovalent an die Membran gebunden. Nach der Trocknung der Membran (1 Stunde bei 80°C) wurde diese entweder bei 4°C gelagert oder bei 68°C in einer Lösung aus 0,5M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH7,2, 1mM EDTA und 7% SDS für mindestens eine Stunde inkubiert. Parallel dazu wurde die Sonde radioaktiv markiert. Die Markierung der DNA und die Aufreinigung der markierten Sonde erfolgten mit dem RediPrime II Random Labelling Kit (GE Healthcare) bzw. dem illustra ProbeQuant G-50 (GE-Healthcare) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Markierungseffizienz wurde durch Messung mit einem LS1701 Scintillation Counter (Beckman) ermittelt. Nach 5 Minütiger Denaturierung der Sonde bei 100°C wurde diese zusammen mit 10ml Hybridisierungslösung (1x10<sup>6</sup> cpm/ml) zu der Membran gegeben und über Nacht bei 68°C hybridisiert. Am nächsten Tag wurde die Membran einmal 15 Minuten mit Waschpuffer (40mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1%SDS) bei 68°C und zweimal 30 Minuten mit kaltem Waschpuffer von nicht-gebundener Sonde befreit. Die Membran wurde dann in Klarsichtfolie verpackt und zusammen mit einem Röntgenfilm in eine



Entwicklungskassette gelegt. Der Film wurde eine Woche bei -80°C exponiert. Die Entwicklung des Filmes erfolgte mit der Curix 60 Entwicklermaschine (Agfa).

#### 4.1.9 Isolierung genomischer DNA aus murinem Gewebe

Gewebeteile wurden über Nacht in 500ul Lysispuffer (100mM Tris/Hcl, pH 8, 200mM NaCl, 0,2% SDS, 0,5mM EDTA) und 10ul ProteinaseK (10mg/ml in 50mM Tris/HCl pH8,0 und 1,5M Ca(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>) bei 56°C lysiert. Zur Fällung der DNA wurden 500ul 100% Isopropanol zugegeben. Nach 10 minütiger Zentrifugation (14000 rpm) wurde der Überstand abgegossen und das Pellet in 1mL 70% Ethanol gewaschen. Nach weiteren 2 Minuten Zentrifugation wurde der Überstand erneut abgegossen, das Pellet 5 Minuten bei RT getrocknet und anschließend in 50ul H<sub>2</sub>O resuspendiert.

#### 4.1.10 Polymerase Kettenreaktion

PCR-Reaktionen erfolgten in 33ul Ansätzen:

|       |                  |                               |
|-------|------------------|-------------------------------|
| 26ul  | H <sub>2</sub> O | (gefiltrert und autoklaviert) |
| 7ul   | PCR-Puffer       | (5x, GoTaq, Promega)          |
| 0,3ul | dNTP-Mix         | (20mM, GeneCraft)             |
| 0,1ul | Primer           | (100uM, Sigma Aldrich)        |
| 0,1ul | Polymerase       | (5u/ul, GoTaq, Promega)       |

Für alle PCR-Reaktionen, außer der Genotypisierung von *Arx*-Mutanten, wurde ein Standardprogramm angewendet:

Standardprogramm:

|   |      |             |
|---|------|-------------|
| 1 | 94°C | 4 Minuten   |
| 2 | 94°C | 30 Sekunden |
| 3 | 62°C | 30 Sekunden |
| 4 | 72°C | 30 Sekunden |

|   |              |              |
|---|--------------|--------------|
|   | Schritte 2-4 | in 38 Zyklen |
| 5 | 72°C         | 5 Minuten    |
| 6 | 4°C          |              |

Programm zur Genotypisierung von *Arx*-Mutanten:

|   |              |              |
|---|--------------|--------------|
| 1 | 94°C         | 4 Minuten    |
| 2 | 94°C         | 60 Sekunden  |
| 3 | 62°C         | 60 Sekunden  |
| 4 | 72°C         | 60 Sekunden  |
|   | Schritte 2-4 | in 45 Zyklen |
| 5 | 72°C         | 5 Minuten    |
| 6 | 4°C          |              |

#### 4.1.11 Total RNA-Isolation, cDNA-Synthese und quantitative-PCR

Nach der Präparation wurden die Pankreata über Nacht bei 4°C in RNAlater (Ambion) eingelegt. Die Lagerung der Gewebe erfolgte in RNAlater bei -80°C. Total RNA wurde aus ganzen Pankreata (E16.5) mit dem RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert. Die mechanische Zerkleinerung der Pankreata erfolgte mit einer Kugelmühle für 3 Minuten bei 50 Hertz (Tissuelyser, Qiagen). Konzentration und Qualität der RNA wurden mittels Spektrometrie (Nanodrop, Peqlab) und anschließender Agarosegelelektrophorese bestimmt. Nur RNA mit einem OD 260/280 Verhältnis >1.8 und OD260/230 Verhältnis >1.8 sowie exzellentem Gelbild wurden zur cDNA-Synthese weiterverwendet. Pro Pankreas wurden 5µg total RNA zur cDNA Synthese mit dem SuperScript II Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen) eingesetzt. Die Menge an *Arx* (QT00162904), *Nkx2.2* (QT00495502) and *Pax6* (QT01052786) Transkripten wurde relative zu *Gusb* (QT00176715) mit Hilfe des QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) ermittelt. Alle Reaktionen erfolgten in 25µl Ansätzen und wurden in Triplikaten ausgeführt. Pro Ansatz wurden folgende Mengen eingesetzt:

|        |                                 |
|--------|---------------------------------|
| 12,5ul | SYBRGreen (Qiagen)              |
| 2,5ul  | Quantitec Primer Assay (Qiagen) |
| 9,4ul  | H <sub>2</sub> O                |
| 0,6ul  | cDNA                            |

Quantitative PCR's erfolgten auf dem Eppendorf Mastercycler Realplex System mit folgendem PCR-Programm:

|                           |                   |                           |
|---------------------------|-------------------|---------------------------|
| 1                         | 95°C              | 15 Minuten                |
| 2                         | 94°C              | 15 Sekunden               |
| 3                         | 55°C              | 30 Sekunden               |
| 4                         | 72°C              | 30 Sekunden               |
| Schritte 2-4 in 45 Zyklen |                   |                           |
| 5                         | 95°C              | 15 Sekunden               |
| 6                         | 60°C              | 15 Sekunden               |
| 7                         | Gradient bis 95°C | 20 Minuten (Schmelzkurve) |
| 8                         | 95°C              | 15 Sekunden               |
| 9                         | 4°C               |                           |

## 4.2 Mauslinien und Konstrukte

| Bezeichnung | Typ                     | Induzierbar | Kurzbeschreibung                                       | Referenz                 |
|-------------|-------------------------|-------------|--|--------------------------|
| Insulin-Cre | Transgen                | Nein        | Insulin-Promoter steuert Cre-Expression                | Herrera et al., 2000     |
| CMV-Cre     | Transgen                | Nein        | CMV-Promoter steuert Cre-Expression (ubiquitär)        | Schwenk et al., 1995     |
| Pax3 KO     | Knockout                | Nein        | Exons ersetzt durch LacZ-Gen                           | St-Onge et al., 1997     |
| Pax4 KO     | Knockout                | Nein        | Exons ersetzt durch LacZ-Gen                           | Sosa-Pineda et al., 1997 |
| Arx KO      | Knockout                | Nein        | Exons ersetzt durch LacZ-Gen                           | Collombat et al., 2003   |
| Nkx2.2 KO   | Knockout                | Nein        | Exons ersetzt durch Neomycin-Gen                       | Sussel et al., 1997      |
| ArxErtm     | Transgen                | Ja          | ArxEr Fusionsprotein unter Steuerung von Pdx1 Promoter | Diese Arbeit             |
| Pax4CKO     | Konditioneller Knockout | Nein        | LoxP-Sequenzen flankieren die Pax4 Exons 2-6           | Diese Arbeit             |

Wenn nicht anders erwähnt, wurden die Mäuse wie in den Referenzen angegeben genotypisiert.

#### 4.2.1 Herstellung des induzierbaren ArxER-Tansgenkonstrukts

In einem ersten Schritt wurde im Plasmid pCIG4-*Ngn3ERnGFP* (Johansson et al., 2007) die 1,6 kb Not1-flankierte *Ngn3ER*-DNA durch eine 46 b große "Mehrfache Klonierungs Stelle (MCS) 5'-Not1-Pac1-Pme1-Not1-3' (5'-GGCCGCTCATTAATTAATAAACTGTAACCTAGGCAGTTTAAACGCTGC-3')

ersetzt. Aus diesem Plasmid wurde dann ein 6,3kb Sal1-flankiertes Fragment (inklusive *Pdx1*-Promoter, Beta-globin Intron, neuer MCS, IRES und *nGFP*) in Sal1 verdautes pBluescript KSII kloniert. In das so entstandene Plasmid (pBS-pPdx1*nGFP*) wurde in einem weiteren Schritt die fusionierte ArxER-DNA inseriert (siehe nächster Abschnitt).

