

„Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.“

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Adéla Hamplová

Vývoj a funkce endokrinních buněk pankreatu

Development and function of endocrine cells of the pancreas

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Gabriela Pavlínková, Ph.D

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 24. 4. 2019

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Gabriele Pavlíkové, Ph.D. za odborné konzultace, vynikající vedení a čas strávený nad mojí diplomovou prací. Také děkuji Ing. Romaně Bohuslavové, Ph.D. za pomoc při vypracovávání experimentální části práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala rodičům za podporu během celého studia.

Abstrakt

Onemocnění *Diabetes mellitus* postihuje téměř 300 miliónů lidí na světě. K rozvoji diabetu dochází dysfunkcí nebo snížením počtu inzulin produkujících β -buněk, které jsou součástí endokrinního pankreatu. Z toho důvodu je důležité pochopení vývoje a funkce endokrinních buněk pankreatu. Práce vychází z hypotézy, že transkripční faktor NEUROD1 je klíčový faktor pro vývoj pankreatu a pro následné udržení funkce endokrinní tkáně. Pro studium role tohoto transkripčního faktoru ve vývoji a funkci pankreatu byl pomocí Cre-loxP systému vytvořen myší model s tkáňově specifickou delecí *Neurod1* v *Isl1* pozitivních buňkách (*Neurod1CKO*). Imunohistochemické analýzy na pankreatech v embryonálním dni 17,5 a postnatálním dni 0 potvrdily nepostradatelnost NEUROD1 pro správný vývoj, organizaci endokrinní tkáně a celkové množství endokrinních buněk pankreatu. Pro lepší porozumění molekulárních změn byly provedeny kvantitativní PCR analýzy genové exprese ve věku embryonálního dne 14,5 a postnatálního dne 1. Pro studium změn exprese byly vybrány geny důležité pro vývoj a funkci pankreatu. Tyto analýzy ukázaly změny v expresi genů sloužících jako markery endokrinního pankreatu (*Pdx1*, *Neurog3*, *Pax6*), genů hormonů produkujících endokrinními buňkami (*Inzulín 1*, *Inzulín 2*, *Glukagon*), genů důležitých pro diferenciaci endokrinních buněk (*MafA*, *MafB*) a genu potřebného pro vývoj exokrinního pankreatu (*Ptf1a*). Tyto výsledky potvrzují výchozí hypotézu o důležitosti NEUROD1 pro správný vývoj a funkci pankreatu. Zcela nově tyto výsledky ukazují, že NEUROD1 ovlivňuje vývoj pankreatu již během sekundární přeměny, a že ztráta endokrinních buněk není v důsledku apoptózy během stádia dozrávání endokrinní tkáně, ale z důvodů abnormálního vývoje a produkce endokrinních prekurzorů.

Klíčová slova

Diabetes mellitus, pankreas, NEUROD1, myší model *Neurod1CKO*, imunohistochemická analýza, exprese genů

Abstract

Diabetes mellitus affects nearly 300 million people in the world. The development of diabetes is caused by dysfunction or by reduction of insulin-producing β -cells that are part of the endocrine pancreas. Therefore, the most critical step for understanding the pathophysiology of diabetes and for restoring lost β cells is the identification of molecular cues that specify the cellular phenotype in the pancreas. This work is based on the hypothesis that the transcription factor NEUROD1 is a key factor for the development of the pancreas and for the maintenance of endocrine tissue function. *Neurod1* conditional KO mutants (*Neurod1CKO*) were generated using the Cre-loxP system by crossing floxed *Neurod1* mice with *Isl1-Cre* line. Immunohistochemical analyses of the pancreas at embryonic day 17.5 and postnatal day 0 showed that the deletion of *Neurod1* negatively affected the development, organization of endocrine tissue, and total mass of pancreatic endocrine cells. To better understand molecular changes, quantitative PCR was used to analyse mRNA expression in the developing pancreas at the age of embryonic day 14.5 and postnatal day 1. Genes important for the development and function of the pancreas have been selected for the study of expression changes. These analyses showed changes in expression of genes serving as endocrine pancreatic markers (*Pdx1*, *Neurog3*, *Pax6*), genes for producing endocrine hormones (*Insulin 1*, *Insulin 2*, *Glucagon*), genes important for endocrine cell differentiation (*MafA*, *MafB*), and gene for development of exocrine pancreas (*Ptf1a*) in *Neurod1CKO* compared to controls. These results confirm the initial hypothesis that NEUROD1 is important for the development and function of the pancreas. Newly, these results show that NEUROD1 already affects pancreatic development during the secondary transformation, and that the loss of endocrine cells is not due to apoptosis during the endocrine maturation stage but due to abnormal development and production of endocrine precursors.

Key words

Diabetes mellitus, pancreas, NEUROD1, *Neurod1* conditional knockout mouse model, immunohistochemical analysis, gene expression

Obsah

Seznam zkratk	7
1. Úvod	8
2. Přehled literatury	9
2.1. <i>Diabetes mellitus</i>	9
2.1.1. Diabetes 1. typu	10
2.1.2. Diabetes 2. typu	10
2.1.3. Ostatní typy diabetu	10
2.1.4. Gestační diabetes	11
2.2. Pankreas	12
2.2.1. Langerhansovy ostrůvky	13
2.2.2. Modelový organismus	13
2.3. Buňky endokrinního pankreatu	14
2.3.1. α -buňky	14
2.3.2. β -buňky	14
2.3.3. δ -buňky	16
2.3.4. ϵ -buňky	17
2.3.5. PP-buňky	17
2.4. Vývoj pankreatu	18
2.4.1. Primární přeměna	19
2.4.2. Sekundární přeměna	19
2.4.3. Terciální přeměna	20
2.5. Transkripční faktory	21
2.5.1. PDX1	21
2.5.2. Pankreatický transkripční faktor 1 (PTF1)	22
2.5.3. Neurogenin3	22
2.5.4. NEUROD1	23
2.5.5. ISL1	24
2.5.6. PAX6	24
2.5.7. MAF transkripční faktor A základního leucinového zipu (MafA) a MafB	25
3. Cíle práce	26
4. Materiál a metody	27
4.1. Materiál	27
4.1.1. Modelový organismus	27

4.1.2. Chemikálie	27
4.1.3. Enzymy	28
4.1.4. Primery	28
4.1.5. Protilátky	30
4.1.6. Roztoky.....	30
4.1.7. Komerční soupravy	31
4.1.8. Přístroje.....	31
4.1.9. Počítačové programy	32
4.2. Metody	33
4.2.1. Izolace myších embryí.....	33
4.2.2. Izolace DNA	33
4.2.3. Stanovení koncentrace a čistoty DNA.....	34
4.2.4. Genotypizace	34
4.2.5. Izolace RNA	35
4.2.6. Reverzní transkripce.....	36
4.2.7. Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR).....	36
4.2.8. Imunohistochemické barvení na vibratomových řezech	37
4.2.9. Imunohistochemické barvení a detekce apoptózy metodou TUNEL („terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling“)	38
5. Výsledky	40
5.1. Delece <i>Neurod1</i> pomocí <i>Isl1-Cre</i>	40
5.2. Porovnání exokrinní a endokrinní části pankreatu	42
5.3. Analýza buněčné proliferace	44
5.4. Analýza apoptózy	46
5.5. Relativní exprese vybraných genů	47
6. Diskuze	54
6.1. Podmíněná delece <i>Neurod1</i> genu ovlivňuje funkci endokrinní tkáně pankreatu a postnatální přežívání	54
6.2. <i>Neurod1</i> je nezbytný pro tvorbu Langerhansových ostrůvků	55
6.3. Delece <i>Neurod1</i> ovlivňuje proliferaci endokrinních pankreatických buněk.....	55
6.4. NEUROD1 ovlivňuje vývoj pankreatu již během stádia sekundární přeměny.....	56
7. Souhrn	59
Seznam použité literatury	60

Seznam zkratek

cDNA	Complementary Deoxyribonucleic acid	Komplementární deoxyribonukleová kyselina
Cq	Crossing point	Přechodový bod
E	Embryonic day	Embryonální den
EMT	Epithelial-mesenchymal transition	Epiteliální-mezenchymální přeměna
GLUT-4	Glucose transporter type 4	Glukózový transportér typu 4
Ht	Heterozygous	Heterozygot
<i>Hprt1</i>	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1	Hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza 1
ISL1	ISL LIM Homeobox 1	LIM homeodoménový faktor ISL1
MafA/B	MAF bZIP transcription factor A/B	MAF transkripční faktor A/B základního leucinového zipu
MODY	Maturity-Onset Diabetes of the Young	Diabetes s počátkem projevu v dětství
mRNA	Messenger Ribonucleic acid	Mediátorová ribonukleová kyselina
NEUROG3	Neurogenin 3	Neurogenin 3
NEUROD1	Neuronal Differentiation 1	Neurogenní diferenciační faktor 1
<i>Neurod1CKO</i>	<i>Neurod1</i> conditional knock out	<i>Neurod1</i> podmíněný knock out
P	Postnatal day	Postnatální den
PCR	Polymerase Chain Reaction	Polymerázová řetězová reakce
PAX6	Paired domain gene 6	Párová doména transkripčního faktoru 6
PDX1	Pancreatic duodenal homeobox 1	Pankreatický duodenální homeoboxový gen 1
PTF1	Pancreas transcription factor 1	Pankreatický transkripční faktor 1
qPCR	Quantitative real-time PCR	Kvantitativní PCR v reálném čase
<i>Wt</i>	Wild type	Divoký typ

