

**Die Funktion von Nkx6-Transkriptionsfaktoren
in der Entwicklung des Pankreas von
Mus musculus (LINNEAUS, 1758)**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg**

**vorgelegt von
Korinna Henseleit
aus Wilhelmshaven**

**Hamburg
September 2003**

Referentin: PD Dr. S. Hoffmeister-Ullerich

Koreferent: Prof. Dr. Lothar Renwrantz

Tag der Disputation: 24.10.03

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Priv.-Doz Dr. S. HOFFMEISTER-ULLERICH
Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. L. RENWRANTZ

Tag der Disputation: 24. Oktober 2003

Hamburg, den 10. Oktober 2003



Professor Dr. A. Frühwald
Dekan

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Bau und Funktion des Pankreas	4
1.2 Die Entwicklung des Pankreas der Maus	5
1.3 Molekulare Grundlagen der Pankreasentwicklung	8
1.3.1 Die Induktion des Pankreas	9
1.3.2 Die Spezifizierung der endokrinen und exokrinen Zelllinie	11
1.3.3 Die Differenzierung der verschiedenen endokrinen Zelltypen	13
1.3.4 Die Nkx6-Transkriptionsfaktoren	17
2 Ergebnisse.....	20
2.1 Identifizierung von Nkx6.1 Zielgenen durch Gen-Chip-Analyse	20
2.2 Expression von Nkx6.2 im embryonalen Pankreas der Maus	25
2.2.1 Analyse der Nkx6.2-Expression durch β -Galaktosidase (lacZ) Färbung.....	26
2.2.2 Immunhistochemischer Nachweis der Nkx6.2-Expression in der Pankreasanlage	27
2.3 Analyse der Nkx6.2-Expression in Nkx6.1-mutanten Mäusen.....	31
2.4 Die Funktion von Nkx6.2 für die Pankreasentwicklung der Maus	33
2.4.1 Untersuchung der Pankreasentwicklung in Nkx6.2-mutanten Mäusen	34
2.4.2 Expression von Nkx6.1 im Pankreas Nkx6.2-mutanter Mäuse.....	36
2.5 Analyse der Pankreasentwicklung von Nkx6.1/Nkx6.2-doppelt mutanten Mäusen	37
2.5.1 Immunhistochemische Untersuchung der Pankreasentwicklung Nkx6.1/Nkx6.2-mutanter Mäuse.....	38
2.5.2 Untersuchung der Ngn3-Expression in Nkx6.1/Nkx6.2-doppelt mutanten Mäusen.....	43
3 Diskussion.....	45
3.1 Die Funktion von Nkx6-Genen für die Entwicklung endokriner Zellen	46
3.2 Die Regulation von Nkx6.2 durch Nkx6.1	51
3.3 Die Redundanz von Nkx6-Faktoren bei der endokrinen Zellentwicklung der Maus	53
3.4 Die Rolle von Genduplikationen in der Evolution	56
3.5 Potenzielle Zielgene für Nkx6.1	58
4 Material	60
4.1 Bezugsquellen häufig verwendeter Substanzen	60
4.2 Zusammensetzung gebräuchlicher Medien und Lösungen	61
4.3 Verwendete Sonden für <i>in situ</i> Hybridisierung.....	62
4.4 Verwendete Mäusestämme	62
4.4.1 Nkx6.1xC57BL/6J und Nkx6.1xNMRI	62

4.4.2	Nkx6.2xC57BL/6J.....	62
4.4.3	Nkx6.1xNkx6.2xC57/BL6J und Nkx6.1xNkx6.2xNMRI	63
4.5	Verwendete Bakterienstämme.....	63
4.6	Für Klonierungen verwendete Basisvektoren	63
4.7	Verwendete Plasmide	64
4.8	Verwendete Oligonukleotide	64
4.9	Verwendete Antikörper.....	65
4.9.1	Primäre Antikörper	65
4.9.2	Sekundäre Antikörper	66
5	Methoden	67
5.1	Herstellung und Aufbereitung von DNS-Fragmenten.....	67
5.1.1	Spaltung von DNS durch Restriktionsendonukleasen.....	67
5.1.2	Auftrennung von DNS-Molekülen im Agarosegel	67
5.1.3	Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen.....	67
5.1.4	Bestimmung von DNS- und RNS-Konzentrationen	68
5.1.5	Modifikation von DNS-Enden.....	68
5.1.5.1	Dephosphorylierung von 5'-Enden	68
5.1.5.2	Auffüllen überhängender 5'-Enden.....	68
5.1.6	Herstellung von DNS-Fragmenten mittels "Polymerase Chain Reaction" (PCR)	69
5.2	Klonierung von DNS-Fragmenten.....	69
5.2.1	Präparation von Vektoren	69
5.2.2	Ligation von DNS-Fragmenten mit Vektoren	70
5.2.3	Klonierung von PCR-Fragmenten	70
5.2.4	Herstellung kompetenter Bakterienzellen	70
5.2.5	Transformation von Bakterienzellen.....	71
5.2.6	Sequenzierung von DNS	71
5.3	Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren	72
5.3.1	Isolierung von Plasmid-DNS durch Maxipräparation.....	72
5.3.2	Isolierung von Plasmid-DNS in analytischem Maßstab (Minipräparation)	72
5.3.3	Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenolextraktion und Ethanol-fällung.....	73
5.3.4	Isolierung von genomischer DNS aus Schwanzspitzen	73
5.3.5	Isolierung von genomischer DNS aus embryonalem Gewebe	74
5.3.6	Herstellung von RNS aus Gewebe.....	75
5.4	Identifizierung von DNS-Fragmenten durch Hybridisierung	76
5.4.1	DNS-Transfer von Agarose-Gelen auf Membranen (Southern blot)	76
5.4.2	Hybridisierung von DNS nach Transfer auf Membranen.....	76
5.4.3	Herstellung radioaktiver DNS Proben	77
5.5	Herstellung von Proteinextrakten aus Gewebe	77
5.6	Proteinanalytische Methoden.....	78
5.6.1	Proteinbestimmung nach Bradford.....	78
5.6.2	Bestimmung des Hormongehaltes in Pankreasextrakten durch RIA (radioimmunoassay).....	78
5.7	In situ Hybridisierung auf Gewebeschnitten.....	79
5.7.1	In situ Hybridisierung mittels Digoxigenin (DIG) markierter RNS Sonden.....	79
5.7.1.1	Synthese von DIG markierten RNS-Sonden durch <i>in vitro</i> Transkription.....	79
5.7.1.2	Hybridisierung auf Gewebeschnitten und Signaldetektion.....	80
5.7.2	In situ Hybridisierung mittels S ³⁵ -markierter Sonde	80
5.7.2.1	Synthese einer S ³⁵ - markierten RNS Sonde durch <i>in vitro</i> Transkription.....	80

5.7.2.2	Hybridisierung auf Gewebeschnitten und Signaldetektion.....	81
5.8	Immunfluoreszenz Färbungen.....	82
5.9	Fixierung und Weiterverarbeitung von Embryonen.....	83
5.9.1	Herstellung von Gefrierschnitten	83
5.9.2	Herstellung von Paraffinschnitten.....	84
5.10	Zellzahlbestimmung.....	84
5.11	β-Galaktosidase Bestimmung auf ganzen Embryonen und Gewebe	85
5.12	Identifizierung differenziell exprimierter Gene mittels Gen-Chip-Analyse	85
5.12.1	Präparation von RNS	86
5.12.2	<i>In vitro</i> Transkription zur Herstellung Biotin markierter cRNS Sonde	86
5.12.3	Fragmentierung der cRNS.....	87
5.12.4	Hybridisierung der Genchips mit biotinylierter cRNS, Färbung und Signaldetektion.....	88
5.12.5	Datenanalyse.....	88
6	Anhang.....	89
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	89
6.1.1	Allgemeine Abkürzungen.....	89
6.1.2	Abkürzungen von Substanzen und Puffern	90
6.1.3	Spezielle Abkürzungen	90
6.2	Liste der verwendeten Oligonukleotide	91
7	Literaturverzeichnis	92

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Gene identifiziert werden, die bei der Entwicklung der Insulin produzierenden β -Zellen des Pankreas eine Rolle spielen. In vorhergehenden Studien konnte durch gezielte Mutation in Mäusen der Homöodomänen-Transkriptionsfaktor Nkx6.1 als essentiell für die Entwicklung der β -Zellen identifiziert werden. Nkx6.1 wirkt als transkriptioneller Repressor, die Zielgene von Nkx6.1 während der β -Zelldifferenzierung sind jedoch unbekannt. Um die Funktion von Nkx6.1 für die Entwicklung der β -Zellen besser verstehen zu können, sollten im Rahmen dieser Arbeit Faktoren identifiziert werden, welche an der Regulation der β -Zellentwicklung stromabwärts von Nkx6.1 beteiligt sind.

Zunächst wurde eine Gen-Chip-Analyse durchgeführt, mittels derer die RNS-Expressionsprofile im Pankreas von Wildtyp und Nkx6.1-mutanten Mäusen am Embryonaltag (E) 13.5 erstellt und miteinander verglichen wurden. Hierdurch sollten Gene identifiziert werden, die zu Beginn der β -Zellentwicklung in Wildtyp und Nkx6.1-Mutanten differenziell exprimiert werden. Dabei zeigte sich, dass der zu Nkx6.1 homologe Transkriptionsfaktor Nkx6.2 im Pankreas Nkx6.1-mutanter Mäuse induziert vorlag. Dieses Ergebnis deutete an, dass Nkx6.2 während der Pankreasentwicklung durch Nkx6.1 reprimiert wird. Da das Expressionsmuster von Nkx6.2 im Pankreas der Maus vor Beginn dieser Studie noch nicht untersucht worden war, wurden im Folgenden mit Hilfe spezifischer Antikörper immunhistochemische Untersuchungen auf embryonalem Pankreasgewebe von Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Während Nkx6.1 in endokrinen Vorläufern und β -Zellen nachweisbar ist, zeigten die Untersuchungen, dass Nkx6.2 im Wildtyp in einigen Glukagon produzierenden α -Zellen und exokrinen Zellen exprimiert wird. Im Einklang mit diesen Befunden zeigte der direkte Vergleich der Expression von Nkx6.1 und Nkx6.2 im embryonalen Pankreas, dass die beiden Transkriptionsfaktoren in der frühen Pankreasknospe koexprimiert werden, zu späteren Entwicklungsstadien aber überwiegend komplementäre Expressionsdomänen aufweisen. Um die Ergebnisse der Gen-Chip-Analyse auf Ebene der Proteinexpression zu verifizieren, wurde im Folgenden die Expression von Nkx6.2 auf Schnitten durch die Pankreasanlage von Wildtyp und

Nkx6.1-mutanten Mäusen mit einem Anti-Nkx6.2 Antikörper untersucht. Hierbei zeigte sich, dass mit Beginn der endokrinen Differenzierung die Anzahl Nkx6.2 exprimierender Zellen in der Pankreasanlage der Nkx6.1-Mutanten gegenüber dem Wildtyp erhöht war. Dies deutete darauf hin, dass ektopisch exprimiertes Nkx6.2 in diesen Mutanten den Verlust von Nkx6.1 teilweise kompensieren könnte. Um dies direkt zu testen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Nkx6.1/Nkx6.2-doppelt mutante Mäuse hergestellt. Anschließend wurde die pankreatische Differenzierung der Nkx6.1/Nkx6.2-Doppelmutanten im Vergleich zu Nkx6.1- und Nkx6.2-Einfachmutanten untersucht. Im Gegensatz zu Nkx6.1-Einfachmutanten, die eine Reduktion der β -Zellen aufweisen, entwickelt sich der Pankreas bei Nkx6.2-Mutanten komplett normal. Im Gegensatz dazu wiesen die Nkx6.1/Nkx6.2-Doppelmutanten Defekte auf, die bei keiner der beiden Einfachmutanten nachweisbar waren. Es konnte eine Reduktion der α -Zellen, sowie im Vergleich zu Nkx6.1-Einfachmutanten eine weitere Reduktion der β -Zellen festgestellt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der frühen Vorläuferzellen, aus denen sich alle vier endokrinen Zelltypen entwickeln, in den Nkx6.1/Nkx6.2-doppelt mutanten Mäusen unverändert ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass Nkx6.1 und Nkx6.2 teilweise redundante Funktionen für die Differenzierung der α - und β -Zellen des Pankreas besitzen. Die Redundanz beruht dabei auf einer Derepression von Nkx6.2 in Abwesenheit von Nkx6.1. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass für die Differenzierung von sowohl α - als auch β -Zellen aus endokrinen Vorläuferzellen Nkx6-Aktivität benötigt wird.

1 Einleitung

Die Bauchspeicheldrüse (Pankreas) ist aus einer Reihe von unterschiedlichen Zelltypen zusammengesetzt und spielt eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung wichtiger Stoffwechselprozesse. Die β -Zellen des endokrinen Pankreas sind die Hauptproduzenten des Hormons Insulin. Die Zerstörung der β -Zellen oder Defekte in der Insulinproduktion sind unter anderem Ursachen für Diabetes mellitus, welcher inzwischen weltweit eine der häufigsten Stoffwechselerkrankungen darstellt. Um die Grundlagen der β -Zellpathogenese besser verstehen und eventuell die β -Zellfunktionen ersetzen zu können, ist es erforderlich, die Mechanismen der β -Zellentwicklung aufzuklären. Die Bildung der unterschiedlichen Zelltypen des Pankreas aus multipotenten Vorläufern wird durch ein komplexes Netzwerk von Transkriptionsfaktoren gesteuert, welche die Genexpression der Zellen in koordinierter Weise regulieren. Für einige Transkriptionsfaktoren konnte bereits gezeigt werden, dass sie eine Rolle bei der Pankreasentwicklung spielen, die genauen Mechanismen der Regulation sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Ziel zukünftiger Studien ist daher die Aufschlüsselung der molekularen Vorgänge, die zur Bildung differenzierter Zelltypen des Pankreas führen. Der nachfolgende Abschnitt soll zunächst einen Einblick in den Bau und die Funktion des adulten Pankreas geben. Im Anschluss soll auf die molekularen Grundlagen der Pankreasentwicklung eingegangen werden. Hierbei sollen vor allem Transkriptionsfaktoren vorgestellt werden, für die eine Funktion bei der Pankreasentwicklung nachgewiesen wurde. Da die Funktionen der Transkriptionsfaktoren Nkx6.1 und Nkx6.2 für die Differenzierung der endokrinen Zellen des Pankreas im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, werden diese Faktoren abschließend gesondert vorgestellt.

1.1 Bau und Funktion des Pankreas

Das Pankreas erwachsener Säugetiere ist mit dem Magen und der oberen Duodenalschleife assoziiert. Im reifen Pankreas von Menschen werden von proximal nach distal Pankreaskopf, Pankreaskörper und Pankreasschwanz unterschieden, in Mäusen ist die Form jedoch weniger abgrenzbar (Slack, 1995). Das Pankreas besteht aus morphologisch und funktionell unterschiedlichen Zellpopulationen (Abb. 1.1A,B). Das exokrine Pankreas, welches die azinären Zellen und die Gangzellen umfasst, bildet etwa 95-99% der gesamten Pankreasmasse. Die azinären Zellen produzieren verschiedene Verdauungsenzyme wie z.B. Amylasen, Proteasen und Lipasen, welche über ein verzweigtes Kanalsystem (Gänge) in den Verdauungstrakt abgegeben werden. In das exokrine Pankreas sind endokrine Zellgruppen eingelagert, die als Langerhanssche Inseln bezeichnet werden. Das endokrine Pankreas synthetisiert Hormone, die über das Blut zu den Zielorganen transportiert werden und dort wichtige Stoffwechselprozesse regulieren. Es existieren insgesamt vier verschiedene endokrine Zelltypen, die gemäß ihrer Hormonproduktion unterschieden werden können (Abb. 1.1B). Die größte Population stellen die Insulin produzierenden β -Zellen dar, welche bei Menschen und auch bei Mäusen den Kern der Langerhansschen Inseln bilden. Weitere Zelltypen sind die Glukagon produzierenden α -Zellen, die Somatostatin produzierenden δ -Zellen sowie die Pankreatisches Polypeptid produzierenden Zellen. Wie in Abbildung 1.1B gezeigt, sind die drei letztgenannten Zellpopulationen in der Peripherie der Insel angeordnet (Pictet et al., 1972). Das meistgebildete Hormon ist das Insulin, welches zusammen mit seinem Antagonisten Glukagon den Blutzuckerspiegel reguliert. Neben den glandulären Komponenten ist das Pankreas reich an Gefäßen und Muskeln, sowie an sympathischen und parasympathischen Nerven, welche an der Regulation der Hormonfreisetzung maßgeblich beteiligt sind (Slack, 1995).

Störungen in der Insulinproduktion oder Signaltransduktion können zu einem pathologischen Zustand führen, der als Diabetes mellitus bezeichnet wird. Abhängig vom auslösenden Mechanismus kann beim Diabetes mellitus der Typ I vom Typ II unterschieden werden. Diabetes mellitus Typ I tritt vorwiegend bei Kindern und Jugendlichen auf und ist auf einen autoimmun bedingten Verlust der β -Zellen zurückzuführen. Beim Diabetes mellitus Typ II liegt eine Insulinresistenz der Zielzellen vor, welche unterschiedliche Ursachen haben kann (Saltiel, 2001).

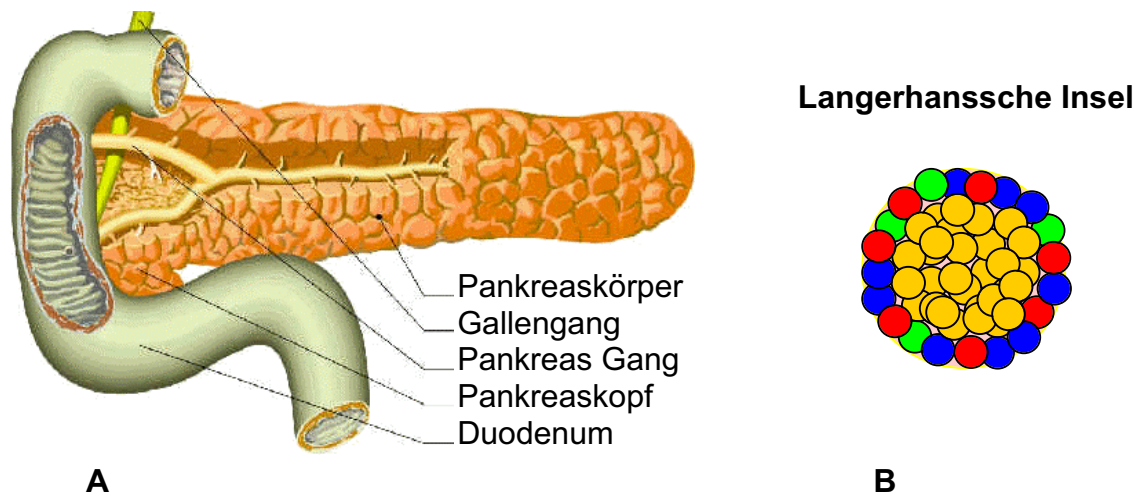


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des adulten Pankreas von Säugetieren

A: Übersichtsabbildung des humanen Pankreas. Den überwiegenden Teil der Pankreasmasse (95-99%) bilden die exokrinen Zellen, welche verschiedene Enzyme wie Proteasen, Lipasen und Nukleasen produzieren, die über das pankreatische Gangsystem in den Verdauungstrakt abgegeben werden. In das exokrine Pankreas sind die endokrinen Langerhansschen Inseln eingebettet. B: Schematischer Aufbau der Langerhansschen Inseln. Den Kern der Insel bilden die Insulin produzierenden β -Zellen (gelb), während die drei weiteren endokrinen Zelltypen ringförmig in der Peripherie angeordnet sind. Dabei handelt es sich um die Glukagon produzierenden α -Zellen (blau), die Somatostatin produzierenden δ -Zellen (rot) und die Pankreatisches Polypeptid produzierenden Zellen (grün).

1.2 Die Entwicklung des Pankreas der Maus

Das Pankreas entwickelt sich aus zwei getrennten Anlagen; der dorsalen und der ventralen Pankreasknospe, die durch Ausstülpung des Endoderms im Bereich der zukünftigen Duodenalschleife gebildet werden (Abb. 1.2). Die dorsale Pankreasknospe ist bei der Maus am Embryonaltag (E) 9.5 erkennbar, während die ventrale Pankreasknospe erst einen Tag später auswächst. Beide Anlagen wachsen nach der Rotation des embryonalen Darms zwischen E16.5 und E17.5 zusammen (Pictet and Rutter, 1972).

Die frühen Pankreasknospen bestehen aus einer Population multipotenter epithelialer Zellen, welche im Laufe der Embryonalentwicklung zu endokrinen und exokrinen sowie zu Zellen der pankreatischen Gänge differenzieren. Im Zuge des Wachstums der Pankreasknospen kommt es zu einer fortschreitenden Verzweigung

des Epithels. Dieser Prozess wird durch Signale induziert, welche vom umliegenden Mesenchym abgegeben werden (Wessells and Cohen, 1967).

Die vier Zelltypen der Langerhansschen Inseln gehen durch weitere Differenzierungsvorgänge aus einem gemeinsamen endokrinen Vorläufer hervor (Gu, 2002). Erste Hormon produzierende Zellen sind bereits am E10.5 in der dorsalen Pankreasknospe nachweisbar. Während ausgereifte endokrine Zellen nur ein spezifisches Hormon produzieren, weisen diese frühen endokrinen Zellen eine Koexpression von Insulin und Glukagon auf (Alpert et al., 1988; Teitelman et al., 1993; Upchurch et al., 1994). Vielfach bestand die Annahme, dass es sich bei diesen frühen Hormonzellen um Vorläufer der reifen α - und β -Zellen handelt (Teitelman et al., 1993). Inzwischen ist dieses Modell jedoch widerlegt. Durch sogenannte „knock-in“-Experimente in Mäusen konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen endokrinen Zellen nicht um Vorläufer ausgereifter β -Zellen handelt und dass der Bildung früher endokriner Zellen andere Mechanismen als der Bildung reifer endokriner Zellen zugrunde liegen (Herrera, 2000). Die Mehrzahl voll differenzierter α -Zellen wird beginnend mit E12.5 infolge einer massiven Differenzierungswelle gebildet. Dieser Prozess setzt bei den β -Zellen erst am E13.5 ein. Erste Somatostatin exprimierende δ -Zellen sowie exokrine Zellen sind am E14.5 nachweisbar, während differenzierte PP (Pankreatisches Polypeptid)-Zellen erst in der letzten Phase der Embryonalentwicklung beginnend mit E17.5 in der Pankreasanlage nachgewiesen werden können (Herrera et al., 1991). Die Zellen des endokrinen Pankreas werden zunächst vereinzelt im Pankreasepithel gebildet und Langerhanssche Inseln sind in der Maus nicht vor E18.5 nachweisbar (Herrera et al., 1991). Die molekularen Mechanismen der Inselbildung sind bisher nicht genau aufgeklärt. Es gibt aber experimentelle Hinweise auf eine Funktion von Cadherinen und CAMs (Cadherin Associated Molecules) bei der Aggregation und Organisation der endokrinen Zellen (Cirulli, 1994; Dahl, 1996; Esni F., 2001).

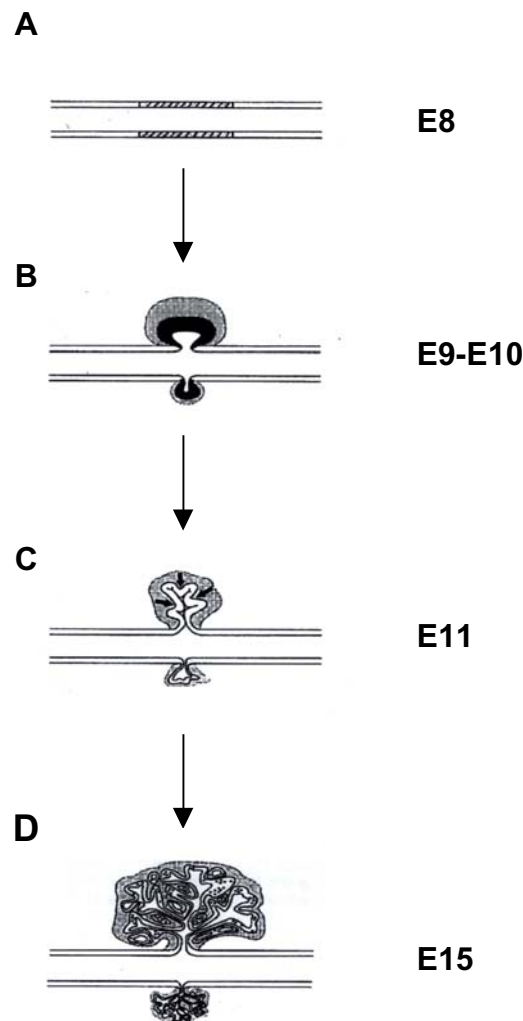


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Pankreasmorphogenese

A: Bereits am Embryonaltag (E) 8.5 ist die Region des Endoderms im Bereich der oberen Duodenalschleife als präpankreatisch spezifiziert. B: Durch Ausstülpung des dorsalen Endoderms bildet sich am E9.5 die dorsale Pankreasknospe, am E10.5 die ventrale Pankreasknospe aus. C-D: Infolge von epithelio-mesenchymalen Wechselwirkungen wachsen die Pankreasknospen aus. Dieser Prozess geht mit einer fortschreitenden Verzweigung des Pankreasepithels einher. Am E15 sind bereits zahlreiche differenzierte endokrine Zellen im Epithel nachweisbar. (Abb. modifiziert nach: H.Edlund, 1998)

1.3 Molekulare Grundlagen der Pankreasentwicklung

Die molekularen Mechanismen der Pankreasentwicklung wurden in zahlreichen Studien untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass epithelio-mesenchymale Interaktionen für das Wachstum, die Morphogenese und die ordnungsgemäße Differenzierung des Pankreas benötigt werden (Golosow and Grobstein, 1962; Pictet and Rutter, 1972; Wessells and Cohen, 1967). Die extrazellulären Mechanismen, welche diese Prozesse steuern, sind bisher nicht genau bekannt. Allerdings scheint eine Vielzahl löslicher oder Membran gebundener Signalfaktoren bei der Pankreasentwicklung eine Rolle zu spielen. Hierzu gehören unter anderem Mitglieder der Hedgehog-(HH) (Hebrok et al., 1998), der Epidermal Growth Factor (EGF)- (Cras-Meneur, 2001; Miettinen, 2000), sowie der Transforming Growth Factor β (TGF- β)-Familie und der TGF-Superfamilie (Deutsch, 2001; Le Bras, 1998; Miralles et al., 1998). An der Bildung endokriner Zellen sind außerdem Faktoren der Notch-Signaltransduktionskaskade beteiligt (Apelqvist et al., 1999; Jensen et al., 2000b). Die Bindung löslicher Faktoren an membrangebundene Rezeptoren führt über intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden zur Expression Zelltyp-spezifischer Transkriptionsfaktoren. In den letzten Jahren konnten eine Reihe von Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, welche für die Differenzierung des Pankreas benötigt werden (Edlund, 1998; Edlund, 2001; Wilson, 2003). Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die spezifische DNS-Bindungsmotive besitzen, mit Hilfe derer sie an Sequenzen in der regulatorischen Region von Zielgenen binden können. Zusätzlich zur DNS-Bindungsdomäne können Transkriptionsfaktoren Protein-Protein Interaktionsdomänen besitzen, über die sie beispielsweise mit Faktoren des basalen Transkriptionsapparates in Kontakt treten und somit die Gewebe-spezifische Expression von Genen negativ oder positiv regulieren. Transkriptionsfaktoren werden gemäß der Struktur ihrer DNS-Bindungsdomäne sowie weiterer funktioneller Domänen klassifiziert und verschiedenen Familien zugeordnet. Die wichtigsten Transkriptionsfaktor-Familien sind die basischen Helix-loop-Helix-Proteine, Zink-Finger-Proteine und Homöodomänen-Proteine (Nelson, 1995).

Im folgenden Abschnitt soll zusammengefasst werden, welche Erkenntnisse über die an der Pankreasentwicklung beteiligten Faktoren bisher gewonnen werden konnten. Dabei soll vor allem auf die Funktion von Transkriptionsfaktoren bei der Pankreasentwicklung eingegangen werden.

1.3.1 Die Induktion des Pankreas

Die Induktion des Pankreas erfolgt bereits vor Erscheinen der Pankreasknospen durch eine regionale Spezifizierung des Endoderms. Die dorsale und die ventrale Knospe werden durch unterschiedliche Mechanismen angelegt. Das dorsale Endoderm steht zum Zeitpunkt der Spezifizierung des Pankreas mit der darüber liegenden Chorda dorsalis in Kontakt (Kim and Hebrok, 2001). Untersuchungen von Mäusen und Hühnern weisen darauf hin, dass Signalmoleküle, die von der Chorda dorsalis sekretiert werden, an der Spezifizierung der dorsalen Pankreasanlage beteiligt sind. Diese Faktoren induzieren die Repression von Sonic Hedgehog (SHH) im präpankreatischen Endoderm (Hebrok et al., 1998; Kim et al., 2000). SHH ist ein sekretiertes Protein der Hedgehog Familie und wird im übrigen embryonalen Darm entlang der antero-posterioren Achse exprimiert (Apelqvist et al., 1997; Bitgood, 1995). Die Repression von SHH ist Voraussetzung für die ordnungsgemäße Spezifizierung und Entwicklung des Pankreas. Die ektopische Expression von SHH in der Pankreasanlage von Hühnern und Mäusen führt zu einem Verlust der Expression pankreatischer Gene und einer Transformation des Pankreasmesenchyms in Darmmesenchym (Apelqvist et al., 1997; Hebrok et al., 1998). Die Identität der von der Chorda dorsalis sezernierten Faktoren, welche an der Repression von SHH im dorsalen Endoderm beteiligt sind, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es gibt jedoch experimentelle Hinweise darauf, dass die Signalmoleküle Aktivin β B und FGF2 den Ausschluss von SHH im dorsalen Endoderm vermitteln könnten (Hebrok et al., 1998; Hebrok et al., 2000; Kim et al., 2000).

Da das ventrale Endoderm nicht mit der Chorda dorsalis in Kontakt steht, muss in diesem Fall ein anderer Mechanismus der Spezifizierung des präpankreatischen Endoderms zugrunde liegen. Es existieren experimentelle Hinweise darauf, dass das ventrale Pankreas und die benachbarte Leber aus gemeinsamen Vorläufern des Endoderms hervorgehen, die zunächst kein SHH exprimieren. Es wird angenommen, dass die Expression von SHH im prähepatischen Endoderm durch extrazelluläre Signale aktiviert und dadurch die Pankreasbildung in diesem Bereich verhindert wird. Bei der Spezifizierung von ventraler Pankreasanlage und Leberanlage spielen wahrscheinlich FGF- und BMP-Signale, die von der benachbarten Herzanlage sezerniert werden, eine Rolle (Deutsch, 2001; Rossi, 2001).

Infolge der Repression von SHH in spezifischen Regionen des embryonalen Darms wird die Expression des Parahox-Faktors Pdx1 induziert. Pdx1 kann beginnend mit E8.5 im präpankreatischen Endoderm nachgewiesen werden und ist bis E13.5 in nahezu allen Epithelzellen der dorsalen und ventralen Pankreasanlage sowie dem Duodenum und dem antralen Magen exprimiert (Ahlgren et al., 1996; Guz et al., 1995; Miller et al., 1994; Ohlsson et al., 1993). Mäuse, in welchen das Pdx1-Gen durch homologe Rekombination inaktiviert wurde, sind apankreatisch und sterben am Tag 3 nach der Geburt (Ahlgren et al., 1996; Jonsson et al., 1994; Offield et al., 1996). Allerdings ist in den Mutanten zu frühen Embryonalstadien eine rudimentäre Pankreasanlage nachweisbar, was darauf hindeutet, dass Pdx1 vermutlich nicht für die Spezifizierung endodermaler Vorläufer, sondern für die Ausbildung des Organs benötigt wird. Analog zur Maus wird Pdx1 auch bei Menschen und Fischen für die Entwicklung des Pankreas benötigt. So konnte bei Patienten mit angeborener Pankreasagenese eine homozygote Mutation im Pdx1-Gen identifiziert werden (Stoffers et al., 1997). Ähnliche Defekte können auch bei Zebrafischen nachgewiesen werden, in denen die Expression des Pdx1-Gens durch komplementäre DNS-Oligonukleotide (morpholinos) inhibiert wurde (Yee, 2001).

Aus den Pdx1-positiven Zellen der frühen Pankreasanlage gehen alle pankreatischen Zelltypen hervor (Gu, 2002). Dies konnte durch *in vivo*-Zellmarkierungen mit Hilfe des Cre/loxP Systems in sogenannten „lineage tracing“-Experimenten gezeigt werden (Lewandoski, 2001; Metzger, 1995). Dazu wurde so vorgegangen, dass Mäuse, die das Cre-Rekombinase-Gen unter der Kontrolle des Pdx1-Promotors exprimieren, mit Reportermäusen gekreuzt wurden, welche den histologischen Marker HPAP (Human Placental Alkaline Phosphatase) exprimieren, sobald eine Transkriptions-Terminationssequenz in der Promotorregion des Reporters durch Cre vermittelte Rekombination entfernt wird. Daher exprimieren alle Zellen der doppelt positiven Mäuse, die von frühen Pdx1-positiven Epithelzellen abstammen, die HPAP und können durch eine Farbreaktion markiert werden. Da alle Zellen des adulten Pankreas markiert waren, bestätigte dieses Experiment, dass die Pdx1 exprimierenden Zellen des frühen Pankreasepithels Vorläufer aller pankreatischen Zelltypen sind (Gu, 2002).