#### Fusionierung der Arx und ER DNAs

In einem ersten Schritt wurde eine 89b Multiple Cloning Site 5'-Xho1- Pac1-EcoR1-Sfi1-HindIII-Xba1-Pme1-Xba1\*-3' (5'-TCGAGTTAATTAAGAATTCGGACTAGGCCGACCCGGCCCTAGGATAACCGAAGCTTTGAATCTAGACGCTTTGTTTAAACTAAGGACCG-3')

in Xho1/Xba1 verdautes pBluescript KSII kloniert. In weiteren 4 Klonierungsschritten wurden die *Arx* DNA und die *ER* DNA eingefügt und über eine HindIII Schnittstelle "in frame" fusioniert. Dabei wurden erstens ein bestelltes 129b 5'-Sfi1-*Arx*(b)-HindIII-3' Fragment (5'-CGGCCACCGCCGCGGCAGACAGACGCGCGTCAAGCATAGCCGCGCTGAGGCTCAAGGCTAAGGAGCACGCCGCGCAGCTCACGCAGCTAACATCCTGC CGGGCACCAGCACGGGGAAGGAGGTGTGCA-3'), zweitens ein durch PCR-generiertes 5'-HindIII-*ER*(a)-Xba1-3' Fragment (P1: 5'-CCCCCCAAGCTTGCGAAATGAAATGGGTGCTTCAGGAGACATGAGGGC-3', P2: 5'-GCTCTAGAAGGATCATATTCAGAATAGATCATGGGCGGTTCAG-3', "Template": pCIG4-*Ngn3ERnGFP*), drittens ein 1,5 kb 5'-EcoR1-*Arx*(a)-Sfi1-3' Fragment (ausgeschnitten aus pBS-*Arx*-DNA, Laborstock) und viertens ein 0,9kb 5'-Xba1-*ER*(b)-Pme1-3' Fragment (ausgeschnitten aus p*Pax4ERnGFP*, Laborstock) nacheinander in die neue MCS inseriert. Die so hergestellte 2,8kb große 5'-Pac1-*ArxER*- Pme1-3' Fusion wurde im Folgenden in das Pac1/Pme1 verdaute pBS-pPdx1*nGFP* (siehe vorheriger Abschnitt) subkloniert. Aus dem so entstandenen

Plasmid pBS-pPdx1-*ArxERnGFP* wurde das fertige 11kb Konstrukt mit EcoRV ausgeschnitten. (\* = Schnittstelle nach Ligation zerstört).

#### 4.2.2 Generierung transgener Mäuse

Nach der pronuklearen Injektion wurden aus 38 Tieren 5 positive, das Transgen tragende Tiere mittels Genotypisierung identifiziert. Dabei wurden Primer gegen GFP (P1: 5'- ACCCTGAAGTTCATCTGCACCA-3', P2: 5'- TGGGTGCTCAGGTAGTGGTTGT-3') sowie die *ArxER*-Fusion eingesetzt (P1: 5'- GACTGCGGCTGCGCTCCTGAGACAGCCCACACCCG-3', P2: 5'- AGCTGTCAAGGACAAGGCAGGGCTATTCTTCTTAG-3'). Drei von den 5 Gründertieren transmittierten das Transgen in die nächste Generation. Von diesen Tieren wurden stabile Linien etabliert.

#### 4.2.3 Tamoxifenlösung und Injektion

Tamoxifen (T5648-1G, Sigma) wurde in Maisöl (C8267, Sigma) 3 Stunden bei 37°C gelöst. Tamoxifeninjektionen erfolgten intraperitoneal mit einer Stammlösung von 20 mg/ml. Adulten Mäusen wurden 5µg Tamoxifen/g Körpergewicht appliziert.

#### 4.2.4 Herstellung des konditionalen *Pax4*-Knockout Konstruktes

Zur Herstellung des konditionalen *Pax4*-Konstrukts (P4CKO) wurde das *Recombineering*-Verfahren verwendet (Baudin et al., 1993, Zhang et al., 1998, Muylers et al., 2001, Copeland et al., 2001, Liu et al., 2003). Dieses Verfahren erlaubt die Modifizierung von klonierter DNA in *E.coli* (Stamm=SW102) durch homologe Rekombination (Yu et al., 2000, Lee et al., 2001). Die Rekombination wird dabei durch die Red-Proteine des Bakteriophagen Lambda vermittelt (Stahl et al., 1998). Dieses Verfahren der DNA-Modifikation hat den Vorteil, dass weder Restriktionsenzyme noch DNA-Ligasen notwendig sind. Dadurch wird die Notwendigkeit einzigartiger Restriktionsschnittstellen umgangen, was die Modifikation großer DNA-Fragmente erlaubt. Die Herstellung eines konditionalen *Targeting*-Konstrukts erfolgt grundsätzlich in drei aufeinanderfolgenden

Rekombinierungsschritten. Dabei wird erstens der zu modifizierende Gen-Lokus von einem BAC ("*bacterial artificial chromosome*") in den *Targeting*-Vektor PL253 rekombiniert (Liu et al., 2003). In zwei weiteren Schritten werden dann die LoxP-Sequenzen mittels den Plasmiden PL452 und PL451 in den Gen-Lokus rekombiniert (Liu et al., 2003). Die Kultivierung und Elektroporation der verwendeten Bakterienstämme SW106, SW105 und SW102 erfolgten nach dem von Soren Warming etablierten Protokoll (Warming et al., 2005).

### Retrieving-Vektor (PL253)

Dieser Vektor enthält eine durch den MC1-Promoter gesteuerte Thymidin Kinase-Kassette (TK), welche der negativen Selektion in ES-Zellen dient (Liu et al., 2003). Aufwärts der Kassette wurden zwei je 500 b große Fragmente inseriert, die homolog zu den den *Pax4*-Lokus flankierenden Sequenzen sind. Die homologen Fragmente wurden mittels PCR gewonnen ("*Template*": BAC-bmq372K14). Primerpaar1 (aufwärts vom *Pax4*-Lokus) (5'-ATAAGAATGCGGCCGCTGCTGGCCTGGGAAATGGATGTTGAATATATGCC-3'; 5'-GACTAGTCCTCCGCTCGCCCCAGAAAGATAGTGAAAAGCGCACCCCTCCAT-3'), Primerpaar2 (abwärts vom *Pax4*-Lokus): (5'-GACTAGTGATAGATGCCCTGGCGACAGGGCAATAGCTGA-3'; 5'-CGGGATCCATTCCCCAACCCACATAAGAAGCTGGGTGTTGT-3'). Die so generierten Not1-Spe1 und Spe1-BamH1 Fragmente wurden in einer Triple-Ligation in das Not1/BamH1 verdaute PL253 kloniert. Im Folgenden wurde dieses Plasmid mit Spe1 linearisiert und zusammen mit der BAC-DNA in die, zur homologen Rekombination fähigen Bakterien (SW102) elektroporiert. Selektioniert wurde gegen PL253 (Ampicillin) und gegen die BAC-DNA (Chloramphenicol), sodass nur Klone anwachsen in denen eine Rekombination stattgefunden hat. Dieser Prozess der homologen Rekombination von BAC-DNA in das linearisierte PL253 nennt sich "*gap retrieving*" und das fertige Plasmid "*gap repaired plasmid*" (GRP). In dieses, den *Pax4*-Lokus enthaltende GRP wurden in zwei weiteren Schritten mit Hilfe der *Targeting*-Vektoren PL452 und PL451, zwei LoxP-Sequenzen rekombiniert. Die Insertion der LoxP-Sequenzen erfolgte 543 b aufwärts und 2.154 b abwärts vom *Pax4*-Startcodon.

Targeting-Vektor 1 (PL452)

Dieser Vektor enthält eine von LoxP-Sequenzen flankierte *Neomycin*-Kassette (Liu et al., 2003). Es wurden 130 b große homologe Bereiche aufwärts und abwärts der *Neomycin*-Kassette inseriert. Aufwärts der Kassette wurde ein Sall-*HomologerBereich*-Spe1-Nde1-EcoR1 Fragment inseriert. Die Spe1-, Nde1- und EcoR1-Schnittstellen wurden zusätzlich eingefügt um in einer späteren Southern Blot-Analyse die korrekte Insertion des fertigen Knockout-Konstrukts in die genomische DNA nachvollziehen zu können.

5'-

GAAGTCATCACCTTAGGCTTTGTGTACCTCTTTCCAATGGGTGGGACCAAT  
 GCCCAGGACCTGAGGTATTACTGAGCCCCAGATTCTGCCCCCAAGAGTTT  
 CCTGGAGAACACAGAAAACAAGAGTCTGGACTAGTCATATG-3'

Abwärts der Kassette wurde ein BamH1-*HomologerBereich*-Not1 Fragment inseriert:

5'-

GATCCATTTTCCTTGAAGTGCTTTGAAGAAAGTGTTTGACTGATACTTGGGA  
 AACTGGACTCGGGACTGTCCAACAGTGAAACCTGAACTTGAGAACTCTG  
 AGCTCAAGAGTCTCTGGCTCAAGAGTGCAACCAGC-3'

Die *Neomycin*-Kassette inklusive der flankierenden homologen Arme wurde mit einem Sall/Not1-Verdau herausgeschnitten und zusammen mit dem "*gap repaired plasmid*" (GRP) in die zur homologen Rekombination fähigen Bakterien (SW102) elektroporiert. Selektioniert wurde auf Kanamycin-haltigen Agar-Platten. Mehrere Klone wurden mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung auf die korrekte Insertion hin untersucht. Das so entstandene GRP-Insert1 wurde im Folgenden in Cre-exprimierende E.coli Bakterien (SW106) elektroporiert um die von LoxP-Sequenzen flankierte *Neomycin*-Kassette zu entfernen. Eine einzelne LoxP-Sequenz bleibt dabei nach der Cre-Rekombination übrig. In das so entstandene Plasmid GRP-LoxP1 wurde im Folgenden eine weitere LoxP-Sequenz mit Hilfe des *Targeting*-Vektors 2 (PL451) eingefügt.