1. Úvod

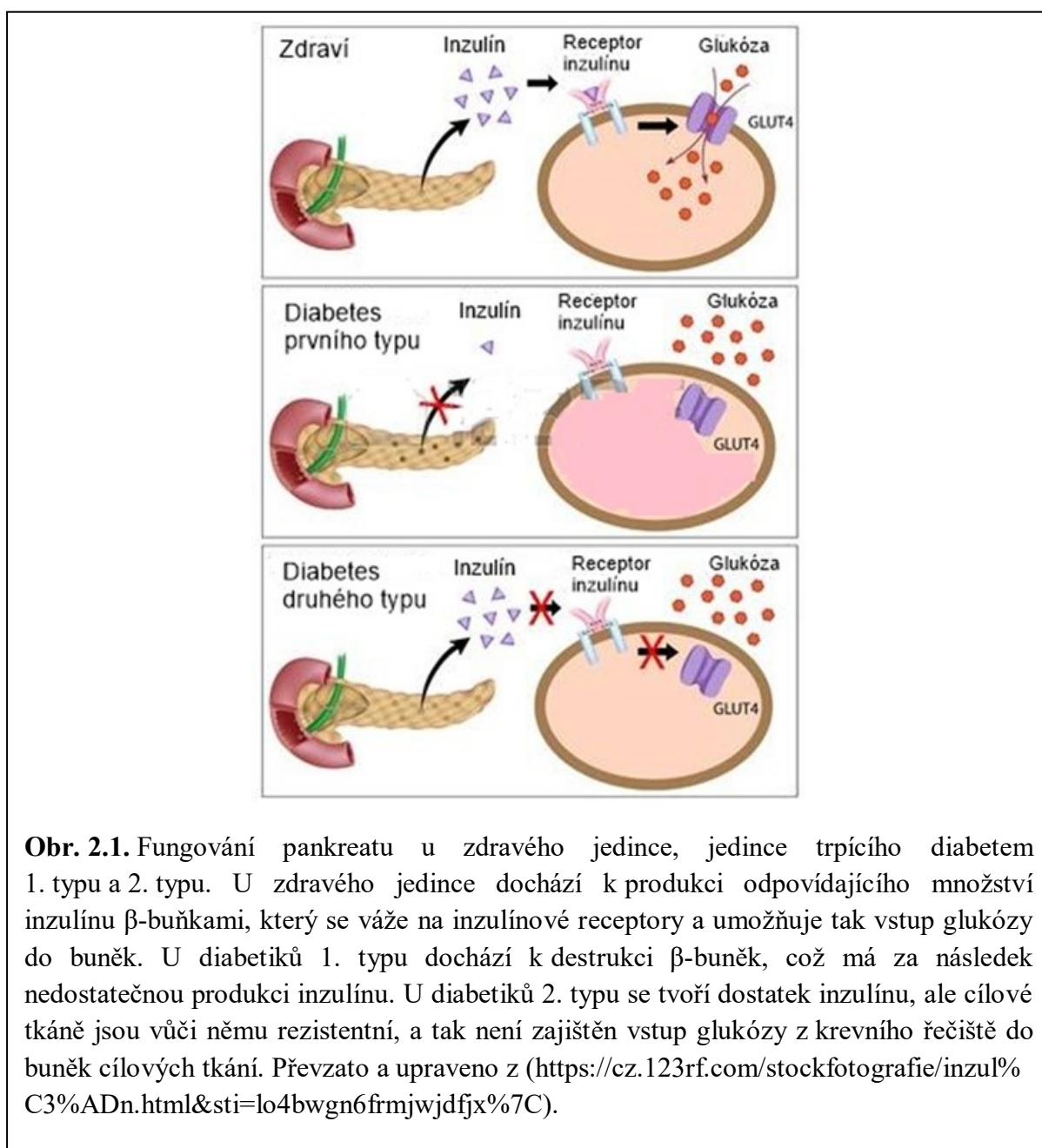
Diabetes mellitus je jedním z nejrozšířenějších civilizačních onemocnění. Existuje několik typů diabetu, které se od sebe odlišují svou etiologií. Diabetes se vyznačuje chronickou hyperglykémií, která je zapříčiněna poškozením produkce inzulínu, působení inzulínu, případně kombinací obojího. Inzulín je produkován β -buňkami, které jsou jedním z pěti typů buněk endokrinního pankreatu. Mezi ostatní typy buněk endokrinního pankreatu patří glukagon produkující α -buňky, somatostatin produkující δ -buňky, ghrelin produkující ϵ -buňky a PP-buňky produkující pankreatický polypeptid. Vývoj pankreatu probíhá během stádia primární, sekundární a terciální přeměny. Pro správnou organogenezi, diferenciaci a zrání pankreatu je klíčová správná exprese transkripčních faktorů. Mezi jedny z nejdůležitějších transkripčních faktorů patří NEUROD1 a ISL1. NEUROD1 je klíčový pro diferenciaci a reguluje expresi inzulínu a glukagonu. Naproti tomu ISL1 reguluje expresi všech hormonů produkovaných buňkami endokrinního pankreatu a je potřebný pro proliferaci a samotné přežívání buněk endokrinního pankreatu.

V této práci byl studován myší model s tkáňově specifickou delecí *Neurod1* genu, ve kterém se zaměřilo na morfologii a molekulární změny ve vyvíjejícím se pankreatu. Pro studium byl použit homozygotní mutant *Isl1-Cre^{+/+}Neurod1^{fl/fl}* (*Neurod1CKO*), kdy u *Isl1* pozitivních buněk byl pomocí Cre-loxP systému vystřižen *Neurod1* gen. Pro sledování morfologie pankreatu v embryonálním dni 17,5 (E17,5) a v postnatálním dni 0 (P0) byly použity imunohistochemické analýzy, pomocí kterých se porovnávala exokrinní tkáň s tkání endokrinní a buněčná proliferace buněk endokrinního pankreatu. V kombinaci imunohistochemie s metodou TUNEL pak byla studována apoptóza buněk endokrinního pankreatu. Pro detekci molekulárních změn byly použity geny, které se podílejí na vývoji a funkci pankreatu. Změny v expresi vybraných genů byly sledovány pomocí relativní kvantitativní polymerázové řetězové reakce v E14,5 a P1.

2. Přehled literatury

2.1. *Diabetes mellitus*

Metabolické onemocnění *diabetes mellitus* se vyznačuje chronickou hyperglykémií, která je způsobena poškozením produkce inzulínu, působení inzulínu, nebo kombinací obojího (Kharroubi & Darwish 2015)*. Inzulín je klíčový anabolický hormon, zajišťující vstup glukózy do buněk cílových tkání a jeho nedostatečné množství nebo nesprávné využití buňkami vede k rozvoji *diabetes mellitus*. Při jeho nesprávném fungování dochází k poruchám metabolismu sacharidů, proteinů a lipidů. Existuje několik typů diabetu, které je možno rozdělit na diabetes 1. typu, 2. typu, gestační diabetes a ostatní typy.



Obr. 2.1. Fungování pankreatu u zdravého jedince, jedince trpícího diabetem 1. typu a 2. typu. U zdravého jedince dochází k produkci odpovídajícího množství inzulínu β -buňkami, který se váže na inzulínové receptory a umožňuje tak vstup glukózy do buněk. U diabetiků 1. typu dochází k destrukci β -buněk, což má za následek nedostatečnou produkci inzulínu. U diabetiků 2. typu se tvoří dostatek inzulínu, ale cílové tkáně jsou vůči němu rezistentní, a tak není zajištěn vstup glukózy z krevního řečiště do buněk cílových tkání. Převzato a upraveno z (<https://cz.123rf.com/stockfotografie/inzul%C3%ADn.html&sti=lo4bwgn6frmjwjdfjx%7C>).

2.1.1. Diabetes 1. typu

Diabetes 1. typu je autoimunitní onemocnění, které je zapříčiněné destrukcí pankreatických β -buněk (viz Obr. 2.1.) (Kharroubi & Darwish 2015)*. Toto onemocnění se nejčastěji objevuje u dětí a dospívajících. Onemocnění má často rychlý nástup, mezi symptomy patří například polydipsie, polyurie, únava, rychlý úbytek tělesné váhy, pomalé hojení ran, infekce, rozmazané vidění a diabetická ketoacidóza. Pacienti s diabetem 1. typu jsou závislí na dodávání inzulínu a mohou být také náchylní k dalším autoimunitním onemocněním.

2.1.2. Diabetes 2. typu

Diabetes 2. typu je nejčastější typ diabetu vyskytující se u dospělých lidí, počet lidí trpících tímto typem diabetu přesahuje půl miliardy (Kharroubi & Darwish 2015)*. Zvýšený výskyt tohoto onemocnění i u mladých lidí je způsoben především nezdravým životním stylem. Typickým příznakem rozvoje tohoto typu diabetu je inzulínová rezistence. Inzulínová rezistence se projevuje zvýšenou potřebou inzulínu v cílových tkáních. Zvýšená produkce inzulínu vede k poruchám ve fungování inzulín produkujících β -buňkách (viz Obr. 2.1.). Na rozdíl od diabetu 1. typu však většina pacientů není závislá na exogenním dodávání inzulínu, protože sekrece inzulínu u nich pokračuje. Postupem času se inzulínová sekrece snižuje v důsledku postupující destrukce a dysfunkce β -buněk. To může vést až k závislosti pacientů na dodávání inzulínu. Mezi komplikace diabetu 2. typu patří například nefropatie, hypertenze, dyslipidemie a onemocnění jater. Zpočátku onemocnění se vyskytují pouze mírné příznaky, proto často dochází k určení diagnózy až se zpožděním. To může vést k dlouhotrvajícím komplikacím. Projevy onemocnění u 1. a 2. typu diabetu nejsou striktní a mohou se prolínat.

2.1.3. Ostatní typy diabetu

Hlavní typ diabetu patřící do této skupiny je monogenetický diabetes (Kharroubi & Darwish 2015)*. Monogenetický diabetes je charakterizován genetickými defekty v jednotlivých genech β -buněk. Konkrétních genů, které se podílejí na rozvoji monogenetického diabetu, bylo identifikováno velké množství. Genetické defekty v β -buňkách vedou k poškození jejich funkčnosti nebo ke snížení jejich počtu. Podle věku nástupu onemocnění se monogenetický diabetes rozděluje na neonatální diabetes a na diabetes typu MODY (maturity onset diabetes of the young). MODY je dědičná forma diabetu, která je obvykle diagnostikována před 25 rokem pacienta. Někdy je MODY špatně diagnostikován

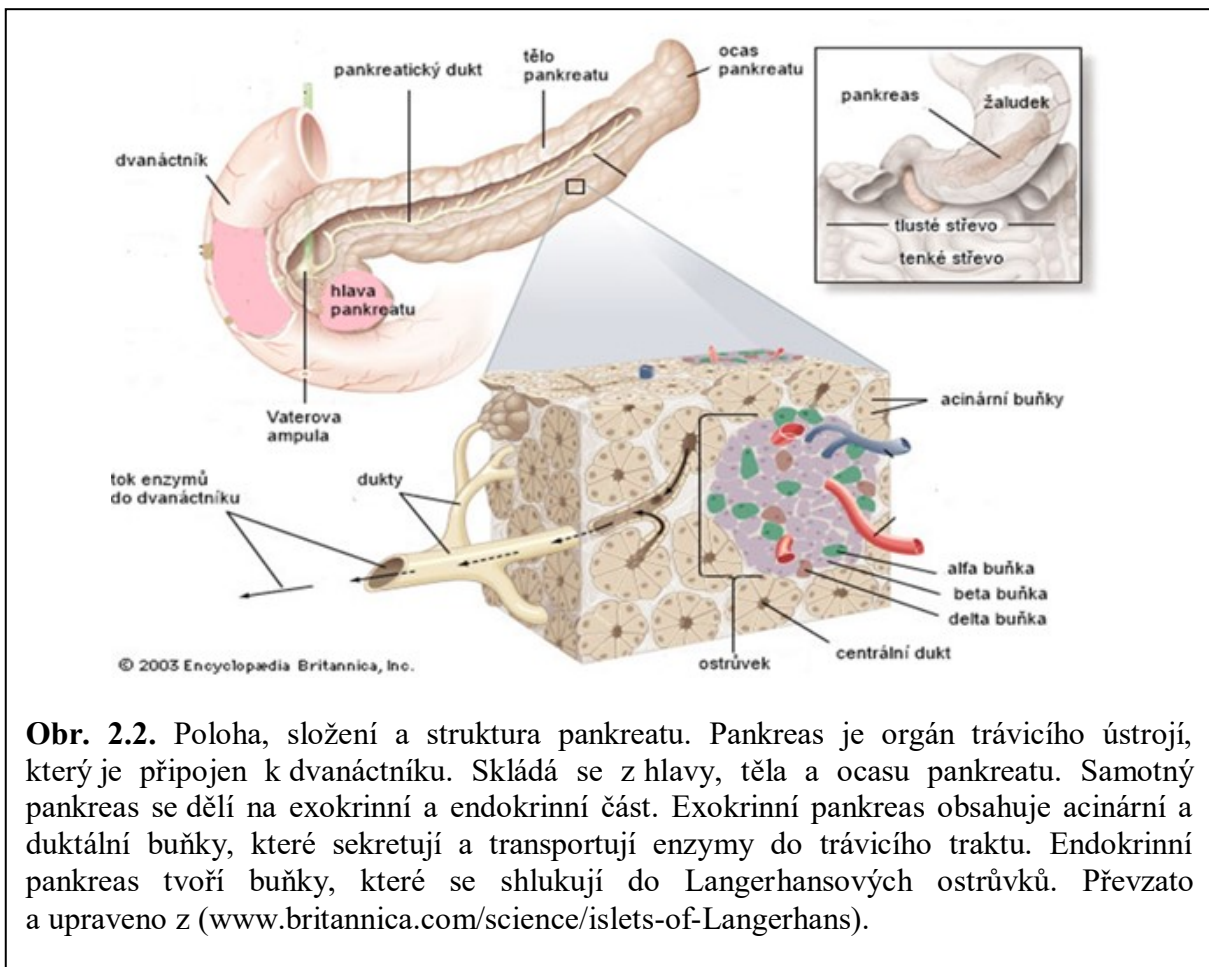
jako diabetes 1. nebo 2. typu. Nejčastější mutace jsou způsobené v HNF1 homeoboxovém genu, dále pak v genu pro glukokinázu a hepatocytový jaderný faktor 4 alfa. Méně časté jsou pak varianty MODY způsobené mutacemi v genech pro HNF1 homeoboxový gen B, neurogenní diferenační faktor 1 (*Neurod1*), pankreatický duodenální homeoboxový gen 1 (*Pdx1*) a inzulín (Shields et al 2010).