1.3.2 Die Spezifizierung der endokrinen und exokrinen Zelllinie

Aus dem Pdx1-positiven Pankreasepithel differenzieren im Verlauf der Entwicklung des Organs die endokrinen, exokrinen und die Gangzellen. Die Spezifizierung der endokrinen Zellen wird durch die Expression von Ngn3 in einer bestimmten Population noch undifferenzierter epithelialer Zellen eingeleitet. Diese Ngn3-Zellen sind mitotisch aktiv und exprimieren noch keine Hormone (Jensen et al., 2000a).

Ngn3 ist das dritte identifizierte Mitglied einer Familie basischer Helix-loop-Helix-Transkriptionsfaktoren, die gemäß ihrer Funktion im zentralen und peripheren Nervensystem als Neurogenine bezeichnet werden (Ma, 1996; Murre et al., 1989; Sommer et al., 1996). Ngn1 und Ngn2 sind dem proneuralen Faktor Atonal aus *Drosophila melanogaster* verwandt und werden für die Entwicklung sensorischer Neurone im peripheren Nervensystem benötigt (Fode, 1998; Ma, 1998; Ma, 1996). Ngn3 wurde in der Maus erstmals in neuronalen Vorläufern in der Ventrikularzone des Rückenmarks sowie in Neuronen des Hypothalamus identifiziert (Cau et al., 1997; Sommer et al., 1996). Im sich entwickelnden Pankreas ist Ngn3 zwischen E11.5 und E18.5 exprimiert (Schwitzgebel, 2000). Wie durch die Analyse Ngn3-mutanter Mäuse gezeigt wurde, wird Ngn3 für die Spezifizierung endokriner Vorläufer benötigt. Bei homozygot Ngn3-mutanten Mäusen lässt sich ein Verlust aller endokrinen Zellen feststellen, während die exokrinen Zellen und Gangzellen normal gebildet werden (Gradwohl et al., 2000). Die ektopische Expression von Ngn3 in der frühen Pankreasanlage hat umgekehrt eine vorzeitige Differenzierung des Epithels zu endokrinen Zellen zur Folge (Schwitzgebel, 2000). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass multipotente epitheliale Zellen der frühen Pankreasanlage durch Ngn3 zu endokrinen Vorläuferzellen spezifiziert werden. Analog zu den für Pdx1 beschriebenen „lineage tracing“-Experimenten konnte in Markierungsstudien auf der Basis des Cre-loxP-Systems nachgewiesen werden, dass alle endokrinen Zelltypen von gemeinsamen Ngn3 exprimierenden Vorläufern abstammen. Die exokrinen- und Gangzellen gehen jedoch aus Ngn3-negativen Vorläufern hervor (Gu, 2002). Die Bildung der Ngn3 exprimierenden endokrinen Vorläufer wird möglicherweise durch einen Mechanismus kontrolliert, der als laterale Inhibition bezeichnet wird (Abb. 1.3). Laterale Inhibition liegt beispielsweise der Bildung von Neuronen aus unspezifizierten Vorläufern des zentralen Nervensystems zugrunde. Dieser Vorgang wird durch den Notch-Signaltransduktionsweg gesteuert. Neuronale Zellen werden zunächst vereinzelt innerhalb einer Region undifferenzierter Vorläufer gebildet

(Lewis, 1996). Diese Zellen sind durch die Expression von Neurogeninen charakterisiert und exprimieren den Notch-Liganden Dll1 (Delta1). Die Bindung von Dll1 an Notch-Rezeptoren der Nachbarzelle führt zur intrazellulären Spaltung des Notch-Rezeptors und infolge dessen zur Aktivierung der Notch-Signaltransduktionskaskade in dieser Zelle. Dies führt über Zwischenschritte unter Mitwirkung des intrazellulären Mediators RBP-J κ zur Expression von Hes (Hairy and Enhancer of Split) Faktoren, welche die Expression proneuronaler Gene, beispielsweise der Neurogenine, reprimieren (Lewis, 1996; Ma, 1998; Ma, 1996).

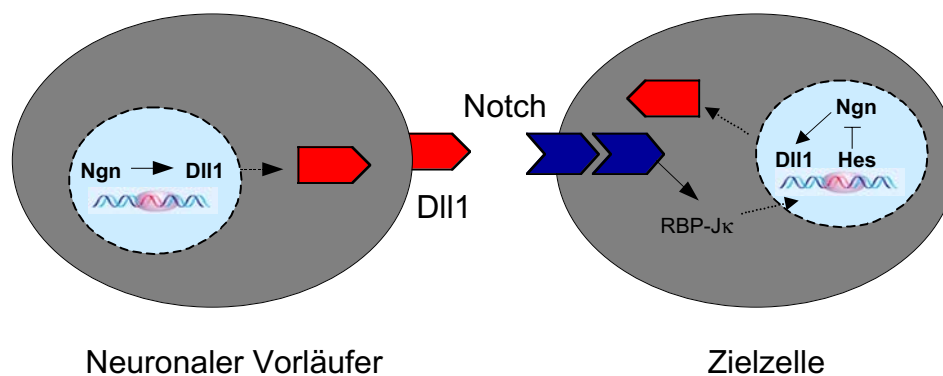


Abb. 1.3: Vereinfachtes Modell der Zellspezifizierung durch laterale Inhibition im Nervensystem

Durch die Expression von Neurogeninen (Ngn) wird eine Vorläuferzelle als neuronale Zelle spezifiziert. Die Neurogenine induzieren in diesen Vorläufern die Expression des Notch-Liganden Delta1 (Dll1), welcher in den extrazellulären Raum abgegeben wird und an den Notch-Rezeptor auf einer Nachbarzelle bindet. Der aktivierte Notchrezeptor löst eine RBK-J κ -vermittelte Signaltransduktionskaskade aus, welche im Zellkern zur Expression von Hes (Hairy and Enhancer of Split) Transkriptionsfaktoren führt. Hes Faktoren reprimieren die Expression neuronaler Gene.

Inzwischen gibt es experimentelle Hinweise darauf, dass der Notch-Signaltransduktionsweg auch bei der Zelldifferenzierung im Pankreas eine Rolle spielt. Bei Mäusen mit einem Defekt im Signalmolekül Dll1 oder im intrazellulären Mediator RBP-J κ kann eine verstärkte und beschleunigte Bildung Ngn3 exprimierender endokriner Zellen beobachtet werden (Apelqvist et al., 1999). Im Einklang damit konnte gezeigt werden, dass die vorzeitige Expression eines konstitutiv aktiven Notch-Rezeptors im Pankreas von Mäusen eine Reduktion der endokrinen und den Verlust der exokrinen Zellen zur Folge hat (Hald, 2003). Diese Befunde weisen darauf hin, dass der Notch-Signaltransduktionsweg die

Differenzierung endokriner und exokriner Zellen aus pankreatischen Vorläuferzellen kontrolliert.

Bisher konnten nur wenige Faktoren identifiziert werden, die bei der Differenzierung der exokrinen Zellen eine Rolle spielen. Die Untersuchungen von Mäusen mit einer homozygoten Mutation in dem Gen, das für den Helix-loop-Helix-Transkriptionsfaktor p48 kodiert, weisen darauf hin, dass dieser Faktor für die Differenzierung exokriner Zellen benötigt wird. Diese Mutanten entwickeln kein exokrines Pankreas, die endokrinen Zellen werden ektopisch im Mesenchym gebildet und sind später in der Milz nachweisbar (Krapp, 1998). P48 ist Teil des PTF-1 Komplexes, welcher die Expression exokriner Gene reguliert (Krapp et al., 1996; Rose, 2001). Bisher ist jedoch ungeklärt, wie p48 die Differenzierung der exokrinen Zellen steuert.

1.3.3 Die Differenzierung der verschiedenen endokrinen Zelltypen

Die oben beschriebenen Befunde zeigen, dass Ngn3 für die Spezifizierung eines pan-endokrinen Vorläufers benötigt wird. Es stellt sich die Frage, welche weiteren Faktoren die Differenzierung der vier endokrinen Zelltypen aus den Ngn3-positiven Vorläufern regulieren. Für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren konnte gezeigt werden, dass sie für die Differenzierung der endokrinen Zellen eine Rolle spielen. Die Analyse von Mausmutanten lässt häufig keinen direkten Schluss darüber zu, durch welchen Mechanismus der untersuchte Faktor die Entwicklung der endokrinen Zellen kontrolliert. Das Expressionsmuster kann aber Hinweise auf mögliche Funktionen des Faktors geben. So kann beispielsweise die Expression in endokrinen Vorläufern darauf hindeuten, dass der Faktor an der Differenzierung beteiligt ist.

Die Transkriptionsfaktoren Pax6 und Isl1 werden ausschließlich in differenzierten endokrinen Zellen exprimiert. Der Verlust der Funktion dieser Faktoren in Mäusen führt zu einer Reduktion bzw. einem kompletten Verlust der α -, β - und δ -Zellen (Ahlgren et al., 1997; Sander et al., 1997; St-Onge et al., 1997). Obwohl der dem Zellverlust zugrunde liegende Mechanismus bei diesen Mutanten nicht vollständig aufgeklärt ist, konnte gezeigt werden, dass Isl1 und Pax6 direkt die Expression endokriner Gene regulieren. Isl1 und Pax6 sind in der Lage, an regulatorische Regionen der für Insulin, Glukagon und Somatostatin kodierenden Gene zu binden (Karlson, 1990; Leonard et al., 1992; Sander et al., 1997; Serup, 1995; Vallejo et al.,

1992; Wang and Drucker, 1995). Dies weist darauf hin, dass die beiden Faktoren direkt an der Regulation der Expression dieser Gene beteiligt sind.

Auch für den Transkriptionsfaktor Pdx1 konnte eine Funktion bei der terminalen Differenzierung nachgewiesen werden. Im frühen Knospenstadium kontrolliert Pdx1 das Auswachsen der Pankreasknospen (siehe 1.3.1). Während der späten Embryonalphase und im adulten Pankreas ist Pdx1 spezifisch in β -Zellen und in einigen δ -Zellen exprimiert (Ohlsson et al., 1993; Oster et al., 1998; Serup, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass Pdx1 die Expression verschiedener endokriner Zellmarker wie Insulin, Somatostatin und Glukokinase direkt reguliert (Gu, 2002; Miller et al., 1994; Ohlsson et al., 1993; Oster et al., 1998; Serup, 1995). Im Einklang mit diesen Befunden führt eine β -Zell-spezifische Inaktivierung des Pdx1 zur Beeinträchtigung der Expression von Insulin (Ahlgren et al., 1998).

Ein weiterer Faktor, der bei der endokrinen Zelldifferenzierung eine Rolle spielt, ist der Helix-loop-Helix-Transkriptionsfaktor NeuroD. NeuroD wird in der regulatorischen Kaskade, die zur Bildung der endokrinen Zellen führt, stromabwärts von Ngn3 exprimiert und möglicherweise durch Ngn3 reguliert (Huang, 2000; Jensen et al., 2000a). Mäuse mit einer homozygoten Mutation im NeuroD-Gen weisen eine Reduktion aller endokrinen Zellentypen auf, wobei die Population der β -Zellen am stärksten betroffen ist. In den NeuroD-mutanten Mäusen ist zwischen E14.5 und E17.5 eine erhöhte Apoptoserate nachweisbar, was andeutet, dass NeuroD bei dem Erhalt endokriner Zellen eine Rolle spielt (Naya et al., 1997). Da bisher keine geeigneten Marker existieren, mit denen endokrine Vorläufer nach Abschalten von Ngn3 identifiziert werden können, konnte bisher nicht geklärt werden, ob NeuroD für den Erhalt später endokriner Vorläufer, differenzierter Inselzellen oder beider Zellpopulationen benötigt wird.

Im Gegensatz zu Isl1, Pax6 und NeuroD, welche ausschließlich in postmitotischen Zellen des endokrinen Pankreas exprimiert sind, werden die Transkriptionsfaktoren Pax4, Nkx2.2 und Nkx6.1 bereits in den nicht differenzierten Epithelzellen der Pankreasanlage exprimiert (Sander et al., 2000b; Sosa-Pineda et al., 1997; Sussel et al., 1998). Dies weist darauf hin, dass diese Faktoren bei der Differenzierung endokriner Vorläufer zu reifen Inselzellen eine Rolle spielen könnten. Pax4 und Nkx2.2 werden vorwiegend, jedoch nicht ausschließlich für die Differenzierung der Insulin produzierenden β -Zellen des Pankreas benötigt. Pax4-defiziente Mäuse

weisen eine starken Reduktion der Insulin produzierenden β -Zellen sowie eines Teils der δ -Zellen auf (Sosa-Pineda et al., 1997). Allerdings reicht Pax4 allein nicht aus, um in der frühen Pankreasanlage die Bildung von β -Zellen zu induzieren (Grapin-Botton, 2001). Da Pax4 in adulten Inselzellen kaum mehr nachweisbar ist, scheint die Funktion dieses Transkriptionsfaktors auf die frühe β -Zellentwicklung beschränkt zu sein (Sosa-Pineda et al., 1997).

Ähnlich wie Pax4-defiziente Mäuse zeigen auch die Nkx2.2-Mutanten einen Verlust der β -Zellen sowie eine Reduktion der α - und PP-Zellen, weisen aber im Gegensatz zu den Pax4-Mutanten δ -Zellen auf (Sussel et al., 1998). Nkx2.2 wird während der Entwicklung sowohl in den undifferenzierten epithelialen Pankreaszellen als auch in differenzierten endokrinen Zellen exprimiert. Da Nkx2.2 auch in den Langerhansschen Inseln des adulten Pankreas nachweisbar ist, hat es möglicherweise auch späte Funktionen. Abbildung 1.4 zeigt ein vereinfachtes Modell für die Funktion der beschriebenen Transkriptionsfaktoren bei der Pankreasentwicklung, welches auf der Basis der bisher veröffentlichten Studien erstellt wurde.

Der bisher einzige Transkriptionsfaktor, bei dessen Inaktivierung ein selektiver Verlust von β -Zellen beobachtet wurde, ist der Homöodomänen-Transkriptionsfaktor Nkx6.1 (Sander et al., 2000b). Da die Funktionen von Nkx6.1 und des verwandten Transkriptionsfaktors Nkx6.2 im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, soll im folgenden Abschnitt auf die Struktur und Funktion der beiden Faktoren genauer eingegangen werden.

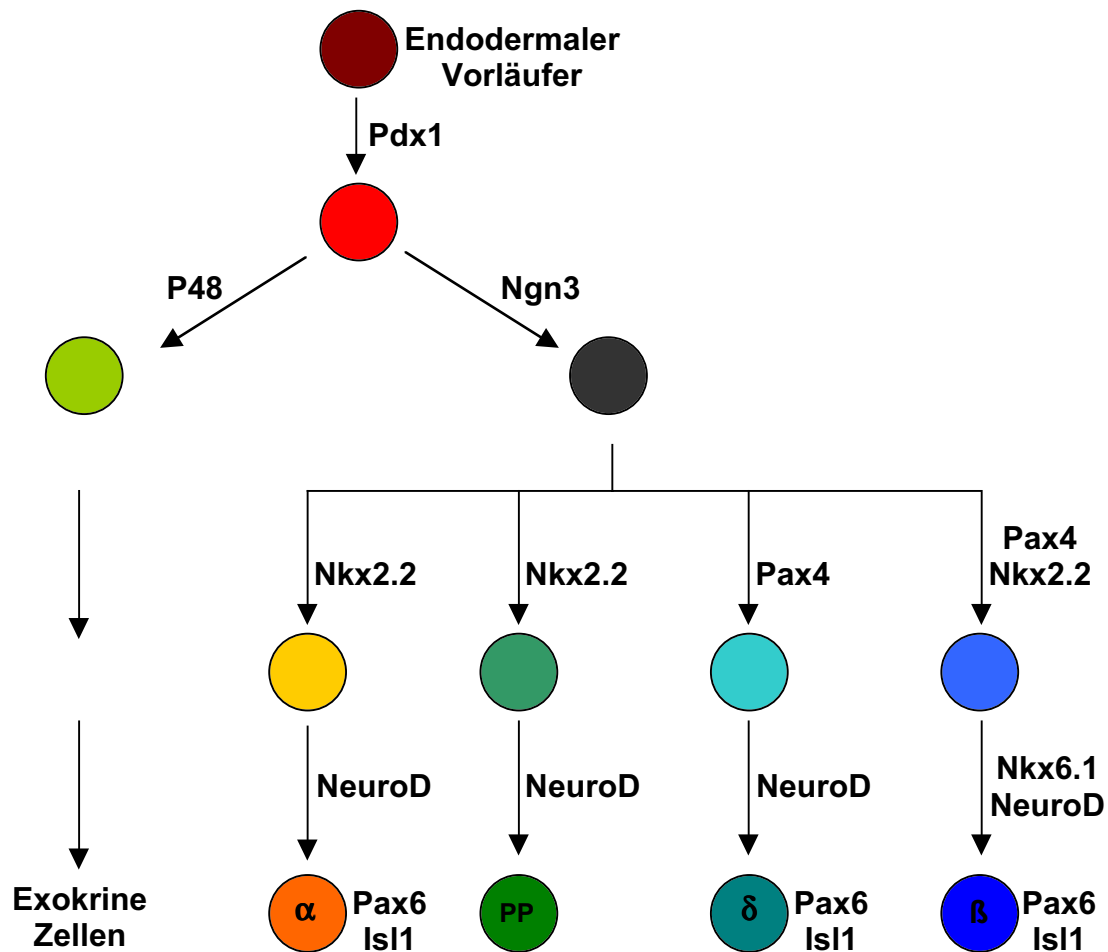


Abb. 1.4: Vereinfachtes Modell der Funktion von Transkriptionsfaktoren bei der Pankreasentwicklung

Die Spezifizierung endodermaler Vorläufer (braun) in Richtung der pankreatischen Zelllinie geht mit der Expression von Pdx1 einher. Aus den Pdx1-positiven Epithelzellen der frühen Pankreasknospe (rot) gehen die endokrinen Zellen und die exokrinen Zellen hervor. Die endokrine Zellentwicklung wird durch die Expression von Ngn3 in einer bestimmten Population epithelialer Zellen induziert (grau). An der Bildung der vier endokrinen Zelltypen sind eine Reihe von Transkriptionsfaktoren beteiligt, die genaue Position dieser Faktoren in der regulatorischen Kaskade, welche die endokrine Zelldifferenzierung steuert, muss jedoch noch genauer untersucht werden.

1.3.4 Die Nkx6-Transkriptionsfaktoren

Nkx6.1 und Nkx6.2 gehören zu den Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren vom Nkx Typ, welche Verwandtschaft mit den NK-Faktoren aus *Drosophila melanogaster* aufweisen (Nirenberg et al., 1995). Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren sind in allen eukaryontischen Organismen vorhanden. Die Struktur der Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren, sowie ihre steuernde Funktion bei entwicklungsbiologischen Prozessen, konnte erstmals in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* aufgeklärt werden. Wie die Analyse mutanter Larven ergab, sind Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren während der frühen Embryonalentwicklung für die ordnungsgemäße Körpersegmentierung von *Drosophila melanogaster* verantwortlich (McGinnis, 1984a; McGinnis, 1984b; Nüsslein-Volhard, 1980). Typisches Strukturmotiv homöotischer Gene ist die Homöobox, welche für die DNS bindende Domäne der Transkriptionsfaktoren kodiert. Die Homöodomäne ist in der Evolution hoch konserviert und besteht aus 60 Aminosäuren, die drei α -Helices bilden, welche durch kurze Polypeptidschleifen voneinander getrennt sind.

Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren können neben der DNS-Bindungsdomäne zusätzliche charakteristische Motive aufweisen, welche ihre Funktion weiter spezifizieren. Beispiele sind die POU-Domänen der OCT-Proteine sowie die LIM-Domäne der LIM-Homöodomänen-Faktoren (Bach, 2000; Ryan, 1997).

Abbildung 1.5 zeigt eine schematische Darstellung von Nkx6.1 und Nkx6.2. Beide Proteine sind strukturell sehr ähnlich und weisen eine hohe Sequenz-Homologie zueinander auf. Die Aminosäuresequenz der Homöodomäne beider Faktoren ist zu 97% homolog, während bezogen auf die gesamte Aminosäuresequenz eine Homologie von 59% besteht (Komuro, 1993; Rudnick et al., 1994). Des Weiteren besitzen Nkx6.1 und Nkx6.2 ein N-terminales NK-Dekapeptid, welches für die Repressorfunktion der Nkx6-Proteine verantwortlich ist. Das NK-Dekapeptid ist der Kernsequenz der eh1 (Engrailed Homology) Domäne des Transkriptionsrepressors Engrailed aus *Drosophila* homolog, welcher mit Korepressoren vom Gro/TLE-Typ interagiert (Smith, 1996). Es konnte gezeigt werden, dass Nkx6.1 und Nkx6.2 ebenfalls mittels des NK-Motivs in der Lage sind, Korepressoren vom Gro/TLE-Typ zu rekrutieren und so als Transkriptionsrepressoren zu wirken (Awatramani et al., 2000; Muhr et al., 2001). Als weitere funktionelle Domäne besitzen Nkx6.1 und Nkx6.2 eine carboxyterminale Bindungsinterferenzdomäne (BID), welche die Bindung

an die DNS, vermutlich durch Interaktion mit der Homöodomäne, stark herabsetzt (Mirmira et al., 2000). Nkx6.1 enthält zusätzlich eine zwischen der Homöodomäne und dem NK-Dekapeptid gelegene Serin-Alanin-Sequenz, welche bei Nkx6.2 nicht vorhanden ist. Die Funktion dieses Motivs ist bisher nicht ausreichend geklärt, es könnte jedoch ebenfalls für Interaktionen mit anderen Proteinen benötigt werden (Rudnick et al., 1994).

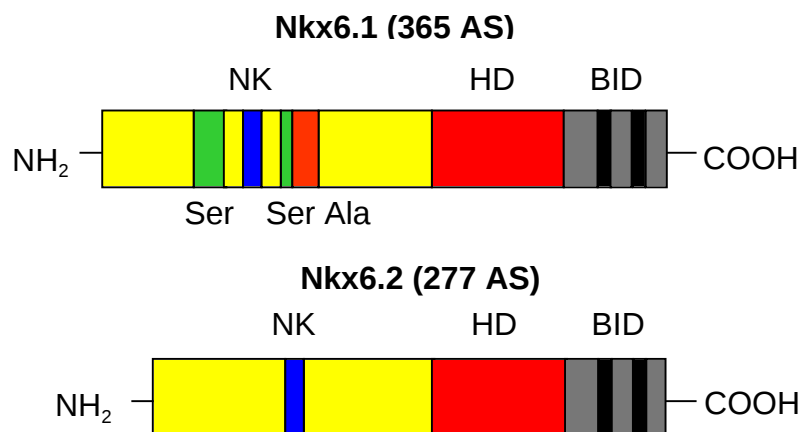


Abb. 1.5: Domänenstruktur der Nkx6-Transkriptionsfaktoren

Nkx6.1 und Nkx6.2 sind verwandte Mitglieder der NK-Transkriptionsfaktor-Familie und weisen eine Sequenzhomologie von 59% auf. Beide Faktoren besitzen eine Homöodomäne mit 97% Homologie, welche die Bindung an die DNS ermöglicht. Die Fähigkeit zur DNS-Bindung wird durch eine C-terminale „binding interference domain“ (BID) stark herabgesetzt. Eine N-terminale NK-Domäne verleiht beiden Faktoren darüber hinaus Repressorfunktion. Ein charakteristisches Merkmal des Nkx6.1-Proteins sind außerdem kurze Serin- und Alaninsequenzen im Bereich der C-terminalen Domäne, welche Nkx6.2 nicht besitzt.

Nkx6.1 wurde erstmals aus einer Hamster Insulinom cDNA Bank isoliert (Rudnick et al., 1994) und ist auch im zentralen Nervensystem des Huhns und der Maus nachweisbar (Qiu et al., 1998). Die Expressionsanalyse mit einem Anti-Nkx6.1-Antikörper zeigte, dass Nkx6.1 in der Maus nicht nur in β -Zellen des adulten Pankreas, sondern auch im embryonalen Pankreasepithel nachweisbar ist. Im Knospenstadium wird Nkx6.1, ähnlich wie Pdx1, in der Mehrzahl der epithelialen Zellen exprimiert. Am E15.5, wenn die meisten endokrinen Zellen differenzieren, lässt sich Nkx6.1 nur noch in einer Subpopulation der epithelialen Zellen nachweisen. Zum einen wird Nkx6.1 zu diesem Zeitpunkt in einem Teil der endokrinen Vorläufer mit Ngn3 koexprimiert. Zum anderen ist Nkx6.1 in Insulin-positiven Zellen nachweisbar, wird aber nicht in Glukagon-positiven Zellen exprimiert.

Im Pankreas adulter Mäuse ist Nkx6.1 ausschließlich in Insulin produzierenden β -Zellen nachweisbar (Oster et al., 1998; Sander et al., 2000b).

Nkx6.2 wurde erstmals in Oligodendrozyten des zentralen Nervensystems und in Hodenkeimzellen der Maus identifiziert und wird in der Literatur daher auch häufig als „Glia and testis specific homeobox factor“ (Gtx) bezeichnet (Komuro, 1993). Nkx6.2 wurde nachfolgend auch in Vorläuferzellen des Rückenmarks und des Hirnstamms der Maus identifiziert (Briscoe et al., 2000; Sander et al., 2000a; Vallstedt, 2001). Durch RT (Reverse Transkriptase)-PCR konnte Nkx6.2 (Gtx) auch im embryonalen Pankreas nachgewiesen werden (Oster et al., 1998). Das Expressionsmuster im Pankreas und die Funktion von Nkx6.2 bei der Pankreasentwicklung sind jedoch bisher unbekannt.

Die Untersuchung von Mäusen, bei denen das Nkx6.1 Gen durch homologe Rekombination in ES-Zellen ausgeschaltet wurde, zeigte, dass Nkx6.1 sowohl für die Differenzierung der β -Zellen als auch für die Ausbildung von Motoneuronen im Rückenmark von Bedeutung ist. Nkx6.1-mutante Embryonen sterben unmittelbar nach der Geburt, vermutlich aufgrund der durch den Motoneuronverlust verursachten fehlenden Innervation der Atemmuskulatur (Sander et al., 2000a). Im Pankreas weisen Nkx6.1-mutante Embryonen eine deutliche Reduktion reifer β -Zellen auf, während die Anzahl der α -, δ - und PP-Zellen nicht verringert ist (Sander et al., 2000b). Der Verlust der β -Zellen scheint auf einem Neubildungsdefekt zu beruhen und wird nicht durch einen vorzeitigen Zelltod schon differenzierter β -Zellen verursacht. Da im Pankreas von Nkx6.1-Mutanten kein vermehrter Zelltod feststellbar ist und auch kein anderer Zelltyp vermehrt gebildet wird, ist derzeit noch unklar, welches Schicksal die β -Zellvorläufer im Pankreas Nkx6.1-mutanter Mäuse erfahren.

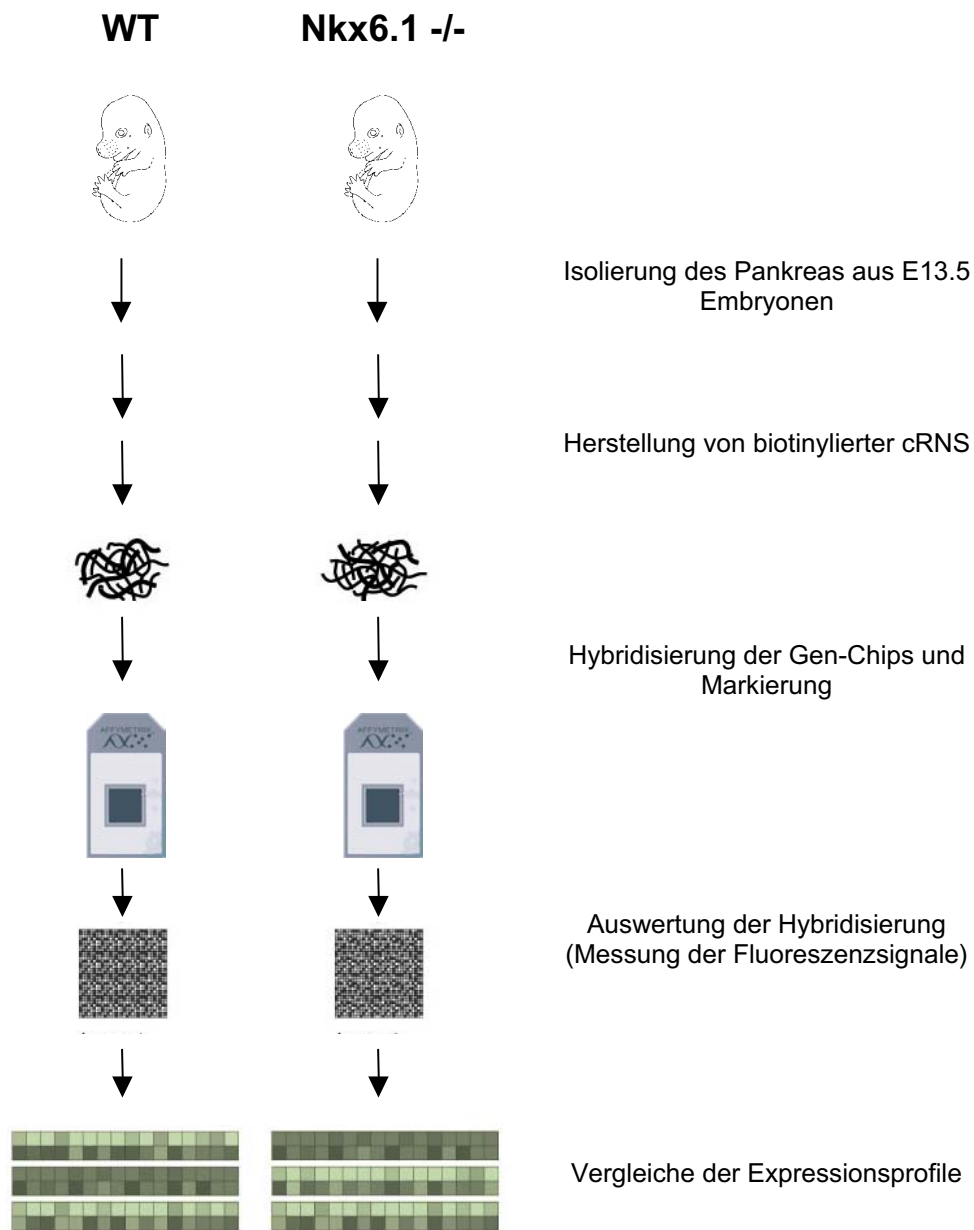
Um die Funktion von Nkx6.1 für die β - Zelldifferenzierung besser verstehen zu können, ist es wichtig, Faktoren zu identifizieren, welche an der Differenzierung der β -Zellentwicklung stromabwärts von Nkx6.1 beteiligt sind. Um Nkx6.1-regulierte Gene zu identifizieren, sollte das Genexpressionsprofil von Wildtyp und Nkx6.1-Mutante mittels Gen-Chip-Analyse verglichen werden. Die Expression und Funktion der Nkx6.1 regulierten Gene sollte anschließend genauer untersucht werden.

2 Ergebnisse

2.1 Identifizierung von Nkx6.1 Zielgenen durch Gen-Chip-Analyse

Der Transkriptionsfaktor Nkx6.1 wird spezifisch in Insulin produzierenden β -Zellen des endokrinen Pankreas der Maus exprimiert und während der Embryonalentwicklung für die Differenzierung der β -Zellen aus endokrinen Vorläufern benötigt (Oster et al., 1998; Qiu et al., 1998; Rudnick et al., 1994; Sander et al., 2000b). Um Einblick in die von Nkx6.1 regulierten Vorgänge der β -Zellentwicklung zu erhalten, sollten im Rahmen dieser Arbeit Zielgene von Nkx6.1 identifiziert und nachfolgend charakterisiert werden. Hierzu wurde eine Gen-Chip-Analyse durchgeführt, die eine schnelle und effiziente Methode zur Erstellung von RNS-Expressionsprofilen darstellt und darüber hinaus die vergleichende Expressionsanalyse zwischen zwei unterschiedlichen Proben erlaubt. Bei den Gen-Chips handelt es sich um eine kompakte Anordnung von Oligonukleotiden, wobei jedes Oligonukleotid ein spezifisches Gen repräsentiert. Die Gen-Chips werden mit RNS-Proben hybridisiert und das Ausmaß der Hybridisierung, welches mit der Genexpression in einer Probe korreliert, anhand von Fluoreszenzsignalen bestimmt. In dieser Arbeit wurden kommerziell erhältliche Gen-Chips der Firma Affymetrix (GeneChip® Murine Genome U74 Set) verwendet, welche 6000 bekannte Gene aus der Maus sowie weitere 6000 sogenannte EST (Expressed Sequence Tags)-Cluster umfassen. ESTs repräsentieren bisher unidentifizierte Gene. Für die Gen-Chip-Analyse sowie nachfolgende Untersuchungen standen Nkx6.1-mutante Mäuse zur Verfügung.

Um in Wildtyp und Nkx6.1-mutantem Pankreas differenziell exprimierte Gene zu identifizieren, wurde eine vergleichende Gen-Chip-Analyse durchgeführt. Da gezielt solche Gene identifiziert werden sollten, welche im Pankreas von Wildtyp und Nkx6.1-mutanten Mäusen zu Beginn der β -Zellentwicklung differenziell exprimiert sind, wurde für die Herstellung der RNS-Proben Pankreasgewebe vom Embryonaltag (E) 13.5 als Ausgangsmaterial verwendet. Zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung lassen sich erstmals vollständig differenzierte β -Zellen nachweisen (Pictet et al., 1972).