Targeting-Vektor 2 (PL451)

Dieser Vektor enthält eine von Frt-Sequenzen flankierte *Neomycin*-Kassette gefolgt von einer einzelnen LoxP-Sequenz (Liu et al., 2003). Folgende 130 b große homologe Bereiche wurden in die die *Neomycin*-Kassette flankierenden MCS' inseriert:

Aufwärts der Kassette wurde ein *Sal1-HomologerBereich-HindIII-Spe1-EcoR1* Fragment inseriert:

5'-

TCGACAGAAAGGTGCTGGACTTGGGTAGACAGTGGGAAAGATGCTGCTGG  
TATGGTGGCAAGGCAACAAACAGTCTTGAGACTTATGGGTGAAGGCTGAC  
AGGGTCCAGGCTGTGGGTGGCTTGACCTGGGAAGCTTACTAGTG -3'

Abwärts der Kassette wurde ein *BamH1-HomologerBereich-Not1* Fragment inseriert:

5'-

GATCCACGGGTTATTTAGGCTTTTAAGAAGTAGGGAGTGGGGACTGACAA  
GGAGACCATTCTTACTCCTTCCCTTACCCTCACTGTGAGAGCCTCTGTCT  
CTACAGAGTTTCAGCGTGGGCAGTATCCAGATTCGC -3'

Die von den homologen Sequenzen flankierte *Neomycin*-Kassette wurde mit einem *Sal1/Not1*-Verdau herausgeschnitten und zusammen mit dem im vorherigen Schritt generierten GRP-LoxP1 in die zur Rekombination fähigen Bakterien (SW102) elektroporiert. Selektioniert wurde auf Kanamycin-haltigen Agar-Platten. Mehrere Klone wurden mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung auf die korrekte Insertion hin untersucht. Der so entstandene fertige Knockout-*Targeting*-Vektor (GRP-LoxP1-Insert2) wurde vor der Elektroporation in ES-Zellen mit *Not1* linearisiert. Außerdem wurde die Funktionalität der Frt - und LoxP-Sequenzen in Flp- bzw. Cre-exprimierenden Bakterien getestet (SW105 bzw. SW106) (Abb. 20).

#### 4.2.5 ES-Zell Analyse und Generierung von Pax4CKO-Mäusen

Die Generierung von rekombinanten ES-Zell Klonen sowie von P4CKO-Mäusen erfolgte nach dem Protokoll von A. Mansouri (Mansouri 2001). Nach der Elektroporation des P4CKO-Konstruktes in ES-Zellen des Stamms 129/sv und



anschließender Selektion mit Gancyclovir und G418 wurden 200 stabil transfizierte ES-Zell Klone etabliert. Alle 200 Klone wurden mittels Southern Blot auf die korrekte Insertion des P4CKO-Konstrukts hin untersucht. Dazu wurden eine externe 512b große 5'-Sonde (P1: 5'-CTGAGAGATTAACCCAGGGGAAGCTTAGATGTGGTG-3', P2: 5'-TAACATGATACTTGCATTATAGTTAATAGAACATA-3') eine externe 253 b große 3'-Sonde (P1: 5'-AGAACTCGGGTCTTCACACTGGTGTAGCAGGTGCT-3', P2: 5'-CTGTTCCGATGTTTTACAGGGTTGGGGTGGGGATT-3') sowie eine 528 b große interne Sonde (P1: 5'-GCTCCCCATTGCTTCCTCTGGCTCTTATGACCTTT-3', P2: 5'-GACTGGTTCCAGATTTTCAGCATGAGATGAATGAGA-3') verwendet. Als PCR-"Template" diente jeweils genomische DNA vom Mausstamm 129/sv. Es wurde ein positiver Klon ermittelt, welcher anschließend mit NMRI-ES-Zellen im 8-Zellstadium aggregiert wurden. Die daraus entstandenen männlichen Chimären wurden mit NMRI CD-1 Weibchen verpaart um heterozygote Mäuse zu erhalten. Nachkommen transmittierender Chimären wurden mit P1 : 5'-AGCTCCAGTGAGTTTAGAACTGCTAGGAGGTG-3' und P2: 5'-CTCCTCAAGTGGGCAACTTGACATCTGGCCCA-3' genotypisiert. Die verwendeten Primer flankieren die erste LoxP-Sequenz womit sich bei heterozygoten Tieren eine 358b Bande (Wildtyp-Allel) und eine 466b-Bande (konditionales Allel) ergeben (Abb. 23).

#### 4.2.6 Genotypisierung von Pax4CKO-Mutanten

Zur Generierung von *Pax4* Knockout-Mäusen wurde wie in Abbildung 24 abgebildet vorgegangen. Es wurden verschiedene Cre-Linien zur zellspezifischen Inaktivierung von *Pax4* eingesetzt, inklusive CMV-Cre (alle Zellen) und Insulin-Cre (Beta-Zelle). Zur Steigerung der Effizienz wurde ein konventionelles *Pax4*-Knockout Allel eingekreuzt, bei dem die Exons 2, 3 und 4 durch ein *lacZ*-Gen ersetzt wurden (Sosa-Pineda et al., 1997). In der F2-Generation besteht dann die Möglichkeit das *Pax4* Nullmutaten mit einem rekombinierten sowie einem konventionellen Knockout-Allel geboren werden (Abb. 24, umrahmt). Zur Genotypisierung wurden Primer gegen Cre (P1: 5'-ATGCTTCTGTCCGTTTGCCG-3', P2: 5'-CCTGTTTTGCACGTTACCG-

3'), lacZ (P1: 5'-TTGGCGTAAGTGAAGCGAC-3', P2: 5'-AGCGGCTGATGTTGAACTG-3') und die erste LoxP-Sequenz (siehe vorheriger Abschnitt) eingesetzt. Im Falle von CMV-Cre Verpaarungen wurden außerdem noch Primer gegen das rekombinierte *Pax4*-Allel eingesetzt. Diese Binden vor der ersten bzw. hinter der zweiten LoxP-Sequenz, sodass nur im Falle einer Rekombination ein Amplifikat (515b) entsteht. Rek (P1: 5'-AGCTCCAGTGAGTTTAGAACTGCTAGGAGGTG-3', P2: 5'-CAGTATACATTCGTCTCCTTTACAGACCCTCACAC-3') (Abb.25).

#### 4.2.7 Blutzuckermessung

Blutzuckermessungen erfolgten mit Hilfe des One Touch Glucose Monitoring Kit von Johnson & Johnson. Es wurden jeweils 15ul peripheren Blutes eingesetzt.

### 4.3 Gewebepräparation und Färbungen

#### 4.3.1 Gewebepräparation zur immunhistochemischen Färbung

Mäuse wurden entweder durch zervikale Dislokation (adult) oder Dekapitation (Embryos und Mäuse jünger als 10 Tage) getötet. Präparierte Pankreata wurden wie folgt behandelt:

|                          |                                |
|--------------------------|--------------------------------|
| 3x 10 Minuten waschen in | 1x PBS (4°C) (AccuGene, Lonza) |
| 30 Minuten Fixierung in  | 4% Paraformaldehyd (4°C)       |
| 3x 10 Minuten waschen in | 1x PBS (4°C)                   |

Pankreata zur Einbettung in Kryomatrix (Jung) wurden wie folgt weiterbehandelt:

|                         |                          |
|-------------------------|--------------------------|
| 25% Saccharoselösung in | 1xPBS bei 4°C über Nacht |
| 2 Stunden Inkubation in | Kryomatrix bei 4°C       |

Kryomatrix inklusive Gewebe wurde auf Trockeneis ausgehärtet. Gefrorene Blöcke wurden bei -80° C gelagert oder es wurden mit Hilfe eines Kryostaten Schnitte

angefertigt. Dabei wurden von adulten Pankreata 8µm und von embryonalen Pankreata 5µm Schnitte angefertigt. Zur anschließenden Immunfärbung wurden die Schnitte 3x 10 Minuten in 1x PBS von der Kryomatrix befreit.

Pankreata zur Einbettung in Paraffin wurden wie folgt behandelt:

|          |  |
|----------|--|
| 1 Stunde | 0,89% Saline                           |
| 1 Stunde | 30% Ethanol                            |
| 1 Stunde | 60% Ethanol                            |
| 1 Stunde | 90% Ethanol                            |
| 1 Stunde | 100% Ethanol                           |
| 1 Stunde | 100% Isopropanol                       |
| 1 Stunde | 100% Toluol                            |
| 3x 1Tag  | Paraffin (60°C) (Paraplast, McCormick) |

Ausgehärtete Paraffinblöcke wurden bei 4°C gelagert oder es wurden mit Hilfe eines Mikrotoms 8µm (adulte Pankreata) oder 5µm (embryonale Pankreata) dicke Schnitte angefertigt. Zur Entparaffinierung wurden die Schnitte wie folgt behandelt:

|              |                          |
|--------------|--------------------------|
| 3x 3 Minuten | Tissueclear (Tissue-Tek) |
| 2x 5 Minuten | 100% Ethanol             |
| 1x5 Minuten  | 90% Ethanol              |
| 1x5 Minuten  | 60% Ethanol              |
| 1x5 Minuten  | 30% Ethanol              |
| 1x5 Minuten  | H <sub>2</sub> O         |
| 2x5 Minuten  | 1xPBS                    |

#### **4.3.2 Immunfluoreszenzfärbung und verwendete Antikörper**

Die Blockierung unspezifischer Bindestellen sowie Antikörperinkubationen erfolgten in 10%-igem inaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS) in 1xPBS. Gewebeschnitte wurden 60 Minuten mit FCS blockiert. Primärantikörperinkubationen erfolgten bei 4°C über Nacht. Nach 3-maligem waschen in 1x PBS wurden die Schnitte 1 Stunde

bei RT mit Sekundärantikörpern inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte nochmals 3x in 1xPBS gewaschen und schließlich mit DAPI Einbettmedium (Vectashield H-1200) eingedeckelt.