2.1.4. Gestační diabetes

Diagnostika diabetu během těhotenství, ať už v podobě gestačního diabetu nebo diabetu 2. typu, zvyšuje riziko komplikací pro matku i plod (Kharroubi & Darwish 2015)*. Mezi rizikové faktory pro rozvoj gestačního diabetu patří obezita, diabetes v rodině, vyšší věk matky, syndrom polycystických vaječnicků a vystavení toxickým faktorům. Hyperglykémie v těhotenství zvyšuje riziko vysoké porodní hmotnosti novorozence, předčasného porodu, císařského řezu a rozvoji preeklampsie.

2.2. Pankreas

Pankreas je orgánem trávicího ústrojí nacházející se v dutině břišní (Slack 1995)*. Studium pankreatu je důležité, protože podléhá závažným chorobám, a to jak již dříve zmíněnému *Diabetu mellitu*, tak i rakovině pankreatu. Pankreas se skládá z několika částí, a to z hlavy, těla a ocasu. Hlava pankreatu je spojena s duodenem (dvanáctníkem, viz Obr. 2.2.). Jednotlivé části pankreatu jsou u člověka lépe rozpoznatelné ve srovnání s hlodavci, kteří se využívají jako nejčastější modelový organismus. Pankreas se skládá ze dvou typů tkání, exokrinní a endokrinní. Buňky exokrinního pankreatu sekretují trávicí enzymy do duodena a tenkého střeva. Trávicí enzymy zahrnují proteázy, amylázy, lipázy a nukleázy. Tyto enzymy jsou většinou sekretovány v podobě inaktivních prekurzorů a aktivují se až po vstupu do trávicího traktu, konkrétně do duodena. Naproti tomu buňky endokrinního pankreatu sekretují hormony do krevního řečiště. Endokrinní část je tvořena kompaktními klastry buněk zakotvenými do části exokrinní. Tyto klastry se nazývají Langerhansovy ostrůvky (viz Obr. 2.2.).



Obr. 2.2. Poloha, složení a struktura pankreatu. Pankreas je orgán trávicího ústrojí, který je připojen k dvanáctníku. Skládá se z hlavy, těla a ocasu pankreatu. Samotný pankreas se dělí na exokrinní a endokrinní část. Exokrinní pankreas obsahuje acinární a duktální buňky, které sekretují a transportují enzymy do trávicího traktu. Endokrinní pankreas tvoří buňky, které se shlukují do Langerhansových ostrůvků. Převzato a upraveno z (www.britannica.com/science/islets-of-Langerhans).

2.2.1. Langerhansovy ostrůvky

Langerhansovy ostrůvky jsou tvořeny pěti typy buněk: α -, β -, δ -, ϵ - a PP-buňkami produkující glukagon, inzulín, somatostatin, ghrelin a pankreatický polypeptid (Prado et al 2004). U lidí a myší je podoba ostrůvků rozdílná. U lidského pankreatu jsou endokrinní buňky rozptýleny po ostrůvcích. Naproti tomu u myší jsou β -buňky seskupeny v centru ostrůvků a ostatní typy buněk jsou lokalizovány na okrajích (Brissova et al 2005).

2.2.2. Modelový organismus

Pro studium vývoje a funkce endokrinních buněk pankreatu se využívají zvířecí modely, nejčastěji myší modely. Myši jsou ideální pro výzkum molekulárních a morfologických mechanismů, z důvodu relativně snadné genetické modifikovatelnosti. Doba vývoje od početí do narození je u myší oproti člověku výrazně kratší, zhruba 3 týdny. Metoda „vaginální zátky“ se používá pro určení březosti u myší. Tato zátka se objevuje u samic po páření. Vaginální zátka je tvořena sekretem pohlavních žláz samce a zabraňuje odtoku spermatu z vagíny. Poledne nalezení vaginální zátky se označuje jako embryonální den 0,5 (E0,5) (Wessels & Sedmera 2003)*. Po narození se dny označují jako postnatální (P).

2.3. Buňky endokrinního pankreatu

2.3.1. α -buňky

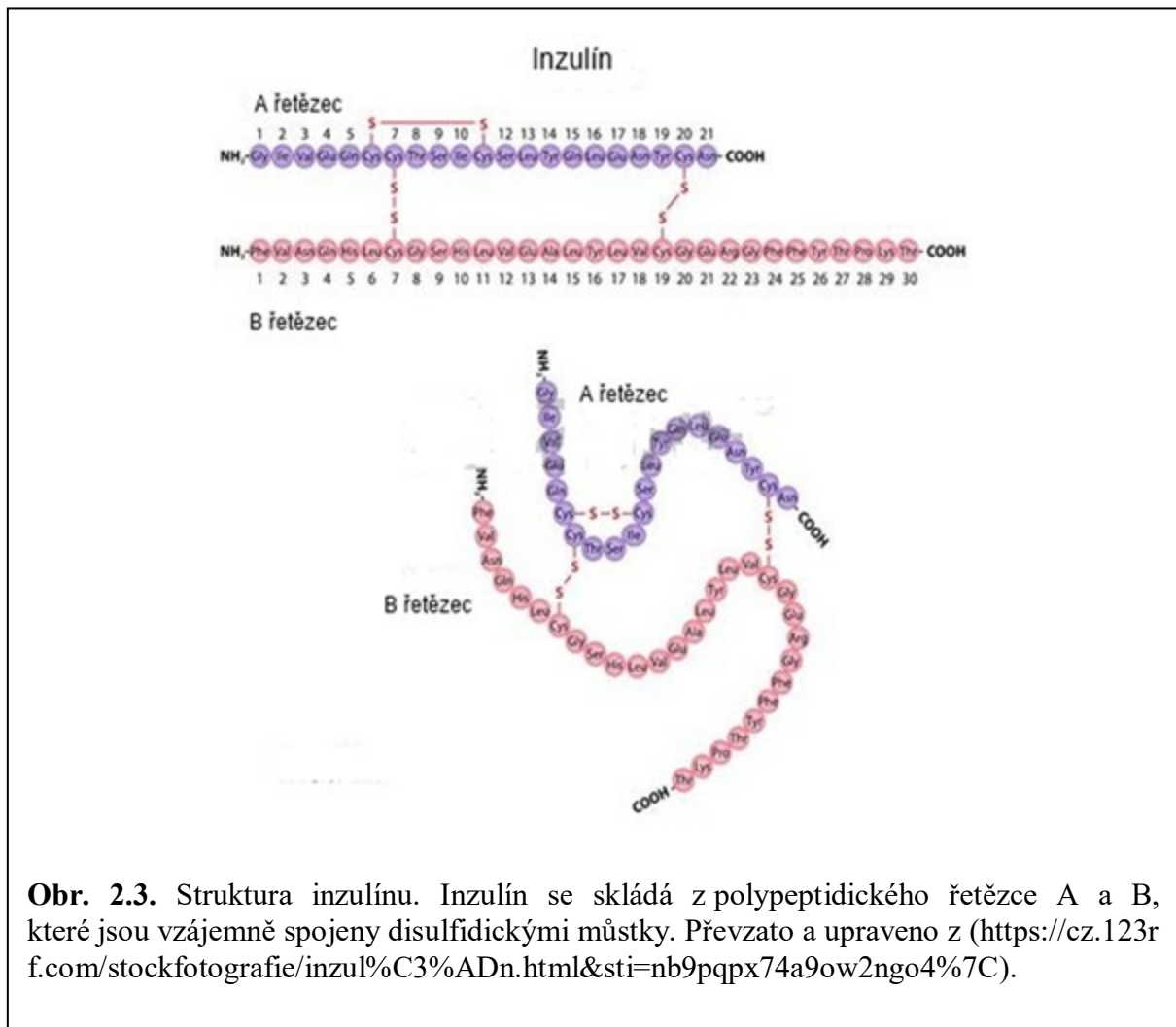
Pankreatické α -buňky produkují glukagon. Glukagon je peptidický hormon, který je jako první exprimován ve vyvíjejícím se pankreatu, u myši v E9,5 (Prasadan et al 2002). Zvýšením glykogenolýzy glukagon aktivuje produkci glukózy z jater (Ikeda et al 1989). Proces glykogenolýzy je aktivován při poklesu hladiny glukózy v krvi, takzvané hypoglykémii, která je indukována funkcí inzulínu. Glukagon s inzulínem fungují jako antagonisté. Při diabetu dochází k poškození fungování α -buněk (Freychet et al 1988). Glukagon vzniká z prekursoru proglukagonu, ze kterého je syntetizován také hlavní proglukagonový fragment, který obsahuje dvě glukagonu podobné sekvence (Patzelt & Schiltz 1984).

2.3.2. β -buňky

Inzulín produkující β -buňky jsou v myším pankreatu detekovatelné v E11. Diferenciace inzulín produkujících buněk probíhá ve dvou fázích. První fáze začíná mezi E9,5 – 11,5, během níž je exprese inzulínového genu ovlivňována přítomností glukagonu. Druhá vlna diferenciace inzulínových buněk, během níž se již objevují plně diferenciované β -buňky, probíhá okolo E15 (Prasadan et al 2002). Hormon inzulín je důležitý pro zachování glukózové homeostáze. Jeho funkcí je zajištění vstupu glukózy do buněk a tím její využití tkáněmi (Fu et al 2013)*. Inzulínové receptory jsou exprimovány skoro ve všech tkáních. Biologické účinky inzulínu jsou kromě stimulace glukózového transportu také aktivace genové transkripce a stimulace růstu buněk (Bruning et al 1998). U myši existují dva geny kódující inzulín, inzulín 1 a inzulín 2 (Cordell et al 1979). U lidí je pouze jeden gen pro inzulín (Harper et al 1981).