**Abb. 2.1: Identifizierung *Nkx6.1*-regulierter Gene durch Affymetrix Gen-Chip-Analyse**

Zur Erstellung der Genexpressionsprofile wurde Pankreasgewebe von Wildtyp und *Nkx6.1*-mutanten Embryonen am Embryonaltag (E) 13.5 als Ausgangsmaterial verwendet. Aus den Pankreasproben wurde cDNS gewonnen, die zur Herstellung von Biotin-markierter RNS durch *in vitro*-Transkription eingesetzt wurde. Die biotinylierte RNS wurde mit den Gen-Chips hybridisiert. Durch Zugabe eines Streptavidin gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes konnte das Expressionsprofil aus Fluoreszenzwerten automatisch erstellt werden. Durch Kreuzvergleich der Expressionsprofile wurden differenziell exprimierte Gene identifiziert.

Im automatisierten Verfahren wurden die Hybridisierungssignale als Fluoreszenzwerte gemessen, aus denen mit standardisierten Algorithmen für jedes Gen vergleichend zwischen Wildtyp und Nkx6.1-mutanten Proben sogenannte „FC (fold change)-Werte“ kalkuliert wurden. Die FC-Werte nehmen für Gene, die im mutanten Pankreas induziert vorliegen, einen positiven Wert an und einen negativen Wert für Gene, die reprimiert vorliegen. Die wichtigsten Schritte der Durchführung sind in Abbildung 2.1 gezeigt. Eine ausführliche Beschreibung der Durchführung findet sich im Methodenteil dieser Arbeit unter 5.12. Die experimentelle Durchführung erfolgte am Max-Delbrück-Zentrum Berlin in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Markus Morkel, die Auswertung der Gen-Chip-Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Kuhlbrodt im Labor von Frau Dr. Sander.

Beim Vergleich der Expressionsprofile von Nkx6.1-Mutante und Wildtyp konnten insgesamt 308 differenziell exprimierte Gene identifiziert werden, wobei ausschließlich solche Gene berücksichtigt wurden, die sich in ihrer Expression zwischen Nkx6.1-Mutante und Wildtyp signifikant unterschieden. Als signifikant verändert galt die Expression eines Gens, wenn ein FC-Wert von mindestens 2 (für induzierte Gene) bzw. -2 (für reprimierte Gen) vorlag. Insgesamt waren 187 Gene in der Nkx6.1-Mutante schwächer exprimiert als im Wildtyp und lagen somit reprimiert vor; 121 Gene zeigten dagegen eine stärkere Expression und lagen somit induziert vor. Um die Datenanalyse zu erleichtern, erfolgte die Einteilung der korrespondierenden Gene nach ihrer Funktion (Tab. 2.1).

Um Informationen über die durch Nkx6.1 regulierten Gene zu erhalten, wurde im Folgenden eine Computer gestützte Datenbankanalyse durchgeführt, aufgrund derer entschieden wurde, ob diese Gene für die Pankreasentwicklung relevant sein könnten. Da es von besonderem Interesse war, direkte Zielgene von Nkx6.1 zu identifizieren - und Nkx6.1 ein Transkriptionsrepressor ist- (Mirmira et al., 2000; Muhr et al., 2001), wurden vor allem solche Gene untersucht, welche auf der Basis der Gen-Chip-Analyse in Nkx6.1-mutanten Mäusen induziert vorlagen und somit möglicherweise durch Nkx6.1 reprimiert werden. In Tabelle 2.2 sind Gene aufgeführt, die auf der Basis der Datenbankanalyse als potenzielle Zielgene von Nkx6.1 interessant erschienen.

Tab.2.1: Übersicht der durch Nkx6.1 regulierten Gene

Proteine mit verwandter biologischer Funktion	Anzahl (prozentualer Anteil) induzierter Gene n=121	Anzahl (prozentualer Anteil) reprimierter Gene n=187
Ionenkanäle und Ionenporter	3 (2%)	7 (4%)
Transkriptionsfaktoren	20 (16%)	21 (11%)
Hormone und Wachstumsfaktoren	7 (6%)	25 (13%)
Faktoren des Metabolismus	14 (11%)	13 (7%)
Zelladhäsionsmoleküle, Bestandteile des Zytoskeletts und verwandte Gene	25 (21%)	56 (30%)
Zytokine, Chemokine und verwandte Rezeptoren	18 (15%)	13 (7%)
Faktoren der Signaltransduktion	1 (<1%)	4 (2%)
Protein und RNS-Synthese bzw. -Modifikation, Faktoren der Zellzyklusregulation	4 (3%)	10 (5%)
Faktoren der Apoptose und der DNS Reparatur	19 (15%)	19 (10%)
Faktoren des Immunsystems	5 (4%)	2 (1%)
ESTS	7 (6%)	13 (7%)

Die Genexpression im Pankreas Nkx6.1-mutanter Mäuse wurde am Embryonaltag (E) 13.5 mittels Affymetrix Gen-Chip-Analyse detektiert und mit dem Expressionsprofil von Wildtyp-Embryonen verglichen. Gene, die einen FC-Wert von >2 aufwiesen, wurden gemäß ihrer biologischen Funktion verschiedenen Gruppen zugeordnet. Der FC-Wert berechnet sich aus Fluoreszenzwerten und gibt die Unterschiede in der Expression eines Gens zwischen Wildtyp und Nkx6.1-Mutante wieder. Die absolute Zahl der hochregulierten (induzierten) bzw. herunterregulierten (reprimierten) Gene einer Gruppe ist angegeben, der prozentuale Anteil der Gruppe an der Gesamtzahl ist in Klammern hinzugefügt.

Die Gene wurden danach ausgewählt, ob sie Mitglieder einer Genfamilie sind, die bei Entwicklungsprozessen eine Rolle spielen. Da die Funktion von Transkriptionsfaktoren bei der Pankreasentwicklung im Mittelpunkt dieser Arbeit stand, wurden überwiegend Gene ausgewählt, welche für Transkriptionsfaktoren kodieren. Hierzu gehört unter anderem der Transkriptionsfaktor GATA-4, welcher während der Embryonalentwicklung von Mäusen im Endoderm und in der Herzanlage exprimiert wird und wichtige Funktionen für die Herzentwicklung besitzt (Arceci, 1993; Grepin, 1995; Kuo, 1997; Molkentin, 1997).

Tab. 2.2: Ausgewählte Gene mit einer möglichen Relevanz für die Pankreasentwicklung

Gen	NCBI Datenbankeintrag	FC-Wert
Nkx6.2/GTX	L08074	2,8
NeuroD2/ndrf	D83507	2,2
FoxC2/MFH-1	X74040	2
HoxC9	X55318	2,1
GATA-4	M98339	2,3
Nkx3.2/Bapx1	U87957	2,1
Wilms tumor 1	M55512	2
Hes5	AV309741	2
Hairless	Z32675	2,1
Vitronectin	M77123	2,1

Aufgeführt sind Gene, die im Pankreas Nkx6.1-mutanter Mäuse induziert vorlagen und deshalb durch Nkx6.1 möglicherweise reprimiert werden. Der angegebene FC-Wert berechnet sich aus Fluoreszenzwerten und gibt die Unterschiede in der Expression eines Gens zwischen Wildtyp und Nkx6.1-Mutante wieder. Die aufgeführten Gene könnten für die Pankreasentwicklung möglicherweise relevant sein, da sie Genfamilien angehören, die eine Rolle bei Entwicklungsprozessen spielen und zum Teil Homologe besitzen, die im Pankreas exprimiert werden. Nkx6.2 ist mit einem FC-Wert von 2,8 der in den Nkx6.1-mutanten Mäusen am stärksten induzierte Faktor.

Weiterhin wurde der Transkriptionsfaktor WT1 (Wilms Tumor Suppressor Gen1) als interessant eingestuft, da er für die Entwicklung der Milz von Mäusen benötigt wird (Herzer et al., 1999). Der Homöobox-Transkriptionsfaktor Nkx3.2 spielt eine Rolle bei der Musterbildung des Skelettes und der Milz und ist darüber hinaus Teil einer regulatorischen Kaskade, die zur Bildung der Links-Rechts-Asymmetrie führt (Lettice L., 2001; Schneider, 1999). Die Bedeutung dieser Transkriptionsfaktoren für Differenzierungsprozesse bei der Entwicklung anderer Organe und Strukturen könnte auch im Zusammenhang mit der endokrinen Zelldifferenzierung im Pankreas der Maus interessant sein. Ein weiteres Gen mit einer möglichen Relevanz für die Pankreasentwicklung kodiert für den Transkriptionsfaktor NeuroD2. Das NeuroD2 Homolog NeuroD/BETA2 wird in differenzierten endokrinen Zellen des Pankreas exprimiert und für die Entwicklung aller endokrinen Zellen benötigt (Naya et al., 1997). NeuroD2 könnte daher ebenfalls bei der Pankreasentwicklung eine Rolle spielen.

Als potenzielles Zielgen von Nkx6.1 war der Transkriptionsfaktor Nkx6.2 von besonderem Interesse. Einerseits erwies sich Nkx6.2 in der Gen-Chip-Analyse als in der Nkx6.1-Mutante nahezu dreifach stärker exprimiert als im Wildtyp, womit es der am stärksten induzierte Transkriptionsfaktor war (Tab. 2.2). Andererseits ist Nkx6.2 wie Nkx6.1 ebenfalls ein Homöodomänen-Transkriptionsfaktor und weist eine hohe Sequenzhomologie zu Nkx6.1 auf. Dies betrifft vor allem die DNS bindende Homöodomäne und die NK-Domäne, welche bei beiden Proteinen zu über 90% homolog sind (Komuro, 1993; Mirmira et al., 2000; Rudnick et al., 1994). Diese Befunde ließen vermuten, dass Nkx6.1 und Nkx6.2 redundante Funktionen bei der Pankreasentwicklung besitzen könnten. Partiiell redundante Funktionen von Nkx6.1 und Nkx6.2 sind auch bei der Entwicklung neuronaler Zelltypen des zentralen Nervensystems beschrieben (Cai et al., 1999; Komuro, 1993; Lee, 2001; Vallstedt, 2001).

Die RNS von Nkx6.2 (Gtx) konnte mit Hilfe von Multiplex RT-PCR in Pankreasextrakten von Rattenembryonen in früheren Untersuchungen nachgewiesen werden (Oster et al., 1998). Bisher ist jedoch nicht bekannt, ob Nkx6.2 im Pankreas der Maus exprimiert wird und welche Zelltypen das Protein herstellen. Im Folgenden sollte daher das genaue Expressionsmuster von Nkx6.2 in der Pankreasanlage der Maus untersucht werden. Dies sollte erste Hinweise auf die Funktion von Nkx6.2 für die Entwicklung der verschiedenen Zelltypen des Pankreas geben.

2.2 Expression von Nkx6.2 im embryonalen Pankreas der Maus

Zum Nachweis der Nkx6.2-Expression wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Zunächst wurde die Expression von Nkx6.2 in heterozygoten Nkx6.2-mutanten Mäusen durch β -Galaktosidase (lacZ)-Färbung auf ganzen Embryonen untersucht. Dies ist möglich, weil die Nkx6.2-mutanten Mäuse das β -Galaktosidase-Gen unter der Kontrolle des Nkx6.2-Promotors exprimieren (Vallstedt, 2001). Nkx6.2-mutante Mäuse standen für diese und nachfolgende Untersuchungen zur Verfügung. Die β -Galaktosidase dient als histologischer Marker der Identifizierung von Zellen mit aktivem Nkx6.2-Promotor. In Nkx6.2-heterozygot mutanten Embryonen sollte die Expression der β -Galaktosidase der Expression von Nkx6.2 entsprechen.

Anschließend wurde die Nkx6.2-Expression auf zellulärer Ebene mittels Antikörpern untersucht. Da im Pankreas keine dem Nervensystem vergleichbare Segmentierung zu beobachten ist und die Position einer Zelle daher keine Aussage über ihre Identität zulässt, konnte die Identität des Nkx6.2 exprimierenden Zelltyps ausschließlich durch den Nachweis spezifischer Markerproteine untersucht werden. Für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien gilt, dass die Expression bzw. Koexpression von Proteinen immer in der gesamten Pankreasanlage analysiert wurde. Hierzu wurde jeweils die gesamte Pankreasanlage der Embryonen in Form von Gefrier- bzw. Paraffin-Schnitten auf Objektträger aufgebracht. Für die immunhistochemische Analyse wurden histologische Schnitte ausgewählt, die alle Bereiche des Pankreasepithels repräsentierten (siehe Methoden). Sollte die Expression von Proteinen zwischen Wildtyp und Mutante verglichen werden, wurden Schnitte aus vergleichbaren Regionen ausgewählt. Die Dokumentation erfolgte jeweils nach sorgfältiger Auswertung aller Schnitte. Die Abbildungen, welche im Zusammenhang mit den immunhistochemischen Analysen gezeigt werden, stellen repräsentative Bereiche des Pankreasepithels von Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien dar.

2.2.1 Analyse der Nkx6.2-Expression durch β -Galaktosidase (lacZ) Färbung

Wie in Abbildung 2.2 gezeigt, konnte lacZ-Expression zwischen E9.5 und E18.5 in der Pankreasanlage heterozygot mutanter Embryonen nachgewiesen werden. Dabei war am E9.5 (A) und E10.5 (B) eine Färbung in der dorsalen sowie ventralen Anlage zu erkennen. Am E15.5 (C) sowie E18.5 (D) beschränkte sich die Expression vorwiegend auf die dorsale Pankreasanlage, während nur wenige lacZ-positive Zellen in der ventralen Anlage zu beobachten waren. LacZ war darüber hinaus im antralen Teil des Magens exprimiert. Die im Duodenum beobachtete Färbung war hingegen vermutlich auf endogene lacZ-Aktivität zurückzuführen, da eine leichte Färbung auch in den Wildtyp-Embryonen auftrat (nicht gezeigt). Hierfür spricht auch, dass Nkx6.2 in der sich anschließenden immunhistochemischen Analyse der Expression im Darmgewebe E15.5 alter Embryonen nicht nachgewiesen werden konnte (nicht gezeigt).

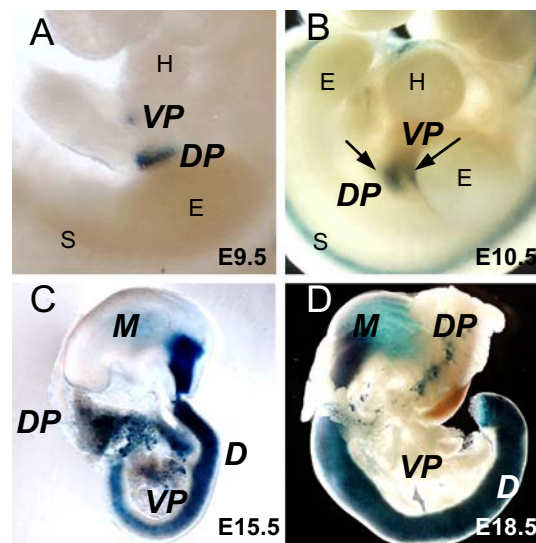


Abb. 2.2: LacZ-Expression in der embryonalen Pankreasanlage heterozygoter Nkx6.2-Mutanten

Die Expression des vom Nkx6.2-Promotor gesteuerten β -Galaktosidase-Gens wurde mittels X-Gal-Färbung auf Embryonen (A,B) bzw. embryonalen Pankreasanlagen (C,D) nachgewiesen. Die lacZ-Expression auf heterozygoten Nkx6.2-Mutanten gibt die endogene Expression von Nkx6.2 wieder.

(A,B) Laterale Aufsicht auf Embryonen am Embryonaltag (E) 9.5 (A) bzw. E10.5 (B). Gezeigt ist der Bereich kaudal des Kopfes zwischen Herzanlage und Schwanzwirbelsäule. LacZ-Expression ist sowohl in der ventralen als auch in der dorsalen Pankreasanlage am E9.5 und E10.5 nachweisbar. (C,D) Aufsicht auf den oberen Magen-Darm-Trakt von Embryonen am E15.5 (C) und E18.5 (D). Am E15.5 ist lacZ-Expression in der dorsalen und ventralen Pankreasanlage sowie im antralen Bereich des Magens und der oberen Duodenalschleife sichtbar. Am E18.5 (D) ist lacZ im Pankreas nur noch schwach in der dorsalen Anlage exprimiert, während in der ventralen Anlage keine Aktivität mehr nachweisbar ist. DP, dorsale Pankreasanlage; VP, Ventrale Pankreasanlage; D, Duodenum; E, Extremitätenanlage; H, Herzanlage; M, Magen; S, Schwanzwirbelsäule.

2.2.2 Immunhistochemischer Nachweis der Nkx6.2-Expression in der Pankreasanlage

Die Expression von Nkx6.2 wurde auf Gefrier-Schnitten durch die Pankreasanlage von Wildtyp-Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien untersucht. Zum Nachweis von Nkx6.2 wurde ein polyklonaler Antikörper gegen eine Peptidsequenz des Nkx6.2-Proteins verwendet (Vallstedt, 2001). Epitheliale Zellen der frühen Pankreasanlage wurden mittels eines Antikörpers gegen Pdx1 identifiziert. Pdx1 markiert zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung multipotente Vorläuferzellen, aus welchen sich alle Zelltypen des Pankreas entwickeln (Gu, 2002; Guz et al., 1995;

Offield et al., 1996). Die immunhistochemische Analyse zeigte, dass Nkx6.2 am E10.5 in beiden Pankreasanlagen sowie im Magen überwiegend mit Pdx1 koexprimiert ist (Abb. 2.3A). Nkx6.2 ist am E10.5 nicht mit Glukagon koexprimiert (Abb. 2.3B).

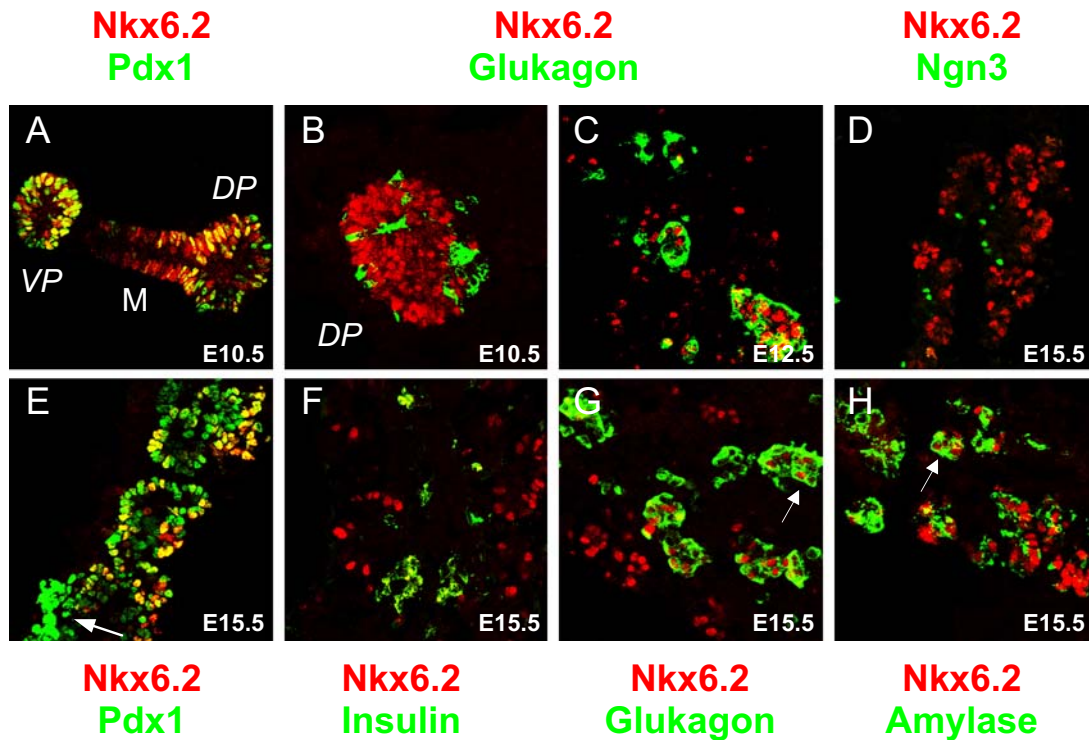


Abb. 2.3: Nkx6.2-Expression im embryonalen Pankreas der Maus

Die Expression von Nkx6.2 wurde im Pankreas in verschiedenen Entwicklungsstadien durch Immunhistochemie nachgewiesen. (A+B) Transversale Schnitte durch einen Wildtyp-Embryo im Bereich der Pankreasanlage am Embryonaltag (E)10.5. Nkx6.2 ist im dorsalen und ventralen Pankreas in der Mehrzahl der Zellen mit Pdx1 koexprimiert (in Gelb), welches zu diesem Zeitpunkt die epithelialen Zellen des Pankreas markiert (A). Deutliche Expression von Nkx6.2 ist auch im Magen nachweisbar. Nkx6.2 ist am E10.5 nicht in Glukagon-positiven Zellen exprimiert (B). (C) Sagittaler Schnitt durch einen Wildtyp-Embryo im Bereich der Pankreasanlage am E12.5. Nkx6.2 ist nur noch in einigen Zellen nachweisbar und teilweise mit Glukagon koexprimiert. (D-H) Schnitte durch die isolierte Pankreasanlage eines Wildtyp-Embryos am E15.5. Nkx6.2 ist in endokrinen Vorläufern, welche durch die Expression von Ngn3 charakterisiert sind, nicht nachweisbar (D). Nkx6.2 ist hingegen mit Pdx1 koexprimiert, welches zu diesem Zeitpunkt schwach in verschiedenen Vorläuferzellen und differenzierten exokrinen Zellen sowie stark in differenzierten β -Zellen exprimiert ist. Nkx6.2 ist in Insulin-positiven Zellen nicht nachweisbar (F), wird aber teilweise mit Glukagon (G, Pfeil) und Amylase (H, Pfeil) koexprimiert. DP, dorsale Pankreasanlage; VP, ventrale Pankreasanlage; M, Magen

Im Laufe der Entwicklung konnte eine deutliche Abnahme der Nkx6.2-Expression beobachtet werden. Am E12.5 ist Nkx6.2 nur noch in wenigen Epithelzellen nachweisbar und zu diesem Zeitpunkt teilweise mit Glukagon koexprimiert (Abb. 2.3C). Die Expression von Nkx6.2 bleibt auch am E15.5 auf eine Subpopulation von Zellen beschränkt, welche teilweise Glukagon und vorwiegend Pdx1 koexprimiert (Abb. 2.3G, E). Das Expressionsniveau von Pdx1 ist in diesen Zellen schwach, während Zellen mit einer starken Expression von Pdx1 kein Nkx6.2 exprimieren (Abb. 2.3E, Pfeil). Da bisher nicht vollständig geklärt ist, welche Zelltypen am E15.5 Pdx1 exprimieren, kann aufgrund der hier beobachteten Koexpression von Nkx6.2 und Pdx1 nicht eindeutig auf den Nkx6.2 exprimierenden Zelltyp geschlossen werden. Es könnte sich einerseits um unvollständig differenzierte Vorläufer handeln. Andererseits ist es möglich, dass einige der Zellen reife exokrine Zellen sind, da, wie in Abb. 2.3H zu sehen ist, Nkx6.2 teilweise auch mit Amylase koexprimiert wird, welches ein charakteristischer Marker dieses Zelltyps ist. Dagegen konnte keine Koexpression mit Insulin und dem Marker für endokrine Vorläuferzellen, Ngn3, nachgewiesen werden (Abb. 2.3D, F).

Im Gegensatz zu Nkx6.2 wird das homologe Protein, Nkx6.1, in Ngn3-positiven Zellen sowie in differenzierten β -Zellen exprimiert (Sander et al., 2000b). Da diese Daten auf ein möglicherweise komplementäres Expressionsmuster der beiden Nkx6-Faktoren im Pankreas hinweisen, sollte im Folgenden das Expressionsmuster von Nkx6.1 und Nkx6.2 direkt verglichen werden. Hierzu wurden Koimmunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen Nkx6.1 und Nkx6.2 auf Schnitten durch die Pankreasanlage am E10.5 bzw. E12.5 und E15.5 durchgeführt. Es zeigte sich, dass Nkx6.1 und Nkx6.2 während der frühen Embryonalentwicklung am E10.5 zunächst teilweise koexprimiert sind (Abb. 2.4 A+B). Am E12.5 exprimiert die Mehrzahl der Epithelzellen Nkx6.1, aber nur wenige der Zellen Nkx6.2. Zu diesem Zeitpunkt sind die Expressionsdomänen bereits überwiegend getrennt (Abb. 2.4C). Die bei E12.5 beobachtete Komplementarität der Expression von Nkx6.1 und Nkx6.2 bleibt auch am E15.5 bestehen, wobei bezogen auf das gesamte Pankreasepithel im Vergleich zu E12.5 mehr Nkx6.2 exprimierende Zellen nachweisbar sind (Abb. 2.4D). Am E18.5 lässt sich durch Immunfluoreszenzfärbung keine Expression von Nkx6.2 nachweisen. Die beobachtete Expression von lacZ in der dorsalen Pankreasanlage am E18.5 (siehe 2.1) lässt sich vermutlich durch die hohe Stabilität der β -Galaktosidase erklären, welche über einen langen Zeitraum aktiv sein kann und

daher nicht notwendigerweise am E18.5, sondern möglicherweise schon früher gebildet wurde. Es ist ebenfalls möglich, dass die Expression von Nkx6.2 am E18.5 zu schwach ist, um durch einen Antikörper detektiert werden zu können.

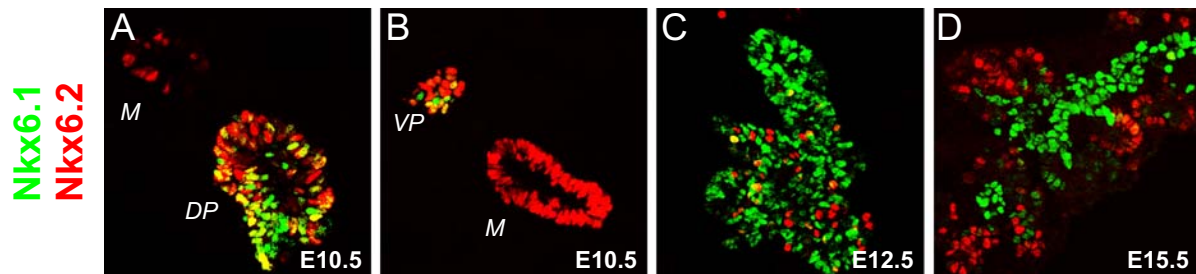


Abb. 2.4: Expression von Nkx6.1 und Nkx6.2 im embryonalen Pankreas der Maus

(A,B) Transversale Schnitte durch einen Wildtyp-Embryo im Bereich der Pankreasanlage am Embryonaltag (E)10.5. Nkx6.1 und Nkx6.2 sind in überlappenden, jedoch nicht identischen Domänen des Pankreas exprimiert. Nkx6.2 ist in der Mehrzahl epithelialer Zellen nachweisbar und teilweise mit Nkx6.1 koexprimiert (gelbes Signal). (C) Sagittaler Schnitt durch einen Wildtyp-Embryo im Bereich der Pankreasanlage am E12.5. Nkx6.1 und Nkx6.2 werden überwiegend nicht koexprimiert. Während Nkx6.1 zu diesem Zeitpunkt in der Mehrheit der Epithelzellen exprimiert wird, ist Nkx6.2 nur noch in einer Subpopulation nachweisbar, die vorwiegend kein Nkx6.1 exprimiert. (D) Am E15.5 sind Nkx6.1 und Nkx6.2 weiterhin in getrennten Domänen der Pankreasanlage exprimiert. DP, dorsaler Pankreas; VP, ventraler Pankreas; M, Magen

Die Beobachtung, dass Nkx6.1 und Nkx6.2 in der Pankreasanlage von Wildtyp Mäusen beginnend mit E12.5 in weitestgehend getrennten Domänen exprimiert werden, könnte im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Gen-Chip-Analyse auf einen regulatorischen Effekt von Nkx6.1 auf die Nkx6.2-Expression hindeuten. Es ist ebenfalls nicht auszuschließen, dass Nkx6.2 umgekehrt die Expression von Nkx6.1 reguliert, da für beide Transkriptionsfaktoren eine Repressorfunktion beschrieben wurde (Awatramani et al., 2000; Muhr et al., 2001). Im Folgenden sollte daher die Expression von Nkx6.2 in Nkx6.1-mutanten Mäusen sowie die Expression von Nkx6.1 in Nkx6.2-mutanten Mäusen näher untersucht werden.

2.3 Analyse der Nkx6.2-Expression in Nkx6.1-mutanten Mäusen

Mittels Gen-Chip-Analyse wurde gezeigt, dass Nkx6.2 am E13.5, also zu dem Zeitpunkt, an welchem die Differenzierung der β -Zellen einsetzt, durch Nkx6.1 reprimiert wird (Abschnitt 2.1). Um dieses Ergebnis zu bestätigen und die Identität der Nkx6.2 exprimierenden Zellen im Pankreas Nkx6.1-mutanter Mäuse gegebenenfalls zu bestimmen, wurde die Expression von Nkx6.2 auf Schnitten durch das embryonale Pankreas Nkx6.1-mutanter Mäuse durch Immunfluoreszenz untersucht.

Die immunhistochemische Analyse bestätigte die Ergebnisse der Gen-Chip-Analyse. Die Anzahl der Nkx6.2 exprimierenden Zellen war in der Pankreasanlage der Nkx6.1-mutanten Mäuse gegenüber den Wildtyp-Mäusen erhöht, obwohl die Morphologie und Größe der Pankreasanlage der Nkx6.1-mutanten Mäuse unverändert erschienen. Dieser Effekt war erstmals am E12.5 zu beobachten (Abb. 2.5)

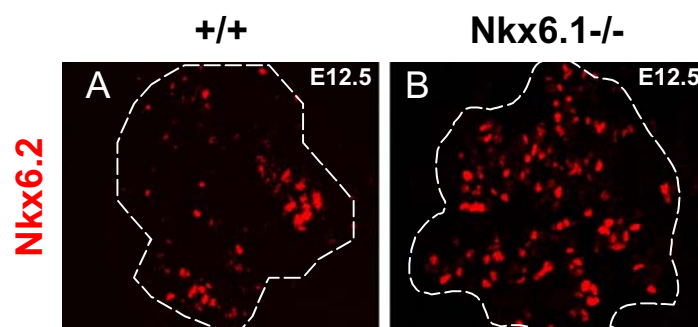


Abb. 2.5: Derepression von Nkx6.2 in Nkx6.1-mutanten Mäusen in der Pankreasanlage am Embryonaltag (E) 12.5

(A,B) Immunhistochemische Analyse der Nkx6.2-Expression auf sagittalen Schnitten durch Wildtyp und Nkx6.1-mutante Embryonen im Bereich der Pankreasanlage am E12.5. Zu diesem Zeitpunkt ist in der Nkx6.1-Mutante (B) gegenüber dem Wildtyp (A) erstmals ein Anstieg von Nkx6.2 exprimierenden Zellen im Pankreasepithel nachweisbar.

Bei der immunhistochemischen Untersuchung der Nkx6.2-Expression am E15.5 waren in den Nkx6.1-mutanten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls deutlich mehr Nkx6.2-positive Zellen nachweisbar (Abb. 2.6). Um die Identität der Zellen zu bestimmen, welche in der Pankreasanlage der Nkx6.1-mutanten Mäusen ektopisch Nkx6.2 exprimieren, wurden Koimmunfluoreszenzfärbungen von Nkx6.2 mit anderen pankreatischen Markern durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass die Anzahl der Glukagon exprimierenden α -Zellen und Amylase exprimierenden exokrinen Zellen, welche Nkx6.2 exprimieren, im Vergleich zum Wildtyp nicht vermehrt waren (Abb.

2.6. A, E; B, F). Da die ektopisch Nkx6.2 exprimierenden Zellen weder Amylase noch Glukagon koexprimieren, sollten im Folgenden weitere Untersuchungen zur Identität dieser Zellen erfolgen. Um zu testen, ob endokrine Zellen bei Nkx6.1-mutanten Mäusen ektopisch Nkx6.2 exprimieren, wurden koimmunhistochemische Färbungen von Nkx6.2 und Ngn3 durchgeführt. Ngn3 wird selektiv in Vorläufern der endokrinen Linie exprimiert. Von diesen Ngn3-positiven Vorläufern stammen alle endokrinen Zellen ab (Gu, 2002). Wie bei den Wildtyp-Embryonen war auch bei den Nkx6.1-mutanten Embryonen keine Koexpression von Nkx6.2 und Ngn3 im Pankreasepithel nachweisbar (Abb. 2.6C, G).

Trotz der beobachteten Derepression von Nkx6.2 konnte im Pankreas der Nkx6.1-mutanten Mäuse am E15.5 keine Expression von Insulin nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass Nkx6.2 den Verlust von Nkx6.1 bei der Entwicklung der β -Zellen initial nicht kompensieren kann. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei den in Nkx6.1-Mutanten ektopisch exprimierenden Zellen vermutlich nicht um differenzierte endokrine bzw. exokrine Zellen oder Ngn3-positive endokrine Vorläufer handelt. Es zeigte sich jedoch, dass Nkx6.2 in den Nkx6.1-Mutanten ektopisch vorwiegend mit Pdx1 koexprimiert ist (Abb. 2.6D, H). Pdx1 wird bis zum E16.5 in verschiedenen Populationen differenzierter und undifferenzierter Pankreaszellen exprimiert (Guz et al., 1995), somit kann aus der Koexpression von Nkx6.2 und Pdx1 nicht eindeutig auf den vorliegenden Zelltyp geschlossen werden.