Folgende Primärantikörper wurden verwendet: Kaninchen anti-Brn4 1/200 [zur Verfügung gestellt von A. Ryan (McGill University, Montreal, QC)]; Meerschweinchen anti-Insulin 1/1000 (Dako); Meerschweinchen anti-Insulin 1/1000 (Linco), Meerschweinchen anti-Glucagon 1/1000 (Linco); Kaninchen anti-Somatostatin 1/600 (Dako); Ratte anti-Somatostatin 1/200 (Millipore); Kaninchen anti-Pankreatisches Polypeptid, 1/200 (Linco); Maus anti-Ghrelin 1/1500 [zur Verfügung gestellt von C. Tomasetto (Université Louis Pasteur, Strasbourg, France)]; Ziege anti-Ghrelin 1/50 (Santa Cruz), Kaninchen anti-Ghrelin 1/1000 (Millipore), Kaninchen anti-Amylin 1/300 (Phoenix Pharmaceuticals); Kaninchen anti-Nkx6.1 1/3000; Kaninchen anti-Pdx1 1/1000 [zur Verfügung gestellt von C. Wright (Vanderbilt University, Nashville, TN)]; Kaninchen anti-Pax6 1/1000 (Covance); Kaninchen anti-Pax4 1/1000 [zur Verfügung gestellt von B. Sosa-Pineda (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN)], Kaninchen anti-PC1/3 1/500 (Millipore) und Kaninchen anti-Arx 1/250.

Folgende Sekundärantikörper (Invitrogen) wurden in einer Verdünnung von 1/1000 eingesetzt: 594-Alexa anti-Maus; 488-Alexa anti-Maus, 594-Alexa anti-Kaninchen; 488-Alexa anti-Kaninchen; 594-Alexa anti-Meerschweinchen; 488-Alexa anti-Meerschweinchen; 594-Alexa anti-Ziege und 488-Alexa anti-Ziege. Bilder wurden entweder mit einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX60) oder einem konfokalem Mikroskop (Leica TCS) aufgenommen.

#### **4.4 Morphometrische und statistische Analysen**

Um die Anzahl Arx<sup>+</sup> Zellen in E16.5 Pankreata von Wildtypen, *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> und *Pax6*<sup>-/-</sup> Mäusen zu bestimmen wurden die Gewebe geschnitten (5um) und von jedem achten Schnitt die Anzahl Arx<sup>+</sup> Zellen bestimmt (Abb. 5)

Um die prozentualen Anteile an Co-positiven Zellen zu bestimmen (Arx<sup>+</sup>/Glucagon<sup>+</sup>, Brn4<sup>+</sup>/Ghrelin<sup>+</sup>, Arx<sup>+</sup>/Ghrelin<sup>+</sup>, Insulin<sup>+</sup>/Ghrelin<sup>+</sup>, Pdx1<sup>+</sup>/Ghrelin<sup>+</sup>, iAPP<sup>+</sup>/Ghrelin<sup>+</sup>

und PC1/3<sup>+</sup>/Ghrelin<sup>+</sup>) wurden 10 repräsentative Mikroskopfelder (pro Pankreas, n=3) ausgezählt (Abb. 5,6).

Zur Quantifizierung der hormon-exprimierenden Zellen in Pankreata von Wildtypen, *Nkx2.2<sup>-/-</sup>/Arx<sup>-</sup>* Einzel- und Doppelmutanten wurden P0 Pankreata seriell geschnitten (8µm), und jeder zwölfte Schnitt (10 Schnitte/Pankreas) gegen Insulin, Glucagon/Ghrelin oder Somatostatin/Ghrelin gefärbt. Von jedem Schnitt wurden nicht-überlappende Bilder aufgenommen bei 10-facher Vergrößerung und gleicher Belichtungszeit. Die totale Pankreasfläche und die fluoreszierende Fläche wurden mittels der Histogramm- und Farbbereich- Funktionen in Adobe Photoshop bestimmt. Resultate sind als fluoreszierende Fläche pro Pankreasfläche angegeben (Abb. 9).

Zur Ermittlung der Somatostatin<sup>+</sup>, Glucagon<sup>+</sup> oder PP<sup>+</sup> Zellen in Wildtypen, induzierten und nicht-induzierten *ArxER/Arx<sup>-</sup>* Tieren wurden ganze Pankreata (E14.5, E16.5 und E18.5) geschnitten (5µm) und ausgezählt (Abb. 19).

Bei allen Quantifizierungen wurden 3 Pankreata pro Genotyp ausgewertet. Zur statistischen Analyse wurde ein einfaktorier ANOVA gekoppelt mit einem Newman-Keuls Test angewendet. p-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Die Fehlerbalken repräsentieren jeweils den Standardfehler des arithmetischen Mittels.

## 5. Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1: Morphologie des Pankreas.....  | 2  |
| Abbildung 2: Definierung der pankreatischen Anlage durch mesodermal/endodermale Interaktionen. ....   | 6  |
| Abbildung 3: Kompartimentalisierung des pankreatischen Epitheliums.....   | 7  |
| Abbildung 4: Schematische Darstellung der Transkriptionsfaktoren die in der Spezifizierung und Aufrechterhaltung pankreatischer Zelltypen involviert sind. ....                                     | 17 |
| Abbildung 5: Expression von Arx und Brn4 in E16.5 Pankreata von Wildtyp, <i>Nkx2.2</i> - und <i>Pax6</i> -Nullmutanten. ....  | 23 |
| Abbildung 6: Co-Detektion von Ghrelin und Insulin, iAPP, PC1/3 oder iAPP in E17.5 Pankreata von Wildtypen sowie <i>Nkx2.2</i> - und <i>Pax6</i> -Nullmutanten. ....                                 | 26 |
| Abbildung 7: Verpaarungsschema zur Generierung von <i>Nkx2.2<sup>-/-</sup>Arx<sup>-/-</sup></i> Doppelmutanten. ....  | 27 |
| Abbildung 8: Expression endokriner Hormone in Pankreata von neugeborenen Wildtyp, <i>Nkx2.2<sup>-/-</sup>Arx<sup>-/-</sup></i> Einfach- und Doppelmutanten. ....                                    | 29 |
| Abbildung 9: Kombinierte Ghrelin- und Somatostatin-Immunfluoreszenzdetektion in Pankreata neugeborener Wildtypen und <i>Nkx2.2<sup>-/-</sup>Arx<sup>-/-</sup></i> Einfach- und Doppelmutanten. .... | 30 |
| Abbildung 10: Expression von Pdx1, iAPP und Pax6 in Pankreata von Wildtyp und <i>Nkx2.2<sup>-/-</sup>Arx<sup>-/-</sup></i> Mäusen. ....   | 32 |
| Abbildung 11: Expression von Pax4 in E16.5 Pankrata von Wildtypen, <i>Nkx2.2<sup>-/-</sup>Arx<sup>-/-</sup></i> Einfach- und Doppelmutanten. ....   | 34 |
| Abbildung 12: Abnehmende Expression von Nkx6.1 in der Abwesenheit von <i>Nkx2.2</i> . ....  | 35 |
| Abbildung 13: Expressionsanalyse transgener Pankreata.....  | 37 |
| Abbildung 14: Expression von Arx in transgenen Pankreata. ....  | 38 |
| Abbildung 15: Nukleäre Translokation des ArxER-Fusionsproteins nach Tamoxifeninjektion.....   | 39 |
| Abbildung 16: Verpaarungsschema zur Einkreuzung von ArxER in einen <i>Arx</i> -defizienten Hintergrund. ....  | 40 |
| Abbildung 17: Aktivierung von ArxER in <i>Arx</i> -defizienten Pankreata.....   | 41 |