Prvotní translační produkt inzulínu je preproinzulín. Jeho sestřihem vzniká proinzulín. Preproinzulín se skládá ze 110 aminokyselin a je tvořen z několika strukturních prvků, mezi které patří signální peptid, A řetězec, C-peptid a B řetězec. N-terminální signální peptid skládající se z 23 aminokyselin je signální peptidázou odštěpován za vzniku proinzulínu, který je prekurzorem inzulínu (Chan et al 1976). Proinzulín se skládá z A a B řetězce, které jsou spojeny C-peptidem (Nolan et al 1971). V drsném endoplazmatickém retikulu dochází k tvorbě proinzulínu odštěpením signálního peptidu z preproinzulínu a tvorbou tří disulfidových vazeb. Vzniklý proinzulín je transportován z endoplazmatického retikula

do Golgiho aparátu, kde dochází k jeho štěpení na inzulín (viz Obr. 2.3.) a C-peptid (Fu et al 2013)*.

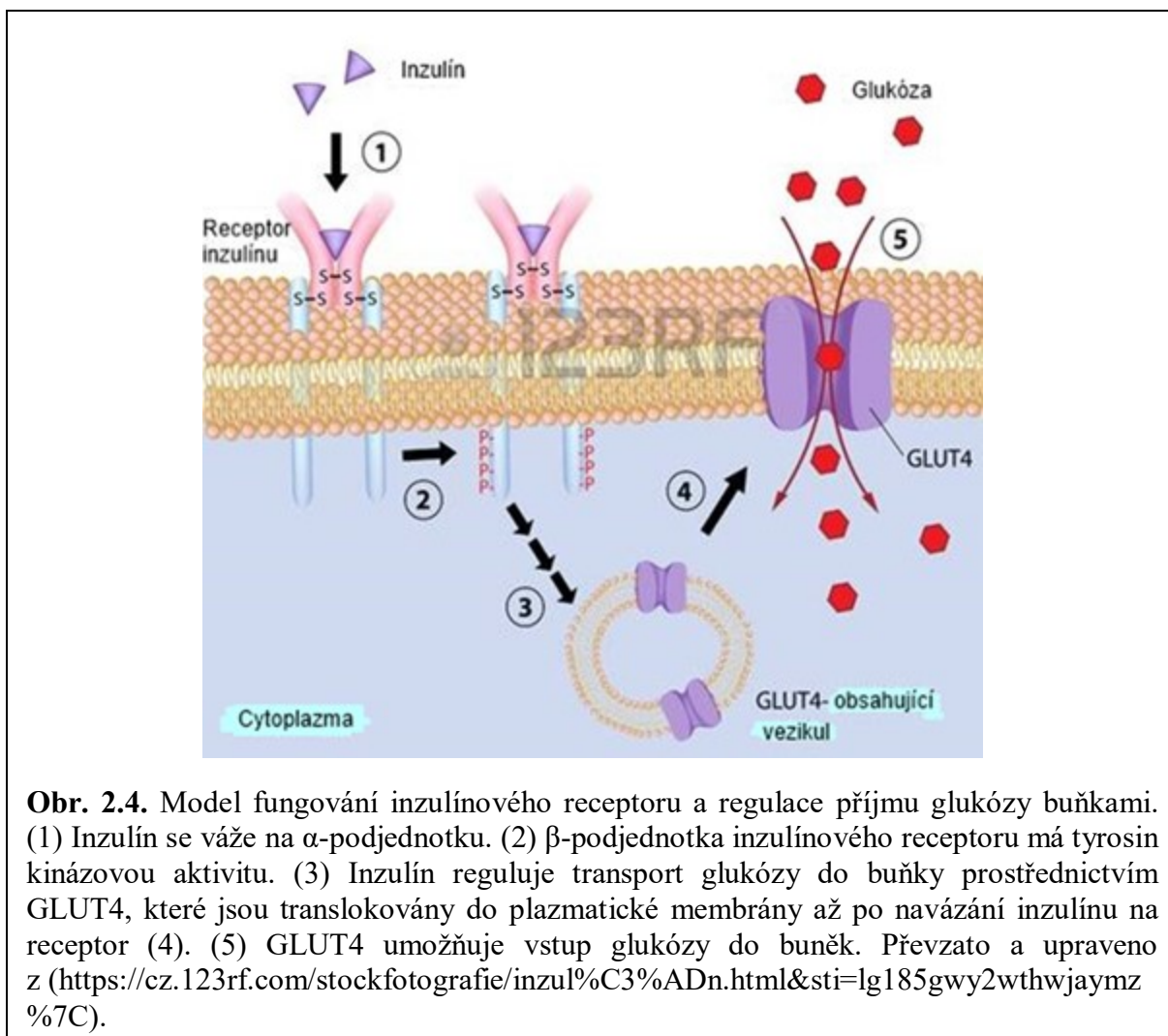


Obr. 2.3. Struktura inzulínu. Inzulín se skládá z polypeptidického řetězce A a B, které jsou vzájemně spojeny disulfidickými můstky. Převzato a upraveno z (<https://cz.123rf.com/stockfotografie/inzul%C3%ADn.html&sti=nb9pqp74a9ow2ngo4%7C>).

β -buňky reagují na změny koncentrace glukózy v plazmě a podle toho uvolňují odpovídající množství inzulínu. Glukóza se dostává do β -buněk glukózovým transportérem 2, který je jediným glukózovým transportérem exprimovaným v β -buněkách (Fu et al 2013)*. Existují i další způsoby sekrece inzulínu. Určité kombinace aminokyselin ovlivňují spuštění inzulínové sekrece nebo zvyšují glukózou stimulovanou inzulínovou sekreci. Stejně jako aminokyseliny, také mastné kyseliny zvyšují inzulínovou sekreci. Pomocí receptoru pro volné mastné kyseliny se dostávají do β -buněk. Uvnitř β -buněk dochází k sekreci inzulínu prostřednictvím lipidových signálních molekul, které jsou syntetizovány z volných mastných kyselin.

Inzulínový receptor se skládá ze dvou extracelulárních podjednotek α a dvou transmembránových podjednotek β . Jedná se tedy o heterotetramer (Chang et al 2004)*.

Na podjednotku α se váže inzulín, podjednotka β má pak tyrosin kinázovou aktivitu. Zvýšení ukládání energie či naopak její využití inzulín zprostředkovává pomocí regulovaného transportu glukózy do buňky prostřednictvím glukózového transportéru 4 (GLUT4). V nepřítomnosti inzulínu je GLUT4 recyklován mezi vezikulárními částmi uvnitř buňky a plazmatickou membránou. K exocytóze transportérů GLUT4 do plazmatické membrány dochází až po navázání inzulínu na inzulinový receptor (viz Obr. 2.4.). Zvýšení příjmu glukózy do buněk inzulín umožňuje navýšením počtu GLUT4 v plazmatické membráně.



2.3.3. δ -buňky

V myším pankreatu jsou δ -buňky, které produkují hormon somatostatin, detekovány od E13,5 (Herrera et al 1991). Sekrece somatostatinu z δ -buněk je stimulována ionty vápníku. Mimo vápník je sekrece somatostatinu indukovaná například acetylcholinem, glukózou, argininem nebo isoproterenolem, ovšem s nižší účinností oproti vápníku. Působení vápníku je

ovlivňováno glukózou, kdy při vyšších koncentracích glukózy dochází ke zvýšené stimulaci uvolňování somatostatinu (Hermansen et al 1979). Somatostatin inhibuje sekreci žaludeční kyseliny (Kondo et al 1993). V endokrinní části pankreatu pak potlačuje uvolňování inzulínu, glukagonu a pankreatického polypeptidu (Nelson-Piercy et al 1994).

2.3.4. ϵ -buňky

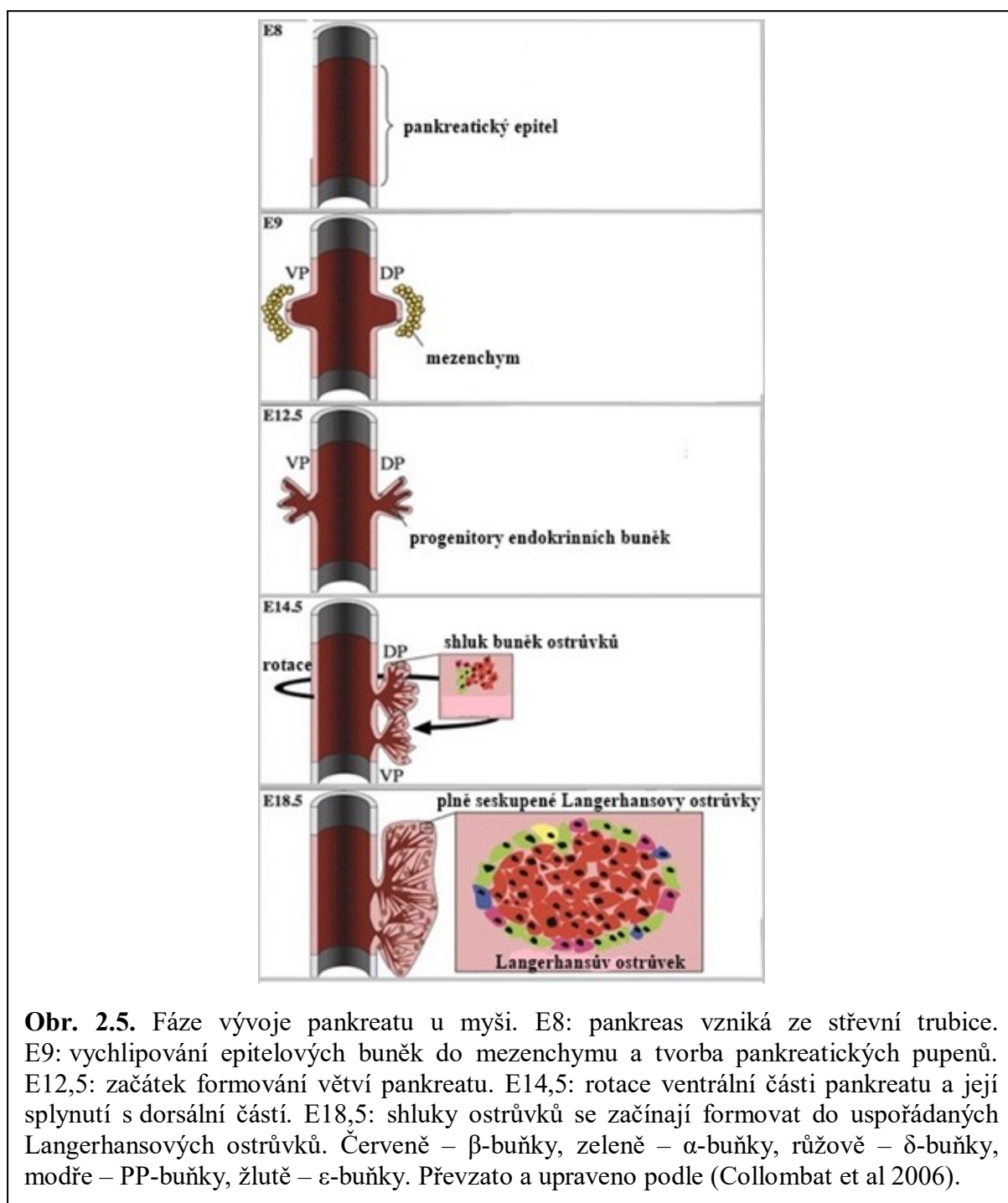
ϵ -buňky exprimují hormon ghrelin, který je v myším pankreatu detekovatelný již v E10,5. Maximální hodnoty exprese ghreluinu jsou detekovány během embryonálního vývoje v E15,5. Ghrelin je žaludeční peptid důležitý pro zvyšování sekrece růstového hormonu, regulaci chuti k jídlu a energetické rovnováhy. V pankreatu ghrelin není koexprimován s inzulínem, somatostatinem a pankreatickým polypeptidem. Během neonatálního období však třetina ghrelinových buněk exprimuje také glukagon. Časně zablokování diference β -buněk vede k nárůstu počtu ϵ -buněk (Prado et al 2004).