Aufgrund der fehlenden ektopischen Expression in differenzierten Zelltypen ist jedoch anzunehmen, dass es sich bei den Nkx6.2/Pdx1 koexprimierenden Zellen um Vorläufer handelt, für welche bisher keine eindeutigen Markerproteine zur Verfügung stehen. Am E18.5 konnte Expression von Nkx6.2 weder in den Nkx6.1-mutanten noch in den Wildtyp-Mäusen beobachtet werden, obwohl Nkx6.1 zu diesem Zeitpunkt noch im Pankreasepithel nachweisbar ist (nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass Nkx6.2 in diesem Stadium unabhängig von Nkx6.1 reguliert wird.

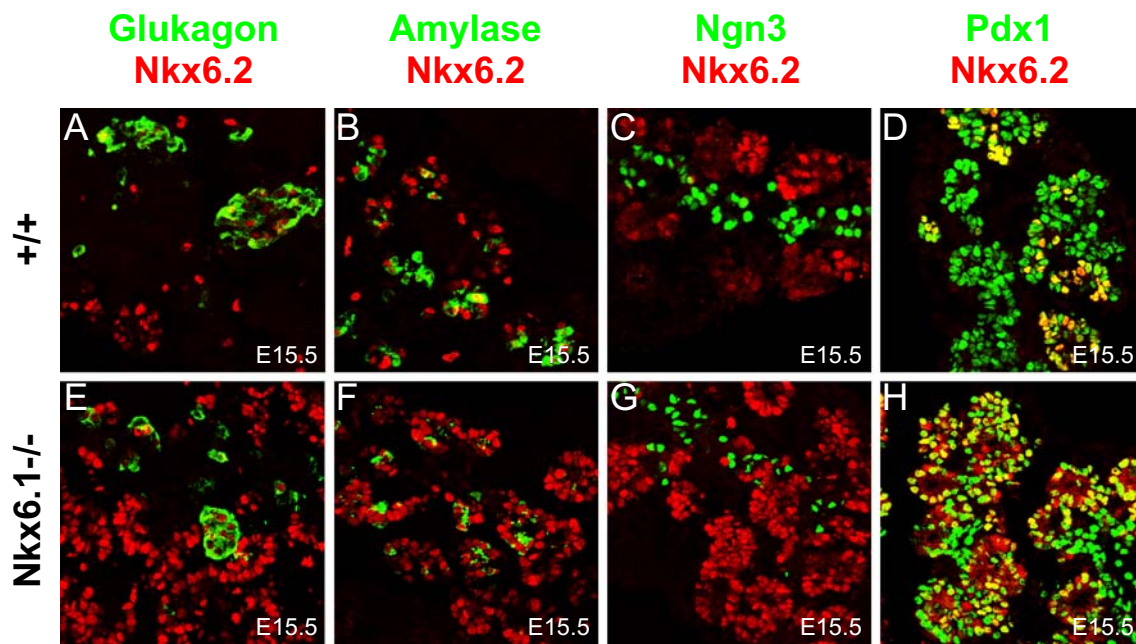


Abb. 2.6: Derepression von Nkx6.2 in der Pankreasanlage Nkx6.1-mutanter Mäuse am Embryonaltag (E) 15.5

Immunhistochemische Analyse der Nkx6.2-Expression auf Schnitten durch die isolierte Pankreasanlage. In den Nkx6.1-mutanten Mäusen ist im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen ein deutlicher Anstieg Nkx6.2 exprimierender Zellen zu beobachten. Nkx6.2 wird in den Nkx6.1-Mutanten ektopisch vorwiegend mit Pdx1 koexprimiert (D,H). Die Anzahl Glukagon und Amylase exprimierender Zellen ist in der Nkx6.1-Mutante gegenüber dem Wildtyp unverändert und es ist keine verstärkte Koexpression von Glukagon bzw. Amylase und Nkx6.2 nachweisbar (A,E; B,F). In gleicher Weise trifft dies für die Expression von Ngn3 zu, welches ein Marker für endokrine Vorläufer ist (C,G).

2.4 Die Funktion von Nkx6.2 für die Pankreasentwicklung der Maus

Wie im Abschnitt 1.2 dieser Arbeit gezeigt wurde, ist der Transkriptionsfaktor Nkx6.2 in der Pankreasanlage von Mäusen in einigen Glukagon- und Amylase-Zellen exprimiert. Dies deutet darauf hin, dass Nkx6.2 eine Funktion für die Entwicklung dieser Zelltypen haben könnte. Nkx6.2-mutante Mäuse sind äußerlich unauffällig. Sie erscheinen gesund, sind zeugungsfähig und haben eine normale Lebensdauer (Cai, 2001). Um die Funktion von Nkx6.2 für die Pankreasentwicklung aufzuklären, sollten daher mögliche Defekte in Nkx6.2-mutanten Mäusen auf zellulärer Ebene untersucht werden.

2.4.1 Untersuchung der Pankreasentwicklung in Nkx6.2-mutanten Mäusen

Um aufzuklären, ob Nkx6.2 eine Rolle für die Pankreasentwicklung spielt, wurden Pankreata adulter Nkx6.2-mutanter Mäuse zunächst hinsichtlich morphologischer Besonderheiten untersucht. Hierbei konnten keine Unterschiede zwischen Nkx6.2-Mutanten und Wildtyp festgestellt werden. Der Pankreas der Nkx6.2-mutanten Mäuse hatte eine normale Größe bzw. Organisation und war ordnungsgemäß hinter der Magenanlage und im Bereich der oberen Duodenalschleife lokalisiert (nicht gezeigt). Daher wurde im Folgenden die Entwicklung der endokrinen und exokrinen Zellen der Pankreasanlage von Wildtyp und Nkx6.2-mutanten Mäusen durch Immunfluoreszenzfärbung untersucht.

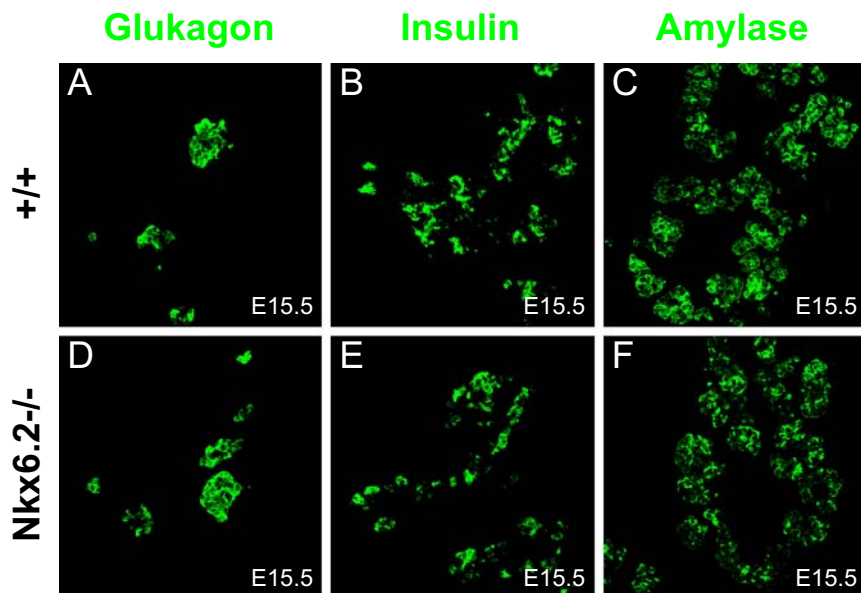


Abb. 2.7: Expression Zelltyp-spezifischer Markerproteine im Pankreas Nkx6.2-mutanter Mäuse am Embryonaltag (E)15.5

Durch Immunfluoreszenzfärbung auf Schnitten durch die isolierte Pankreasanlage von Wildtyp und Nkx6.2-mutanten Mäusen wurde die Entwicklung von endokrinen und exokrinen Zellen am E15.5 untersucht. Es zeigte sich, dass die Anzahl der Glukagon (A,D), Insulin (B,E) und Amylase (C,F) exprimierenden Zellen in Nkx6.2-Mutanten und Wildtyp vergleichbar ist.

Dabei konnten in der Nkx6.2-Mutante und im Wildtyp am E15.5 eine vergleichbare Anzahl Insulin und Glukagon exprimierender Zellen nachgewiesen werden (Abb. 2.7A, D; B, E). Auch die Expression von Amylase ist in Nkx6.2-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp unverändert (Abb. 2.7C, F). Eine normale Expression aller Marker war

auch am E18.5 in der Pankreasanlage Nkx6.2-mutanter Mäuse im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten (Abb. 2.8A+C; B+D).

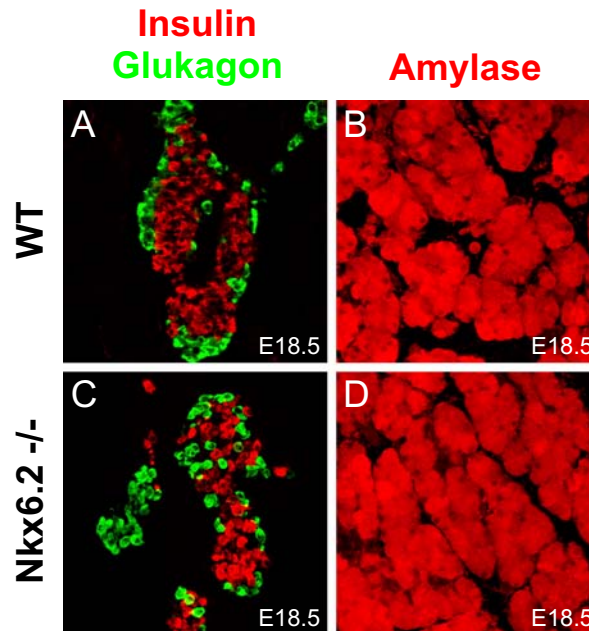


Abb. 2.8: Expression Zelltyp-spezifischer Markerproteine im Pankreas Nkx6.2-mutanter Mäuse am Embryonaltag (E) 18.5

Die Anzahl der Insulin und Glukagon (A,C) sowie Amylase (B,D) exprimierenden Zellen ist in der Pankreasanlage Nkx6.2-mutanter Mäuse gegenüber den Wildtyp-Mäusen normal.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen konnten durch radioimmunologische Messungen der Insulin- und Glukagonkonzentration in Proteinextrakten von Wildtyp und Nkx6.2-mutanten Mäusen bestätigt werden (Angaben zur Durchführung: siehe Methoden Abschnitt 5).

Wie sich zeigte, ist die Konzentration beider Hormone in den Pankreasextrakten Nkx6.2-mutanter Mäuse gegenüber den Wildtyp-Mäusen unverändert (Tab. 2.3).

Tab. 2.3: Quantifizierung der Hormonkonzentration in der Pankreasanlage von E18.5 Wildtyp und Nkx6.2-mutanten Mäusen

Hormonkonzentration	+/+	Nkx6.2 ^{-/-}
Glukagon (ng/mg Protein)	329 +/- 55 (n=3)	300 +/-49 (n=4)
Insulin (µg/ mg Protein)	7,8 +/- 2,8 (n=3)	6,8 +/- 1,2 (n=4)

Die Hormonkonzentration wurde in Proteinextrakten individueller Pankreata von Wildtyp und Nkx6.2-mutanten Mäusen bestimmt. Es sind die Mittelwerte +/- Standardabweichung der getesteten Proben angegeben.

Die Beobachtung, dass die endokrinen und exokrinen Zellen in den Nkx6.2-Mutanten normal differenzieren, lässt vermuten, dass Nkx6.2 bei der Pankreasentwicklung keine eigenständige Rolle spielt. Aufgrund der hier gezeigten Versuche kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass ein gegenseitiges regulatorisches Verhältnis zwischen Nkx6.1 und Nkx6.2 besteht, Nkx6.2 also möglicherweise auch Nkx6.1 reprimiert. Dies könnte dann dazu führen, dass Nkx6.1 in den Nkx6.2-mutanten Mäusen dereprimiert wird und den Verlust von Nkx6.2 kompensieren könnte. Im Folgenden wurde daher die Expression von Nkx6.1 in der Pankreasanlage von Nkx6.2-mutanten und Wildtyp-Mäusen untersucht.

2.4.2 Expression von Nkx6.1 im Pankreas Nkx6.2-mutanter Mäuse

Die Expression von Nkx6.1 in der Pankreasanlage von Wildtyp und Nkx6.2-mutanten Mäusen wurde durch Immunfluoreszenzfärbung im frühen und späten Embryonalstadium untersucht. Wie in Abbildung 2.9 dargestellt, ist die Anzahl der Nkx6.1 exprimierenden Zellen sowohl in der frühen als auch in der späten Embryonalphase bei Wildtyp und Nkx6.2-mutanten Mäusen vergleichbar. Am E10.5 war Nkx6.1 sowohl im Wildtyp als auch in Nkx6.2-mutanten Mäusen in einem Großteil der epithelialen Pankreaszellen nachweisbar und mit Glukagon koexprimiert (Abb. 2.9A, D). Am E15.5 ist Nkx6.1 sowohl im Wildtyp als auch in den Nkx6.2-mutanten Mäusen mit Insulin koexprimiert (C,F) und ist auch in einzelnen Glukagon-positiven Zellen nachweisbar (Abb. 2.9B, E Pfeil).

Da das Expressionsmuster von Nkx6.1 bei Wildtyp und Nkx6.2-Mutante identisch ist, liegt im Gegensatz zur Regulation von Nkx6.2 durch Nkx6.1 keine Regulation von Nkx6.1 durch Nkx6.2 vor. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Nkx6.2 initial nicht für die Entwicklung pankreatischer Zelltypen benötigt wird.

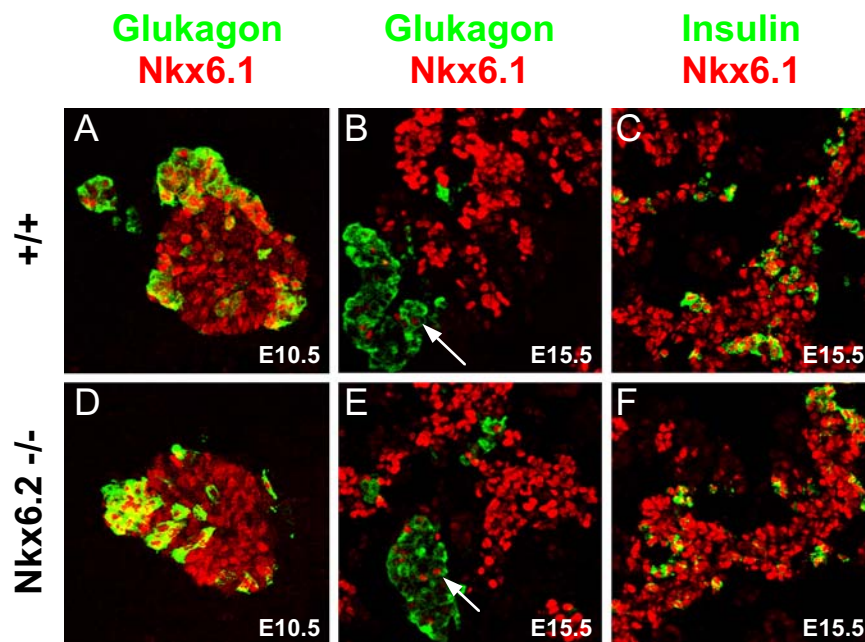


Abb. 2.9: Nkx6.1 wird nicht durch Nkx6.2 reguliert

Die Expression von Nkx6.1 wurde durch Immunfluoreszenzfärbung mittels eines polyklonalen Antikörpers gegen Nkx6.1 in der Pankreasanlage von Nkx6.2-mutanten und Wildtyp-Mäusen in verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Anzahl Nkx6.1 exprimierender Zellen sowohl am Embryonaltag (E) 10.5 als auch E15.5 bei Nkx6.2-Mutanten und Wildtyp vergleichbar war (A-F). Am E10.5 ist Nkx6.1 sowohl im Wildtyp als auch im Nkx6.2-mutanten Pankreas mit Glukagon koexprimiert (A,D). Am E15.5 ist Nkx6.1 im Wildtyp und in der Nkx6.2-Mutante in wenigen Zellen mit Glukagon (B,E, Pfeil) koexprimiert. Darüber hinaus ist Nkx6.1 zu diesem Zeitpunkt in Insulin-positiven Zellen des Wildtyps und der Nkx6.2-Mutante exprimiert (C,F)

2.5 Analyse der Pankreasentwicklung von Nkx6.1/Nkx6.2-doppelt mutanten Mäusen

Die Untersuchungen der Genexpression pankreatischer Marker in Wildtyp und Nkx6.2-mutanten Mäusen weisen darauf hin, dass Nkx6.2 keine eigenständige Funktion für die Zelldifferenzierung des Pankreas besitzt. Die Beobachtung, dass die Insulin exprimierenden Zellen im Pankreas Nkx6.1-mutanter Mäuse zwar stark reduziert, jedoch nicht abwesend sind (Sander et al., 2000b), legt jedoch die Vermutung nahe, dass weitere Faktoren vorhanden sein müssen, welche den Verlust von Nkx6.1 teilweise kompensieren können. Aufgrund der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit von Nkx6.1 und Nkx6.2 wäre denkbar, dass es sich bei einem dieser Faktoren um Nkx6.2 handelt. Um eine mögliche kompensatorische Funktion von Nkx6.2 für die Differenzierung endokriner Zellen des Pankreas

aufzudecken, wurden im Rahmen dieser Arbeit Nkx6.1/Nkx6.2-doppelt mutante (Nkx6) Embryonen erzeugt. Die Herstellung der Doppelmutanten erfolgte durch Kreuzung von Nkx6.1- und Nkx6.2-einfach mutanten Mäusen. Eine genaue Beschreibung der Vorgehensweise befindet sich im Abschnitt Material unter 4.4.3. Es folgte in unterschiedlichen Entwicklungsstadien eine immunhistochemische Untersuchung der Nkx6.1/Nkx6.2-mutanten Embryonen hinsichtlich der Pankreasentwicklung.

2.5.1 Immunhistochemische Untersuchung der Pankreasentwicklung Nkx6.1/Nkx6.2-mutanter Mäuse

Anhand der immunhistochemischen Untersuchung der Insulin-und Glukagon-Expression am E14.5 im Pankreas Nkx6-mutanter Mäuse konnte zunächst kein Effekt der gleichzeitigen Deletion von Nkx6.1 und Nkx6.2 auf die Entwicklung endokriner Zelltypen nachgewiesen werden. Im Wildtyp waren Glukagon exprimierende Zellen in kleinen Aggregaten sowie Insulin exprimierende Zellen nachweisbar, welche über das Pankreasepithel verstreut waren (Abb. 2.10A). Wie bereits aus vorangegangenen Untersuchungen zu vermuten war (siehe Abb. 2.7), ließ sich ein vergleichbares Expressionsmuster auch bei den Nkx6.2-mutanten Mäusen beobachten und die Anzahl der Glukagon und Insulin exprimierenden Zellen war gegenüber dem Wildtyp unverändert (Abb. 2.10B). Sowohl bei den Nkx6.1-mutanten als auch bei den Nkx6.1/Nkx6.2-doppelt mutanten Mäusen konnte nahezu keine Insulin-Expression nachgewiesen werden. Die Anzahl der Glukagon exprimierenden Zellen war jedoch weder bei einfach noch bei doppelt mutanten Mäusen gegenüber den Wildtyp Mäusen merklich verändert (Abb. 2.10C, D).

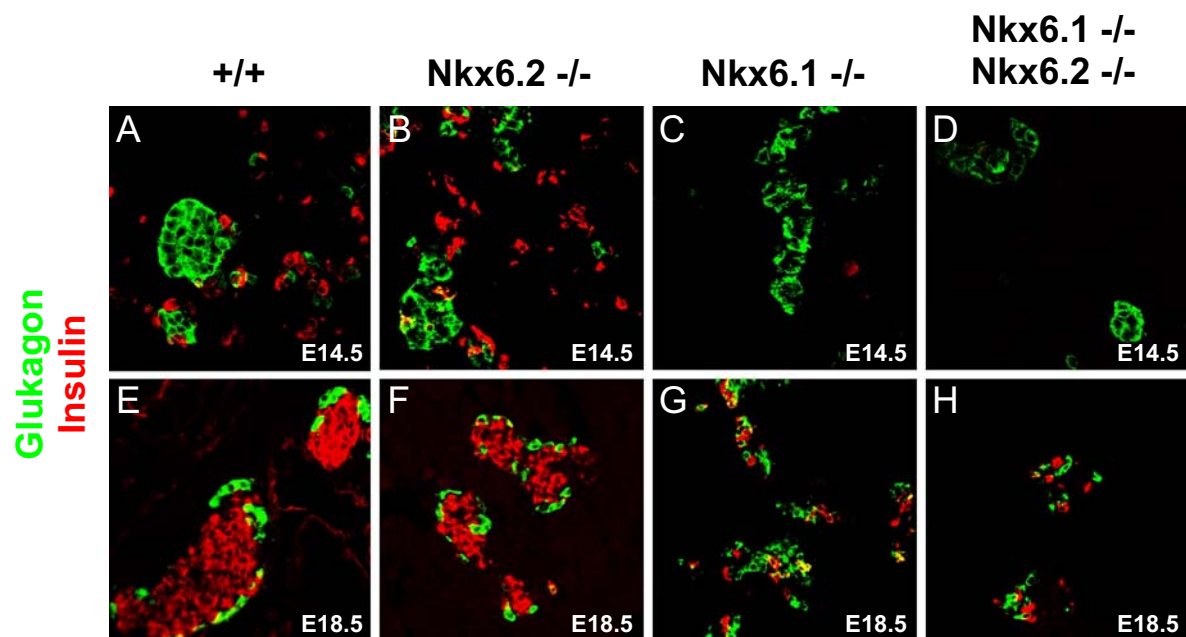


Abb. 2.10: Nkx6.1 und Nkx6.2 haben redundante Funktionen bei der Entwicklung endokriner Zellen

Gezeigt sind Schnitte durch die isolierte Pankreasanlage von Wildtyp (A,E) und Nkx6.1 (C,G) bzw. Nkx6.2- (B,F) mutanten sowie Nkx6.1/Nkx6.2-doppelt mutanten (D,H) Mäusen. Die Expression von Insulin und Glukagon wurde durch Immunfluoreszenzfärbung am Embryonaltag (E) 14.5 (A-D) und E18.5 (E-H) nachgewiesen. Am E14.5 ist die Anzahl der Insulin exprimierenden Zellen in der Nkx6.1-Mutante (C) sowie der Nkx6.1/Nkx6.2-Doppelmutante (D) gegenüber dem Wildtyp (A) deutlich reduziert. Die Glukagon-Expression ist hingegen unverändert. In den Nkx6.2-mutanten Mäusen ist im Vergleich zum Wildtyp kein Unterschied in der Expression von Insulin und Glukagon erkennbar (B).

Am E18.5 ist die Expression von Insulin in den Nkx6.1-Mutanten und Nkx6.1/Nkx6.2-Doppelmutanten im Vergleich zum Wildtyp weiterhin stark reduziert (G,H) und die Morphologie der Inseln ist merklich gestört. In den Nkx6.1/Nkx6.2-Mutanten erscheint die Anzahl der Insulin-positiven Zellen leicht reduziert (G+H). Darüber hinaus ist eine deutliche Reduktion der Glukagon-positiven Zellen zu beobachten, was bei den Nkx6.1-Mutanten nicht nachgewiesen werden kann (G+H). Die Anzahl Glukagon und Insulin-positiver Zellen sowie die grundsätzliche Organisation der Inseln in Nkx6.2-mutanten Mäusen ist gegenüber den Wildtyp-Mäusen unverändert (F). Eventuelle Unterschiede in der Größe der Inseln sind kein Anzeichen für einen Defekt, sondern dadurch bedingt, dass die Inselbildung am E18.5 noch nicht abgeschlossen ist. Unterschiede in der Größe individueller Inseln treten auch beim Wildtyp auf.

Dieses Ergebnis konnte durch „Real time PCR“ bestätigt werden, welche von Frau Dr. Kuhlbrodt im Labor von Frau Dr. Sander durchgeführt wurde. Auf eine Redundanz von Nkx6.1 und Nkx6.2 konnte somit zu diesem Entwicklungszeitpunkt nicht geschlossen werden.

Im Gegensatz zu E14.5 ließen sich jedoch am E18.5 Unterschiede in der Hormonexpression zwischen Nkx6.1-mutanten und doppelt mutanten Mäusen nachweisen. Am E18.5 waren im Pankreas der Wildtyp-Mäuse bereits

Langerhanssche Inseln erkennbar (Abb. 2.10E). Häufig war bereits eine ovale Form sowie die für die Langerhansschen Inseln typische Zellordnung erkennbar. Allerdings war die Größe der Inseln teilweise noch unterschiedlich und die Glukagon-Zellen waren nicht immer in der Peripherie angeordnet. Dieser Befund ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Inselbildung in der Maus am E18.5 noch nicht abgeschlossen war. Die Inseln der Nkx6.2-mutanten Mäuse wiesen eine vergleichbare Organisation auf (Abb. 2.10F). Im Einklang mit früheren Untersuchungen (Sander et al., 2000b), waren im Pankreas Nkx6.1-mutanter Mäuse hingegen keine intakten Inselstrukturen vorhanden. Die Zahl der Insulin exprimierenden Zellen war gegenüber den Wildtyp-Mäusen deutlich reduziert und die Glukagon- sowie verbliebenen Insulin-positiven Zellen waren nicht in ovalen Strukturen, sondern in kleinen gemischten Aggregaten oder langen Reihen angeordnet (Abb. 2.10G).

Ein ähnliches Expressionsmuster war auch in den Nkx6.1/Nkx6.2-mutanten Mäusen zu sehen. Die Zahl der Insulin exprimierenden Zellen schien gegenüber den Nkx6.1-Mutanten jedoch leicht reduziert zu sein. Zusätzlich war ein deutlicher Verlust Glukagon exprimierender Zellen gegenüber dem Wildtyp und den Nkx6.1- bzw. Nkx6.2-mutanten Mäusen zu verzeichnen (Abb. 2.10H). Um die Unterschiede in der Insulin- bzw. Glukagonexpression zwischen der Nkx6.1-Einfachmutante und der Doppelmutante zu quantifizieren, wurde die Zahl der Insulin bzw. Glukagon exprimierenden Zellen auf Schnitten durch den embryonalen Pankreas von Wildtyp und Nkx6-mutanten Mäusen am E18.5 bestimmt. Wie aus Abbildung 2.11 zu ersehen ist, konnte die Zellzahlbestimmung die oben beschriebenen Beobachtungen bestätigen. Die durchschnittliche Zahl der Insulin (Abb. 2.11, roter Balken) bzw. Glukagon (Abb. 2.11, grüner Balken) exprimierenden Zellen im Pankreas vom Wildtyp und der Nkx6.2-Mutante lagen etwa in der gleichen Größenordnung. In der Nkx6.1-Einfachmutante und der Nkx6.1/Nkx6.2-Doppelmutante war die Anzahl der Insulin exprimierenden Zellen deutlich niedriger als im Wildtyp, wobei die Zellzahl der Doppelmutante gegenüber der Nkx6.1-Einfachmutante zusätzlich etwas reduziert war. Die Zellzählung bestätigte außerdem die Beobachtung, dass die Nkx6.1/Nkx6.2-mutanten Mäuse merklich weniger Glukagon exprimierende Zellen besitzen als die Wildtyp- und die Nkx6.1- bzw. die Nkx6.2-mutanten Mäuse (Abb. 2.11).

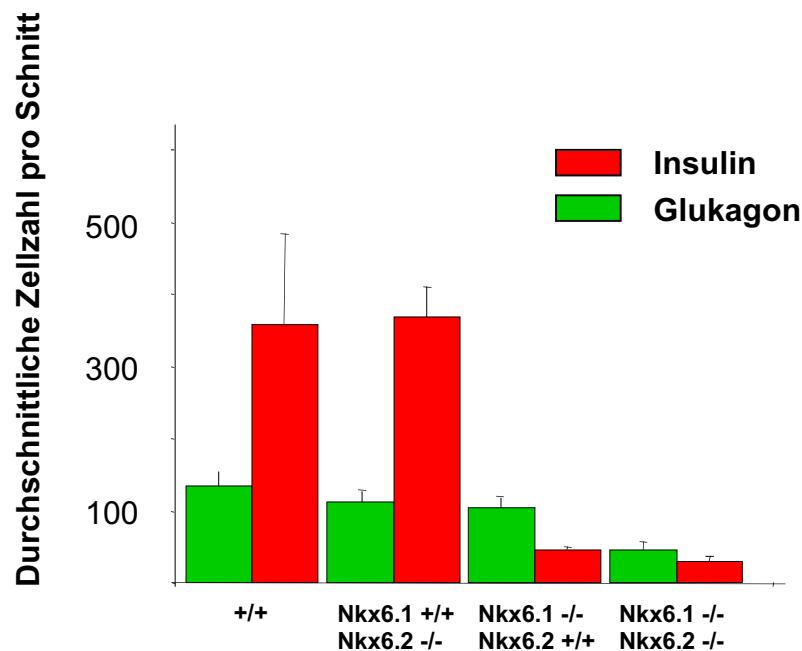


Abb. 2.11: Anzahl der Hormon exprimierenden Zellen im Pankreas von Wildtyp und mutanten Embryonen am Embryonaltag (E) 18.5

Die durchschnittliche Zellzahl der Insulin und Glukagon exprimierenden Zellen pro Schnitt wurde durch Zählung immunhistochemisch gefärbter Zellen auf zwanzig repräsentativen Schnitten durch die gesamte Pankreasanlage eines jeweiligen Embryos bestimmt (dies entspricht etwa jedem neunten Schnitt). Die Balken repräsentieren die durchschnittliche Anzahl der Hormon-positiven Zellen pro Schnitt + SED (Standard error of the means) von jeweils vier verschiedenen Pankreata. In den Nkx6.2-Mutanten ist die Anzahl der Insulin- und Glukagonzellen gegenüber dem Wildtyp unverändert. Die Nkx6.1-Mutanten und Nkx6.1/Nkx6.2-Mutanten weisen eine Reduktion von Insulin exprimierenden Zellen auf, wobei die Zahl der Insulinzellen in der Doppelmutante gegenüber der Nkx6.1-Einfachmutante schwach reduziert ist. Die Anzahl der Glukagon exprimierenden Zellen ist in den Nkx6.1- bzw. Nkx6.2-mutanten Mäusen gegenüber den Wildtyp-Mäusen unverändert, die Anzahl der Glukagon exprimierenden Zellen in den Nkx6.1/Nkx6.2-doppelt mutanten Mäusen ist gegenüber den Wildtyp Mäusen dagegen um 30-50% reduziert.

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob die Differenzierung der zwei weiteren endokrinen Zelltypen des Pankreas, der Somatostatin exprimierenden δ -Zellen und der Pankreatisches Polypeptid (PP) exprimierenden Zellen, in den verschiedenen Nkx6-Mutanten gestört ist.

Wie die immunhistochemische Analyse zeigte, war die Zahl der Somatostatin bzw. PP exprimierenden Zellen am E18.5 sowohl bei den Nkx6.1- bzw. Nkx6.2-einfach mutanten Mäusen als auch bei den doppelt mutanten Mäusen gegenüber den Wildtyp-Mäusen unverändert (Abb. 2.12A-D; E-H).

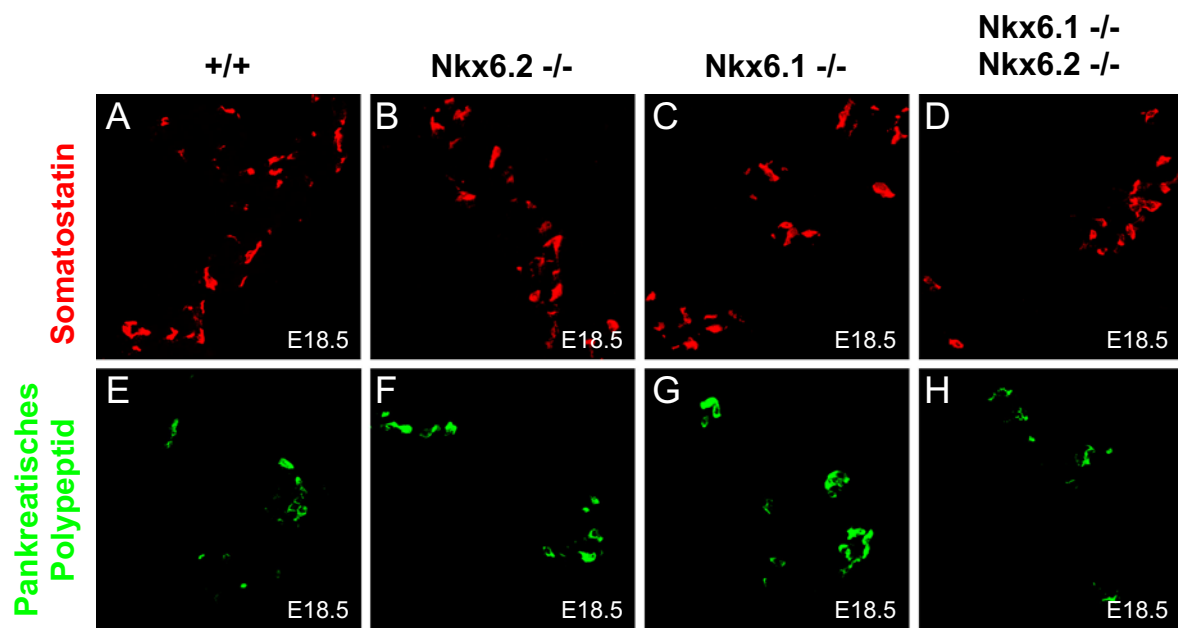


Abb. 2.12: Die Expression von Somatostatin und Pankreatischem Polypeptid ist in den Mutanten unbeeinträchtigt

Immunhistochemischer Nachweis von Somatostatin und Pankreatischem Polypeptid auf Schnitten durch die isolierte Pankreasanlage von Wildtyp- (A,E), Nkx6.2- (B,F), Nkx6.1-(C,G) und doppelt mutanten Mäusen (D,H) am Embryonaltag (E) 18.5. Die Expression beider Hormone, welche neben Glukagon und Insulin die weiteren zwei endokrinen Zelltypen des Pankreas charakterisieren, ist in allen Mutanten gegenüber dem Wildtyp unverändert.