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 18: Quantifizierung hormon-exprimierender Zellen in Wildtypen, induzierten und nicht-induzierten ArxER/ <i>Arx</i> <sup>-</sup> Pankreata. .... | 43 |
| Abbildung 19: Charakterisierung Glucagon- und PP-exprimierender Zellen. ....  | 45 |
| Abbildung 20: Darstellung der einzelnen Rekombinationsschritte zur Herstellung des <i>Pax4</i> -Targeting-Konstrukts.....                                 | 48 |
| Abbildung 21: EcoR1 und Spe1-Restriktionsverdau des fertigen <i>Pax4</i> -Targeting-Konstrukts. ....  | 49 |
| Abbildung 22: Southern Blot-Analyse mutanter ES-Zell Klone. ....  | 50 |
| Abbildung 23: Genotypisierung konditionaler <i>Pax4</i> -Mausmutanten mittels PCR.....  | 51 |
| Abbildung 24: Verpaarungsschema zur Generierung von Pax4-Nullmutanten. ....   | 52 |
| Abbildung 25: Genotypisierung von CMV-Cre Pax4CKO Tieren.....   | 53 |
| Abbildung 26: Expression von Pax4 und Pax6 in E14.5 Pankreata von Kontrolltieren und konditionalen <i>Pax4</i> -Nullmutanten. ....                        | 54 |
| Abbildung 27: Hormonexpression in P1 Pankreata neugeborener CMV-Cre Pax4 <sup>-lacZ</sup> Mutanten. ....  | 55 |
| Abbildung 28: Expression endokriner Hormone nach InsCre-vermittelter <i>Pax4</i> -Inaktivierung. ....   | 56 |
| Abbildung 29: Expression von Beta-Zell spezifischen Markern in P42 Pankreata von InsCre Pax4 <sup>-lacZ</sup> Mutanten. ....                              | 57 |

## 6. Literatur

- ADRIAN, T. E., BLOOM, S. R., HERMANSEN, K. & IVERSEN, J. 1978. Pancreatic polypeptide, glucagon and insulin secretion from the isolated perfused canine pancreas. *Diabetologia*, 14, 413-7.
- AHLGREN, U., JONSSON, J., JONSSON, L., SIMU, K. & 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, 1763-8.
- AHLGREN, U., PFAFF, S. L., JESSELL, T. M., EDLUND, T. & EDLUND, H. 1997. Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature*, 385, 257-60.
- ANDERSEN, F. G., HELLER, R. S., PETERSEN, H. V., JENSEN, J., MADSEN, O. D. & SERUP, P. 1999a. Pax6 and Cdx2/3 form a functional complex on the rat glucagon gene promoter G1-element. *FEBS Lett*, 445, 306-10.
- ANDERSEN, F. G., JENSEN, J., HELLER, R. S., PETERSEN, H. V., LARSSON, L. I., MADSEN, O. D. & SERUP, P. 1999b. Pax6 and Pdx1 form a functional complex on the rat somatostatin gene upstream enhancer. *FEBS Lett*, 445, 315-20.
- ARTNER, I., LE LAY, J., HANG, Y., ELGHAZI, L., SCHISLER, J. C., HENDERSON, E., SOSA-PINEDA, B. & STEIN, R. 2006. MafB: an activator of the glucagon gene expressed in developing islet alpha- and beta-cells. *Diabetes*, 55, 297-304.
- ASHERY-PADAN, R., ZHOU, X., MARQUARDT, T., HERRERA, P., TOUBE, L., BERRY, A. & GRUSS, P. 2004. Conditional inactivation of Pax6 in the pancreas causes early onset of diabetes. *Dev Biol*, 269, 479-88.
- BAUDIN, A., OZIER-KALOGEROPOULOS, O., DENOUEL, A., LACROUTE, F. & CULLIN, C. 1993. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 21, 3329-30.
- BAYHA, E., JORGENSEN, M. C., SERUP, P. & GRAPIN-BOTTON, A. 2009. Retinoic acid signaling organizes endodermal organ specification along the entire antero-posterior axis. *PLoS One*, 4, e5845.



- BORT, R., MARTINEZ-BARBERA, J. P., BEDDINGTON, R. S. & ZARET, K. S. 2004. Hex homeobox gene-dependent tissue positioning is required for organogenesis of the ventral pancreas. *Development*, 131, 797-806.
- BRUN, T., FRANKLIN, I., ST-ONGE, L., BIASON-LAUBER, A., SCHOENLE, E. J., WOLLHEIM, C. B. & GAUTHIER, B. R. 2004. The diabetes-linked transcription factor PAX4 promotes {beta}-cell proliferation and survival in rat and human islets. *J Cell Biol*, 167, 1123-35.
- BRUN, T. & GAUTHIER, B. R. 2008. A focus on the role of Pax4 in mature pancreatic islet beta-cell expansion and survival in health and disease. *J Mol Endocrinol*, 40, 37-45.
- CHAO, C. S., LOOMIS, Z. L., LEE, J. E. & SUSSEL, L. 2007. Genetic identification of a novel NeuroD1 function in the early differentiation of islet alpha, PP and epsilon cells. *Dev Biol*, 312, 523-32.
- COLLOMBAT, P., HECKSHER-SORENSEN, J., BROCCOLI, V., KRULL, J., PONTE, I., MUNDIGER, T., SMITH, J., GRUSS, P., SERUP, P. & MANSOURI, A. 2005. The simultaneous loss of Arx and Pax4 genes promotes a somatostatin-producing cell fate specification at the expense of the alpha- and beta-cell lineages in the mouse endocrine pancreas. *Development*, 132, 2969-80.
- COLLOMBAT, P., HECKSHER-SORENSEN, J., KRULL, J., BERGER, J., RIEDEL, D., HERRERA, P. L., SERUP, P. & MANSOURI, A. 2007. Embryonic endocrine pancreas and mature beta cells acquire alpha and PP cell phenotypes upon Arx misexpression. *J Clin Invest*, 117, 961-70.
- COLLOMBAT, P., MANSOURI, A., HECKSHER-SORENSEN, J., SERUP, P., KRULL, J., GRADWOHL, G. & GRUSS, P. 2003. Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. *Genes Dev*, 17, 2591-603.
- COLLOMBAT, P., XU, X., RAVASSARD, P., SOSA-PINEDA, B., DUSSAUD, S., BILLESTRUP, N., MADSEN, O. D., SERUP, P., HEIMBERG, H. & MANSOURI, A. 2009. The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently beta cells. *Cell*, 138, 449-62.
- COPELAND, N. G., JENKINS, N. A. & COURT, D. L. 2001. Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat Rev Genet*, 2, 769-79.

- CSABA, Z. & DOURNAUD, P. 2001. Cellular biology of somatostatin receptors. *Neuropeptides*, 35, 1-23.
- DESGRAZ, R. & HERRERA, P. L. 2009. Pancreatic neurogenin 3-expressing cells are unipotent islet precursors. *Development*, 136, 3567-74.
- DESSIMOZ, J., OPOKA, R., KORDICH, J. J., GRAPIN-BOTTON, A. & WELLS, J. M. 2006. FGF signaling is necessary for establishing gut tube domains along the anterior-posterior axis in vivo. *Mech Dev*, 123, 42-55.
- DEUTSCH, G., JUNG, J., ZHENG, M., LORA, J. & ZARET, K. S. 2001. A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development*, 128, 871-81.
- DEZAKI, K., KAKEI, M. & YADA, T. 2008. Ghrelin suppresses insulin release via G alpha(i2)-mediated modulation of Kv channels and Ca<sup>2+</sup> signaling in islet beta-cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 106, 89p-89p.
- DEZAKI, K., SONE, H. & YADA, T. 2006. Ghrelin attenuates glucose-induced insulin release in an autocrine/paracrine manner in pancreatic islets. *Diabetologia*, 49, 304-305.
- DOYLE, M. J., LOOMIS, Z. L. & SUSSEL, L. 2007. Nkx2.2-repressor activity is sufficient to specify alpha-cells and a small number of beta-cells in the pancreatic islet. *Development*, 134, 515-23.
- DOYLE, M. J. & SUSSEL, L. 2007. Nkx2.2 regulates beta-cell function in the mature islet. *Diabetes*, 56, 1999-2007.
- ESNI, F., JOHANSSON, B. R., RADICE, G. L. & SEMB, H. 2001. Dorsal pancreas agenesis in N-cadherin- deficient mice. *Dev Biol*, 238, 202-12.
- FURUKAWA, T., KOZAK, C. A. & CEPKO, C. L. 1997. rax, a novel paired-type homeobox gene, shows expression in the anterior neural fold and developing retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 3088-93.
- GANNON, M., GAMER, L. W. & WRIGHT, C. V. 2001. Regulatory regions driving developmental and tissue-specific expression of the essential pancreatic gene pdx1. *Dev Biol*, 238, 185-201.
- GANNON, M., RAY, M. K., VAN ZEE, K., RAUSA, F., COSTA, R. H. & WRIGHT, C. V. 2000. Persistent expression of HNF6 in islet endocrine cells causes disrupted islet architecture and loss of beta cell function. *Development*, 127, 2883-95.