2.3.5. PP-buňky

PP-buňky produkující pankreatický polypeptid jsou detekovatelné v dorsální části pankreatu myši od E10,5. Ve ventrální části se objevují v E11,5. Na rozdíl od α -buněk jsou PP-buňky hojněji zastoupeny ve ventrálních duktech. V počátcích pankreatického vývoje se objevuje kolokalizace buněk obsahujících glukagon a pankreatický polypeptid (Herrera et al 1991). Mimo pankreas je pankreatický polypeptid produkován v menším množství napříč trávicím traktem, nejvíce je ho ve střevě. Z PP-buněk je pankreatický polypeptid uvolňován v závislosti na množství přijaté potravy a jeho zvýšená koncentrace vydrží až několik hodin po jídle (Adrian et al 1976). Pankreatický polypeptid je také zodpovědný za omezení příjmu potravy a pokles chuti k jídlu (Batterham et al 2003).

2.4. Vývoj pankreatu

Vývoj pankreatu je nejlépe prostudován na myším modelu, který jsem použila také pro svůj výzkum. Proces vývoje pankreatu u myši lze rozdělit na tři stádia, a to na primární, sekundární a terciální přeměnu, během nichž dochází k organogenezi, diferenciaci a zrání buněk. Jedná se o vysoce regulovaný a komplexní proces, který je řízen mnoha transkripčními faktory a signálními drahami. Pankreas, jeho ventrální i dorsální část, se vyvíjí z endodermy primitivní střevní trubice, posteriorně od vznikajícího žaludku (Spooner et al 1970).



Obr. 2.5. Fáze vývoje pankreatu u myši. E8: pankreas vzniká ze střevní trubice. E9: vychlipování epitelových buněk do mezenchymu a tvorba pankreatických pupenů. E12,5: začátek formování větví pankreatu. E14,5: rotace ventrální části pankreatu a její splynutí s dorsální částí. E18,5: shluky ostrůvků se začínají formovat do uspořádaných Langerhansových ostrůvků. Červeně – β -buňky, zeleně – α -buňky, růžově – δ -buňky, modře – PP-buňky, žlutě – ϵ -buňky. Převzato a upraveno podle (Collombat et al 2006).

2.4.1. Primární přeměna

Primární přeměna je stádium vývoje pankreatu od E8,5 – E12,5. Během primární přeměny se objevují první známky organogeneze. Epitelové buňky se zhušťují a vychlípují do okolního mezenchymu. Tímto procesem dochází k tvorbě dvou rozvrstvených epitelů, které obklopují primární centrální lumen (Villasenor et al 2010). Z epitelů se pak vytvářejí pankreatické pupeny, které jsou počátkem vývoje dorsální a ventrální části pankreatu (viz Obr. 2.5.) (Pictet et al 1972). První hormon exprimovaný při vývoji pankreatu je glukagon. Exprese glukagonu je započata v E9,5. K první vlně diferenciaci buněk produkujících inzulín dochází přibližně v E11 a je pravděpodobně ovlivňována glukagonem. Druhá vlna diferenciaci inzulín produkujících β -buněk nastává až během sekundární přeměny (Prasadan et al 2002). Tyto buňky, které produkují glukagon a inzulín v časném vývoji pankreatu, procházejí dalším vývojem a nejedná se tedy o prekurzory dospělých α - a β -buněk. α - a β -buněčné linie vznikají pravděpodobně ze společných prekurzorů, ale nezávisle na sobě (Herrera 2000). Na konci primární přeměny v E12,5 dochází k počátku formování větví pankreatu a k rozdělování epitelu do okrajových a kmenových domén pankreatu (viz Obr. 2.5.). Prekurzory endokrinních buněk se vyskytují pouze v kmenových doménách, zatímco multipotentní prekurzorové buňky převládají spíše v těch okrajových (Zhou et al 2007).

2.4.2. Sekundární přeměna

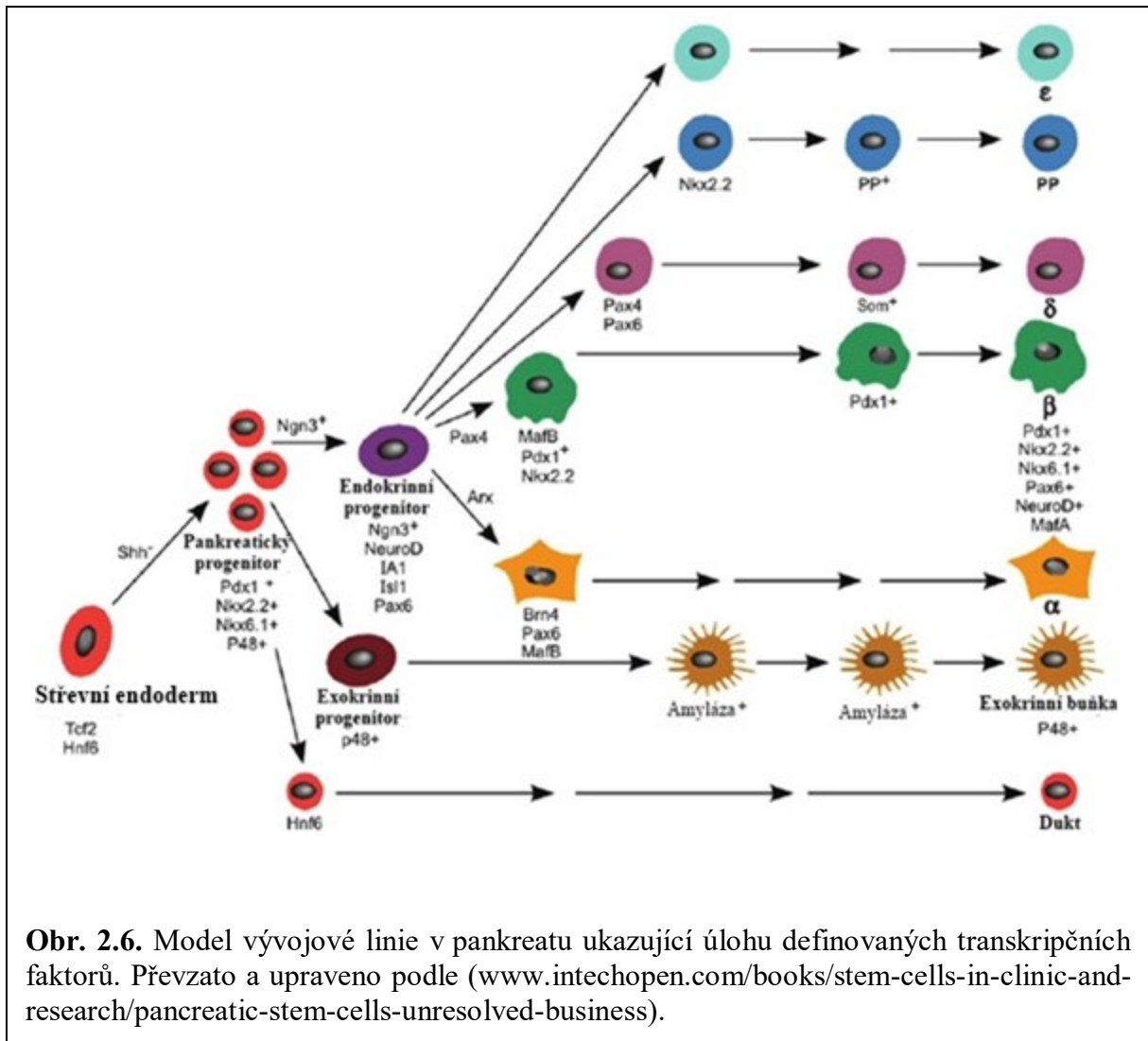
Stádium sekundární přeměny je doba mezi E12,5 – E16,5. Začíná rozdělováním dorsálního pupenu pankreatu na laloky a jeho rozpínáním kolem stěny žaludku. Dále dochází k větvení a k vytváření rozvětvené struktury z epitelových buněk (viz Obr. 2.5.). Z těchto epitelových buněk odvozených od endodermy vznikají endokrinní a duktální buňky (Villasenor et al 2008). Buňky vyskytující se v kmeni pankreatu rychle expandují a diferencují. Jedná se o buňky endokrinních prekurzorů. Uplatňuje se zde proces epiteliálně-mezenchymální přeměny (EMT), pomocí něhož dochází k oddělování jednotlivých vrstev endokrinních buněk. EMT je vývojový mechanismus, který umožňuje migraci buněk, morfogenezi tkání a přestavbu orgánů. EMT se uplatňuje během gastrulace, organogeneze a migrace buněk z neurální lišty (Rukstalis & Habener 2007). Z multipotentních prekurzorových buněk, umístěných na okrajích větvího se pankreatu, jsou od E13 produkovány pouze exokrinní buňky (Zhou et al 2007). Z kmenové části epitelu pankreatu vznikají plně diferenciované α - a β -buňky, a to konkrétně mezi E13 – E15 (Pictet et al 1972).

2.4.3. Terciální přeměna

Terciální přeměna mapuje stádium vývoje pankreatu od E16,5 – časně postnatální období. Diferencované buňky pankreatu během této fáze migrují a dále zrají (Pictet et al 1972). Prekurzory ostrůvků se shlukují a v E18,5 se tyto shluky začínají utvářet do podoby zralých Langerhansových ostrůvků (viz Obr. 2.5.) (Herrera et al 1991).

2.5. Transkripční faktory

Expres transkripčních faktorů během vývoje pankreatu je klíčová pro správnou organogenezi, diferenciaci a zrání pankreatu. Schéma transkripčních faktorů, které se účastní diferenciace jednotlivých populací buněk pankreatu, je na Obr. 2.6.



Obr. 2.6. Model vývojové linie v pankreatu ukazující úlohu definovaných transkripčních faktorů. Převzato a upraveno podle (www.intechopen.com/books/stem-cells-in-clinic-and-research/pancreatic-stem-cells-unresolved-business).

2.5.1. PDX1

Expres PDX1, která se poprvé objevuje v E8,5, je pouze v oblasti střevního endodermu, ze kterého se později vychlipuje dorsální a ventrální část pankreatu (Ohlsson et al 1993). Z prekursorových buněk exprimujících PDX1 se vyvíjí všechny buňky pankreatu (duktální, exokrinní a endokrinní). Prekuzory exokrinního a endokrinního pankreatu exprimují PDX1 po celé období embryogeneze. Naproti tomu prekuzory duktálních buněk exprimují PDX1 pouze od E9,5 do E12,5 (Gu et al 2002). U dospělých jedinců je expres

PDX1 pouze v β -buňkách, ve kterých se PDX1 podílí na regulaci exprese inzulinu vazbou do inzulinového promotoru. Inzulín produkující buňky se však objevují již okolo E12 v dorsálním pupenu, přibližně o den později ve ventrálním pupenu (Ohlsson et al 1993). V embryích, u kterých je *Pdx1* gen odstraněn, dochází k vytvoření pouze malého dorsálního pupenu, ale další jeho růst a morfogeneze je potlačena. Příčina nesprávného vývoje pankreatu u mutantních jedinců je v poškozeném epitelu. Glukagon a inzulin produkující buňky se u těchto mutantů vyskytují na počátku pankreatického vývoje, ale jejich množství je omezené. Exprese PDX1 je však potřebná k jejich propagaci a přežití (Ahlgren et al 1996).