Die Immunfluoreszenzfärbungen im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Zellzählung weisen somit darauf hin, dass Nkx6.1 und Nkx6.2 teilweise redundante Funktionen bei der Entwicklung der Glukagon exprimierenden α -Zellen und in geringerem Maße auch bei der Entwicklung der Insulin exprimierenden β -Zellen des Pankreas der Maus besitzen, für die Differenzierung der Somatostatin exprimierenden δ -Zellen und Pankreatisches Polypeptid exprimierenden Zellen jedoch nicht benötigt werden. Gleichzeitig deutet der Verbleib einer geringen Population Insulin exprimierender Zellen sowie einer soliden Population Glukagon exprimierender Zellen aber auch darauf hin, dass Nkx6.1/Nkx6.2-unabhängige Mechanismen der Differenzierung dieser Zelltypen existieren.

Abschließend wurde die Expression des exokrinen Markers Amylase in den Nkx6-Mutanten mit der Expression im Wildtyp verglichen. Wie bereits gezeigt wurde (siehe Abschnitt 2.5.1), ist die Expression von Amylase in den Nkx6.2-mutanten Mäusen gegenüber den Wildtyp-Mäusen nicht verändert (Abb. 2.7+2.8). Durch

immunhistochemische Färbungen auf Schnitten durch die Pankreasanlage der verschiedenen Nkx6-mutanten Mäuse und Wildtyp-Mäuse am E18.5 zeigte sich, dass die Expression von Amylase bei den Nkx6.1-mutanten und Nkx6.1/Nkx6.2-mutanten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls unverändert ist (Abb. 2.13A-D).

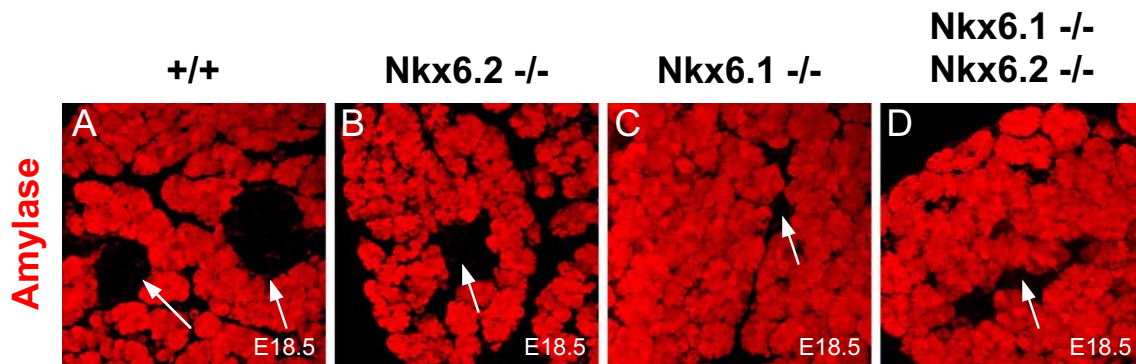


Abb. 2.13: Die Expression von Amylase ist in den mutanten Mäusen nicht verändert

Immunhistochemischer Nachweis der Amylase-Expression auf Schnitten durch die isolierte Pankreasanlage von Wildtyp- und mutanten Mäusen am Embryonaltag (E)18.5.

Amylase Expression ist in den differenzierten exokrinen Zellen von Wildtyp-Mäusen nachweisbar (A, in Rot). In endokrinen Zellen sowie anderen, nicht exokrinen Strukturen, wird Amylase hingegen nicht exprimiert. Die Nkx6.2-mutanten Mäuse weisen ein zum Wildtyp identisches Expressionsmuster auf und die Anzahl der exokrinen Zellen ist gegenüber den Wildtyp-Mäusen unverändert (B). Bei den Nkx6.1-mutanten und den Nkx6.1/Nkx6.2-doppelt mutanten Mäusen ist die Morphologie des Gewebes durch den Verlust geordneter Inselstrukturen verändert, die Amylase Expression ist gegenüber den Wildtyp-Mäusen jedoch nicht beeinträchtigt (C,D). Die Pfeile markieren endokrine Regionen des Epithels, die in das exokrine Gewebe eingelagert sind.

2.5.2 Untersuchung der Ngn3-Expression in Nkx6.1/Nkx6.2-doppelt mutanten Mäusen

Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass Nkx6.1 und Nkx6.2 teilweise redundante Funktionen für die Entwicklung der α - und β -Zellen des Pankreas der Maus besitzen (siehe Abschnitt 2.4.1). Es stellte sich nun die Frage, ob die Abwesenheit von Nkx6.1 und Nkx6.2 zu einem Verlust der endokrinen Vorläufer führt oder ob Nkx6-Gene eine spätere Funktion in der weiteren Differenzierung dieser Vorläuferzellen ausüben. Wie im Abschnitt 2.5.1 dieser Arbeit bereits gezeigt werden konnte, entwickeln sich die Somatostatin exprimierenden δ -Zellen und die Pankreatisches Polypeptid exprimierenden Zellen unabhängig von Nkx6-Genen. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass endokrine Vorläuferzellen auch in Abwesenheit

von Nkx6.1 und Nkx6.2 spezifiziert werden. Es ist jedoch auch möglich, dass Nkx6.1 und Nkx6.2 für die Entstehung und Spezifizierung einer Subpopulation endokriner Vorläufer verantwortlich ist. Daher wurde die Entwicklung der endokrinen Vorläuferzellen durch *in situ*-Hybridisierung mit einer Ngn3 Antisense Sonde im endokrinen Pankreas von Wildtyp, Nkx6.1- und Nkx6.2-einfach mutanten Mäusen, sowie Nkx6.1/Nkx6.2-doppelt mutanten Mäusen untersucht.

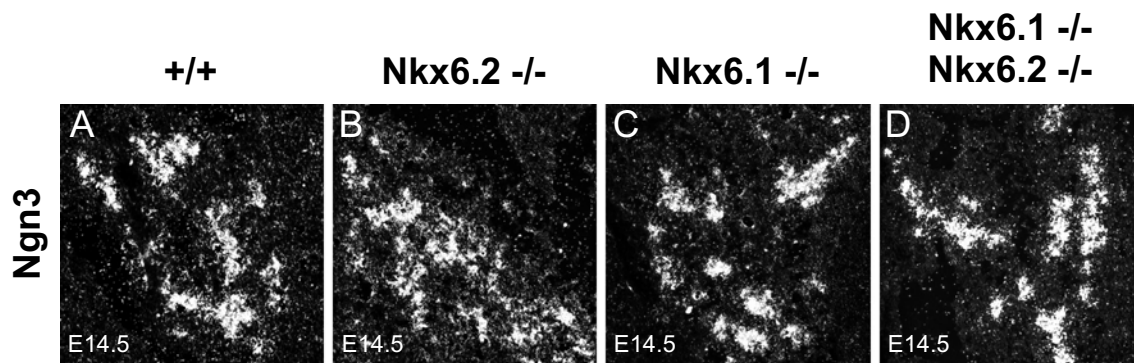


Abb. 2.14: Die Expression von Ngn3 erfolgt unabhängig von Nkx6.1 und Nkx6.2

Radioaktive *in situ*-Hybridisierung mit einer RNS-Antisense-Sonde im Pankreas von Wildtyp- (A), Nkx6.2- (B), Nkx6.1- (C) und Nkx6.1/Nkx6.2-doppelt mutanten Mäusen (D). Gezeigt sind sagittale Schnitte durch Embryonen im Bereich der Pankreasanlage am E14.5. Die Expression von Ngn3 ist in allen Mutanten gegenüber dem Wildtyp unverändert. Daraus kann abgeleitet werden, dass sich die endokrinen Vorläufer unabhängig von Nkx6.1 und Nkx6.2 entwickeln können.

Ngn3 ließ sich am E14.5 im Pankreasepithel sowohl der Wildtyp-Mäuse als auch der Nkx6.1- bzw. Nkx6.2- einfach mutanten sowie doppelt mutanten Mäuse nachweisen und der Grad der Ngn3-Expression der verschiedenen Nkx6-Mutanten war identisch zum Wildtyp (Abb. 2.14A, B-D). Diese Beobachtung zeigt, dass Nkx6.1 und Nkx6.2 für die Spezifizierung der frühen endokrinen Vorläufer im Pankreas der Maus nicht benötigt werden.

3 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Zielgene des für die Differenzierung der β -Zellen im Pankreas der Maus essenziellen Homöodomänen-Transkriptionsfaktors Nkx6.1 identifiziert werden. Durch vergleichende Gen-Chip-Analyse der RNS aus Pankreas von Wildtyp und Nkx6.1-mutanten Embryonen sowie durch immunhistochemische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der zu Nkx6.1 verwandte Homöodomänen-Transkriptionsfaktor Nkx6.2 während der embryonalen Entwicklung des Pankreas durch Nkx6.1 reguliert wird. Die Untersuchung der Nkx6.1- und Nkx6.2-Expression im Pankreas von Mäuseembryonen ergab, dass die beiden Faktoren im Wildtyp in überwiegend komplementären Domänen exprimiert sind und Nkx6.2 im Nkx6.1-mutanten Hintergrund ektopisch exprimiert wird. Da Nkx6.2 eine hohe Sequenzhomologie zu Nkx6.1 aufweist, deuten diese Befunde darauf hin, dass Nkx6.2 in Abwesenheit von Nkx6.1 teilweise das Fehlen von Nkx6.1 kompensieren könnte. Die Analyse Nkx6.2-mutanter Mäuse ließ zunächst nicht auf eine Funktion dieses Faktors bei der endokrinen Entwicklung schließen. Die Nkx6.2-mutanten Mäuse erwiesen sich als äußerlich unauffällig und die Entwicklung aller pankreatischen Zelltypen war normal. Durch die Untersuchung Nkx6.1/Nkx6.2-doppelt mutanter Mäuse zeigte sich jedoch, dass Nkx6.1 und Nkx6.2 teilweise redundante Funktionen bei der Differenzierung der α - und β -Zellen ausüben. Im Gegensatz zu Nkx6.1-Einfachmutanten, die eine Reduktion der β -Zellen aufweisen, ließ sich bei den Doppelmутanten eine Reduktion der α -Zellen und eine weitere Verringerung der β -Zellen beobachten. In der Diskussion sollen folgende Gesichtspunkte dieser Befunde besprochen werden: Zunächst soll die Funktion der Nkx6-Faktoren bei der Pankreasentwicklung diskutiert werden. Im folgenden Abschnitt sollen mögliche Mechanismen der Regulation von Nkx6.2 durch Nkx6.1 besprochen werden. Anschließend soll beleuchtet werden, welche Aspekte der Nkx6.1- und Nkx6.2-Funktion redundant sind und welche funktionelle Bedeutung die Erhaltung redundanter Gene hat. Im Hinblick auf zukünftige Projekte soll abschließend diskutiert werden, wie verifiziert werden kann, dass es sich bei anderen Genen, die in der Gen-Chip-Analyse als differenziell exprimiert identifiziert wurden, um Zielgene von Nkx6.1 bei der β -Zelldifferenzierung handelt.

3.1 Die Funktion von Nkx6-Genen für die Entwicklung endokriner Zellen

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass Nkx6.1 und Nkx6.2 teilweise redundante Funktionen bei der Entwicklung von α - und β -Zellen des endokrinen Pankreas besitzen. Der beobachteten Reduktion endokriner Zellen bei Nkx6-mutanten Mäusen könnten verschiedene Ursachen zu Grunde liegen. Nkx6-Proteine könnten zum einen für die Ausbildung der endokrinen Zellen, zum anderen für deren Erhalt benötigt werden. Beide Funktionen würden bei einer Mutation der Gene zu einer Verminderung der Zahl terminal differenzierter α - und β -Zellen führen. Verschiedene Beobachtungen sprechen gegen eine Funktion von Nkx6-Proteinen für den Erhalt endokriner Zellen. Zum einen konnte bei Nkx6.1-einfach mutanten Mäusen im Pankreas keine erhöhte Apoptoserate beobachtet werden (Sander et al., 2000b). Zum anderen spricht das Expressionsmuster von Nkx6.2 gegen eine mögliche Funktion beim Zellerhalt. Obwohl Nkx6.2 teilweise die Funktion von Nkx6.1 bei der α - und β -Zellentwicklung kompensiert, findet sich bei Nkx6.1-Mutanten keine ektopische Expression von Nkx6.2 in reifen α - und β -Zellen (siehe Abb. 2.6). Da eine Zellerhaltungsfunktion eines Transkriptionsfaktors in der Regel die Expression des Faktors im betreffenden Zelltyp erfordert, spricht diese Beobachtung gegen eine Erhaltungsfunktion.

Die Ergebnisse vorhergehender und dieser Untersuchungen sprechen dagegen für eine Funktion der Nkx6-Proteine bei der Differenzierung endokriner Zellen aus ihren Vorläuferzellen. Im Folgenden soll mit Bezugnahme auf die Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert werden, welche Schritte der α - bzw. β -Zelldifferenzierung möglicherweise durch Nkx6-Faktoren reguliert werden.

Wie in Kapitel 1.3.1 der Einleitung genauer beschrieben, entwickeln sich sowohl endokrine als auch exokrine Zellen aus dem Epithel der Pankreasknospe. Im Knospenstadium exprimieren zunächst fast alle Epithelzellen den Transkriptionsfaktor Pdx1 und durch „cell lineage“-Analysen konnte gezeigt werden, dass sowohl endokrine als auch exokrine und Gangzellen aus diesen Pdx1 positiven Vorläufern hervorgehen (Gu, 2002). Im Laufe der endokrinen Differenzierung wird ein pan-endokriner Vorläufer gebildet, der durch den Transkriptionsfaktor Ngn3 markiert ist. „Lineage tracing“-Studien zeigen, dass alle vier endokrinen Zelltypen, nicht jedoch exokrine oder Gangzellen aus diesen Ngn3 exprimierenden Vorläufern

hervorgehen (Gu, 2002). Derzeit ist noch unklar, zu welchem Entwicklungszeitpunkt und durch welche Faktoren die unterschiedlichen endokrinen Subtypen spezifiziert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass Nkx6.1 und Nkx6.2 eine Funktion für die Differenzierung Ngn3-positiver Zellen zu reifen α - und β -Zellen ausüben (Abb. 3.1). Für eine späte Funktion von Nkx6.1 und Nkx6.2 bei der Differenzierung der α - und β -Zellen spricht, dass die Expression von Ngn3 in Nkx6-einfach sowie -doppelt mutanten Mäusen gegenüber den Wildtyp-Mäusen nicht verändert ist (Abb. 2.14). Obwohl bisher nicht eindeutig geklärt ist, wann die endokrinen Subtypen spezifiziert werden, spricht die Beobachtung, dass in Nkx6-mutanten Mäusen lediglich die α - und β -Zelldifferenzierung, nicht aber die Entwicklung aller endokrinen Zelltypen des Pankreas beeinträchtigt ist, für eine Funktion der Nkx6-Faktoren nach der Spezifizierung Ngn3-positiver Vorläufer. Ein weiteres Indiz für eine späte Funktion bei der endokrinen Differenzierung ist, dass die Anzahl Glukagon exprimierender Zellen in der Pankreasanlage der Nkx6.1/Nkx6.2-doppelt mutanten Mäuse erst nach E14.5 gegenüber dem Wildtyp vermindert ist (Abb. 2.10).

Nkx6-Faktoren könnten entweder zusammen mit Ngn3 die endokrine Differenzierung steuern oder stromabwärts von Ngn3 benötigt werden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen können den vorliegenden Mechanismus nicht aufklären und schließen beide Möglichkeiten nicht aus. Da Nkx6.1 in einer Population endokriner Vorläufer mit Ngn3 koexprimiert wird (Sander et al., 2000b), ist es möglich, dass Nkx6.1 direkt mit Ngn3 zusammen wirkt. Gegen eine Funktion parallel zu Ngn3 spricht jedoch das Muster der ektopischen Expression von Nkx6.2 in Nkx6.1-Mutanten. Die immunhistochemischen Untersuchungen zeigen, dass Nkx6.2 den Verlust von Nkx6.1 bei der endokrinen Differenzierung zwar teilweise kompensiert, jedoch zu keinem Zeitpunkt der Entwicklung mit Ngn3 koexprimiert wird (Abb. 2.3D und Abb. 2.6C, G). Dies könnte bedeuten, dass Nkx6.2 in endokrinen Vorläufern exprimiert wird, die Ngn3 auf ihrem Differenzierungsweg zu α - oder β -Zellen bereits abgeschaltet haben (Abb. 3.1). Es ist möglich, dass Nkx6.1 im Wildtyp ebenfalls in solchen Vorläufern exprimiert wird. Nkx6.1 ist, ebenso wie Nkx6.2 im Wildtyp und ektopisch in der Nkx6.1-Mutante, teilweise mit Pdx1 koexprimiert (nicht gezeigte Beobachtung). Da zurzeit keine Markerproteine zur Identifizierung später endokriner Vorläufer bekannt sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht untersucht werden, ob es sich bei den Pdx1/Nkx6.1- und Pdx1/Nkx6.2-positiven

Zellen um solche Vorläufer handelt. Die Analyse der Nkx6.1- und Nkx6.2-Expression in Ngn3-mutanten Mäusen könnte Aufschluss darüber geben, ob Nkx6-Faktoren tatsächlich stromabwärts von Ngn3 exprimiert werden. Analog zu den für Pdx1 und Ngn3 durchgeführten Studien, stellen „lineage tracing“-Experimente eine weitere Möglichkeit dar, die Differenzierungsschritte der Nkx6.2 exprimierenden Zellen *in vivo* zu verfolgen. Hierfür müsste eine Mauslinie, welche eine induzierbare Cre-Rekombinase (Danielian, 1998; Metzger, 1995) unter der Kontrolle des Nkx6.2-Promotors exprimiert, mit einer Reportermaus gekreuzt werden, welche einen histologischen Marker (z.B. die β -Galaktosidase) ubiquitär in Abhängigkeit von der Cre-Rekombinase exprimiert. In den doppelt positiven Mäusen wird die Cre-Rekombinase in allen Zellen mit aktivem Nkx6.2-Promotor exprimiert, so dass diese infolge dessen markiert werden können. Kreuzt man diese Mäuse wiederum mit Nkx6.1 deletierten Mäusen bis zur Homozygotität des mutierten Nkx6.1-Allels, können alle Zellen erfasst werden, welche in der Nkx6.1-Mutante Nkx6.2 exprimieren. Bei diesem Verfahren kann die Expression von Nkx6.2 in einer Zelle auch dann nachgewiesen werden, wenn sie Nkx6.2 zu einem späteren Zeitpunkt nicht mehr exprimiert, da die β -Galaktosidase nach Cre vermittelter Rekombination konstitutiv exprimiert bleibt. Wird Nkx6.2 während der endokrinen Zelldifferenzierung stromaufwärts von Ngn3 exprimiert, sollte Nkx6.2 in den Nkx6.1-mutanten Reporter-mäusen mit lacZ koexprimiert werden. Wird Nkx6.2 hingegen stromabwärts von Ngn3 exprimiert, sollte im Pankreas keine Koexpression des Markers und Ngn3 nachweisbar sein.

Wie oben diskutiert, sprechen die Ergebnisse für eine Funktion der Nkx6-Faktoren bei der Differenzierung endokriner Vorläufer in reife α - und β -Zellen. Es stellt sich die Frage, welches Schicksal die endokrinen Vorläufer der Nkx6-mutanten Mäuse erfahren, wenn sie nicht in α - und β -Zellen differenzieren. Bei anderen Mausmutanten mit Defekten in der endokrinen Differenzierung, wie zum Beispiel der Pax4-Mutante (Sosa-Pineda et al., 1997), konnte gezeigt werden, dass die Vorläuferzellen in Abwesenheit des Faktors in einen anderen endokrinen Zelltyp differenzieren. Bei Pax4-Mutanten ist ein Verlust der β - und δ -Zellen zu beobachten, gleichzeitig ist jedoch die Anzahl der α -Zellen vermehrt. Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei Pax4 Mutanten konnte bei Nkx6-Mutanten keine erhöhte Anzahl anderer endokriner Zellen festgestellt werden (Abb. 2.12). Diese Ergebnisse könnten dahingehend interpretiert werden, dass die Vorläuferzellen zum Zeitpunkt der

Aktivierung von Nkx6-Faktoren bereits einen Teil ihrer Plastizität verloren haben und somit nicht mehr in andere Zelltypen differenzieren können. Zurzeit ist noch unklar, was in Nkx6-Mutanten mit den α - und β -Zellvorläufern passiert, wenn sie keine weitere Differenzierung durchlaufen. Wie bereits oben erwähnt, konnte im gesamten Pankreas bei Nkx6.1-Einfachmutanten während verschiedener Stadien der Embryonalentwicklung keine erhöhte Apoptoserate festgestellt werden (Sander et al., 2000b). Um den Mechanismus aufzuklären, müsste die Apoptose- und Proliferationsrate bei Nkx6-Mutanten direkt in α - und β -Zellvorläufern untersucht werden. Da ein spezifischer Marker für diese Zellpopulationen fehlt, konnten diese Experimente jedoch nicht durchgeführt werden.

Die in dieser Arbeit durch genetische Studien gewonnenen Ergebnisse deuten auf eine späte Funktion von Nkx6.1 und Nkx6.2 bei der endokrinen Differenzierung hin. Die Untersuchungen zeigen jedoch auch, dass beide Faktoren schon früh in den undifferenzierten Epithelzellen der Pankreasknospe exprimiert sind. Nkx6.2 ist bereits am E9.5 in der ventralen und dorsalen Pankreasknospe nachweisbar (Abb. 2.2). Wie in Abbildung 2.3 gezeigt, ist am E10.5 auch Nkx6.1 nachweisbar und zu diesem Zeitpunkt werden beide Faktoren in einem Teil der Epithelzellen koexprimiert. Trotz dieser frühen Expression in der Pankreasanlage ist die Entwicklung des Organs nicht von Nkx6.1 und Nkx6.2 abhängig. In unserer Arbeitsgruppe konnte kürzlich ein weiterer Nkx6-Transkriptionsfaktor identifiziert werden, der wie Nkx6.1 und Nkx6.2 im frühen Pankreasepithel exprimiert ist. Im Gegensatz zu den anderen beiden Nkx6-Faktoren ist Nkx6.3 jedoch zum Zeitpunkt der endokrinen Differenzierung nicht mehr im Pankreas nachweisbar (M.Sander, mündl. Mitteilung). Nkx6.3 weist eine sehr hohe Sequenzhomologie zu Nkx6.2 auf. Dieser Befund weist darauf hin, dass Nkx6.3 den Verlust von Nkx6.1 und Nkx6.2 in der frühen Pankreasantwicklung kompensieren könnte. Ob Nkx6-Aktivität tatsächlich für die frühe Entwicklung des Organs benötigt wird, kann nur durch die Herstellung mehrfach mutanter Mäuse aufgeklärt werden. In unserer Arbeitsgruppe werden hierfür derzeit Nkx6.3-mutante Mäuse hergestellt. Es ist nicht ungewöhnlich, dass ein Faktor getrennte Funktionen in der frühen und späten Entwicklung eines Organs ausübt. So ist Pdx1 beispielsweise in der frühen Embryonalphase für das Wachstum der Pankreasknospe verantwortlich und reguliert später in der differenzierten β -Zelle die Expression des Insulin-Gens (Offield et al., 1996; Ohlsson et al., 1993).

Ob differenzierte endokrine Zellen für ihre Funktion Nkx6.2-Aktivität benötigen, ist derzeit noch unklar. Nkx6.1 ist der einzige der drei Nkx6-Faktoren, der nach der Geburt im Pankreas exprimiert ist. Da Nkx6.1-mutante Mäuse bereits bei der Geburt sterben, kann in diesem Modell die Funktion von Nkx6.1 in adulten β -Zellen nicht untersucht werden. Wie für Pdx1 (Ahlgren et al., 1998), müsste für die Untersuchung der Nkx6.1-Funktion im adulten Pankreas ein konditionaler „Knock-out“ hergestellt werden. Durch gezielte Deletion des Nkx6.1-Gens in β -Zellen könnte dann die Bedeutung der Nkx6.2-Aktivität für die β -Zellfunktion untersucht werden. Kürzlich in unserer Arbeitsgruppe erhaltene Ergebnisse weisen bereits indirekt auf eine Funktion von Nkx6.1 in reifen β -Zellen hin. Der Transkriptionsfaktor MafA ist selektiv in den Insulin produzierenden Zellen des sich entwickelnden und adulten Pankreas exprimiert und ist in der Lage, an den Insulin-Promotor zu binden und diesen zu transaktivieren (Kataoka, 2002; Olbrot, 2002). Im Gegensatz zu Wildtyp- β -Zellen exprimieren die verbleibenden β -Zellen in Nkx6.1-mutanten Mäusen kein MafA (Maike Sander, mündl. Mitteilung). Dieser Verlust der MafA Expression in β -Zellen deutet darauf hin, dass Nkx6.1 für Schritte der terminalen Differenzierung von β -Zellen von Bedeutung sein könnte.

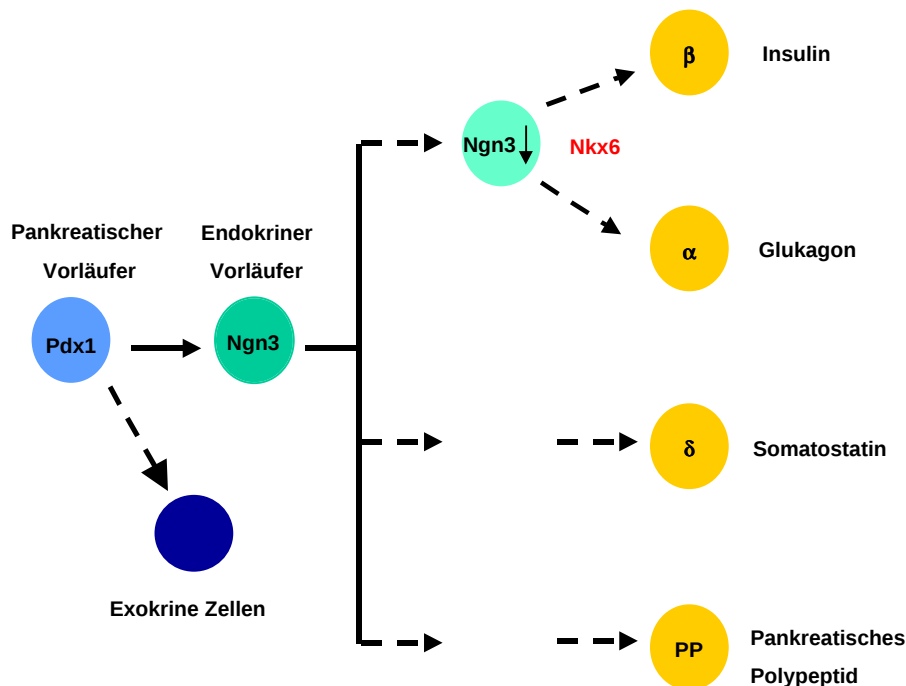


Abb. 3.1: Modell für die Regulation der endokrinen Zellentwicklung durch Nkx6-Faktoren

Die Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren Nkx6.1 und Nkx6.2 haben redundante Funktionen bei der Entwicklung der α - und β -Zellen des Pankreas der Maus. Nkx6.1/Nkx6.2-mutante Mäuse weisen eine normale Expression von Pdx1 und Ngn3 auf. Da sich die δ - und PP Zellen in Nkx6-mutanten Mäusen normal entwickeln, werden Nkx6.1 und Nkx6.2 wahrscheinlich für die Differenzierung Ngn3-positiver Vorläufer zu reifen α - und β -Zellen benötigt.

3.2 Die Regulation von Nkx6.2 durch Nkx6.1

Die Ergebnisse der Gen-Chip-Analyse und der immunhistochemischen Untersuchungen deuten darauf hin, dass Nkx6.1 die Expression von Nkx6.2 reguliert. Da Nkx6.1 ein transkriptioneller Repressor ist (Muhr et al., 2001) und Nkx6.2 ektopisch im Pankreas von Nkx6.1-Mutanten exprimiert wird, könnte es sich hierbei sowohl um eine direkte, als auch eine indirekte Regulation handeln. Um zu überprüfen, ob es sich möglicherweise um eine direkte Repression des Nkx6.2-Promotors durch Nkx6.1 handelt, wurden 5 kb genomischer Sequenz stromaufwärts vom potenziellen Transkriptionsstart des murinen und humanen Nkx6.2-Gens auf Bindungsstellen für Nkx6.1 durchmustert. Nkx6.1 bindet an die Konsensussequenz TTAATTAG bzw. TTAATTG/A (Jorgensen, 1999; Mirmira et al., 2000), die das Kernmotiv TAAT als Homöodomänen-Bindungsmotiv enthält. Eine vollständige Homologie zu diesem Motiv konnte innerhalb der 5 kb umfassenden Promotorregion

weder in sense noch in antisense-Richtung identifiziert werden. Allerdings konnten der Konsensussequenz ähnliche Sequenzen identifiziert werden, welche das gemeinsame Kernmotiv aller Homöodomänen-Proteine, TAAT, sowie eine bis zwei weitere Basen der Nkx6.1-Bindestelle umfassen. Daher könnte Nkx6.1 an den Nkx6.2-Promotor binden.

Um experimentell zu überprüfen, ob die potenziellen Bindungsstellen eine Repression des Nkx6.2-Promotors durch Nkx6.1 vermitteln, wurden Bereiche aus der Promotorregion, welche diese Motive enthielten, in den Reportervektor pGL3 eingebracht. Dieser Vektor trägt das Luziferase-Gen stromabwärts der Klonierungsstelle für den Promotor. Die Expression der Luziferase dient nach Einbringen dieses Vektors in eine Zelllinie als Maß für die Aktivität des Nkx6.2-Promotors.

Um eine mögliche Repression der Promotoraktivität durch Nkx6.1 dokumentieren zu können, galt es zunächst eine Zelllinie zu identifizieren, in der das Nkx6.2-Gen exprimiert wird und somit der Promotor aktiv ist. In Testversuchen stellte sich heraus, dass der Nkx6.2-Promotor weder in adulten α -TC noch β -TC (Tumorzelllinien aus adulten α -Zellen bzw. adulten β -Zellen) aktiv ist. Da es bisher nicht gelungen ist, eine Zelllinie zu identifizieren, in welcher der Nkx6.2-Promotor aktiv ist, konnten im Rahmen dieser Arbeit keine weiteren Untersuchungen einer direkten Repression der Nkx6.2-Transkription durch Nkx6.1 durchgeführt werden. Viel versprechend als mögliche Modellzelllinie erscheinen embryonale Pankreaszelllinien, da Nkx6.2 nur im embryonalen, nicht aber im adulten Pankreas exprimiert wird. Eine weitere Möglichkeit, Interaktionen von Nkx6.1 mit den potenziellen Bindestellen im Nkx6.2-Promotor zu untersuchen, ist der EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay). Obwohl die beschriebenen Experimente wertvolle Hinweise auf das Vorliegen einer direkten Regulation der Nkx6.2-Expression durch Nkx6.1 liefern können, kann eine definitive Aussage nur dadurch erbracht werden, dass die funktionelle Bedeutung der Nkx6.1-Bindungsstellen *in vivo* gezeigt wird.

Einige in dieser Arbeit vorgestellten Befunde deuten darauf hin, dass zusätzliche Proteine die Repression von Nkx6.2 durch Nkx6.1 modulieren. Obwohl Nkx6.2 im Pankreas Nkx6.1-mutanter Embryonen ektopisch in vielen undifferenzierten epithelialen Zellen exprimiert wird, zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse auch, dass nicht alle Zellen, die normalerweise Nkx6.1-positiv sind, in Nkx6.1-Mutanten eine ektopische Expression von Nkx6.2 aufweisen. Während Nkx6.1 bei Wildtyp-Mäusen

mit Ngn3 koexprimiert wird, konnte in Nkx6.1-Mutanten keine Koexpression von Nkx6.2 und Ngn3 festgestellt werden. Dies zeigt, dass nicht alle Zellen bei Verlust von Nkx6.1 ektopisch Nkx6.2 exprimieren. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass möglicherweise bisher unbekannte, Zelltyp-spezifische Faktoren darüber entscheiden, ob in Abwesenheit von Nkx6.1 eine Derepression von Nkx6.2 erfolgt. In der Gen-Chip-Analyse konnten weitere Gene identifiziert werden, die möglicherweise durch Nkx6.1 reguliert werden. Es ist denkbar, dass einer der durch diese Gene kodierten Faktoren eine Funktion bei der Regulation der Nkx6.2 Expression ausübt. Dies könnte im Rahmen zukünftiger Projekte untersucht werden.