- GERRISH, K., CISSELL, M. A. & STEIN, R. 2001. The role of hepatic nuclear factor 1 alpha and PDX-1 in transcriptional regulation of the pdx-1 gene. *J Biol Chem*, 276, 47775-84.
- GERRISH, K., VAN VELKINBURGH, J. C. & STEIN, R. 2004. Conserved transcriptional regulatory domains of the pdx-1 gene. *Mol Endocrinol*, 18, 533-48.
- GOUZI, M., KIM, Y. H., KATSUMOTO, K., JOHANSSON, K. & GRAPIN-BOTTON, A. 2011. Neurogenin3 initiates stepwise delamination of differentiating endocrine cells during pancreas development. *Dev Dyn*, 240, 589-604.
- GRADWOHL, G., DIERICH, A., LEMEUR, M. & 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, 1607-11.
- GUNEY, M. A. & GANNON, M. 2009. Pancreas cell fate. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 87, 232-48.
- HEBROK, M., KIM, S. K. & MELTON, D. A. 1998. Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev*, 12, 1705-13.
- HELLER, R. S., JENNY, M., COLLOMBAT, P., MANSOURI, A., TOMASETTO, C., MADSEN, O. D., MELLITZER, G., GRADWOHL, G. & SERUP, P. 2005. Genetic determinants of pancreatic epsilon-cell development. *Dev Biol*, 286, 217-24.
- HEREMANS, Y., VAN DE CASTEELE, M., IN'T VELD, P., GRADWOHL, G., SERUP, P., MADSEN, O., PIPELEERS, D. & HEIMBERG, H. 2002. Recapitulation of embryonic neuroendocrine differentiation in adult human pancreatic duct cells expressing neurogenin 3. *J Cell Biol*, 159, 303-12.
- HERRERA, P. L., HUARTE, J., SANVITO, F., MEDA, P., ORCI, L. & VASSALLI, J. D. 1991. Embryogenesis of the murine endocrine pancreas; early expression of pancreatic polypeptide gene. *Development*, 113, 1257-65.
- HILL, M. E., ASA, S. L. & DRUCKER, D. J. 1999. Essential requirement for Pax6 in control of enteroendocrine proglucagon gene transcription. *Mol Endocrinol*, 13, 1474-86.
- HUSSAIN, M. A., LEE, J., MILLER, C. P. & HABENER, J. F. 1997. POU domain transcription factor brain 4 confers pancreatic alpha-cell-specific expression of

- the proglucagon gene through interaction with a novel proximal promoter G1 element. *Mol Cell Biol*, 17, 7186-94.
- HUSSAIN, M. A., MILLER, C. P. & HABENER, J. F. 2002. Brn-4 transcription factor expression targeted to the early developing mouse pancreas induces ectopic glucagon gene expression in insulin-producing beta cells. *J Biol Chem*, 277, 16028-32.
- JACQUEMIN, P., YOSHITOMI, H., KASHIMA, Y., ROUSSEAU, G. G., LEMAIGRE, F. P. & ZARET, K. S. 2006. An endothelial-mesenchymal relay pathway regulates early phases of pancreas development. *Dev Biol*, 290, 189-99.
- JENSEN, J., HELLER, R. S., FUNDER-NIELSEN, T., PEDERSEN, E. E., LINDSELL, C., WEINMASTER, G., MADSEN, O. D. & SERUP, P. 2000a. 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, 163-76.
- JENSEN, J., PEDERSEN, E. E., GALANTE, P., HALD, J., HELLER, R. S., ISHIBASHI, M., KAGEYAMA, R., GUILLEMOT, F., SERUP, P. & MADSEN, O. D. 2000b. Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nat Genet*, 24, 36-44.
- JOHANSSON, K. A., DURSUN, U., JORDAN, N., GU, G., BEERMANN, F., GRADWOHL, G. & GRAPIN-BOTTON, A. 2007. Temporal control of neurogenin3 activity in pancreas progenitors reveals competence windows for the generation of different endocrine cell types. *Dev Cell*, 12, 457-65.
- JONSSON, J., CARLSSON, L., EDLUND, T. & EDLUND, H. 1994. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature*, 371, 606-9.
- JORNS, A., TIEDGE, M., SICKEL, E. & LENZEN, S. 1996. Loss of GLUT2 glucose transporter expression in pancreatic beta cells from diabetic Chinese hamsters. *Virchows Arch*, 428, 177-85.
- KATAOKA, K., SHIODA, S., ANDO, K., SAKAGAMI, K., HANDA, H. & YASUDA, K. 2004. Differentially expressed Maf family transcription factors, c-Maf and MafA, activate glucagon and insulin gene expression in pancreatic islet alpha- and beta-cells. *J Mol Endocrinol*, 32, 9-20.

- KIM, Y. W., PARK, Y. K., LEE, S., PARK, J. H., LEE, S. M., HONG, S. W., LEE, J. & YANG, M. H. 1997. Pancreatic endocrine tumor admixed with a diffuse microcystic adenoma--a case report. *J Korean Med Sci*, 12, 469-72.
- KOJIMA, H., FUJIMIYA, M., MATSUMURA, K., YOUNAN, P., IMAEDA, H., MAEDA, M. & CHAN, L. 2003. NeuroD-betacellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice. *Nat Med*, 9, 596-603.
- KRAPP, A., KNOFLER, M., FRUTIGER, S., HUGHES, G. J., HAGENBUCHLE, O. & WELLAUER, P. K. 1996. The p48 DNA-binding subunit of transcription factor PTF1 is a new exocrine pancreas-specific basic helix-loop-helix protein. *Embo J*, 15, 4317-29.
- KRAPP, A., KNOFLER, M., LEDERMANN, B., BURKI, K., BERNEY, C., ZOERKLER, N., HAGENBUCHLE, O. & WELLAUER, P. K. 1998. The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes Dev*, 12, 3752-63.
- KUMAR, M., JORDAN, N., MELTON, D. & GRAPIN-BOTTON, A. 2003. Signals from lateral plate mesoderm instruct endoderm toward a pancreatic fate. *Dev Biol*, 259, 109-22.
- LAMMERT, E., CLEAVER, O. & MELTON, D. 2001. Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science*, 294, 564-7.
- LARSSON, L. I., ST-ONGE, L., HOUGAARD, D. M., SOSA-PINEDA, B. & GRUSS, P. 1998. Pax 4 and 6 regulate gastrointestinal endocrine cell development. *Mech Dev*, 79, 153-9.
- LEE, E. C., YU, D., MARTINEZ DE VELASCO, J., TESSAROLLO, L., SWING, D. A., COURT, D. L., JENKINS, N. A. & COPELAND, N. G. 2001. A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics*, 73, 56-65.
- LEONARD, J., PEERS, B., JOHNSON, T., FERRERI, K., LEE, S. & MONTMINY, M. R. 1993. Characterization of somatostatin transactivating factor-1, a novel homeobox factor that stimulates somatostatin expression in pancreatic islet cells. *Mol Endocrinol*, 7, 1275-83.

- LIU, P., JENKINS, N. A. & COPELAND, N. G. 2003. A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome Res*, 13, 476-84.
- MARSHAK, S., BENSHUSHAN, E., SHOSHKES, M., HAVIN, L., CERASI, E. & MELLOUL, D. 2000. Functional conservation of regulatory elements in the *pdx-1* gene: PDX-1 and hepatocyte nuclear factor 3beta transcription factors mediate beta-cell-specific expression. *Mol Cell Biol*, 20, 7583-90.
- MARTIN, M., GALLEGU-LLAMAS, J., RIBES, V., KEDINGER, M., NIEDERREITHER, K., CHAMBON, P., DOLLE, P. & GRADWOHL, G. 2005. Dorsal pancreas agenesis in retinoic acid-deficient *Raldh2* mutant mice. *Dev Biol*, 284, 399-411.
- MATSUOKA, T. A., ARTNER, I., HENDERSON, E., MEANS, A., SANDER, M. & STEIN, R. 2004. The MafA transcription factor appears to be responsible for tissue-specific expression of insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 2930-3.
- MCKENZIE, O., PONTE, I., MANGELSDORF, M., FINNIS, M., COLASANTE, G., SHOUBRIDGE, C., STIFANI, S., GECZ, J. & BROCCOLI, V. 2007. *Aristaless*-related homeobox gene, the gene responsible for West syndrome and related disorders, is a Groucho/transducin-like enhancer of split dependent transcriptional repressor. *Neuroscience*, 146, 236-47.
- MILLER, C. P., MCGEHEE, R. E., JR. & 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, 1145-56.
- MILLER, K., KIM, A., KILIMNIK, G., JO, J., MOKA, U., PERIWAL, V. & HARA, M. 2009. Islet formation during the neonatal development in mice. *PLoS One*, 4, e7739.
- MUYRERS, J. P., ZHANG, Y. & STEWART, A. F. 2001. Techniques: Recombineering--new options for cloning and manipulating DNA. *Trends Biochem Sci*, 26, 325-31.
- NAYA, F. J., HUANG, H. P., QIU, Y., MUTOH, H., DEMAYO, F. J., LEITER, A. B. & TSAI, M. J. 1997. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in *BETA2/neuroD*-deficient mice. *Genes Dev*, 11, 2323-34.
- NISHIMURA, W., KONDO, T., SALAMEH, T., EL KHATTABI, I., DODGE, R., BONNER-WEIR, S. & SHARMA, A. 2006. A switch from MafB to MafA