2.5.2. Pankreatický transkripční faktor 1 (PTF1)

PTF1 je další důležitý transkripční faktor pro vývoj pankreatu. Jeho exprese začíná mezi E10 – E10,5 v buňkách pankreatických pupenů, které exprimují PDX1. Společná exprese PDX1 a PTF1 je důležitá pro správnou specifikaci, proliferaci a diferenciaci exokrinního pankreatu. Při snížené expresi PTF1 dochází ke snížení exprese genů potřebných pro proliferaci a diferenciaci buněk exokrinního pankreatu (Kawaguchi et al 2002, Krapp et al 1996). PTF1 je nejdůležitějším známým faktorem výhradně pro ontogenezi pankreatické exokrinní tkáně. Inaktivací *Ptfla* genu dochází ke ztrátě exokrinní části pankreatu a k časnému postnatálnímu úmrtí. Buňky endokrinního pankreatu přežívají v mezenteriu do E16. V konečné fázi embryonálního vývoje dochází k migraci těchto buněk do sleziny, kde ve funkčním stavu přečkávají až do postnatální smrti. Z toho vyplývá, že zformování pankreatické exokrinní části je důležité pro správné prostorové uspořádání i endokrinní části (Krapp et al 1998).

2.5.3. Neurogenin3

Buňky exprimující Neurogenin 3 (NEUROG3) během vývoje pankreatu jsou prekurzory všech typů buněk endokrinní tkáně pankreatu. Také v dospělém pankreatu byly detekovány v Langerhansenových ostrůvcích buňky exprimující NEUROG3. Jedno z možných vysvětlení je, že buňky s NEUROG3 expresí přežívají, jako progenitory endokrinní tkáně v ostrůvcích, i u dospělého pankreatu. Dalším možným vysvětlením je jejich diferenciace ze zralých buněk pankreatických kanálků a jejich následná migrace do již utvořených ostrůvků (Gu et al 2002). Buňky exprimující NEUROG3 jsou prvně detekovatelné v pankreatu v E9,5, jejich počet se navyšuje do E15,5 a poté klesá. Mutantní jedinci s deletovaným *Neurog3* genem v pankreatu nemají vytvořené Langerhansovy ostrůvky a detekovatelné buňky endokrinního pankreatu produkující hormony (Gradwohl et al 2000).

Jedinci s touto mutací umírají dva až tři dny po narození. U mutantů s delecí *Neurog3* nedochází k expresi dalších transkripčních faktorů jako je LIM homeodoménový faktor ISLET1 (ISL1), NEUROD1 a párová doména transkripčních faktorů 4 a 6 (PAX6), které jsou všechny důležité pro správný vývoj endokrinní části pankreatu.

2.5.4. NEUROD1

NEUROD1 je transkripční faktor podílející se na diferenciaci neuronů a zároveň je i klíčovým regulátorem transkripce inzulinového genu v β -buňkách (Boutin et al 2010, Naya et al 1995). NEUROD1 je nepostradatelný pro správný vývoj a funkci endokrinního pankreatu, tedy pro samotné přežití endokrinních buněk a udržení glukózové homeostáze. V epitelu pankreatu se exprese NEUROD1 objevuje v E9,5. V E14,5 se buňky s expresí NEUROD1 vyskytují v duktálním epitelu dorsálních a ventrálních laloků pankreatu. Od E17,5 je exprese NEUROD1 omezena na buňky Langerhansových ostrůvků (Naya et al 1997). V dospělém pankreatu je NEUROD1 exprimován převážně v β -buňkách. Exprese NEUROD1 není úplně potlačena ani v glukagon produkujících α -buňkách. Bylo prokázáno, že NEUROD1 aktivuje kromě inzulinového také glukagonový promotor (Dumonteil et al 1998). Na myších s globální delecí *Neurod1* genu byla testována úloha NEUROD1. Pankreas se u mutantních jedinců vyvíjí bez změny fenotypu až do E17,5, kdy je patrné selhání tvorby Langerhansových ostrůvků a zvýšení buněčné smrti ostrůvkových buněk. Masivní apoptóza je patrná především u β -buněk. Tito mutantní jedinci s delecí *Neurod1* umírají v rozmezí třetího až pátého postnatálního dne v důsledku hyperglykémie (Naya et al 1997). V odlišné studii u mutantního kmene myší se stejnou delecí *Neurod1* avšak na rozdílném genetickém pozadí docházelo k nižší míře úmrtnosti po narození. U těchto jedinců přežilo 40 % mutantů, kteří měli v P4 snížený počet β -buněk. V rozmezí mezi P4 až jednoho měsíce se počet β -buněk začal postupně navyšovat z důvodu jejich neogeneze. Mutantní jedinci v jednom měsíci nevykazovali znaky diabetu a stali se normoglykemičtí. Po dvou měsících dosáhla hodnota inzulinu 50% hodnoty kontrolních myší. Immunohistologické analýzy ukázaly shluky buněk obsahující β -buňky, které neodpovídaly svou strukturou zralým Langerhansovým ostrůvkům. Tyto výsledky opět přinášejí potvrzení důležitosti NEUROD1 ve správné morfogenezi Langerhansových ostrůvků. Výsledky této studie také ukázaly, že postnatálně může dojít k navýšení počtu β -buněk diferenciací přímo z epitelu pankreatických duktů nebo proliferací již existujících β -buněk v endokrinním pankreatu (Huang et al 2002). Spouštěcí mechanismus k této obnově či navýšení počtu β -buněk stále není objasněn.

2.5.5. ISL1

ISL1 je exprimován během vývoje pankreatu a v dospělých buňkách Langerhansových ostrůvků. Kromě pankreatu je ISL1 v průběhu embryonálního vývoje exprimován také v nervovém systému a srdci (Karlsson et al 1990, Thor et al 1991, Zhuang et al 2013). ISL1 pozitivní buňky jsou poprvé detekovatelné v epitelu dorsálního pankreatu a v mezenchymu obklopujícím střevní epitel v E9. Od E9,5 je ISL1 exprimován v mezenchymálních buňkách epitelu dorsálního pankreatu a o 12 až 24 hod později ve ventrálním pankreatickém epitelu (Ahlgren et al 1997). U myšího embrya s globálně deletovaným genem pro *Isl1* je vývoj zastaven po E9,5 z důvodu postižení vývoje srdce a celého kardiaskulárního systému. Studium důležitosti ISL1 v průběhu vývoje pankreatu bylo zkoumáno na myším modelu s tkáňově specifickou delecí genu *Isl1* v buňkách v pankreatickém epitelu pozitivních na PDX1 během sekundární přeměny, konkrétně v E13,5. (Du et al 2009) Mutanti vykazovali hyperglykémii a také se u nich projevila narušená glukózová tolerance poukazující na nesprávné fungování β -buněk. Změněna byla i velikost Langerhansových ostrůvky, kdy v P4 byly menší a také jich bylo méně v porovnání s kontrolními jedinci. U mutantních myši byla snížena exprese PAX6, která je spolu s ISL1 důležitá pro zachování endokrinních prekurzorů. ISL1 reguluje proliferaci a přežívání buněk endokrinního pankreatu i postnatálně. ISL1 kontroluje expresi všech hormonů endokrinních buněk pankreatu prostřednictvím vazby v promotorech genů kódující tyto hormony. Pro aktivaci transkripce inzulinového genu jak v β -buňkách, tak i v ostatních buňkách, je zapotřebí interakce a spolupráce ISL1 s NEUROD1 (Peng et al 2005, Zhang et al 2009). Role ISL1 ve vývoji endokrinní tkáně pankreatu zůstává stále nedostatečně objasněna.

2.5.6. PAX6

PAX6 hraje klíčovou roli ve funkci a diferenciaci α -buněk prostřednictvím kontroly transkripce klíčových genů (NEUROD1, MAF transkripční faktor B základního leucinového zipu (MafB)), které se podílejí na zpracování proglukagonu, transkripce glukagonu a diferenciaci α -buněk (Gosmain et al 2010). Exprese transkripčního faktoru PAX6 je poprvé detekována v E9,5 v dorsálním pupenu pankreatu. V průběhu vývoje pankreatu v E15,5 bylo detekováno velké množství buněk pozitivních na PAX6, nikoli však v souvislosti s exokrinním pankreatem. Bylo prokázáno, že PAX6 je během vývoje přítomen v buňkách endokrinního pankreatu (Sander et al 1997). U myších embryí s mutací *Pax6* genu (bodová mutace mající za následek nesprávný sestřih RNA) byl potvrzen snížený počet buněk endokrinního pankreatu. Také množství hormonů produkovaných endokrinními buňkami bylo

sníženo v porovnání s kontrolními jedinci (Sander et al 1997). Snížení počtu hormon produkujících buněk vede k jejich atypickému uspořádání v rámci Langerhansových ostrůvků. Mutantní jedinci byli diabetičtí. To ukazuje na klíčovou roli PAX6 v zachování správného fungování β -buněk a také jejich správného uspořádání v Langerhansových ostrůvcích (Ashery-Padan et al 2004). PAX6 není důležitý pouze pro β -buňky, protože buňky s expresí PAX6 se diferencují do zralých α -buněk (St-Onge et al 1997).

2.5.7. MAF transkripční faktor A základního leucinového zipu (MafA) a MafB

Transkripční faktory MafA a MafB patřící mezi rodinu Maf proteinů jsou exprimovány v buňkách endokrinního pankreatu. Během vývoje pankreatu je MafB exprimován v buňkách produkujících glukagon a v inzulín produkujících buňkách (Nishimura et al 2006). K expresi MafB dochází dříve než k expresi MafA. Inzulín pozitivní buňky exprimující MafA jsou detekovatelné od E13,5. Diferenciace β -buněk probíhá prostřednictvím přepnutí exprese MafB na MafA. V dospělém pankreatu je MafA exprimován pouze β -buňkami, zatímco exprese MafB je převážně omezena na α -buňky. Transkripční faktor MafA je důležitý pro regulaci přežití a funkčnosti dospělých β -buněk a MafB má stejnou úlohu u α -buněk v dospělém pankreatu.