3.3 Die Redundanz von Nkx6-Faktoren bei der endokrinen Zellentwicklung der Maus

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie legen nahe, dass Nkx6.1 und Nkx6.2 bei der endokrinen Zellentwicklung redundante Funktionen ausüben. Da Nkx6.1 und Nkx6.2 während der endokrinen Zelldifferenzierung nicht koexprimiert sind, würde man zunächst nicht annehmen, dass die beiden Proteine *in vivo* Redundanz zeigen. Obwohl die Mutation von Nkx6.2 allein keinen Defekt bei der endokrinen Differenzierung hervorruft, führt die Mutation von Nkx6.2 auf Nkx6.1-mutantem Hintergrund im Vergleich zu Nkx6.1-Mutanten zu einer weiteren Reduktion der β -Zellen. Darüber hinaus weisen Nkx6.1/Nkx6.2-doppelt mutante Mäuse eine Reduktion der α -Zellen auf, die bei Nkx6.1- oder Nkx6.2-einfach mutanten Mäusen nicht beobachtet wird (Abb. 2.10). Demzufolge ist Nkx6.2 in Abwesenheit von Nkx6.1 in der Lage, dessen Verlust bei der Differenzierung der α -Zellen und teilweise bei der Differenzierung der β -Zellen zu kompensieren. Da Nkx6.2 in Abwesenheit von Nkx6.1 im Pankreas ektopisch exprimiert wird, lässt sich folgern, dass die Kompensation in Nkx6.1-Mutanten durch die Derepression der Nkx6.2-Expression erfolgt. Die deutliche Reduktion der β -Zellen in Nkx6.1-einfach mutanten Mäusen zeigt aber auch, dass Nkx6.2 den Verlust von Nkx6.1 nicht vollständig kompensieren kann. Es stellt sich daher die Frage, warum paraloge Gene¹ wie Nkx6.1 und Nkx6.2

¹ Gruppe von Genen, die in ihrer Basensequenz eine hohe Übereinstimmung zeigen und in ein und demselben Organismus vorkommen; werden als in der Evolution zustande gekommene Vervielfältigungen eines einzelnen Urgens betrachtet.

zwar ähnliche aber nicht identische Funktionen bei der Zellspezifizierung besitzen. Für eine vollständige funktionelle Redundanz ist eine völlige Übereinstimmung der räumlichen und zeitlichen Expressionsdomänen, der Expressionsintensität und der funktionellen Eigenschaften beider Faktoren Voraussetzung. Im Folgenden sollen die möglichen Ursachen diskutiert werden, warum Nkx6.2 den Verlust von Nkx6.1 nur partiell kompensiert.

Wie die vergleichende Analyse der Expression von Nkx6.1 und Nkx6.2 zeigte, besteht sowohl zeitlich als auch räumlich keine absolute Übereinstimmung in der Expressionsdomäne der Nkx6-Faktoren. Nkx6.1 und Nkx6.2 sind in Wildtyp-Mäusen in den meisten Epithelzellen der frühen Pankreasanlage koexprimiert (Abb. 2.4A, B). Bereits am Embryonaltag E12.5, also ungefähr zu dem Zeitpunkt, an dem die endokrine Zelldifferenzierung einsetzt, sind Nkx6.1 und Nkx6.2 aber überwiegend in verschiedenen Zellpopulationen exprimiert (Abb. 2.4C, D). Während Nkx6.1 in Ngn3-positiven endokrinen Vorläufern und differenzierten β -Zellen exprimiert wird (Sander et al., 2000b), kann zu keinem Zeitpunkt der Entwicklung eine Koexpression von Ngn3 bzw. Insulin und Nkx6.2 nachgewiesen werden (Abb. 2.3D+F). In Nkx6.1-mutanten Mäusen ist Nkx6.2 in vielen Epithelzellen ektopisch exprimiert, aber auch hier kann keine Koexpression mit Ngn3 beobachtet werden (Abb. 2.6C+G). Obwohl aufgrund des Fehlens geeigneter Marker nicht ausgeschlossen werden kann, dass die ektopisch in der Nkx6.1-Mutante Nkx6.2 exprimierenden Epithelzellen im Wildtyp Nkx6.1 exprimieren, weist dies darauf hin, dass Nkx6.2 auch ektopisch nicht in genau derselben Zellpopulation wie normalerweise Nkx6.1 exprimiert wird. Auch bei der Entwicklung von Motoneuronen im Rückenmark weisen Nkx6.1 und Nkx6.2 partiell redundante Funktionen auf. Analog zu den Befunden im Pankreas wird Nkx6.2 in Abwesenheit von Nkx6.1 ektopisch exprimiert, was nahelegt, dass auch im Rückenmark die beobachtete Redundanz auf einer Derepression von Nkx6.2 in Abwesenheit von Nkx6.1 beruht (Vallstedt, 2001). Im Gegensatz zum Pankreas scheint im Rückenmark die ektopische Expression von Nkx6.2 jedoch alle Zellen zu umfassen, die normalerweise Nkx6.1 exprimieren. Allerdings konnte beobachtet werden, dass in den ektopisch Nkx6.2 exprimierenden Zellen Nkx6.2 im Vergleich zu Nkx6.1 auf niedrigerem Niveau exprimiert wird.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Analyse der Nkx6.2-Expression weist darauf hin, dass im Pankreas ebenfalls Unterschiede im Expressionsniveau der Nkx6-Faktoren bestehen. Die ektopische Expression von Nkx6.2 erschien merklich

schwächer als die Expression von Nkx6.1. Obwohl eine Quantifizierung der Proteinkonzentration durch Immunhistochemie nicht möglich ist, deuten diese Beobachtungen darauf hin, dass auch im Pankreas die Menge ektopisch exprimierten Nkx6.2-Proteins geringer ist als die Menge des im Wildtyp exprimierten Nkx6.1-Proteins. Aufgrund dieser Beobachtungen ist nicht ausgeschlossen, dass Nkx6.2 auch in Ngn3-positiven Zellen der Nkx6.1-Mutante exprimiert wird, die Proteinmenge jedoch nicht ausreicht, um durch Antikörper nachgewiesen zu werden. Es ist daher denkbar, dass Nkx6.2 in den Nkx6.1-mutanten Mäusen nicht hoch genug exprimiert ist, um den Verlust von Nkx6.1 bei der endokrinen Zelldifferenzierung in dessen Abwesenheit vollständig zu kompensieren.

Alternativ besteht die Möglichkeit, dass funktionelle Unterschiede zwischen Nkx6.1 und Nkx6.2 auf Unterschieden in der Sequenz beider Proteine beruhen. Die Homologie zwischen Nkx6.1 und Nkx6.2 beträgt bezogen auf die gesamte Proteinsequenz nur etwa 60%. Ein strukturelles Motiv, das mögliche funktionelle Unterschiede bedingen könnte, ist ein N-terminales Serin-Alanin-Motiv, das sich nur bei Nkx6.1, nicht aber bei Nkx6.2 finden lässt. Die Funktion dieser Sequenz ist bisher nicht geklärt, es wird jedoch vermutet, dass hierdurch Protein-Protein-Interaktionen vermittelt werden könnten (Komuro, 1993; Rudnick et al., 1994). Nkx6.1 könnte somit Kofaktoren rekrutieren, die nicht von Nkx6.2 erkannt werden.

Allerdings sind die DNS bindende Homöodomäne und die NK-Domäne von Nkx6.1 und Nkx6.2 fast identisch. Im Einklang hiermit konnte gezeigt werden, dass Nkx6.1 und Nkx6.2 das gleiche Potenzial besitzen, Korepressoren vom Gro/TLE-Typ zu rekrutieren, welche für die Repressorfunktion beider Proteine benötigt werden (Awatramani et al., 2000; Muhr et al., 2001). Überexpressionsstudien im Huhn weisen zudem darauf hin, dass Nkx6.1 und Nkx6.2 *in vivo* funktionell identische Eigenschaften haben (Briscoe et al., 2000). Um direkt zu testen, ob eine Übereinstimmung in der Funktionalität beider Proteine besteht, müsste das Nkx6.2 Gen *in vivo* vom Nkx6.1-Lokus exprimiert werden. Dies könnte durch die Herstellung sogenannter „knock-in“-Mäuse, die Nkx6.2 unter der Kontrolle der Nkx6.1-regulatorischen Sequenzen exprimieren, erreicht werden. Diese Strategie erlaubt eine Expression von Nkx6.2, die sowohl zeitlich als auch räumlich exakt mit der endogenen Nkx6.1-Expression übereinstimmt. Wäre Nkx6.2 in der Lage, die Funktion von Nkx6.1 bei der endokrinen Entwicklung vollständig zu ersetzen, würde

dies bedeuten, dass die Nkx6.1- und Nkx6.2-Proteine *in vivo* identische biologische Funktionen besitzen.

3.4 Die Rolle von Genduplikationen in der Evolution

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass Nkx6.1 und Nkx6.2 nur partiell redundante Funktionen bei der Entwicklung des endokrinen Pankreas besitzen. Geht man davon aus, dass Nkx6.1 und Nkx6.2 durch Genduplikation aus einem gemeinsamen Vorläufer gebildet wurden, müssen beide Faktoren ursprünglich vollkommen identisch gewesen sein. Es stellt sich daher die Frage nach den Mechanismen, welche im Laufe der Evolution zu den beobachteten Unterschieden zwischen den beiden Faktoren geführt haben. Die vorliegenden Daten weisen darauf hin, dass Nkx6.2 in den Nkx6.1-mutanten Mäusen verwendet wird, um die Funktion von Nkx6.1 bei der Differenzierung der endokrinen Zellen in dessen Abwesenheit zu übernehmen. Da Nkx6.2 den Verlust von Nkx6.1 nicht vollständig kompensieren kann, scheinen sich die Unterschiede zwischen Nkx6.1 und Nkx6.2 eher nachteilig auf die Entwicklung des Pankreas auszuwirken. Worin besteht also die biologische Relevanz dieser Divergenz?

Die Ergebnisse phylogenetischer Studien deuten an, dass duplizierte Gene im Zuge der Evolution nicht zur Absicherung bestehender Mechanismen erhalten wurden, sondern die Entwicklung neuer Funktionen ermöglicht haben (Ohno, 1970; Prince, 2002). Viele Modelle basieren auf Vergleichen der Hox-Gene unterschiedlicher phylogenetischer Spezies, da ihre Organisation, Regulation und Funktion im Laufe der Evolution hoch konserviert ist. Hox-Gene wurden erstmals in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* identifiziert, wo sie eine steuernde Funktion bei der Ausbildung der Körpersegmentierung besitzen (Nüsslein-Volhard, 1980). Hox-Gene konnten inzwischen bei allen phylogenetischen Gruppen der Vertebratenlinie nachgewiesen werden und in allen untersuchten Spezies besteht ihre Funktion in der Spezifizierung der anterior-posterioren Identität (De Rosa, 1999; McGinnis and Krumlauf, 1992). Auf der Basis von Sequenzvergleichen sowie der Hox-Gen-Organisation unterschiedlicher Spezies wird postuliert, dass im Laufe der Evolution mehrfache Duplikationen des gesamten Genoms sowie einzelner Gene eines gemeinsamen Vorläufers von Vertebraten und Invertebraten stattgefunden hat. Es wird angenommen, dass diese Vorgänge zur Bildung der komplexen Körperstruktur der Vertebraten geführt haben (Bailey, 1997; Friedman, 2001; Sidow, 1996). Die aus

den Untersuchungen der Hox-Gen-Funktion bei verschiedenen Spezies gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass paraloge Gene teilweise redundante, teilweise aber auch eigenständige Funktionen erfüllen und häufig in überlappenden, aber nicht identischen Domänen exprimiert werden (Prince, 2002).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stehen im Einklang mit diesem Modell. Die Expressionsanalyse von Nkx6.1 und Nkx6.2 im embryonalen Pankreas zeigt, dass beide Faktoren im frühen Embryonalstadium teilweise koexprimiert sind (Abb 2.4 A,B), später jedoch in unterschiedlichen Domänen exprimiert werden. Die Daten der vorliegenden Studie geben zurzeit keine Hinweise auf eine eigenständige Funktion von Nkx6.2 bei der Pankreasentwicklung.

Es existieren mehrere Modelle, um die Divergenz in Expression und Funktion zwischen duplizierten Genen zu erklären, von denen nur zwei kurz erläutert werden sollen.

Das klassische Modell der Neo-Funktionalisierung postuliert, dass durch Genduplikation eine Redundanz geschaffen wird, die mutationsbedingte strukturelle Änderungen der Proteinsequenz duplizierter Gene erlaubt, was zum Erwerb neuer Funktionen führen kann (Ohno, 1970).

Das sogenannte Modell der Subfunktionalisierung oder DDC (Duplication Degeneration Complementation)- Modell postuliert hingegen, dass folgend auf die Genduplikation eine Degeneration komplementärer regulatorischer Regionen der duplizierten Gene zu einer Verschiebung der Expressionsdomänen und des Expressionsniveaus geführt hat. Hierdurch wird die Funktion des ursprünglichen Gens sozusagen „aufgeteilt“, so dass die komplementären Funktionen beider Gene für die Aufrechterhaltung der Funktionen des ursprünglichen Gens benötigt werden (Force, 2002). Dieses Modell bietet eine Erklärung für die beobachteten Unterschiede in der Expression von Nkx6.1 und Nkx6.2 im Pankreas und im zentralen Nervensystem und unterstützt die Vermutung, dass diese Divergenz die Ursache für die unvollständige Kompensation der Nkx6.1-Funktionen durch Nkx6.2 ist. Um überprüfen zu können, ob die Unterschiede in der Expression von Nkx6.1 und Nkx6.2 im Pankreas und im Nervensystem ganz oder teilweise auf Subfunktionalisierung zurückzuführen sind, wäre es daher erforderlich, mehr Informationen über die regulatorischen Regionen stromaufwärts und stromabwärts der beiden Faktoren zu haben. Außerdem wäre es interessant herauszufinden, ob tatsächlich ein gemeinsamer Vorläufer existiert, der die Expressionsdomänen der

Nkx6-Gene im Pankreas vereinigt und eine identische Funktion besitzt. Bisher konnte in der Linie der Vertebraten kein solcher Vorläufer identifiziert werden. Allerdings wurde in *Drosophila melanogaster* ein Faktor nachgewiesen, der eine hohe Homologie zu Nkx6.1 und Nkx6.2 aufweist und daher als Nk6 bezeichnet wird (Uhler, 2002). Eine dem Pankreas äquivalente Struktur ist in *Drosophila* nicht vorhanden, die Expressionsdomänen im zentralen Nervensystem (ZNS) entsprechen jedoch denen der Nkx6-Faktoren im ZNS der Maus. Bisher ist nicht geklärt, ob Nk6 analog zu Säugern auch bei *Drosophila melanogaster* für die Spezifizierung bestimmter Neurone verantwortlich ist. Die bisher durchgeführten Studien weisen jedoch darauf hin, dass das *Drosophila*-Nk6-Gen zu einem anderen Zeitpunkt der neuronalen Entwicklung exprimiert wird als die Nkx6-Gene im Rückenmark und Hirnstamm der Maus. Während das Nk6-Gen in *Drosophila melanogaster* erst in einer späten Entwicklungsphase des ZNS exprimiert wird, werden Nkx6.1 und Nkx6.2 bereits im frühen Neuralrohrstadium im Nervensystem exprimiert (Qiu et al., 1998; Uhler, 2002).

3.5 Potenzielle Zielgene für Nkx6.1

Mittels der Affymetrix Gen-Chip-Analyse konnten weitere Gene identifiziert werden, welche am E13.5 in der Pankreasanlage von Nkx6.1-mutanten und Wildtyp-Mäusen differenziell exprimiert werden. Eine interessante Aufgabe im Rahmen weiterer Projekte könnte daher die Untersuchung dieser Gene im Hinblick auf ihre Funktion für die Pankreasentwicklung sein.

Hierfür muss zunächst bestätigt werden, dass diese Gene wirklich im Pankreas exprimiert werden. Für den qualitativen Nachweis der mRNA im Pankreasgewebe eignet sich die RT-PCR, mit der schon geringe Mengen des Transkripts nachgewiesen werden können. Diese Methode erlaubt es, eine große Anzahl von Genen in kurzer Zeit im Hinblick auf ihre mögliche Expression im Pankreas zu untersuchen. Um im Folgenden die quantitativen Unterschiede in der mRNA Expression zwischen Wildtyp und Mutante zu verifizieren, bietet sich die Methode der real time PCR an. Im Gegensatz zur einfachen PCR handelt es sich hierbei um eine quantitative Methode, bei welcher bei jedem PCR Amplifikationszyklus ein Fluorochrom in den neu synthetisierten DNS-Strang eingebaut wird. Dieses Fluorochrom wird bei jedem Zyklus durch ein spezielles Gerät detektiert, wodurch indirekt eine Quantifizierung der mRNA erfolgt. Da die PCR keine Lokalisation der

Transkripte im Organ erlaubt, sollen bestimmte Kandidatengene anschließend mittels RNS *in situ* Hybridisierung oder Immunohistochemie im Hinblick auf ihre Lokalisation im Pankreas untersucht werden. Wenn entsprechende Antikörper verfügbar sind, ist die Immunhistochemie die Methode der Wahl, da direkt gezeigt werden kann, dass im Pankreas von Nkx6.1-Mutanten nicht nur mehr mRNA sondern auch mehr Protein exprimiert wird. Alternativ kann der Nachweis auch mittels des „Western blot“-Verfahrens erfolgen. Die Immunhistochemie hat jedoch den Vorteil, dass durch Kofärbungen mit spezifischen Antikörpern der Zelltyp ermittelt werden kann, in dem das zu untersuchende Protein exprimiert wird. Nachfolgende Promotorbindungsstudien und Reporterassays können klären, ob diese Gene direkt durch Nkx6.1 reguliert werden.

4 Material

4.1 Bezugsquellen häufig verwendeter Substanzen

Agarose	Gibco/BRL, Eggenstein
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Carl Roth KG, Heidelberg
³² P-dCTP	Amersham-Pharmacia, UK
BSA	Sigma, München
Chloroform	Merck, Darmstadt
Desoxy- und Ribonukleotide	Boehringer, Mannheim
DMSO	Merck, Darmstadt
DNAseI aus Rinderpankreas	Boehringer, Mannheim
DTT	Merck, Darmstadt
EDTA	Sigma, München
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Formamid	Sigma, München
Glycerin	Carl Roth KG, Karlsruhe
Heringsspermien-DNS	Sigma, München
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Lachsspermien-DNS	Sigma, München
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
3MM-Papier	Whatman, Maidstone (USA)
Nitrozellulose	Schleicher & Schüll, Dassel
PFA	Carl Roth KG, Karlsruhe
Phenol	Riedel-deHaen, Seelze
Paraformaldehyd	Carl Roth KG, Karlsruhe
Random Primers Labeling Kit	Gibco/BRL, Eggenstein
Restriktionsendonukleasen	Gibco/BRL, Eggenstein
RNase aus Rinderpankreas	Boehringer, Mannheim
Röntgenfilme	Kodak, Amersham-Pharmacia, UK

SDS	Serva, Heidelberg
Sterilfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
T4-DNS-Ligase	Boehringer, Mannheim
Tris	Carl Roth KG, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin	Serva, Heidelberg
Xylencyanol	Serva, Heidelberg
Zellkulturplatten	Greiner, Nürtingen
Salze und sonstige Chemikalien	Merck, Darmstadt,
Vectashield Fluoreszenz Mounting	
Medium	Vector, Alexis, Grünberg Deutschland
X-Gal	Carl Roth KG, Heidelberg

4.2 Zusammensetzung gebräuchlicher Medien und Lösungen

Denhardt's	1g Ficoll 400; 1g Polyvenylpyrrolidine; 1g BSA; auf 100ml ddH ₂ O
DEPC-H ₂ O	Diethylpyrocarbonat: ddH ₂ O 1:1000 verdünnen. Vor dem autoklavieren über Nacht rühren.
LB-Medium	1 % Casein-Hydrolysat, 0,5 % Hefe Extrakt, 0,5 % NaCl, 0,1 % Glukose, pH7,0
PBS-Puffer	0,14 M NaCl, 2,7 mM KCl, 3,2 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ P0 ₄ 25 mM Tris-HCl, pH 8,0
PCI	Phenol:Chloroform: Isoamylalkohol (25:24:1)
PFA Fixativ	4% Paraformaldehyd in PBS
SSC-Puffer (20x)	3 M NaCl, 0,3 M Natriumzitat pH7.0
TAE-Puffer (1X)	0,2 M Tris-Acetat, 10 mM EDTA pH8

1M Tris Puffer

121g Tris auf 800ml ddH₂O. PH Wert
einstellen. Auf 1L mit ddH₂O auffüllen.

4.3 Verwendete Sonden für *in situ* Hybridisierung

Gen	Ausgangsplasmid	Sondenherstellung (antisense)	Referenz
ngn3	pcDNAI	Plasmidlinearisierung durch NotI Verdau	Gradwohl, et al., 2000

4.4 Verwendete Mäusestämme

4.4.1 Nkx6.1xC57BL/6J und Nkx6.1xNMRI

Für die im Rahmen dieser Studie durchgeführten Untersuchungen standen Nkx6.1-mutante Mäuse auf C57BL/6J Hintergrund zur Verfügung (Sander et al., 2000). Nkx6.1-heterozygote C57BL/6J Mäuse wurden, sofern erforderlich, auf die Linie NMRI zurückgekreuzt. Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR. Um Nkx6.1-homozygot mutante Embryonen zu erhalten, wurden Nkx6.1-heterozygot mutante Mäuse terminiert verpaart und die Embryonen zum gewünschten Zeitpunkt geerntet. Für die Altersbestimmung der Embryonen wurde der Tag nach dem Auftreten des Vaginalverschlusses als Tag 0.5 postcoitum (0.5) festgelegt. Die Genotypisierung der Mutanten erfolgte durch „Southern blot“-Verfahren oder PCR wie beschrieben (siehe Methoden).

4.4.2 Nkx6.2xC57BL/6J

Nkx6.2-mutante Mäuse wurden durch die Arbeitsgruppe von Johan Ericson, Karolinska Institut, Stockholm, zur Verfügung gestellt. Nkx6.2-homozygot mutante Mäuse wurden analog zu den Nkx6.1-Mutanten durch terminierte Verpaarung heterozygoter Tiere erhalten. Die Genotypisierung der Mäuse und Embryonen erfolgte durch „Southern blot“ Verfahren wie beschrieben (siehe Methoden).

4.4.3 Nkx6.1xNkx6.2xC57/BL6J und Nkx6.1xNkx6.2xNMRI

Die Nkx6.1/Nkx6.2-doppelt mutanten Mäuse stammen aus eigener Herstellung. Zur Gewinnung doppelt homozygot mutanter Embryonen wurden zunächst doppelt heterozygote Mäuse hergestellt. Da homozygot Nkx6.1-mutante Mäuse nicht lebensfähig sind, wurden hierzu Nkx6.1-heterozygot mutante Mäuse auf NMRI oder C57BL/6J Hintergrund mit homozygoten Nkx6.2-mutanten Mäusen gekreuzt. Durch terminierte Verpaarung (s.o) der doppelt heterozygoten Tiere konnten im Verhältnis 1:16 doppelt homozygot mutante Embryonen gewonnen werden. Die Genotypisierung aller mutanten Mäuse und Embryonen erfolgte durch „Southern blot“ Verfahren wie beschrieben (Siehe Methoden).

4.5 Verwendete Bakterienstämme

DH5 α	New England Biolabs
XL1-Blue	New England Biolabs

4.6 Für Klonierungen verwendete Basisvektoren

pBluescript KS+/SK-	Klonierungsvektor der Firma Stratagene
PGEM-5Zf(+)	Klonierungsvektor der Firma Promega

4.7 Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Basisvektor	Insert	Verwendungs zweck	Hersteller
Tau LacZ Nkx6.2	pBluescript KS ⁺ /SK ⁻	tau lacZ/ pGK neo Kassette flankiert von 3' und 5' Region der Nkx6.2 Sequenz	Sondenpräparation für die Genotypisierung von Nkx6.2 Mutanten	Johan Ericson, Schweden
pBluescript+Nkx6.1	pBKS+	Nkx6.1 genomische Maus DNS	Sondenpräparation für die Genotypisierung von Nkx6.1 Mutanten	Maike Sander, ZMNH, Universität Hamburg
PGK neo	pBKS+	Neomycin-Gen unter der Kontrolle des PGK Promotors	Sondenpräparation für die Genotypisierung von Nkx6.1/Nkx6.2 Mutanten	Maike Sander, ZMNH, Universität Hamburg

4.8 Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von Metabion (Martinsried), MWG Biotech (Ebersberg) oder Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Nach dem Lösen in ddH₂O wurden jeweils Verdünnungen von 40 pmol/ µl hergestellt.

Eine Liste der verwendeten Oligonukleotide befindet sich im Anhang.

4.9 Verwendete Antikörper

4.9.1 Primäre Antikörper

Antikörper (anti-)	Bezugsquelle	aus Spezies	eingesetzte Verdünnung
α -Amylase	Sigma	Kanichen	1:500
Carboxypeptidase A	Biotrend	Kaninchen	1:2000
Glukagon	Linco	Meerschweinchen	1:8000
Glukagon	Sigma	Maus	1:8000
Insulin	Linco	Meerschweinchen	
Ki-67/B56	Pharmingen	Maus	1:100
Ngn3	Schenkung von M. German, San Fransisco	Kaninchen	1:3000
Nkx6.1	Schenkung von P. Serup, Gentofte	Kaninchen	1:3000
Nkx6.2	Schenkung von J. Ericson, Stockholm	Meerschweinchen	1:3000
Pankreatisches Polypeptid	Dako	Kaninchen	1:3000
Pdx1	Schenkung von H. Edlund, Ume	Kaninchen	1:3000
Somatostatin	Dako	Kaninchen	1:4000

4.9.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle	aus Spezies	eingesetzte Verdünnung
Cy3- α -Kaninchen	Dianova	Ziege IgG(H+L)	1:2000
Cy3- α -Meerschweinchen	Dianova	Ziege IgG(H+L)	1:2000
Cy3- α -Maus	Dianova	Ziege IgG(H+L)	1:2000
Cy3- α -Kaninchen	Dianova	Ziege Fab Fragment	1:50 -1:100
Alexa 488- α -Maus	Mobitech	Ziege IgG(H+L)F(ab') ₂ Fragment	1:2000
Alexa 488- α -Kaninchen	Mobitech	Ziege IgG(H+L)F(ab') ₂ Fragment	1:2000

5 Methoden

5.1 Herstellung und Aufbereitung von DNS-Fragmenten

5.1.1 Spaltung von DNS durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen schneiden DNS-Moleküle durch Hydrolyse interner Phosphodiesterbindungen. Die Restriktion von DNS wurde in den vom Hersteller jeweils angegebenen Pufferlösungen durchgeführt. Die verwendeten Restriktionsendonukleasen schneiden innerhalb einer punktsymmetrischen Erkennungssequenz (Palindrom). Die Reaktionen inkubierten 1,5-2 h bei 37°C, es wurden in der Regel 1-2 U des Enzyms pro µg DNS eingesetzt. Durch Zugabe von Probenpuffer (bei anschließender Gelelektrophorese) oder durch Erhitzen (im Falle nachfolgender Manipulation der DNS mit weiteren Enzymen) wurden die Reaktionen beendet.

5.1.2 Auftrennung von DNS-Molekülen im Agarosegel

DNS Moleküle werden in Agarosegelen in horizontalen Elektrophoresekammern aufgetrennt. Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose in 1xTAE gelöst (aufkochen) und Ethidiumbromid hinzugefügt (0,01 µl/ml). Die Konzentration der Agarose war von der Größe der DNS-Moleküle Abhängig (0,8-2%). Als Laufpuffer wurde ebenfalls 1xTAE benutzt. Die Proben wurden in Probenpuffer aufgenommen und bei 80-100 mA elektrophoretisch aufgetrennt.

5.1.3 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Auftrennen der DNS wurden die DNS enthaltenen Agarosestücke unter UV-Licht bei 360 nm ausgeschnitten und die DNS unter Verwendung des NucleoSpin Extract Kit (Macherey-Nagel) nach Angabe des Herstellers aus der Agarose isoliert.

5.1.4 Bestimmung von DNS- und RNS-Konzentrationen

Die Konzentration wässriger DNS-Lösungen wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt (Ultrospec 3000, Pharmacia). Bei dieser Wellenlänge liegt sowohl für einzel- als auch für doppelsträngige DNS das Absorptionsmaximum. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht einer Nukleinsäure-Konzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNS sowie 20 µg/ml für einzelsträngige DNS und 40 µg/ml für RNS.

Zur Überprüfung der photometrisch ermittelten Meßergebnisse und zum exakten Abgleich kleinster DNS-Mengen wurden Aliquots der entsprechenden DNS-Lösungen zusammen mit Referenzproben bekannter Konzentration auf Ethidiumbromid-haltigen Agarosegelen koelektrophoretisiert. Die Konzentrationen der einzelnen DNS-Lösungen konnten anhand der Fluoreszenz-Intensitäten miteinander verglichen werden.

5.1.5 Modifikation von DNS-Enden

5.1.5.1 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Zur Entfernung von Phosphatgruppen am 5'-Ende von doppelsträngigen DNS-Molekülen wurden 1-5 pmol DNS in 44 µl ddH₂O aufgenommen. Nach Zugabe von 5 µl 10xClP-Puffer und 1 U alkalischer Phosphatase wurde der Ansatz für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 1 U alkalischer Phosphatase wurde weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Phosphatase wurde der Reaktionsansatz für 10 min auf 65°C erhitzt. Die dephosphorylierte DNS wurde durch zweimalige Phenolextraktion und Ethanolfällung gereinigt.

5.1.5.2 Auffüllen überhängender 5'-Enden

Überhängende 5'-Enden wurden durch das Klenow-Fragment der *E. coli* DNS-Polymerase oder durch T4-Polymerase aufgefüllt. Ein Reaktionsansatz enthielt 0,5-5 µg DNS-Fragment, 5 µl 10xNT-Puffer, 4 µl dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dGTP, dTTP, dCTP), 1 U T4 DNS-Polymerase sowie ddH₂O ad 50 µl. Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Erhitzen beendet und das

DNS-Fragment unter Verwendung des NucleoSpin Extract Kit (Machery-Nagel) isoliert.

5.1.6 Herstellung von DNS-Fragmenten mittels "Polymerase Chain Reaction" (PCR)

Die PCR ist eine *in vitro* Methode zur enzymatischen Synthese spezifischer DNS-Sequenzen. Hierzu wird eine doppelsträngige DNS (Template-DNS) denaturiert und an den entstehenden komplementären DNS-Einzelsträngen zwei Oligonukleotid-Primer, welche die zu amplifizierende Region (Ziel-DNS) flankieren, hybridisiert. Mittels einer thermostabilen DNS-Polymerase werden, ausgehend von den entsprechenden Oligonukleotid-Primern, die jeweiligen komplementären DNS-Stränge synthetisiert. Eine repetitive Folge von Template-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Verlängerung der Primer durch die thermostabile DNS-Polymerase führt zu einer exponentiellen Anreicherung der Ziel-DNS, deren Enden durch die Primer festgelegt sind.

Zur Herstellung von DNS-Fragmenten wurde in einem 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß 1 ng Template-DNS, 2,5 µl 20xPCR-Reaktionspuffer (200 mM Tris/HCl pH 8,3; 1 M KCl), 4 µl 25 mM MgCl₂, 40 pMol von jedem Primer, 4 µl 2,5 mM dNTP-Mix, 1 U Taq-Polymerase mit ddH₂O zu einem Reaktionsvolumen von 50 µl kombiniert. Der Ansatz wurde für 1 min bei 94°C inkubiert und durchlief dann 25-40 mal im Thermocycler (Biometra) einen Zyklus aus Denaturierung (94°C, 1 min), Hybridisierung (bei geeigneter Temperatur und Dauer) und Polymerasereaktion (72°C und geeignete Dauer).

Die Hybridisierungstemperatur der Primer ist abhängig vom GC Gehalt der Oligonukleotide. Die Dauer der Polymerasereaktion richtete sich nach der Länge der zu amplifizierenden Sequenz. Als Abschluß der PCR wurde der Ansatz für 5 min bei 72°C inkubiert und auf RT gekühlt.

5.2 Klonierung von DNS-Fragmenten

5.2.1 Präparation von Vektoren

Zur Herstellung linearer Vektor-DNS wurde die Plasmid-DNS mit einem Restriktionsenzym oder einer Kombination zweier Restriktionsenzyme gespalten. Zur Überprüfung der Vollständigkeit der Reaktion wurde ein Aliquot des Ansatzes auf

einem Agarosegel analysiert. Anschließend wurde die DNS über einer Säule des NucleoSpin Extract Kit (Macherey-Nagel) aufgereinigt. Zur Verhinderung einer Religation von Vektor-DNS, die nur mit einem Restriktionsenzym linearisiert worden war, wurden die 5'-Enden des Vektors dephosphoryliert.

5.2.2 Ligation von DNS-Fragmenten mit Vektoren

Die Ligation eines linearisierten und dephosphorylierten Vektors mit dem gewünschten DNS-Fragment wurde durch die T4-DNS-Ligase katalysiert. Dazu wurden 40 ng Vektor-DNS mit einem drei- bis fünf-fachen molaren Überschuß des zu ligierenden Fragmentes in 10 µl Ligase-Puffer mit 1 U der T4-DNS-Ligase über Nacht bei 16°C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde zur Transformation kompetenter Bakterien-Zellen des *E. coli*-Stammes DH5α eingesetzt.

5.2.3 Klonierung von PCR-Fragmenten

Die Amplifizierung und Isolierung von DNS-Fragmenten erfolgte wie unter 5.1.6 und 5.1.3 beschrieben. Überhängende 5'-Enden der synthetisierten DNS-Fragmente wurden mit T4 DNS-Polymerase aufgefüllt. Enthalten die zur PCR eingesetzten Primer Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen, so wurden die Fragmente anschließend mit den betreffenden Restriktionsendonukleasen geschnitten und konnten dann in Plasmide kloniert werden. PCR-Fragmente, die mit Primern hergestellt wurden, die keine Schnittstellen für Restriktionsenzyme enthielten, wurden über glatte Enden in Plasmide kloniert.