- expression accompanies differentiation to pancreatic beta-cells. *Dev Biol*, 293, 526-39.
- OBATA, J., YANO, M., MIMURA, H., GOTO, T., NAKAYAMA, R., MIBU, Y., OKA, C. & KAWAICHI, M. 2001. p48 subunit of mouse PTF1 binds to RBP-Jkappa/CBF-1, the intracellular mediator of Notch signalling, and is expressed in the neural tube of early stage embryos. *Genes Cells*, 6, 345-60.
- OFFIELD, M. F., JETTON, T. L., LABOSKY, P. A., RAY, M., STEIN, R. W., MAGNUSON, M. A., HOGAN, B. L. & WRIGHT, C. V. 1996. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development*, 122, 983-95.
- OHLSSON, H., KARLSSON, K. & EDLUND, T. 1993. IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *Embo J*, 12, 4251-9.
- OHLSSON, H., THOR, S. & EDLUND, T. 1991. Novel insulin promoter- and enhancer-binding proteins that discriminate between pancreatic alpha- and beta-cells. *Mol Endocrinol*, 5, 897-904.
- PAN, F. C. & WRIGHT, C. 2011. Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland. *Dev Dyn*, 240, 530-65.
- PICTET, R. L., CLARK, W. R., WILLIAMS, R. H. & RUTTER, W. J. 1972. An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas. *Dev Biol*, 29, 436-67.
- PIN, C. L., RUKSTALIS, J. M., JOHNSON, C. & KONIECZNY, S. F. 2001. The bHLH transcription factor Mist1 is required to maintain exocrine pancreas cell organization and acinar cell identity. *J Cell Biol*, 155, 519-30.
- PITTNER, R. A., ALBRANDT, K., BEAUMONT, K., GAETA, L. S., KODA, J. E., MOORE, C. X., RITTENHOUSE, J. & RINK, T. J. 1994. Molecular physiology of amylin. *J Cell Biochem*, 55 Suppl, 19-28.
- PRADO, C. L., PUGH-BERNARD, A. E., ELGHAZI, L., SOSA-PINEDA, B. & SUSSEL, L. 2004. Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 2924-9.
- RATH, M. F., BAILEY, M. J., KIM, J. S., COON, S. L., KLEIN, D. C. & MOLLER, M. 2009a. Developmental and daily expression of the Pax4 and Pax6 homeobox genes in the rat retina: localization of Pax4 in photoreceptor cells. *J Neurochem*, 108, 285-94.

- RATH, M. F., BAILEY, M. J., KIM, J. S., HO, A. K., GAILDRAT, P., COON, S. L., MOLLER, M. & KLEIN, D. C. 2009b. Developmental and diurnal dynamics of Pax4 expression in the mammalian pineal gland: nocturnal down-regulation is mediated by adrenergic-cyclic adenosine 3',5'-monophosphate signaling. *Endocrinology*, 150, 803-11.
- RAUM, J. C., GERRISH, K., ARTNER, I., HENDERSON, E., GUO, M., SUSSEL, L., SCHISLER, J. C., NEWGARD, C. B. & STEIN, R. 2006. FoxA2, Nkx2.2, and PDX-1 regulate islet beta-cell-specific mafA expression through conserved sequences located between base pairs -8118 and -7750 upstream from the transcription start site. *Molecular and Cellular Biology*, 26, 5735-43.
- RONCORONI, L., VIOLI, V., MONTANARI, M. & MURI, M. 1983. Effect of somatostatin on exocrine pancreas evaluated on a total external pancreatic fistula of neoplastic origin. *Am J Gastroenterol*, 78, 425-8.
- ROSSI, J. M., DUNN, N. R., HOGAN, B. L. & ZARET, K. S. 2001. Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev*, 15, 1998-2009.
- SAMARAS, S. E., CISELL, M. A., GERRISH, K., WRIGHT, C. V. E., GANNON, M. & STEIN, R. 2002. Conserved sequences in a tissue-specific regulatory region of the pdx-1 gene mediate transcription in pancreatic beta cells: Role for hepatocyte nuclear factor 3 beta and Pax6. *Molecular and Cellular Biology*, 22, 4702-4713.
- SAMARAS, S. E., ZHAO, L., MEANS, A., HENDERSON, E., MATSUOKA, T. & STEIN, R. 2003. The islet beta cell-enriched RIPE3b1/Maf transcription factor regulates pdx-1 expression. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 12263-12270.
- SANDER, M., NEUBUSER, A., KALAMARAS, J., EE, H. C., MARTIN, G. R. & GERMAN, M. S. 1997. Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. *Genes Dev*, 11, 1662-73.
- SANDER, M., SUSSEL, L., CONNERS, J., SCHEEL, D., KALAMARAS, J., DELA CRUZ, F., SCHWITZGEBEL, V., HAYES-JORDAN, A. & GERMAN, M. 2000. Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas. *Development*, 127, 5533-40.



- SEUFERT, D. W., PRESCOTT, N. L. & EL-HODIRI, H. M. 2004. *Xenopus* aristaless-related homeobox (xARX) gene product functions as both a transcriptional activator and repressor in forebrain development. *Dev Dyn*, 21, 21.
- SEYMOUR, P. A., FREUDE, K. K., TRAN, M. N., MAYES, E. E., JENSEN, J., KIST, R., SCHERER, G. & SANDER, M. 2007. SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 1865-70.
- SLACK, J. M. 1995. Developmental biology of the pancreas. *Development*, 121, 1569-80.
- SMITH, S. B., WATADA, H., SCHEEL, D. W., MREJEN, C. & GERMAN, M. S. 2000. Autoregulation and maturity onset diabetes of the young transcription factors control the human PAX4 promoter. *J Biol Chem*, 275, 36910-9.
- ST-ONGE, L., SOSA-PINEDA, B., CHOWDHURY, K., MANSOURI, A. & GRUSS, P. 1997. Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas. *Nature*, 387, 406-9.
- STAFFORD, D., WHITE, R. J., KINKEL, M. D., LINVILLE, A., SCHILLING, T. F. & PRINCE, V. E. 2006. Retinoids signal directly to zebrafish endoderm to specify insulin-expressing beta-cells. *Development*, 133, 949-56.
- STAHL, F. W. 1998. Recombination in phage lambda: one geneticist's historical perspective. *Gene*, 223, 95-102.
- SUSSEL, L., KALAMARAS, J., HARTIGAN-O'CONNOR, D. J., MENESES, J. J., PEDERSEN, R. A., RUBENSTEIN, J. L. & GERMAN, M. S. 1998. Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells. *Development*, 125, 2213-21.
- TEITELMAN, G. 1993. On the origin of pancreatic endocrine cells, proliferation and neoplastic transformation. *Tumour Biol*, 14, 167-73.
- UPCHURCH, B. H., APONTE, G. W. & 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, 245-52.
- VILLASENOR, A., CHONG, D. C., HENKEMEYER, M. & CLEAVER, O. 2010. Epithelial dynamics of pancreatic branching morphogenesis. *Development*, 137, 4295-305.

- WANG, J., ELGHAZI, L., PARKER, S. E., KIZILOCAK, H., ASANO, M., SUSSEL, L. & SOSA-PINEDA, B. 2004. The concerted activities of Pax4 and Nkx2.2 are essential to initiate pancreatic beta-cell differentiation. *Dev Biol*, 266, 178-89.
- WANG, Q., ELGHAZI, L., MARTIN, S., MARTINS, I., SRINIVASAN, R. S., GENG, X., SLEEMAN, M., COLLOMBAT, P., HOUGHTON, J. & SOSA-PINEDA, B. 2008. Ghrelin is a novel target of Pax4 in endocrine progenitors of the pancreas and duodenum. *Dev Dyn*, 237, 51-61.
- WANG, S., JENSEN, J. N., SEYMOUR, P. A., HSU, W., DOR, Y., SANDER, M., MAGNUSON, M. A., SERUP, P. & GU, G. 2009. Sustained Neurog3 expression in hormone-expressing islet cells is required for endocrine maturation and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 9715-20.
- WARMING, S., COSTANTINO, N., COURT, D. L., JENKINS, N. A. & COPELAND, N. G. 2005. Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. *Nucleic Acids Res*, 33, e36.
- WESSELLS, N. K. & COHEN, J. H. 1967. Early pancreas organogenesis: morphogenesis, tissue interactions and mas effects. *Dev. Biol.*, 15, 237-270.
- WIERUP, N., SVENSSON, H., MULDER, H. & SUNDLER, F. 2002. The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept*, 107, 63-9.
- YOSHITOMI, H. & ZARET, K. S. 2004. Endothelial cell interactions initiate dorsal pancreas development by selectively inducing the transcription factor Ptf1a. *Development*, 131, 807-17.
- YU, D., ELLIS, H. M., LEE, E. C., JENKINS, N. A., COPELAND, N. G. & COURT, D. L. 2000. An efficient recombination system for chromosome engineering in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5978-83.
- ZHANG, Y., BUCHHOLZ, F., MUYRERS, J. P. & STEWART, A. F. 1998. A new logic for DNA engineering using recombination in Escherichia coli. *Nat Genet*, 20, 123-8.
- ZHAO, L., GUO, M., MATSUOKA, T. A., HAGMAN, D. K., PARAZZOLI, S. D., POITOUT, V. & STEIN, R. 2005. The islet beta cell-enriched MafA activator is a key regulator of insulin gene transcription. *J Biol Chem*, 280, 11887-94.

- ZHOU, Q., LAW, A. C., RAJAGOPAL, J., ANDERSON, W. J., GRAY, P. A. & MELTON, D. A. 2007. A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis. *Dev Cell*, 13, 103-14.
- ZHU, X., ORCI, L., CARROLL, R., NORRBOM, C., RAVAZZOLA, M. & STEINER, D. F. 2002. Severe block in processing of proinsulin to insulin accompanied by elevation of des-64,65 proinsulin intermediates in islets of mice lacking prohormone convertase 1/3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 10299-304.