3. Cíle práce

- Objasnění vlivu podmíněné delece NEUROD1 na vývoj a funkci endokrinní tkáně
- Popis fenotypu mutantní myši *Isl1-Cre^{+/-} Neurod1^{ff}*
- Morfologické posouzení embryonálního a postnatálního vývoje
- Zjištění změn exprese vybraných genů v pankreatu pomocí qPCR

4. Materiál a metody

4.1. Materiál

4.1.1. Modelový organismus

Experimentální práce se zvířaty proběhla v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb. ve znění jeho následných novel a vyhlášky č. 419/2012 Sb. Jako modelový organismus byla použita myš domácí (*Mus musculus*). Myši určené k experimentům byly umístěny v 12ti hodinových intervalech střídání světla a tmy při 23 °C a krmeny dle libosti. Veškeré experimenty byly provedeny na samcích a samicích se smíšeným genetickým pozadím. Hladiny glukózy v krvi byly zjištěny pomocí glukometru. Podmíněná delece *Neurod1* genu byla vytvořena pomocí Cre-loxP systému. Enzym Cre rekombináza vyštipuje fragment DNA ohraničený dvěma loxP rozpoznávacími sekvencemi (Sander & German 1997). *Isl1-Cre^{+/-}* myš (Yang et al 2006) a homozygotní floxovaná *Neurod1* myš (*Neurod1^{ff}*) (Goebbels et al 2005) byly zkríženy, aby se vytvořili heterozygoti (ht) *Isl1-Cre^{+/-} Neurod1^{ff}* a homozygoti *Isl1-Cre^{+/-} Neurod1^{ff}*, *Neurod1* podmíněný knock out (*Neurod1CKO*). Jedinci s genotypem *Neurod1^{ff}* nebo *Neurod1^{+ff}* nebyli ovlivněni vloženou loxP sekvencí a byly použity jako kontroly (*wt*).

4.1.2. Chemikálie

Agarosa, Sigma-Aldrich, USA

DAPI Fluoromount-G[®], SouthernBiotech, USA

Dihydrogenfosforečnan draselný, Penta, Česká republika

Dimehtylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich, USA

Disodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA), Sigma-Aldrich, USA

dNTP Mix (10mM), Fermentas, USA

Dodecylsulfát sodný (SDS), Sigma-Aldrich, USA

Ethidium bromid, Sigma-Aldrich, USA

Ethylalkohol, Penta, Česká republika

DNA standard - GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Thermo, USA

Glycerol, Amresco, USA

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, Penta, Česká republika

Chlorid draselný, Penta, Česká republika

Chlorid sodný, Penta, Česká republika

Izopropylalkohol, Penta, Česká republika

Kozí sérum, Jackson ImmunoResearch, USA

Kyselina boritá (H₃BO₃), Sigma-Aldrich, USA

PAP pen, Sigma-Aldrich, USA

Paraformaldehyd (PFA), Sigma-Aldrich, USA

Tris, Sigma-Aldrich, USA

Trizol Reagent, Invitrogen, USA

Tween20, Amresco, USA

Voda bez DNAs a RNAs, Sigma-Aldrich, USA

4.1.3. Enzymy

Proteináza K (20 mg/ml), Sigma-Aldrich, USA

4.1.4. Primery

Název	Sekvence (5' - 3')	Účel
<i>Cre rekombináza</i> – F	GCCTGCATTACCGGTCGATGCAACGA	genotypizace
<i>Cre rekombináza</i> – R	GTGGCAGATGGCGCGGCAACACCATT	genotypizace
<i>Neurod1</i> – F	ACCATGCACTCTGTACGCATT	genotypizace
<i>Neurod1</i> – R	GAGAACTGAGACACTCATCTG	genotypizace
<i>Glukagon</i> – F	CAGAAGAAGTCGCCATTGCC	qPCR
<i>Glukagon</i> – R	AAGTCCCTGGTGGCAAGATT	qPCR

<i>Inzulín1</i> – F	GACCAGCTATAATCAGAGACCATC	qPCR
<i>Inzulín1</i> – R	GTAGGAAGTGCACCAACAGG	qPCR
<i>Inzulín2</i> – F	GGCTTCTTCTACACACCCAT	qPCR
<i>Inzulín2</i> – R	CCAAGGTCTGAAGGTCACCT	qPCR
<i>Isl1</i> – F	ATGATGGTGGTTTACAGGCTAAC	qPCR
<i>Isl1</i> – R	TCGATGCTACTTCACTGCCAG	qPCR
<i>MafA</i> – F	CTCCAGAGCCAGGTGGAG	qPCR
<i>MafA</i> – R	GTACAGGTCCCGCTCCTTG	qPCR
<i>MafB</i> – F	GCAGGTATAAACGCGTCCAG	qPCR
<i>MafB</i> – R	TGAATGAGCTGCGTCTTCTC	qPCR
<i>Neurod1</i> – F	ATGACCAAATCATACAGCGAGAG	qPCR
<i>Neurod1</i> – R	TCTGCCTCGTGTTCCCTCGT	qPCR
<i>Neurog3</i> – F	AGTGCTCAGTTCCAATTCCAC	qPCR
<i>Neurog3</i> – R	CGGCTTCTTCGCTTTTTGCTG	qPCR
<i>Pax6</i> – F	GTTGTGTGAGTAAAATTCTGGGC	qPCR
<i>Pax6</i> – R	GAGTCGCCACTCTTGGCTTA	qPCR
<i>Pdx1</i> – F	CCCCAGTTTACAAGCTCGCT	qPCR
<i>Pdx1</i> – R	CTCGGTTCCATTCGGGAAAGG	qPCR
<i>Ptf1a</i> – F	CACCGACCAGTCCTCTCG	qPCR
<i>Ptf1a</i> – R	GAACTCTACTTCTGCTTGCTCGT	qPCR
<i>Hprt1</i> – F	GTGGCCCTCTGTGTGCTC	qPCR
<i>Hprt1</i> – R	TCTACAGTCATAGGAATGGATCTATCA	qPCR

4.1.5. Protilátky

Protilátky primární	Hostitelský organismus	Typ	Společnost
Anti- Alfa amyláza	Králík	Polyklonální	Sigma- Aldrich
Anti- Glukagon	Myš	Monoklonální	Abcam
Anti- Inzulín	Králík	Monoklonální	Cell Signaling
Anti- Inzulín	Morče	Polyklonální	Abcam
Anti- Ki67	Králík	Monoklonální	Cell Signaling
Anti- Neurog3	Myš	Monoklonální	DSHB
Anti- PDX1	Králík	Monoklonální	Cell Signaling

Protilátky sekundární			
DyLight 405	Koza	-	Jackson Immunoresearch
DyLight 488	Koza	-	Jackson Immunoresearch
DyLight 594	Koza	-	Jackson Immunoresearch

4.1.6. Roztoky

Antifade:

21,2% (w/v) n-propylgalát, 2M Tris (pH = 8,0), 90% (v/v) glycerol

Elektroforetický pufr 0,5krát TBE:

45mM Tris, 45mM kyselina boritá, 1mM EDTA, pH = 8,0

Fosfátový pufr (PBS):

10mM Na₂HPO₄, 150mM NaCl, 2mM KCl, 2mM KH₂PO₄, pH = 7,4

Lyzační pufr:

50mM Tris (pH = 8), 100mM EDTA (pH = 8), 100mM NaCl, 1% SDS, pH = 8,0

PBT:

0,5% (w/v) Tween®20 v PBS pufru

4.1.7. Komerční soupravy

Komerční souprava pro polymerázovou řetězovou reakci, JumpStart™ Taq DNA Polymerase, Sigma-Aldrich, USA

Komerční souprava pro kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci, 5x HOT FIREPol Blend Master Mix RTL 10mM with BSA, Solis BioDyne OÜ, Estonsko

Komerční souprava pro TUNEL („terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling“) „In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein“ (Roche, USA)

4.1.8. Přístroje

Analytické váhy 154AI, Bel engineering, Itálie

Biorad CFX394, Bio-Rad, USA

Centrifuga Z216 MK, Hermle, Německo

Elektroforéza Mini Gel System B1, Owl Separation systems, Velká Británie

Fotoaparát SP- 565 UZ, Olympus, Japonsko

Glukometr Contour TS, Bayer, Německo

Hybridizační pecProBlot, LabnetInternational, USA

Konfokální mikroskop Zeiss CZ LSM880 2P, Německo

Microtome Leica RM2255, Leica, Německo

Mikrovlnná trouba MCE30, Hitachi, Japonsko

Pipety P39604P, Gilson, Labnet International, USA

Spektrofotometr N1000, NanoDrop Technologies, USA

Stolní třepačka Vortex V-1 plus, Labnet International, USA

Stolní centrifuga FVL-2400N, Biosan, USA

Termoblok BioTDB-100, LabnetInternational, USA

Termocycler CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad, USA

Termocycler, Biometra, Německo

Termostat Mini Incubator 5110-230V, LabnetInternational, USA

Vibratom, Leica Biosystems, Německo

Vortex MIXER S0200, LabnetInternational, USA

pozn. veškeré použité laboratorní nádoby i roztoky jsou sterilní a bez RNáz a DNáz

4.1.9. Počítačové programy

Adobe Photoshop CS5.1, USA

Bio-Rad CFX Manager 3.0, USA

GraphPad Prism 5.04, GraphPad Software, USA

ImageJ 1.45s, National Institutes of Health, USA (<https://imagej.nih.gov/ij>)

ND-1000 V.3.3.0, NanoDrop Technologies, USA

NIS Elements D 3.2, Nikon, Japonsko

4.2. Metody

4.2.1. Izolace myších embryí

Následující ráno po připuštění myši ke kopulaci byla provedena kontrola přítomnosti vaginálních zátek. Vaginální zátky jsou tvořeny ze sekretu koagulačních žlázek samce a slouží k zabránění odtoku spermatu z vagíny. Jako začátek březosti byl stanoven den nalezení vaginální zátky. Tento den se označuje jako embryonální den 0,5. Myši byly v poledne E14,5 dne a E17,5 dne březosti usmrceny cervikální dislokací. Z těla byly vyjmuty embryonální váčky a vloženy do fosfátového pufru umístěného na ledu. Poté byla pod stereomikroskopem Nikon SMZ 1500 izolována jednotlivá embrya. Část tkáně ocásků byla použita ke genotypizaci.

4.2.2. Izolace DNA

Izolace DNA je proces, při kterém je DNA z tkáně získána vysrážením z vodné fáze pomocí isopropanolu. Do sterilních mikrozkuvek obsahujících tkáň ocasu bylo přidáno 8 μ l proteinázy K a 300 μ l lyzačního pufru. Mikrozkuvky byly umístěny do hybridizační pece vytemperované na 55 °C a v ní inkubovány za rotace přes noc. Další den byly vzorky promíchány za použití stolní třepačky, a poté odstředovány 12 minut při 18 °C a 14 000 g v centrifuze Z216 MK. Poté byl supernatant přenesen do prázdných sterilních mikrozkuvek. Přidáním 300 μ l isopropanolu a promícháním obsahu mikrozkuvky byla vysrážena DNA. Usazení DNA bylo docíleno odstředěním v centrifuze Z216 34 MK. Všechna další odstředování probíhala po dobu 2 minut při 18 °C a 14 000 g. Supernatant byl slit a k peletám bylo přidáno 500 μ l 70% ethylalkoholu za účelem jejich odsolení. Pelety DNA byly protřepáním uvolněny ze dna mikrozkuvky, aby došlo k jejich úplnému omytí. Po odstředění v centrifuze Z216 MK byl supernatant znovu odlit a k peletám bylo přidáno 500 μ l absolutního ethylalkoholu pro jejich odvodnění. Následně proběhlo poslední odstředění v centrifuze Z216 MK a odlití ethylalkoholu. Získané pelety DNA byly vysušeny v termostatu vyhřátém na 55 °C. Po vyschnutí k nim bylo přidáno 90 μ l vody bez RNáz a DNáz. DNA byly ponechány přes noc v termostatu při teplotě 55 °C, aby došlo k úplnému rozpuštění pelety. Vzorky DNA byly poté uchovávány v chladu v lednici.