5.2.4 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Zur Herstellung kompetenter Bakterienzellen wurden ausschließlich autoklavierte Gegenstände und Lösungen verwendet.

Von einer Glycerinkultur des *E. coli*-Stammes DH5α wurden etwa 10 µl auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen. Nach Wachstum über Nacht bei 37°C im Brutschrank wurde eine einzelne Kolonie zum Animpfen einer 5 ml Vorkultur benutzt, die wiederum über Nacht bei 37°C geschüttelt wurde. Als Hauptkultur wurden 150 ml LB-Medium mit 1 ml der Vorkultur angeimpft und solange geschüttelt, bis die Bakterien

die exponentielle Wachstumsphase erreicht hatten. Dies ist der Fall, wenn die Bakteriensuspension eine OD_{600} von 0,45-0,5 erreicht hat. Die Suspension wurde dann bei 4°C und 2.000 Upm 5 min abzentrifugiert (Zentrifuge J2-21 M/E Rotor JA14, Beckman) und der Überstand vorsichtig abgeschüttet. Die Zellen wurden in 45 ml kaltem TFB 1-Puffer (100 mM RbCl; 50 mM MnCl₂; 30 mM KOAc; 10 mM CaCl₂; 15% Glycerin, pH 5,8; sterilfiltriert) resuspendiert und 90 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde bei 2.000 Upm und 4°C abzentrifugiert und das Pellet anschließend in 6 ml kaltem TFB 2-Puffer (10 mM MOPS pH 8,0; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl₂, 15% Glycerin; autoklaviert) aufgenommen und in Aliquots bei -70°C eingefroren.

5.2.5 Transformation von Bakterienzellen

Die bei -80°C aufbewahrten kompetenten Bakterien wurden 10 min auf Eis aufgetaut und anschließend zu den jeweiligen Ligationsansätzen gegeben. Diese Zellsuspension wurde 15 min auf Eis inkubiert, anschließend einer Hitzebehandlung von 90 sek bei 42°C unterzogen und sofort wieder im Eisbad abgekühlt. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium wurden die Bakterien 30 min bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden auf Antibiotika-haltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Ein Teil der Kolonien wurde als Flüssigkultur in analytischem Maßstab angezüchtet und die isolierte Plasmid-DNS durch Restriktionsverdau und nachfolgende Gelelektrophorese analysiert.

5.2.6 Sequenzierung von DNS

DNS-Sequenzierung wurde mit einem ABI Prism 377 DNS-Sequencer (Perkin Elmer) unter Verwendung des ABI-Prism-Dye-Cycle-Sequencing-Ready-Reaction-Kit (Perkin Elmer) und Standard-Primern nach Angaben des Herstellers freundlicherweise von der Sequenz Service Station im ZMNH durchgeführt. Die Auswertung wurde mit dem Computerprogramm SeqManII (DNS-Star) vorgenommen.

5.3 Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

5.3.1 Isolierung von Plasmid-DNS durch Maxipräparation

Die Durchführung erfolgte mit dem Maxipräparationssystem der Firma LifeTechnologies.

Zur Herstellung einer Bakterien-Vorkultur wurden 5 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium mit einer Kolonie von einer Agarplatte angeimpft und 8-12 h bei 37°C mit 200 Upm geschüttelt. Für die Hauptkultur wurden 150 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium mit der Vorkultur versetzt und 16 h bei 37°C mit 250 Upm geschüttelt. Die Bakterienkultur wurde in Zentrifugenbecher (Beckman) überführt und 15 min bei 6.000 Upm und 4°C zentrifugiert (Zentrifuge J2-21M/E, Rotor JA14, Beckman). Das Bakterienpellet wurde in 10 ml Zellsuspensionspuffer E1 (50 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA; 100 mg/ml RNase A, pH 8) resuspendiert und in ein 15 ml Greiner-Röhrchen überführt. Anschließend wurden 10 ml Zellysepuffer E2 (200 mM NaOH; 1% SDS) zugegeben, die beiden Lösungen gut gemischt und das Bakterienlysats 5 min bei RT inkubiert. Nach Mischen mit 10 ml Neutralisierungspuffer E3 (2,8 M KOAc pH 5,2), wurde die Suspension 10 min bei 14.000 Upm und RT zentrifugiert (Zentrifuge J2-21M/E, Rotor JA 20, Beckman) und in der Zwischenzeit die Säule mit 30 ml Äquilibrationpuffer E4 (100 mM Tris/H₃PO₄; 15% Ethanol; 900 mM KCl, pH 6,3) äquilibriert. Der Überstand wurde auf die äquilibrierte Säule gegeben, und nach dem Durchlauf wurde die Säule mit 60 ml Waschpuffer E5 (100 mM Tris/H₃PO₄; 15% Ethanol; 1150 mM KCl, pH 6,3) gewaschen. Die Plasmid-DNS konnte nun mit 15 ml Elutionspuffer E6 (100 mM Tris/H₃PO₄; 15% Ethanol; 1 M KCl, pH 8,5) eluiert werden. Durch Zugabe von 0,8 Vol Isopropanol wurde die Plasmid-DNS 10 min bei RT gefällt und 30 min bei 13.500 Upm (Zentrifuge J2-21M/E, Rotor JA20, Beckman) abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen und bei 4°C 5 min zentrifugiert. Das Ethanol wurde entfernt, das Pellet 10 min getrocknet und in 200-500 µl ddH₂O gelöst. Danach kann die Konzentration wie unter 1.1.4 beschrieben bestimmt werden.

5.3.2 Isolierung von Plasmid-DNS in analytischem Maßstab (Minipräparation)

2 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium wurden mit einer einzelnen Bakterien-Kolonie von einer Agarplatte angeimpft und 12 h bei 37°C geschüttelt. Die Übernachtskultur

wurde bei 14.000 Upm zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in ca. 0,1 ml Restlösung resuspendiert. Die Suspension wurde mit 0,35 ml STET (1 mM Tris; 0,1 mM EDTA; 0,1 N NaOH; 0,5% SDS) versetzt und gevortext. Nach Zugabe von 20 µl Lysozym (20mg/ml) und kurzem Mischen (nicht vortexen) wurde die Suspension 2 min bei 95° inkubiert und dann 10 min zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge, 5417). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 25 µl Phenol und 400 µl Isopropanol versetzt. Nach 10 minütiger Zentrifugation, anschließendem Waschen des Niederschlages mit 70% Ethanol und 5 minütiger Trocknung wurde das Pellet in 100 µl ddH₂O mit RNase (20 µg/ml) gelöst. Von diesem Ansatz wurden 5 µl für Restriktionsanalysen und 2,5 µl für Sequenzanalysen eingesetzt.

5.3.3 Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenolextraktion und Ethanolfällung

Zur Entfernung von Proteinen aus wässrigen DNS-Lösungen wurden diese mit 1 Vol einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) versetzt und gut gemischt. Die Phasentrennung wurde durch eine kurze Zentrifugation beschleunigt (Eppendorf Tischzentrifuge, 5417). Aus der oberen wässrigen Phase wurde durch Ausschütteln mit je 1 Vol Chloroform die restliche Phenollösung entfernt. Durch Zugabe von 0,1 Vol 3 M NaOAc, pH 4,8 und 2,5 Vol Ethanol wurde die DNS 30 min bei -70°C gefällt. Zur Präzipitation kleiner DNS-Fragmente wurde zusätzlich 0,01 Vol einer 1M MgCl₂-Lösung zugegeben. Die Fällung erfolgte über Nacht bei -20°C. Das durch Zentrifugation erhaltene DNS-Sediment wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in dem gewünschten Volumen ddH₂O aufgenommen.

5.3.4 Isolierung von genomischer DNS aus Schwanzspitzen

Die Schwanzspitzen (ca. 0,5 cm) wurden jeweils mit 18 µl Lysis-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0; 20 mM NaCl; 1% SDS) und 2 µl Proteinase K (20 mg/ml) in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und die Ansätze über Nacht bei 55°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden pro Ansatz 10 µl RNase A (10 µg/ml) zugefügt und die Ansätze für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch 5 minütige Inkubation bei 95°C beendet. Zur weiteren Verwendung

wurde ca. 500 µl H₂O zugefügt. Die Proben wurden bis zur Genotypisierung bei 4°C aufbewahrt. Sollten die Proben besonders rein vorliegen, wurden die Ansätze mit 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt und für ca 5 min geschwenkt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 4°C für 15 min mit 15.000 Upm zur Phasentrennung. Die Überstände wurden vorsichtig abgenommen. Um die DNS zu fällen, wurden zum Überstand 50 µl 3 M Na-Acetat, pH 7,0 zugefügt, gemischt und die Mischungen für 15 min bei 4°C mit 15.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und verworfen. Danach erfolgte Waschen der DNS-Pellets mit 500 µl 70% Ethanol. Die DNS-Pellets wurden kurz getrocknet (5 min mit geöffnetem Deckel) und jeweils in 200-400 µl TE resuspendiert.

Die DNS wurde für die Genotypisierung mittels „Southern blot“ oder PCR eingesetzt.

5.3.5 Isolierung von genomischer DNS aus embryonalem Gewebe

Das Gewebe wurde in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß mit 700 µl Lyse-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA, pH 8,0; 100 mM NaCl; 1% SDS) überführt, 35 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugefügt und bei 56°C unter Schütteln über Nacht resuspendiert. War nur wenig DNS zu erwarten (bei Verdau der Amnionhülle) wurde 1 Vol Isopropanol zugefügt und die genomische DNS durch mehrmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes gefällt. Beim Verdau großer Gewebestücke wurden die Proteine durch Phenol-Chloroform Fällung entfernt. Hierzu wurde die DNS mit 1 Vol einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI)-Lösung (25:24:1) versetzt und gut gemischt. Die Phasentrennung wurde durch eine kurze Zentrifugation beschleunigt (Eppendorf Tischzentrifuge, 5417). Aus der oberen wäßrigen Phase wurde durch Ausschütteln mit je 1 Vol Chloroform die restliche Phenollösung entfernt. Die DNS wurde dann mit 1 Vol Isopropanol gefällt. Die DNS wurde durch Zentrifugation abgetrennt. Bei großen Mengen DNS wurde diese mit einer Pipettenspitze entnommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Das Pellet wurde dann mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in dem gewünschten Volumen TE aufgenommen. Damit sich die genomische DNS besser löst, wurde sie ca. 2h bei 55°C geschüttelt und vor der Weiterverarbeitung mindestens über Nacht bei 4°C inkubiert. Die DNS wurde für die Genotypisierung mittels „Southern blot“ eingesetzt.

5.3.6 Herstellung von RNS aus Gewebe

Das Gewebe wurde präpariert und bis zur erfolgreichen Genotypisierung bei -80 °C in RNAlater (Ambion) gelagert.

Zur Isolierung der RNS wurde das RNeasy Kit und das Quiashredder Kit (Quiagen) verwendet. Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und in 350 µl RLT Puffer mit 10 µl/ml β-Mercaptoethanol (RNeasy Kit, Quiagen) überführt. Das Lysat wurde zunächst kräftig gemischt und dann zur Zerkleinerung größerer Zellbestandteile auf eine Quiashreddersäule aufgetragen (Quiashredder, Quiagen). Das Lysat wurde durch Zentrifugation bei 14.000 Upm für 2 min eluiert, mit gleichem Volumen 70% Ethanol gemischt und auf eine RNeasy Säule aufgetragen. Um die RNS an die Säule zu binden, wurde 15 sek bei 10.000 Upm zentrifugiert und die immobilisierte RNS anschließend mit 350 µl RW1 Puffer gewaschen. Zur Zerstörung größerer DNS Bestandteile folgte ein DNaseI Verdau auf der Säule (RNase freies DNase Set, Quiagen, siehe dort). Zum Waschen der RNS wurde im Anschluß 350 µl RW1 Puffer auf die Säule gegeben und für 15 sek bei 10.000 Upm zentrifugiert. Weitere Waschschrirte folgten mit jeweils 500 µl RPE Puffer wobei zuerst für 15 sek bei 10.000 Upm und zum Trocknen der Säule für 2 min bei 14.000 Upm zentrifugiert wurde. Die Elution erfolgte in 2 x 50 µl DEPC H₂O durch Zentrifugation für 15 sek bei 10.000 Upm.

Die so gewonnene RNS wurde anschließend gefällt und in einem geringen Volumen aufgenommen. Hierzu wurde ein 2,5-faches Volumen 100%-igen Ethanols und 10% Natriumacetat (3M) zum Eluat gegeben und über Nacht bei -20°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Lösung bei 14.000 Upm und 4°C zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Präzipitat zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die RNS in einem gewünschten Volumen aufgenommen und für die cDNS Synthese durch *in vitro* Transkription eingesetzt (siehe 5.12.2).

5.4 Identifizierung von DNS-Fragmenten durch Hybridisierung

5.4.1 DNS-Transfer von Agarose-Gelen auf Membranen (Southern blot)

Nach dem Schneiden der DNS mit einem spezifischen Restriktionsenzym, wurden die Proben auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen und ca. 16h (über Nacht) bei 40 V durch Gelelektrophorese, wie unter 5.1.2 beschrieben, aufgetrennt.

Das Gel wurde bis zur Gelb- bzw. Grünfärbung der Bromphenolblau- bzw. Xylenxylanol Bande, jedoch mindestens 30 min im vierfachen Volumen 0,2 N HCl inkubiert. Dieser Schritt führt zur Depurinierung und anschließender Spaltung der DNS-Fragmente. Dadurch verbessert sich der Transfer langer (> 5 kb) DNS-Fragmente. Danach wurde das Gel kurz in ddH₂O gewaschen und anschließend für 30 min im zehnfachen Volumen Denaturierungspuffer (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH) inkubiert. Hierdurch wird die DNS in hybridisierbare Einzelstränge denaturiert. Dann folgten 30 min und nach Pufferwechsel weitere 15 min Inkubation im zehnfachen Volumen Neutralisierungspuffer (0,5 M Tris/HCl, pH 7; 1,5 M NaCl). Anschließend wurde das Gel 30 min im zehnfachen Volumen 10 x SSC äquilibriert. Währenddessen wurde eine Nylon-Membran (Schleicher & Schuell) für 5 min unter ddH₂O befeuchtet und 10 min in 10 x SSC äquilibriert. Die Membran wurde auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten. Der Transfer der DNS auf die Membran erfolgte für mindestens 36h durch Kapillarkraft. Das Gel wurde hierfür auf einen Whatman 3MM Papierstreifen gelegt, der mit den Enden in 10 x SSC Lösung taucht. Auf das Gel wurde eine Nitrozellulose-Membran gelegt. Darüber folgten 3 Whatman 3MM Papiere und ein Stapel Haushaltspapier. Der Stapel wurde mit einem Gewicht von ca. 500 g beschwert. Als Transferpuffer wurde 10 x SSC verwendet. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran 30 min in 2x SSC geschwenkt und 10 min getrocknet. Die Fixierung der transferierten DNS an die Membran erfolgte durch UV-Bestrahlung der Membran im UV-Crosslinker (Stratagene).

5.4.2 Hybridisierung von DNS nach Transfer auf Membranen

Die Nylon-Membran mit der DNS wurde in eine 100 ml Glasröhre (Schott) transferiert und in 5-10 ml Express-Hyb Lösung (Clontech) 30 min bei 63°C prähybridisiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1×10^6 cpm [α -³²P]dCTP markierter DNS-Sonde (s. 5.4.3) pro 1ml Hybridisierungslösung. Die Hybridisierung erfolgte für 2 h bei 63°C.

Danach wurde unspezifisch gebundene Sonde in 2 kurzen Waschschritten durch Schütteln in Lösung 1 (2x SSC/0,5 % SDS), dann für 2-5 x 30 min bei 63°C in Lösung 2 (0.2%SSC, 0.1%SDS) abgewaschen. Die Membran wurde im feuchten Zustand in Saran-Folie eingeschlagen und bei -70°C unter Verwendung eines Röntgenfilms (Biomax MR, Kodak) und einer signalverstärkenden Folie 1 bis 5 Tage exponiert.

5.4.3 Herstellung radioaktiver DNS Proben

Diese Methode erzeugt radioaktiv markierte DNS mit besonders hoher spezifischer Aktivität (bis 10^9 cpm/ μ g). 5-25 ng DNS wurden in 40 μ l TE aufgenommen und für 5 min bei 95°C denaturiert. Durch schnelles Abkühlen auf 0°C wurde die Rehybridisierung der Einzelstränge verhindert. Der Ansatz wurde dann zusammen mit 5 μ l α - 32 P in ein Reaktionsgefäß des Rediprime II Kit von Amersham pipettiert. Dieses Kit enthält sowohl dNTP's, Klenow-Enzym als auch "Random-Primer" zur Synthese der radioaktiv markierten DNS. Der Ansatz wurde 1h bei 37°C inkubiert, die Reaktion mit 5 μ l 0,2 M EDTA beendet und 5 min zur Denaturierung bei 100°C erhitzt. Zur Verhinderung der Renaturierung wurde die Probe bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

5.5 Herstellung von Proteinextrakten aus Gewebe

Der Pankreas neonataler Mäuse wurde in eiskaltem PBS sauber herauspräpariert und in 50 μ l Eisessig (80% Ethanol, 18% H₂O, 2% konz. HCl) auf Eis gelagert. Anschließend wurde das Gewebe im Ultraschallbad für 20 sek homogenisiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Durch nachfolgende Zentrifugation für 15 min bei 14.000 Upm und 4°C wurden grobe Zellfragmente abgetrennt. Der Überstand wurde isoliert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Eine geringes Volumen wurde zur anschließenden Bestimmung des Gesamtproteingehaltes nach Bradford verwendet.

5.6 Proteinanalytische Methoden

5.6.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Proteinbestimmung wurde konzentrierte Bradfordlösung (Rot-Quant, Roth) 1:5 in H₂O verdünnt. Zur Herstellung einer Standardkurve wurden BSA Stammlösung mit bekanntem Proteingehalt (0,5 mg, 1 mg, 2,5 mg, 5 mg, 7,5 mg, 10 mg) verwendet. Zur Bestimmung des Proteingehaltes in den Gewebeextrakten wurde der in 5.5 gewonnene Überstand 1:10 verdünnt und 4 µl von der Verdünnung auf ein 1 ml Bradfordlösung gegeben. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wurde die OD der Proben bei 595 nm gemessen. Durch Auftrag der OD der BSA Stammlösungen gegen den Proteingehalt konnte eine Eichgerade ermittelt werden, mit Hilfe derer die Proteinkonzentration der Gewebeextrakte berechnet werden konnte.

5.6.2 Bestimmung des Hormongehaltes in Pankreasextrakten durch RIA (radioimmunoassay)

Die quantitative Bestimmung der Insulin und Glukagon Konzentrationen in Pankreasextrakten neonataler Mäuse erfolgte durch kompetitiven RIA (radioimmunoassay). Hierzu wurde entweder das Glukagon RIA Kit oder das Rat Insulin RIA Kit (Linco Research incl.) verwendet.

Diese Systeme enthalten einerseits einen spezifischen Antikörper gegen das zu quantifizierende Hormon und andererseits eine I¹²⁵-markierte Form des Hormons, die als "tracer" bezeichnet wird. Für die Konzentrationsbestimmung wird eine bestimmte Menge des "tracers" mit seinem spezifischen Antikörper inkubiert. Wenn im Proteinextrakt enthaltenes unmarkiertes Hormon zum Reaktionsansatz gegeben wird, konkurriert dieses mit dem I¹²⁵ markierten "tracer" um die Bindung an den Antikörper. Daher sinkt die Menge gebundenen "tracers" mit zunehmender Konzentration des unmarkierten Hormons in der Probe. Der Abfall an Radioaktivität in Abhängigkeit der Hormonkonzentration in den Proteinextrakten kann nach dem Entfernen ungebundener Radioaktivität im Reaktionsansatz mit einem Meßgerät für γ -Strahlung quantifiziert werden.

Zur Bestimmung der Konzentrationen von Glukagon und Insulin in Pankreasextrakten von Wildtyp und Nkx6.2-mutanten Mäusen wurden Proteinextrakte verwendet, die wie unter 5.5 beschrieben hergestellt wurden. Die

Durchführung der radioimmunologischen Quantifizierungen erfolgte gemäß der Anleitung des Glucagon RIA Kit (Linco research incl; cat. no GL-32K) bzw des Rat Insulin RIA Kit (Linco Research incl. cat. RI-13K).

5.7 *In situ* Hybridisierung auf Gewebeschnitten

Für die Versuche wurden Embryonen der Mauslinie JES x Nkx6.1 x NMRI am E14.5 verwendet. Für die Altersbestimmung der Embryonen wurde der Tag nach dem Auftreten des Vaginalverschlusses als Tag 0.5 postcoitum (E0.5) festgelegt.

5.7.1 *In situ* Hybridisierung mittels Digoxigenin (DIG) markierter RNS Sonden

5.7.1.1 Synthese von DIG markierten RNS-Sonden durch *in vitro* Transkription

Zur Detektion von mRNS durch *in situ* Hybridisierung wird die komplementäre RNS als Sonde eingesetzt. Als Matrice für die Transkription dieser RNS-Sonde verwendet man die cDNS der zu detektierenden mRNS. Die cDNS-Sequenz liegt in der von RNS-Polymerase Promotoren (T3, T7 oder SP6) flankierten multiplen Klonierungsstelle eines Plasmids.

Für die Transkription einer komplementären RNS-Sonde wurde das Plasmid stromaufwärts der cDNS-Sequenz mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert. Das Enzym sollte glatte oder 5'-Überhang Schnittenden hinterlassen. Dadurch wird die Transkription von Plasmid-DNS unterbunden. Die linearisierte DNS wurde mit Hilfe des NucleoSpin Extract Kit (Macherey-Nagel) nach Angabe des Herstellers aus der Agarose isoliert und auf 1 µg/µl DNS-Konzentration eingestellt. Die Polymerase-Reaktion erfolgte mit dem "DIG RNA Labeling Kit" (Roche, Mannheim) an 1 µg DNS. Die Reaktion wurde entsprechend den Angaben des Herstellers und mit der geeigneten RNS-Polymerase angesetzt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Zum Abbau der DNS-Matrice folgte ein DNase-Verdau für 15 min bei 37°C mit DNaseI (Roche, Mannheim). Zur Fällung der DIG-markierten RNS wurde zur Probe 2,5 µl LiCl (4M) und 75 µl vorgekühltes 100%iges Ethanol gemischt und für 30 min bei -80°C inkubiert. Der Ansatz wurde zentrifugiert (4°C, 20 min, 15.000 Upm, Eppendorf Tischzentrifuge, 5415C) und das RNS-Pellet nach Waschen mit 70%

Ethanol in 50 µl ddH₂O Depc aufgenommen. Der Probe wurde zusätzlich noch 1 µl RNase Inhibitor zugefügt.

5.7.1.2 Hybridisierung auf Gewebeschnitten und Signaldetektion

Zur Herstellung einer *in situ* Hybridisierung auf Gefrierschnitten, wurde die DIG markierte DNS Probe 1:100 mit dem Hybridisierungspuffer verdünnt und dann 5-10 min bei 70°C denaturiert. In der Zwischenzeit wurden die Gefrierschnitte aufgetaut. Auf jeden Objektträger wurde 100 µl Probenmix gegeben. Die Gefrierschnitte wurden über Nacht bei 65°C in einer geschlossenen, mit 5 x SSC und 50% Formamid getränkten Kassette, hybridisiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger in einer Waschlösung (1 x SSC, 50% Formamid, 0,1% Tween20) 3 x 30 min bei 65°C und anschließend 2 x 30 min bei RT in MABT (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH7,5, 0,1% Tween20) gewaschen. Um unspezifischer Hybridisierung vorzubeugen, wurden die Gefrierschnitte mit 600 µl Blockierlösung (MABT, 2% Boehringer Blocking Reagenz, 20%iges hitzeinaktiviertes NGS (20 min bei 56°C)) 1h inkubiert. Der anti-DIG Antikörper wurde 1:2500 in der Blockierlösung verdünnt, auf die Objektträger aufgetragen und über Nacht in einer geschlossenen, feuchten Kammer bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger 5 x 20 min bei RT in MABT und anschließend 2 x 10 min bei RT im Alkaline-Phosphatase (AP) -Puffer (100mM NaCl, 50mM MgCl, 100mM Tris pH 7.9, 0,1% Tween20, 0,5 mg/ml Levamisol) gewaschen. Die Signaldetektion erfolgte durch enzymatische Färbung. Hierzu wurden die Objektträger mit einer Färbelösung (3,5 µl NBT/ml AP-Puffer; 3,5 µl X-Phosphat/ml AP-Puffer) bis zum gewünschten Färbegrad (1-3 d) bei RT und unter Lichtausschluß inkubiert. Durch mehrmaliges Waschen in H₂O wurde die Reaktion beendet. Nach der Färbung wurden die Gefrierschnitte getrocknet und mit Entellan gedeckelt.

5.7.2 *In situ* Hybridisierung mittels S³⁵-markierter Sonde

5.7.2.1 Synthese einer S³⁵- markierten RNS Sonde durch *in vitro* Transkription

Die DNS, welche als Matrizze für die RNS Synthese diente, wurde wie unter 5.7.1.1 beschrieben hergestellt. Für die radioaktive Markierung wurde 1 µl DNS (1 µg/µl) zu einem Reaktionsansatz aus 4 µl 10 mM dNTP (Ambion), 2 µl Transkriptionsbuffer (Fa. Ambion), 5 µl S³⁵UTP (Fa. Hartmann) und 2 µl Polymerase (SP6/T3/T7, Ambion)

gegeben. Der Reaktionsansatz wurde bei 37°C für 1 h inkubiert. In der Zwischenzeit wurden Säulen (NUCAway, Ambion 10070) für die Aufreinigung der markierten RNS nach Angaben des Herstellers vorbereitet (Ambion).

Nach der Inkubation wurden 80 µl 1mM DTT zum Reaktionsansatz gegeben, welcher anschließend auf die Säule aufgetragen wurde. Durch Zentrifugation bei 1.700 Upm für 5 min wurde die RNS eluiert und zur Abtrennung von Pufferbestandteilen aufgereinigt. Hierzu wurden 2 Volumen 100% Ethanol zum Eluat gegeben und bei maximaler Geschwindigkeit für 15 min zentrifugiert. Die RNS wurde dann bei 37°C getrocknet und in 40 µl 1M DTT aufgenommen.

Anschließend wurde die RNS Sonde mit vorgewärmter Hybridisierungslösung (4 x SSC, 50% Formamid, 1x Denhardts, 5% Dextransulfat, 0,5 µg/ml ssDNS, 0,25 µg/ml Hefe tRNS) auf 1×10^5 cpm/µl eingestellt. Für die eigentliche Hybridisierungslösung wurde die Sonde in 2 ml Hybridisierungslösung mit 20µl 1M DTT so verdünnt, daß die Lösung eine Konzentration von 5000 cpm/µl hatte. Die Sonde konnte so bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

5.7.2.2 Hybridisierung auf Gewebeschnitten und Signaldetektion

Die Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden zunächst aufgetaut und getrocknet. Anschließend wurden die Objektträger für 3 min in 0,1 M Triethanolamin (pH8,0) in einer Glasküvette inkubiert. Inzwischen wurde eine weitere Küvette mit Triethanolamin vorbereitet, dem man nach Ablauf der Inkubationszeit 350 µl Eisessig Anhydrid zufügte. Die Objektträger wurden dann sofort in die frische Lösung gestellt und für weitere 10 min inkubiert. Zur Dehydrierung wurden die Objektträger für jeweils 3 min in Ethanol mit aufsteigender Konzentration inkubiert (30% Ethanol, 50% Ethanol, 70% Ethanol, 95% Ethanol 100 % Ethanol) und nachfolgend für 20 min getrocknet.

Für die Hybridisierung wurde 80 µl des Probenmixes aus 5.7.2.1 auf jeden Objektträger gegeben, welcher dann mit einem Deckglas bedeckt wurde. Um Austrocknung zu vermeiden, wurden die Ränder mit DPX verschlossen. Es folgte eine Inkubation für 18-24 Std bei 55°C.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger zunächst für 15 min auf RT abgekühlt und dann nach Entfernung des DPX in 4 x SSC für 20 min bei RT langsam schüttelnd inkubiert, um die Deckgläser zu entfernen. Die Objektträger wurden nachfolgend für 10 min in 2x SSC bei RT und dann für 30 min bei 37°C in RNase A Puffer (0,5M

NaCl, 10 mM Tris pH 7.5, 0,02 mM EDTA pH8,0, 25 µg/ml RNase A , Boeringer) gewaschen. Es folgten weitere Waschschr tte in Lösungen mit absteigender SSC-Konzentration (2x SSC, 1x SSC, 0,5x SSC, jeweils 10 min bei RT; 0,1x SSC, 0,1x SSC, jeweils 30 min bei 55 C).

Die Schnitte wurden dann nacheinander mit 70% und 96% Ethanol für jeweils 3 min dehydriert und für 20 min getrocknet. Die trockenen Objektträger wurden in einer Filmkassette unter Lichtausschlu f für 24h unter einem Röntgen Film (Biomax MR, Kodak) exponiert. Dieser Schritt diente als Kontrolle für den Erfolg der Hybridisierung.

Die eigentliche radioaktive Signaldetektion erfolgte ebenfalls unter Lichtausschlu f. Hierfür wurde zunächst Fotoemulsion (Kodak) 1:1 mit ddH₂O gemischt. Die Emulsion war zum Lösen zuvor auf 42 C erwärmt worden. Die Objektträger wurden in die Lösung eingetaucht und anschließend aufrecht stehend 30 min im Dunkeln getrocknet. Die so behandelten Objektträger wurden in einem mit Alufolie umwickelten Objekttr gerkasten bei 4 C für 1-2 Wochen exponiert.

Die anschließende Entwicklung der Schnitte wurde in vollständiger Dunkelheit durchgeführt. Die Objektträger wurden 4 min in Entwicklungslösung (D19, Kodak), 1 min in 2% Acetoacetat, 5 min in Fixierer (Kodak) und 5 min in H₂O inkubiert, anschließend für mindestens 20 min in fließendem H₂O gewaschen und in gefilterter Giemsa Lösung (18 ml Giemsa Lösung, Merck, 1,6 ml 0,5M NaHPO₄, pH 6,0; 180 ml H₂O) für 10 min gefärbt. Nach der Färbung wurden die Objektträger solange unter fließendem H₂O gewaschen, bis nur noch die Schnitte, nicht aber die Objektträger gefärbt waren. Die Objektträger wurden über Nacht getrocknet und mit Entellan gedeckelt.

5.8 Immunfluoreszenz Färbungen

Die Detektion von Proteinen mittels spezifischer Antikörper erfolgte auf Gefrierschnitten oder dehydrierten Paraffinschnitten. Zur Permeabilisierung der Zellkernmembran wurden in Paraffin fixierte Gewebeschnitte sofern erforderlich 2 x 5 min in einer Citratlösung (Na-Citrat, 10mM) in der Mikrowelle gekocht, während Gefrierschnitte zu diesem Zweck 2-12h bei 70 C in PBS inkubiert wurden. Die Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden daraufhin bis zur weiteren Behandlung in PBS bei RT gelagert. Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen

wurden das Gewebe 30 min in 1-5%igem NGS in PBST bei RT vorinkubiert und dann über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper in einer feuchten Kammer inkubiert. Der Antikörper war zuvor mit 1%-5%igem NGS (in PBST) auf die geeignete Konzentration eingestellt worden. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden die Gewebeschnitte 1h bei RT mit dem sekundären, fluoreszierenden Antikörper in einer feuchten Kammer inkubiert. Um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden, mußte die Kammer abgedunkelt werden. Abschließend wurden die Schnitte 3 x 5 min in PBS gewaschen und mit einem Mounting Medium (Vectashield) gedeckelt. Die Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgte unter dem Mikroskop (Zeiss Axiophot mit Fluoreszenzeinrichtung bzw. Konfokales Lasermikroskop).

5.9 Fixierung und Weiterverarbeitung von Embryonen

5.9.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Die Präparation erfolgte in eiskaltem PBS. Embryonen von E10.5 bis E13.5 wurden als Ganzes präpariert, bei Embryonen am E15.5 wurde der Pankreas zusammen mit dem Magen und der oberen Duodenalschleife entnommen und bei Embryonen am E18.5 wurde ausschließlich die Pankreasanlage isoliert. Das Gewebe wurde nach der Präparation 2h–18h (je nach Alter des Embryos bzw. der Gewebemengen) bei 4°C in 4% Paraformaldehyd (PBS) fixiert und danach 2 x 15 min mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurde das Gewebe in 30% Sucrose (PBS) bei 4°C inkubiert. Nach Absinken des Gewebes wurde dieses in TissueTek (Sakura) eingebettet und in einem Ethanol/Trockeneis Bad eingefroren. Das Gewebe kann so mehrere Monate bei -80°C gelagert werden. Bei Bedarf wurden im Kryostat (2800 Frig-Cut E, Reichert-Jung) bei -20°C Gefrierschnitte von 10 µm Dicke angefertigt. Die Schnitte wurden auf beschichtete Objektträger aufgezogen, getrocknet und entweder bei -80°C gelagert oder sofort verwendet. Embryonen am E10.5 wurden transversal, Embryonen am E12.5 sagittal geschnitten. Das Gewebe wurde seriell aufgezogen. Je nach Alter der Embryonen wurden 3er (E10.5), 8er (E12.5), 10er (E15.5) oder 15er Serien (E18.5) angefertigt.