**Webadressen:**

[www.espace-svt.ac-rennes.fr](http://www.espace-svt.ac-rennes.fr)

## 7. Zusammenfassung

Die Bauchspeicheldrüse lässt sich gemäß ihrer funktionalen Eigenschaften in zwei Kompartimente unterteilen: Exokrine Zellen zur Produktion von Verdauungsenzymen und endokrine Zellen zur Produktion Blutzucker-regulierender Hormone. Endokrine Zellen aggregieren typischerweise in kugelförmigen Anordnungen, den Langerhans'schen Inseln, die im exokrinen Gewebe eingebettet sind. Es werden fünf endokrine Zelltypen aufgrund ihrer Hormonproduktion unterschieden: Beta-Zellen, Alpha-, Delta-, PP- und Epsilon-Zellen welche Insulin, Glucagon, Somatostatin, Pankreatisches Polypeptid bzw. Ghrelin produzieren.

Die Differenzierung pankreatischer Vorläuferzellen in diese fünf Zelltypen unterliegt der Steuerung durch diverse Transkriptionsfaktoren.

Knockout- und Überexpressions-Studien haben offenbart, dass der Transkriptionsfaktor *Arx* für die Ausbildung Glucagon-produzierender Alpha-Zellen essenziell ist. *Arx*-Knockout Mäuse entwickeln keine Alpha-Zellen wohingegen die Populationen der Beta- und Delta-Zellen vergrößert ist (Collombat et al., 2003). Die Überexpression von *Arx* in pankreatischen Vorläufern resultiert in einer Zunahme von Alpha- aber auch PP-Zellen auf Kosten der Beta- und Delta-Zellpopulation (Collombat et al., 2007). In *Nkx2.2*-Knockout-Mäusen sind die Beta- und Alpha-Zell Populationen stark reduziert, wohingegen ein Ghrelin-exprimierender Zelltyp dominiert. Interessanterweise sind in *Nkx2.2*-defizienten Pankreata fünf-fach erhöhte *Arx*-Transkriptmengen zu detektieren (Sussel et al., 1998, Chao et al., 2007). Daraus ergab sich die Frage nach der funktionellen Verbindung von *Nkx2.2* und *Arx*. Detaillierte Analysen der Pankreata von Wildtypen, *Nkx2.2*<sup>-/-</sup> / *Arx*<sup>-</sup> Einfach- und Doppelmутanten, lassen den Schluss zu, dass die synergistische Aktivität von *Nkx2.2* und *Arx* zur Entwicklung der Alpha-Zellen notwendig ist. Im Gegensatz dazu erscheint *Nkx2.2* in entstehenden Beta-Zellen involviert in die Suppression von *Arx*.

Wie bereits angesprochen resultiert die Überexpression von *Arx* in pankreatischen Vorläufern in der Bildung zahlreicher Glucagon- aber auch PP-exprimierender Zellen (Collombat et al., 2007). Daraus ergaben sich die Fragen ob (1.) *Arx* ausreichend ist um diese Differenzierungsprogramme zu aktivieren und (2.) in welchem spatio-temporalen Kontext diese Programme initiiert werden. Zur Beantwortung dieser Fragen wurde eine transgene Linie erzeugt, mit Hilfe derer ein chemisch

induzierbares ArxER-Fusionsprotein in pankreatischen Vorläuferzellen *Arx*-defizienter Tiere aktiviert werden konnte. Die Aktivierung von ArxER zu frühen Stadien der Pankreatogenese resultierte dabei in der vornehmlichen Bildung Glucagon<sup>+</sup> Zellen wohingegen die Aktivierung ab Embryonaltag 13.5 zusätzlich in der Bildung zahlreicher PP<sup>+</sup> Zellen resultiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass Arx ausreichend ist um diese Differenzierungsprogramme zu aktivieren.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Funktion des Transkriptionsfaktors Pax4 in Beta-Zellen adulter Mäuse. Mehrere Studien offenbarten, dass *Pax4* zur Bildung der Beta-Zellen essenziell ist. In *Pax4*-Knockout-Tieren ist die Entwicklung von Beta-Zellen fast vollständig verhindert (Sosa-Pineda et al., 1997). Aufgrund der daraus resultierenden frühen Letalität dieser Mutanten (2 Tage nach der Geburt) blieb jedoch offen ob *Pax4* auch in reifen Beta-Zellen adulter Tiere eine Funktion zukommt. Zur Beantwortung dieser Frage wurde eine konditionale *Pax4*-Knockout Linie erzeugt. Die Beta-Zell spezifische Deletion von *Pax4* mit Hilfe einer Insulin-Cre Linie führte zu keiner offensichtlichen Beeinträchtigung normaler Beta-Zellfunktionen in der Maus. Diese Ergebnisse zeigen, dass *Pax4* zwar maßgeblich an der Spezifizierung endokriner Vorläufer in Richtung eines Beta-Zellschicksals beteiligt ist, aber mit beginnender Insulin-Produktion redundant wird.

## 8. Publikationen

KORDOWICH, S., MANSOURI, A. & COLLOMBAT, P. 2010. Reprogramming into pancreatic endocrine cells based on developmental cues. (Review) *Mol Cell Endocrinol*, 323, 62-9.

KORDOWICH, S., COLLOMBAT, P., MANSOURI A. & SERUP, P. 2011. *Arx* and *Nkx2.2* compound deficiency redirects pancreatic alpha- and beta-cell differentiation to a *somatostatin/ghrelin* co-expressing cell lineage. Manuskript eingereicht bei BMC *Developmental Biology*.

## 9. Curriculum Vitae

Dipl. Ing. (FH) Simon Kordowich  
Ulmenweg 4  
37077 Göttingen  
Simon\_Kordowich@gmx.li

Geburtsdatum: 09.06.1980  
Geburtsort: 66564 Ottweiler  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Ausbildung

- 10/2008 - 7/2011 Promotion am Max Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen, Abtlg. Prof. Gruss, AG Prof. Mansouri. Thema: Funktionelle Charakterisierung der Transkriptionsfaktoren Nkx2.2 und Arx in der Entwicklung der endokrinen Zellen im murinen Pankreas.
- 1/2008 – 9/2011 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen, Abtlg. Prof. Gruss, AG Prof. Mansouri.
- 9/2003 - 7/2007 Studium der Bioingenieurwissenschaften an der FH Aachen mit den Schwerpunkten Gentechnik, Zellkulturtechnik & Downstream-Processing.  
Abschluss: Diplom-Ingenieur (FH)
- 7/2001-7/2003 Rheinische Akademie Köln  
Abschluss: Biologisch technischer Assistent

### Praktika

- 10/2006 - 6/2007 Praxissemester & Diplomarbeit bei EVOTEC Neuroscience GmbH in Hamburg. Thema: Charakterisierung von monoklonalen und polyklonalen Antikörpern gegen BACE1, einer für die Alzheimererkrankung relevanten Protease.
- 1+2/2003 Max Planck-Institut für experimentelle Neurologie in Köln

**Tätigkeit neben dem Studium**

3/2004 – 11/2005      Studentische Hilfskraft bei agroisolab GmbH in Jülich

**Publikationen**

KORDOWICH, S., MANSOURI, A. & COLLOMBAT, P. 2010. Reprogramming into pancreatic endocrine cells based on developmental cues. (Review) *Mol Cell Endocrinol*, 323, 62-9.

KORDOWICH, S., COLLOMBAT, P., MANSOURI A. & SERUP, P. 2011. *Arx* and *Nkx2.2* compound deficiency redirects pancreatic alpha- and beta-cell differentiation to a *somatostatin/ghrelin* co-expressing cell lineage. Manuskript eingereicht bei BMC *Developmental Biology*.



## 10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich bei allen Bedanken die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Ahmed Mansouri insbesondere für die unkomplizierte Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Ich bedanke mich für die Überlassung des interessanten Themas, das geschenkte Vertrauen und die vielfältigen Anregungen.

I'm profoundly grateful to Patrick Collombat for teaching me what science is. Without his advice and constant support this work would not exist.

Herzlichen Dank an Prof. Ernst Wimmer für die Bereitschaft diese Arbeit zu betreuen sowie an die Mitglieder der Prüfungskommission Prof. Anastasia Stoykova, Dr. Annette Borchers, Prof. Detlef Doenecke und Prof. Reinhard Schuh.

I wish to thank Prof. Palle Serup for helpful discussions, for the critical reading of my manuscript and for the financial support.

Sigurd Hille danke ich für die stes schnelle Sequenzierung von sehr vielen Plasmiden. Danke an Sharif Mahsur für die Stammzell-Elektroporation und die Selektion von über 600 Klonen. Uli Franke danke ich für die Durchführung der Stammzell-Aggregationen und für diverse Vorkerninjektionen.

Silvia Schrötter, Vanessa Böning und Sandra Otte danke ich für die Pflege unzähliger Mauslinien und für die angenehme und vorallem unkomplizierte Zusammenarbeit.

Bojka und Ela danke ich dafür, dass immer alles an seinem Platz war.

Ich bedanke mich herzlich für die moralische und praktische Unterstützung im Laboralltag, für die stete Bereitstellung von Nahrungsmitteln wenss mal wieder später wurde, für geliehene Zigaretten, anregende Diskussionen, diverse

## DANKSAGUNG

---

Korrekturlesungen, für die Lösung von IT-Problemen, sportliche Wettkämpfe und schöne gemeinsame Abende, in unsortierter Reihenfolge bei:

Thomas, Christian, Mei-Chih, Tamara, Alex, Marco, Vanessa, Sven

Ich danke meinen Eltern und Geschwistern für jegliche Art der Unterstützung und die konstanten Ermutigungen.