5.9.2 Herstellung von Paraffinschnitten

Die Präparation und Fixierung des Gewebes erfolgte gemäß 5.9.1. Anschließend wurde das Gewebe in Paraffin Einbettkassetten (Histosettes, Roth) überführt und zur Dehydrierung für jeweils 30 min in einer Alkoholreihe (50% Ethanol, 70% Ethanol, 2 x 95% Ethanol, 2 x 99% Ethanol, 100% Ethanol, 3 x 100% Xylen) inkubiert. In 70% Ethanol kann das Gewebe einige Tage bei 4°C gelagert werden. Danach wurde das Gewebe 3 x 12h in flüssigem Paraffin bei 65°C inkubiert und anschließend eingebettet. Hierzu wurde ein Paraffin Ausgießer (Leica EG1160) mit integrierter Kühlplatte verwendet. Am Mikrotom (Leica) wurden Paraffinschnitte von 6 µm Dicke angefertigt. Diese wurden zur Glättung auf die Wasseroberfläche eines Wasserbades (42°C) überführt und anschließend auf beschichtete Objektträger aufgezogen.

Für immunhistologische Untersuchungen oder *in situ* Hybridisierungen wurde das Paraffin aus dem Gewebe entfernt. Dazu wurden die Objektträger mit den Paraffinschnitten jeweils 2 min in einer Alkoholreihe (2 x Xylen, 2 x 100% Ethanol, 2 x 95% Ethanol, 2 x 70% Ethanol, 50% Ethanol, H₂O) inkubiert.

5.10 Zellzahlbestimmung

Die Pankreata von Mäuseembryonen E18.5 wurden wie beschrieben präpariert, fixiert und in Paraffin eingebettet. Zur Bestimmung endokriner Zellzahlen wurden Mikrotomschnitte von 6 µm Dicke angefertigt. Die Pankreata wurden seriell aufgezogen, wobei eine Serie 15 Objektträger umfasste und jeweils 4 Schnitte auf einen Objektträger aufgezogen wurden. Es wurden insgesamt drei Serien pro Pankreas erhalten, was einer Objektträger Anzahl von 45 entspricht. Hiervon wurde jeder neunte Objektträger ausgewählt. Das Gewebe wurde wie beschrieben deparaffiniert und die endokrinen Zellen mittels entsprechender Antikörper immunhistochemisch markiert. Die Zählung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss). Für jedes individuelle Pankreas wurde die mittlere Zellzahl pro Schnitt berechnet. Die Mittelwerte der Zellzahlen von jeweils 4 individuellen Pankreata der verschiedenen Nkx Genotypen wurden mit den Zellzahlen einer entsprechenden Anzahl von Wildtyp Embryonen verglichen, um eine mögliche Zellzahlveränderung in den Mutanten zu ermitteln (siehe Ergebnisse).

5.11 β -Galaktosidase Bestimmung auf ganzen Embryonen und Gewebe

Die Reaktion wurde an Embryonen der Linie Nkx6.2 x C57BL/6J durchgeführt.

Die Embryonen wurden in kaltem PBS isoliert und je nach Alter zwischen 15 und 30 min in Fixierungslösung (1% Formaldehyd, 0,2% Glutaraldehyd, 0,002% NP40, 1 x PBS) inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Embryonen 2 x 20 min in 1 x PBS gewaschen und in Zellkulturschalen mit Färbelösung (1mg/ml X-Gal, 5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 5mM $K_4Fe(CN)_6$, 2mM $MgCl_2$, 0,02% NP40) überführt. Hierin wurden die Embryonen über Nacht bei 30°C leicht schüttelnd gefärbt. Da die Färbelösung lichtempfindlich ist, wurden die Platten mit Alufolie umwickelt.

Die Reaktion wurde am folgenden Tag durch Waschen mit 1 x PBS (2 x 20min) beendet.

5.12 Identifizierung differenziell exprimierter Gene mittels Gen-Chip-Analyse

Die Gen-Chip-Analyse ist eine schnelle und effiziente Methode zur Erstellung von Genexpressionsprofilen und erlaubt darüber hinaus die vergleichende Analyse zweier gegebener Systeme. Bei den Gen-Chips handelt es sich um eine kompakte Anordnung von Oligonukleotiden, welche durch kovalente Bindung an einer Silikatmatrix immobilisiert wurden. Dabei repräsentiert jedes Oligonukleotid ein spezifisches Gen. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten System handelt es sich um kommerziell erhältliche Gen-Chips der Firma Affymetrix (GeneChip[®] Murine Genome U74 Set), welche 6000 bekannte Gene aus der Maus sowie weitere 6000 sogenannte EST Cluster umfassen. ESTs repräsentieren bisher unidentifizierte Gene. Zur Erstellung eines Genexpressionsprofils wurde die gesamte genetische Information von Wildtyp und Nkx6.1 Mutante in Form einer komplementären RNS Sonde (cRNS) auf die Genchips aufgebracht. Die cRNS Sonde wurde durch *in vitro* Transkription aus der zuvor synthetisierten cDNS hergestellt. Für die Herstellung der cRNS wurden biotinylierten Ribonukleotide verwendet, welche die nachfolgende Markierung der cRNS erlaubt. Die Expression eines Genes in einer Probe kann durch Bindung einer cRNS Sequenz und das komplementäre Oligonukleotid auf den Gen-Chips nachgewiesen werden. Zum Nachweis einer Bindung wurde der

Floureszenzfarbstoff Phycoerythrin verwendet, welcher als Streptavidin Konjugat kommerziell erhältlich ist. Da Streptavidin mit Biotin interagiert, wurde überall dort ein Lichtsignal erzeugt, wo komplementäre RNS an den Chip gebunden hat. Die Summe der Lichtsignale, die durch die Bindung der cRNS einer Probe erzeugt wird, konnte durch einen Laserscanner gemessen werden, welcher in der durch die Firma Affymetrix entwickelten Auswertungsstation integriert ist. Durch automatisierte Verfahren wurde aus den Lichtsignalen die Expression eines bestimmten Genes in der Probe bestimmt. Es wurden doppelte Ansätze angefertigt, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu erhöhen.

Durch Kreuzvergleich der Genexpressionsprofile von Wildtyp und Nkx6.1 Mutante konnten differenziell exprimierte Gene identifiziert werden. Die Änderung in der Genexpression wurde automatisch berechnet und als sogenannter "FC" (fold change) angegeben. Der „FC“-Wert für jedes Gen wird durch standardisierte Algorithmen aus den Floureszenzwerten von Wildtyp und Nkx6.1-Mutante kalkuliert und ist der differenziellen Expression des Gens proportional. Ein Schema zur Durchführung der Gen-Chip-Analyse ist in Abb 2.1 des Ergebnisteils wiedergegeben.

5.12.1 Präparation von RNS

Die Synthese von Gesamt RNS aus Gewebe erfolgte wie unter 5.3.6 beschrieben. Als Ausgangsmaterial dienten Pankreata von Nkx6.1-mutanten sowie Wildtyp-Mäuseembryonen E13.5. Die RNS aus jeweils 6 Pankreata wurde in einem Volumen von 11 µl DEPC H₂O aufgenommen. Es wurden jeweils 2 Reaktionsansätze pro Genotyp angefertigt.

5.12.2 *In vitro* Transkription zur Herstellung Biotin markierter cRNS Sonde

Für die Synthese des cDNS Erststranges wurden 11µl der in 5.3.6 isolierte RNS mit 1 µl oligodT/T7 Primer (100 pmol/µl, MWG) gemischt und für 10 min bei 70°C inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend kurz auf Eis gelagert. Für die DNS Synthese wurden 4 µl Erststrang Puffer (2 µl 0,1 M DTT und 10 mM dNTP) sowie 1 µl Reverse Transkriptase (Invitrogen) hinzugefügt und der Ansatz bei 42 °C für 1h inkubiert.

Der Reaktionsansatz wurde anschließend für 5 min auf Eis gelagert. Gleichzeitig wurde der Probenmix für die Zweitstrang Reaktion auf Eis angefertigt (106 µl DEPC H₂O, 15 µl 10 x Zweitstrang Puffer (200 mM Tris pH 6,9, 900 mM KCl, 46 mM MgCl₂, 1,5 mM NAD (Calbiochem), 100 mM NH₄SO₄), 3 µl 10 mM dNTP, 1 µl DNA Ligase (NEB, 10 u/µl), 4 µl DNA Polymerase (NEB, 10 u/µl), 2 µl RNase H (Boehringer 1 u/µl)) und nach Ablauf der Inkubationszeit zum Erststrang Reaktionsansatz gegeben. Der Gesamtansatz wurde für 2h bei 16°C inkubiert. Zur Herstellung von glatten Enden wurde anschließend 2 µl T4 Polymerase (Invitrogen) zum Reaktionsansatz gegeben für weitere 5 min bei 16°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl 0,5 M EDTA beendet und anschließend aufgereinigt.

Für die Aufreinigung wurde das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes mit DEPC H₂O auf 300 µl gebracht und ein gleiches Volumen neutrales Phenol/Chloroform (1:1) hinzugegeben. Nach mehrfachem Kippen des Reaktionsgefäßes zur Durchmischung wurde für 5 min bei 14.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand, der die cDNS enthielt, wurde anschließend mit 2,5 Volumen 96% Ethanol und 120 µl NH₄OAc versetzt und nochmals 30 min bei 14.000 Upm zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen des Präzipitats mit 70% Ethanol wurde die DNS getrocknet und in 45 µl DEPC H₂O aufgenommen.

Die aufgereinigte cDNS wurde in einem Volumen von 45 µl aufgenommen, was einer Konzentration von ca 200 ng/µl entsprach.

Für die Herstellung biotinylierter cRNS zur Hybridisierung der Affymetrix Oligonukleotid-Chips wurde das "RNA Transcript Kit" (Enzo) verwendet und erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Die cDNS wurde mit 2 µl 10x Hy Reaktionspuffer, 6 µl H₂O, 2 µl 10x Biotin markierte Ribonukleotide, 10 µl 10x DTT, 10 µl RNase Inhibitor und 5 µl T7 Polymerase über Nacht bei 37°C inkubiert. Dabei wurde der Reaktionsansatz mehrfach im Abstand von 45 min gemischt.

Die Aufreinigung der biotinylierten RNS erfolgte unter Verwendung des "RNeasy Kit" (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Es wurden etwa 10 µg biotinylierte Sonde pro Ansatz isoliert.

5.12.3 Fragmentierung der cRNS

Zur Fragmentierung der biotinylierten cRNS wurde der Gesamtansatz mit 2 µl Fragmentierungspuffer (200 mM Tris-Actetat pH 8,1, 500 mM KOAc, 150 mM MgOAc) bei 94 °C für 35 min inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt.

5.12.4 Hybridisierung der Genchips mit biotinylierter cRNS, Färbung und Signaldetektion

Die biotinylierte cRNS aus embryonalem Gewebe von Nkx6.1-mutanten und Wildtyp-Embryonen wurde zur Hybridisierung auf die Gen-Chips aufgebracht. Es folgten mehrere automatisierte Waschschrte und anschließend die Färbung gebundener cRNS mittels Streptavidin gekoppeltem Phycoerythrin. Für die gesamte experimentelle Prozedur wurde die "Gene Chip Fluidics Station 400" der Firma Affymetrix verwendet und wurde nach dem Affymetrix Gene Chip Expression Manual durchgeführt (s. dort). Die Signaldetektion erfolgte mit dem der Station integrierten Fluoreszenzmeßgerät.

5.12.5 Datenanalyse

Die Auswertung der Messdaten des Hybridisierungsexperimentes erfolgte automatisch durch das Auswertungsprogramm der Firma Affymetrix (Genechip Analysis Suite software). Es wurde zunächst die Auswertung jedes einzelnen Gen-Chip Experimentes (absolute Analyse) durchgeführt. Hierbei wurden Gene gemäß ihrer Signalintensität als exprimiert oder nicht exprimiert eingestuft. In der Vergleichsanalyse wurden dann die Messwerte der einzelnen Experimente miteinander verglichen und somit der FC-Wert berechnet. Die genaue Durchführung der Datenanalyse ist in Anhang 5 des Affymetrix GenChip3.1 Benutzerhandbuches beschrieben.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

6.1.1 Allgemeine Abkürzungen

A, mA	Ampere, Milliampere
Ad	auf ein Volumen von x zu bringen
ca	circa
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
cm, mm	Zentimeter, Millimeter
cpm	Impulse pro Minute
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
Fa	Firma
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
h, min, sek	Stunde, Minute, Sekunde
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
konz	konzentriert
Kat. nr.	Katalog-Nummer
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
M, mM, µM	molar, millimolar, mikromolar
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger-RNA)
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR

U	Unit (Einheit)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen

6.1.2 Abkürzungen von Substanzen und Puffern

BSA	Rinderserumalbumin
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosid Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2'-Ethansulfonsäure
MetOH	Methanol
³² P	Phosphor-Isotop 32
PBS	Phosphat gepufferte Saline
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactosidase

6.1.3 Spezielle Abkürzungen

E	Embryonaltag
EST	expressed sequence tag
MHC	major histocompatibility complex
ZNS	Zentrales Nervensystem

6.2 Liste der verwendeten Oligonukleotide

Primer bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Hersteller	Verwendungszweck
IC-1	CACAGGAGAATGGGAAGCCGAA	Metabion	Genotypisierung
IC-2	TCCACACAGATGGAGAGTCCAG	Metabion	Genotypisierung
Neo-3	CTTCAGTGACAACGTGAGC	Metabion	Genotypisierung
Neo-4	GATGGATTGCACGCAGGTTC	Metabion	Genotypisierung
Nkx6.2 5'	CTGTCGTTTGAACGCGG TCC	Metabion	Genotypisierung
Nkx6.2 3'	ACACCTGCAGACGAGGCGACG	Metabion	Genotypisierung
Nkx6.2 lacZ 5'	GTCAATCCGCCGTTTGTTCAC GG	Metabion	Genotypisierung
Nkx6.2 lacZ 3'	GCGTGTACCACAGCGGATGGTTC GG	Metabion	Genotypisierung
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	Invitrogen	Sequenzierung
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Invitrogen	Sequenzierung
Affy-T7	TCTAGTCGACGGCCAGTGAATTG TAATTGTAATACGACTCACTATAG GGCGT ₂₁	MWG	<i>in vitro</i> Transkription

7 Literaturverzeichnis

- Ahlgren, U., Jonsson, J. and Edlund, H. (1996) The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice. *Development* 122, 1409-16.
- Ahlgren, U., Jonsson, J., Jonsson, L., Simu, K. and Edlund, H. (1998) beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ip1/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. and Edlund, H. (1997) Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature* 385, 257-60.
- Alpert, S., Hanahan, D. and Teitelman, G. (1988) Hybrid insulin genes reveal a developmental lineage for pancreatic endocrine cells and imply a relationship with neurons. *Cell* 53, 295-308.
- Apelqvist, A., Ahlgren, U. and Edlund, H. (1997) Sonic hedgehog directs specialised mesoderm differentiation in the intestine and pancreas. *Curr Biol* 7, 801-4.
- Apelqvist, A., Li, H., Sommer, L., Beatus, P., Anderson, D.J., Honjo, T., Hrabe de Angelis, M., Lendahl, U. and Edlund, H. (1999) Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* 400, 877-81.
- Arceci, R.J., King, A.A., Simon, M.C., Orkin, S.H., Wilson, D.B. (1993) Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol.* 13, 2235-46.
- Awatramani, R., Beesley, J., Yang, H., Jiang, H., Cambi, F., Grinspan, J., Garbern, J. and Kamholz, J. (2000) Gtx, an oligodendrocyte-specific homeodomain protein, has repressor activity. *J Neurosci Res* 61, 376-87.
- Bach, I. (2000) The lim domain: regulation by association. *Mech Dev* 91, 5-17.
- Bailey, W.J., Wagner, G.P., Ruddle, F.H. (1997) Phylogenetic reconstruction of vertebrate Hox cluster duplication. *Mol. Biol. Evol.* 14, 843-853.
- Bitgood, M.J., Shen, L., McMahon, A.P. (1995) Hedgehog and BMP genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell- interaction in the mouse embryo. *Dev Biol*, 126-138.
- Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T.M. and Ericson, J. (2000) A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 101, 435-45.
- Cai, J., St Amand, T., Yin, H., Guo, H., Li, G., Zhang, Y., Chen, Y. and Qiu, M. (1999) Expression and regulation of the chicken *Nkx-6.2* homeobox gene suggest its possible involvement in the ventral neural patterning and cell fate specification. *Dev Dyn* 216, 459-68.
- Cai, J.e.a. (2001) Mice lacking *Nkx6.2* (Gtx) homeodomain transcription factor develop and reproduce normally. *Mol Cell Biol* 21, 4399-4403.
- Cau, E., Gradwohl, G., Fode, C. and Guillemot, F. (1997) *Mash1* activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors. *Development* 124, 1611-21.
- Cirulli, V., Baetens, D., Rutishauser, U., Halban, P.A., Orci, L., Roullier, D.G. (1994) Expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in rat islets and its role in islet cell type segregation. *J Cell Sci* 107, 1429-1436.

- Cras-Meneur, C., Elghazi, L., Czernichow, P., Scharfmann, R. (2001) Epidermal growth factor increases undifferentiated pancreatic embryonic cells in vitro. *Diabetes* 50, 1571-1579.
- Dahl, U., Sjodin, A., Semb, H. (1996) Cadherins regulate aggregation of pancreatic β cells in vivo. *Development* 122, 2895-2902.
- Danielian, P.S., Muccino, D., Rowitch, D.H., Michael, S.K., Mc Mahon, A.P. (1998) Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. *Curr Biol*.
- De Rosa, R., Grenier, J.K., Andreeva, T., Cook, C.E., Adoutte, A., Akam, M., Carroll, S.B., Balavoine, G. (1999) Hox Genes in brachiopods and priapulids and protostome evolution. *Nature* 399, 772-776.
- Deutsch, G., Jung, J., Zheng, M., Lora, J., Zaret, K.S. (2001) A biopotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development*, 871-881.
- Edlund, H. (1998) Transcribing pancreas. *Diabetes* 47, 1817-23.
- Edlund, H. (2001) Developmental biology of the pancreas. *Diabetes* 50 Suppl 1, S5-9.
- Esni F., J., B.R., Radice, G.L., Semb, H. (2001) Dorsal pancreatic agenesis in N-Cadherin deficient mice. *Dev Biol* 238, 202-212.
- Fode, C., Gradwohl, G., Morin, X., Dierich, A., LeMeur, M., Goridis, C., Guillemot, F. (1998) The bHLH protein Neurogenin 2 is a determination factor for epibranchial placode-derived sensory neurons. *Neuron* 20, 483-494.
- Force, A., Amores, A., Postlethwait, J. (2002) Hox Cluster organization in the jawless vertebrate *Petromyzon marinus*. *Exp. Zool* 294, 30-46.
- Friedman, R., Hughes, A.L. (2001) Pattern and timing of gene duplication in animal genomes. *Genome Res.* 11, 1842-1847.
- Golosow, N. and Grobstein, C. (1962) Epitheliomesenchymal interaction in pancreatic morphogenesis. *Dev. Biol.* 4, 242-255.
- Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M. and 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.
- Grapin-Botton, A., Majithia, A.R., Melton, D.A. (2001) Key events of pancreas formation are triggered in gut endoderm by ectopic expression of pancreatic regulatory genes. *Genes Dev*, 444-454.
- Grepin, C., Robitaille, L., Antakly, t., Nemer, M. (1995) Inhibition of transcription factor GATA-4 expression blocks in vitro cardiac muscle differentiation. *Mol Cell Biol* 15, 4095-102.
- Gu, G., Dubauskaite, J., Melton, D.A. (2002) Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development*, 2447-2457.
- Guz, Y., Montminy, M.R., Stein, R., Leonard, J., Gamer, L.W., Wright, C.V. and Teitelman, G. (1995) Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in beta cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny. *Development*.
- Hald, J., Hjorth, J.P., German, M.S., Madsen, O.D., Serup, P., Jensen, J. (2003) Activated Notch1 prevents differentiation of pancreatic acinar cells and attenuate endocrine development. *Dev Biol* 260, 426-37.
- Hebrok, M., Kim, S.K. and Melton, D.A. (1998) Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev* 12, 1705-13.

- Hebrok, M., Kim, S.K., St Jacques, B., McMahon, A.P. and Melton, D.A. (2000) Regulation of pancreas development by hedgehog signaling. *Development* 127, 4905-13.
- Herrera, P.L. (2000) Adult insulin and glucagon producing cells differentiate from two independent cell lineages. *Development*, 2317-2322.
- Herrera, P.L., Huarte, J., Sanvito, F., Meda, P., Orci, L. and Vassalli, J.D. (1991) Embryogenesis of the murine endocrine pancreas; early expression of pancreatic polypeptide gene. *Development* 113, 1257-65.
- Herzer, U., Crocoll, A., Barton, D., Howells, N. and Englert, C. (1999) The Wilms tumor suppressor gene *wt1* is required for development of the spleen. *Curr Biol* 9, 837-40.
- Huang, H.P., Liu, M., El-Hodiri, H.M., Chu, K., Jamrich, M., Tsai, M.J. (2000) Regulation of the pancreatic islet-specific gene *BETA2 (neuroD)* by *neurogenin3*. *Mol Cell Biol* 20, 3292-3307.
- Jensen, J., Heller, R.S., Funder-Nielsen, T., Pedersen, E.E., Lindsell, C., Weinmaster, G., Madsen, O.D. and 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. and Madsen, O.D. (2000b) Control of endodermal endocrine development by *Hes-1*. *Nat Genet* 24, 36-44.
- Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T. and Edlund, H. (1994) Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371, 606-609.
- Jorgensen, M.C., Petersen, H.V., Ericson, J., Madsen, O.D., Serup, P. (1999) Cloning and DNA-binding properties of the rat pancreatic β -cell-specific factor *Nkx6.1*. *FEBS Lett* 461, 287-294.
- Karlson, O., Thor, S., Norberg, H., Ohlsson, H., Edlund, T. (1990) Insulin enhancer binding protein *Isl-1* is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature* 344.
- Kataoka, K., Han, S.I., Shioda, S., Hirai, M., Nishizawa, M., Handa H. (2002) *MafA* is a glucose-regulated and pancreatic beta-cell-specific transcriptional activator for the insulin gene. *J Biol Chem.* 277, 49903-10.
- Kim, S.K. and Hebrok, M. (2001) Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes Dev* 15, 111-27.
- Kim, S.K., Hebrok, M., Li, E., Oh, S.P., Schrewe, H., Harmon, E.B., Lee, J.S. and Melton, D.A. (2000) Activin receptor patterning of foregut organogenesis. *Genes Dev* 14, 1866-71.
- Komuro, I.S., M.;Jahn,L.; Bodmer,R.; Jenkins, N. A.; Copeland, N. G.; Izumo, S. (1993) *GTX*: a novel murine homeobox-containing gene, expressed specifically in glial cells of the brain and germ cells of testis, has a transcriptional repressor activity in vitro for a serum-inducible promoter. *Embo J* 12, 1387-1401.
- Krapp, A., Knofler, M., Frutiger, S., Hughes, G.J., Hagenbuchle, O. and 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.

- Kuo, C.T., Morrissey, E.E., Anandappa, R., Sigrist, K., Lu, M.M., Parmacek, M.S., Soudais, C., Leiden, J.M. (1997) GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev* 11, 1048-60.
- Le Bras, S., Miralles, f., Basmaciogullari, A., Czernichow, P., Scharfmann, R. (1998) fibroblast growth factor 2 promotes pancreatic epithelial cell proliferation via functional fibroblast growth factor receptors during embryonic life. *Diabetes* 47, 236-242.
- Lee, S.D., J.A.;Vidal, S.M.;Belouchi,A. (2001) Cloning, expression and chromosomal location aof NKXB to 10q26, a region frequently deleted in brain tumors. *Mamm Genome* 12, 157-162.
- Leonard, J., Serup, P., Gonzalez, G., Edlund, T. and Montminy, M. (1992) The LIM family transcription factor Isl-1 requires cAMP response element binding protein to promote somatostatin expression in pancreatic islet cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6247-6251.
- Lettice L., H.-S.J., Hill R. (2001) The role of Bapx1 (Nkx3.2) in the development and evolution of the axial skeleton. *J Anat.* 199, 181-7.
- Lewandoski, M. (2001) conditional control of gene expression in the mouse. *Nature reviews* 2, 743-755.
- Lewis, J. (1996) Neurogenic genes and vertebrate neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 6, 3-10.
- Ma, Q., Chen,Z., del Barco Barrantes,I., de la Pompa, J.L., Anderson, D.J. (1998) Neurogenin1 is essential for the determination of neuronal precursors for proximal cranial sensory ganglia. *Neuron* 20, 469-482.
- Ma, Q., Kintner, Anderson, D.J. (1996) Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* 87, 43-52.
- McGinnis, W., Garber, R.L., Wirz, J., Kuroiwa, A., Gering, W.L. (1984a) A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoa. *Cell*, 403-408.
- McGinnis, W. and Krumlauf, R. (1992) Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68, 283-302.
- McGinnis, W., Levinem, S., Hafen, E., Kuroiwa, A., Gehring, W.L. (1984b) *Nature*, 428-433.
- Metzger, D., Clifford, J., Chiba, H., Chambon, P. (1995) Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6991-6995.
- Miettinen, P.J., Huotari, M-A., Koivisto, T., Ustinov, J., Palgi, J., Rasilainen, S., Lehtonen, E., Keski-Oja, J., Otonski, T (2000) Impaired migration and delayed differentiation of pancreatic islets in mice lacking EGF-receptors. *Development* 127, 2617-2627.
- Miller, C.P., McGehee, R.E., Jr. and 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.
- Miralles, F., Czernichow, P. and Scharfmann, R. (1998) Follistatin regulates the relative proportions of endocrine versus exocrine tissue during pancreatic development. *Development* 125, 1017-24.
- Mirmira, R.G., Watada, H. and German, M.S. (2000) Beta-cell differentiation factor Nkx6.1 contains distinct DNA binding interference and transcriptional repression domains. *J Biol Chem* 275, 14743-51.
- Molkentin, J.D., Olson, E.N. (1997) GATA4: a novel transcriptional regulator of cardiac hypertrophy? *Circulation* 96, 3833-5.

- Muhr, J., Andersson, E., Persson, M., Jessell, T.M. and Ericson, J. (2001) Groucho-mediated transcriptional repression establishes progenitor cell pattern and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 104, 861-73.
- Murre, C., McCaw, P.S. and Baltimore, D. (1989) A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and *myc* proteins. *Cell* 56, 777-783.
- Naya, F.J., Huang, H.P., Qiu, Y., Mutoh, H., DeMayo, F.J., Leiter, A.B. and Tsai, M.J. (1997) Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev* 11, 2323-34.
- Nelson (1995) Structure and Function of DNA-binding proteins. *Curr Biol*, 180-189.
- Nirenberg, M., Nakayama, K., Nakayama, N., Kim, Y., Mellerick, D., Wang, L.H., Webber, K.O. and Lad, R. (1995) The NK-2 homeobox gene and the early development of the central nervous system of *Drosophila*. *Ann N Y Acad Sci* 758, 224-42.
- Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E. (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, 795-801.
- Offield, M.F., Jetton, T.L., Labosky, P.A., Ray, M., Stein, R.W., Magnuson, M.A., Hogan, B.L. and 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. and Edlund, T. (1993) IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *EMBO J.* 12, 4251-4259.
- Ohno, S. (1970) Evolution by Gene Duplication. Springer Verlag, Heidelberg.
- Olbrot, M., Rud, J., Moss, L.G., Sharma, A. (2002) Identification of beta-cell-specific insulin gene transcription factor RIPE3b1 as mammalian MafA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6737-6742.
- Oster, A., Jensen, J., Serup, P., Galante, P., Madsen, O.D. and Larsson, L.I. (1998) Rat endocrine pancreatic development in relation to two homeobox gene products (Pdx-1 and Nkx 6.1). *J Histochem Cytochem* 46, 707-15.
- Pictet, R. and Rutter, W.J. (1972) Development of the embryonic endocrine pancreas. In Society, A.P. et al. (eds.), *Handbook of Physiology*, Williams and Wilkins, Washington DC, Vol. section 7, volume 1, pp. 25-66.
- Pictet, R.L., Clark, W.R., Williams, R.H. and Rutter, W.J. (1972) An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas. *Dev Biol* 29, 436-67.
- Prince, V.E. (2002) The Hox Paradox: More complex (es) than imagined. *Dev Biol* 249, 1-12.
- Qiu, M., Shimamura, K., Sussel, L., Chen, S. and Rubenstein, J.L. (1998) Control of anteroposterior and dorsoventral domains of Nkx-6.1 gene expression relative to other Nkx genes during vertebrate CNS development. *Mech Dev* 72, 77-88.
- Rose, S.D., Swift, G.H., Peyton, M.J., Hammer, R.E., MacDonald, R.J. (2001) The role of PTF1-P48 in pancreatic acinar gene expression. *J Biol Chem* 276, 44018-26.
- Rossi, J.M., Dunn, N.R., Zaret, K.S. (2001) Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchym, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev* 15, 1998-2009.
- Rudnick, A., Ling, T.Y., Odagiri, H., Rutter, W.J. and German, M.S. (1994) Pancreatic beta cells express a diverse set of homeobox genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12203-7.
- Ryan, A.K., Rosenfeld, M.G. (1997) POU domain family values: flexibility, partnerships and developmental codes. *Genes Dev* 11, 1207-1225.

- Saltiel, A.R. (2001) New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell* 104, 517-529.
- Sander, M., Neubuser, A., Kalamaras, J., Ee, H.C., Martin, G.R. and 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., Paydar, S., Ericson, J., Briscoe, J., Berber, E., German, M., Jessell, T.M. and Rubenstein, J.L. (2000a) Ventral neural patterning by Nkx homeobox genes: Nkx6.1 controls somatic motor neuron and ventral interneuron fates. *Genes Dev* 14, 2134-9.
- Sander, M., Sussel, L., Connors, J., Scheel, D., Kalamaras, J., Dela Cruz, F., Schwitzgebel, V., Hayes-Jordan, A. and German, M. (2000b) Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas. *Development* 127, 5533-40.
- Schneider, A., Mijalski, T., Schlange, T., Dai, W., Overbeek, P., Arnold, H.H., Brand, T. (1999) The homeobox gene NKX3.2 is a target of left-right signalling and is expressed on opposite sides in chick and mouse embryos. *Curr Biol.* 9, 911-4.
- Schwitzgebel, V., Scheel, D.W., Connors, J.R., Kalamaras, J., Lee, J.E., Anderson, D.J., Sussel, L., Johnson, J.D., German, M. (2000) Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development*, 3533-3542.
- Serup, P., Petersen, E.E., Edlund, H., Leonard, J., Petersen, J.S., Larson, L.I., Madsen, O.D. (1995) The homeodomain protein IPF-1/STF-1 is expressed in a subset of islet cells and promotes rat insulin 1 gene expression dependent on an intact E1 helix-loop-helix factor binding site. *J Biochem* 310, 997-1003.
- Sidow, A. (1996) Gen(ome) duplications in the evolution of early vertebrates. *Curr.Opin. Genet. Dev.* 6, 715-722.
- Slack, J.M. (1995) Developmental biology of the pancreas. *Development* 121, 1569-80.
- Smith, S.t., Jaynes, J.B. (1996) A conserved region of engrailed, shared among all en-, gsc-, Nk1,Nk2-,and msh-class homeoproteins, mediates active transcriptional repression. *Development* 122, 3141-3150.
- Sommer, L., Ma, Q. and Anderson, D.J. (1996) Neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS. *Mol. Cell. Neurosci.* 8, 221-241.
- Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Torres, M., Oliver, G. and Gruss, P. (1997) The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature* 386, 399-402.
- St-Onge, L., Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Mansouri, A. and Gruss, P. (1997) Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas. *Nature* 387, 406-9.
- Stoffers, D.A., Zinkin, N.T., Stanojevic, V., Clarke, W.L. and Habener, J.F. (1997) Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat Genet* 15, 106-10.
- Sussel, L., Kalamaras, J., Hartigan-O'Connor, D.J., Meneses, J.J., Pedersen, R.A., Rubenstein, J.L. and 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., Alpert, S., Polak, J.M., Martinez, A. and Hanahan, D. (1993) Precursor cells of mouse endocrine pancreas coexpress insulin, glucagon and the

- neuronal proteins tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y, but not pancreatic polypeptide. *Development* 118, 1031-9.
- Uhler, J., Garbern, J., Yang, L., Kamholz, J., Mellerick, D (2002) Nk6, a novel *Drosophila* homeobox gene regulated by vnd. *Mech Dev* 116, 105-116.
- Upchurch, B.H., Aponte, G.W. and 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.
- Vallejo, M., Penchuk, L. and Habener, J.F. (1992) Somatostatin gene upstream enhancer element activated by a protein complex consisting of CREB, Isl-1-like, and alpha-CBF-like transcription factors. *J Biol Chem* 267, 12876-84.
- Vallstedt, A., Muhr, J., Pattyn, A., Pierani, A., Mendelsohn, M., Sander, M., Jessel, T.M., Ericson, J. (2001) Different levels of repressor activity assign redundant and specific roles to Nkx6 genes in motoneuron and interneuron specification. *Neuron* 31, 743-755.
- Wang, M. and Drucker, D.J. (1995) The LIM domain homeobox gene isl-1 is a positive regulator of islet cell-specific proglucagon gene transcription. *J Biol Chem* 270, 12646-52.
- Wessells, N.K. and Cohen, J.H. (1967) Early pancreas organogenesis: morphogenesis, tissue interactions and mass effects. *Dev. Biol*, 15, 237-270.
- Wilson, M.E., Scheel, D., German, M.S. (2003) Gene expression cascades in pancreatic development. *Mech Dev* 120, 65-80.
- Yee, N.S., Yusuff, S., Pack, M. (2001) Zebrafish pdx1 morphant displays defects in pancreas development and digestive organ chirality, and potentially identifies a multipotent pancreas progenitor cell. *Genesis* 30, 137-140.