4.2.3. Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Pro stanovení koncentrace a čistoty DNA byla změřena absorbance DNA pomocí spektrofotometru N1000 při 230, 260 a 280 nm a následně vyhodnocena pomocí počítačového programu ND-1000 V.3.3.0. Toto měření vedlo ke zjištění koncentrace DNA (260 nm) a kvality DNA (230 a 280 nm). Pro zjištění kontaminace DNA proteiny sloužil poměr absorbancí (260 nm/280 nm). Tento poměr se pokaždé pohyboval v rozmezí 1,8 - 2,0, což odpovídá čisté DNA bez kontaminace proteiny. Měření absorbance při 230 nm slouží ke zjištění kontaminace DNA organickými sloučeninami. Poměr absorbancí (260/230 nm) se také pohyboval v rozmezí 1,8 - 2,0, což vypovídalo o DNA neznečištěné organickými látkami.

4.2.4. Genotypizace

Genotyp byl určen pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Ke zjištění genotypu byly použity specifické primery. Byla změřena koncentrace a čistota DNA (viz 4.2.3. Stanovení koncentrace a čistoty DNA). Následně byla vytvořena reakční směs pro PCR dle tabulky 4.1. Reakční objem byl 20 μ l.

Tabulka 4.1. Reakční směs PCR reakce

Chemikálie	Objem (μ l)
Sigma H ₂ O	13
5x Master Mix	4
Foward primer	1
Reverse primer	1
DNA	1

Mikrozkumavky byly umístěny do termocycleru, kde došlo k amplifikaci DNA podle tabulky 4.2. Reakce proběhla ve 35 cyklech.

Tabulka 4.2. Schéma PCR reakce

Kroky reakce	Teplota (°C)	Čas (min)
Iniciace denaturace	95	5:00
Denaturace DNA	95	0:30
Nasednutí primerů	63	0:30
Elongace řetězce	72	0:30
Konečná elongace	72	5:00

Produkty PCR reakce byly detekovány pomocí horizontální gelové elektroforézy na 2% agarosovém gelu v 0,5krát zředěném TBE pufru a za přidání ethidiumbromidu (0,4 µg/ml). Vzorky byly napipetovány do jamek gelu po 8 µl. Jako standard molekulových hmotností DNA byl použit GeneRuler 50 bp DNA Ladder v objemu 3 µl. Elektroforetické rozdělení probíhalo po dobu 20 minut při 130 V/cm. Po rozdělení byly produkty detekovány pomocí UV záření a byl proveden fotografický záznam gelu.

4.2.5. Izolace RNA

Ke tkáni bylo přidáno 300 µl „Trizol®Reagent“. Po manuální homogenizaci injekčními stříkačkami byly vzorky 10 min inkubovány při laboratorní teplotě. Ke zhomogenizované tkáni byl přidán chloroform (1/5 objemu „Trizol®Reagent“), následovala inkubace vzorků po dobu 5 minut při laboratorní teplotě a poté byly vzorky centrifugovány 15 min/14000 g, 4 °C. Do čisté mikrozkumavky byla odebrána vodná fáze a po přidání isopropanolu (1/2 objemu „Trizol®Reagent“) byla srážena RNA. Poté byly vzorky centrifugovány 15 min/14000 g, 4 °C. Pelety byly omyty přidáním 0,5 ml 75% (v/v) ethanolu. Usazení pelet byla zajištěna centrifugací 5 min/7500 g, 4 °C. Pelety RNA byly omyty dohromady třikrát. Nakonec byl ethanol odlit a pelety byly sušeny v inkubátoru při 37 °C po dobu 20 min a po vysušení rozpuštěny ve 20 µl (embryonální slinivky E14,5) resp. 50 µl vody (slinivky mláďat P1) bez RNáz a DNáz. Takto připravené vzorky byly skladovány při teplotě -80 °C.

4.2.6. Reverzní transkripce

Reverzní transkripce byla provedena pomocí komerční soupravy „RevertAid H Minus First Strand cDNA synthesis Kit“ (Thermo Scientific, USA), postupováno bylo podle protokolu výrobce. Koncentrace RNA byla stanovena spektrofotometricky (při vlnové délce 260 nm) pomocí spektrofotometru ND1000. Byl přepsán 1 µg RNA do cDNA. K 10 µl RNA (0,1 µg/µl) byl přidán 1 µl primeru oligo(dT)₁₈ (100 µM) a 1 µl primeru náhodných hexamerů (100 µM). Reakční směs byla inkubována po dobu 5 minut v termocykleru BIOER při 65 °C. Vzorky byly poté ochlazeny na ledu a byly přidány 4 µl 5x reakčního pufru, 1 µl „RiboLock RNázy Inhibitoru“ (20 U/µl), 2 µl dNTP Mix (10 mM) a 1 µl „RevertAid H Minus M-MuLV Reverzní Transkriptázy“ (200 U/µl). Samotná reakce byla provedena v termocykleru BIOER nejprve při 42 °C po dobu 60 min, následně 5 minut při 70 °C. Zbytky RNA byly degradovány přidáním 0,6 µl RNázy H (5 U/µl) za inkubace při 37 °C po dobu 20 min v termobločku. Vzorky cDNA byly uchovány při -80 °C.

4.2.7. Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR)

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase byla provedena s využitím komerční soupravy „SYBR®Green JumpStart™ Tag ReadyMix™“, bylo postupováno podle protokolu výrobce. cDNA byla nejprve naředěna vodou (1:19). Takto připravená cDNA byla použita jako templát pro qPCR. Reakce byla provedena v objemu 10 µl. Reakční směs byla složena ze 4 µl cDNA, 0,25 µl forward primeru (10 µM), 0,25 µl reverse primeru (10 µM), 0,5 µl vody a 5 µl „Syber®Green JumpStart™ Tag ReadyMix™“. Použité sady primerů jsou uvedené v 4.1.4. Reakce byla provedena v přístroji CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, USA) podle schématu, které je uvedené v tabulce 4.3.

Tabulka 4.3. Schéma qPCR

Krok	Teplota (°C)	Doba (min)	Počet opakování
Aktivace polymerázy	95	30	1
Denaturace	95	5	39
Nasedání primerů	60	30	39
Elongace	72	30	39
Kontrola křivek tání	65 – 95	0,083	-

Výsledky qPCR byly zpracovány programem Bio-Rad CFX Manager 3.0., ve kterém byly vypočítány hodnoty Cq („crossing point“). Z technických duplikátů byly vypočítány průměrné hodnoty Cq, které byly normalizovány ke kontrolnímu konstitutivně exprimovanému genu *Hprt1* podle vzorce: $\Delta Cq = Cq_{\text{gen}} - Cq_{Hprt1}$. Tyto hodnoty byly vyhodnoceny v programu GraphPad Prism 5.04 a to testem analýzy rozptylu jednoduchého třídění („one-way ANOVA“) a následným dvouvýběrovým nepárovým t-testem, při kterém byly porovnávány všechny skupiny s kontrolními vzorky (*wt*).

Relativní změna exprese genu byla určena z účinnosti reakce qPCR, která byla vypočítána v programu LinRegPCR, a difference (Δ) přechodového bodu (Cq) experimentálního vzorku vůči kontrole.

4.2.8. Imunohistochemické barvení na vibratomových řezech

Vypreparované pankreaty byly přeneseny do 4% agarózového gelu. Připravený agarózový bloček se nechal vysušit po dobu 20 min v mini inkubátoru při 37 °C a poté se ponechal 20 min v 4 °C. Na vibratomu byly nakrájeny 80 μ m řezy, které byly vloženy do mikrotitrační destičky a následně na nich bylo provedeno imunohistochemické barvení. K řezům bylo přidáno 500 μ l PBS třikrát po dobu 30 min. Poté byl k řezům nanesen blokační roztok (2,5% (w/v) kozího séra (Jackson ImmunoResearch, USA) v PBS pufru, 0,5% (w/v) Tween®20 v PBS pufru). Blokace probíhala celkem 60 min při laboratorní teplotě. Po skončení blokace bylo k řezům přidáno 600 μ l roztoku s primárními protilátkami (1:2000 Alfa amyláza (Sigma- Aldrich, USA), 1:400 glukagon (Abcam, UK), 1:50 inzulin (Cell Signaling, USA), 1:50 inzulin (Abcam, UK), 1:400 Ki67 (Cell Signaling, USA), 2,5% (w/v) kozí sérum, 0,5% (v/v) Tween®20 v PBS). Inkubace s primárními protilátkami probíhala 48 – 72 hod při 4 °C. Po odejmutí primárních protilátek byly řezy omyty pětikrát 1 ml PBS po dobu

30 min a opět blokovány v 600 µl blokačního roztoku 60 min. Poté byly vzorky inkubovány s 600 µl roztoku sekundárních protilátek (1:500 „DyLight488- conjugated Goat Anti-Mouse IgG“ (Jackson ImmunoResearch, USA), 1:500 „DyLight594- conjugated Goat Anti-Mouse IgG“ (Jackson ImmunoResearch, USA), 1:500 „DyLight405- conjugated Goat Anti-Mouse IgG“ (Jackson ImmunoResearch, USA), 2,5% (w/v) kozí sérum; 0,5% (v/v) Tween® 20; 0,1% TritonX v PBS) ve tmě po dobu 12 hod při 4 °C. Všechny vzorky byly následně promyty alespoň pětkrát PBS. Řezy s *wt* a mutanty byly značeny odlišně, aby bylo možné barvit tyto odlišné vzorky najednou za stejných podmínek. Řezy byly umístěny na podložní sklíčka s Antifade médiem a zakryty krycími skly. Snímky byly pořízeny pomocí konfokálního mikroskopu.

4.2.9. Imunohistochemické barvení a detekce apoptózy metodou TUNEL („terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling“)

Řezy pankreatu na sklech byly nejdříve zbaveny parafinu a prosyceny PBT pufrém. Na řezy byl nanesen roztok Proteinázy K (20 µg/ml) v 10mM Tris-HCl pufru (pH = 8), která enzymaticky rozruší strukturu tkáně. Řezy byly inkubovány s Proteinázou K ve vlhké komůrce po dobu 60 min při 37 °C. Po skončení inkubace byly řezy promyty v PBT třikrát po dobu 5 min. Byly vybrány dva řezy, jeden sloužil jako pozitivní a druhý jako negativní kontrola. Všechny řezy byly na skle ohraničeny pomocí PapPenu a pouze sklíčko s pozitivní kontrolou bylo následně inkubováno v roztoku DNázy I (1 U/µl), pomocí které byly indukovány zlomy vláken DNA. Řez byl s DNázou I inkubován 12 min při laboratorní teplotě, ostatní řezy byly zality roztokem PBT. Následovalo promytí řezů v PBT třikrát po dobu 5 min. Poté byl na všechny řezy nanesen blokační roztok (10% (w/v) kozího séra (Jackson ImmunoResearch, USA) v PBT pufru). Blokace probíhala celkem 90 min při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce. Následně byl nanesen na řezy roztok primárních protilátek (1:400 inzulín (Cell Signaling, USA), 10% (w/v) kozí sérum v PBT pufru). Řezy s primárními protilátkami byly inkubovány přes noc ve vlhké komůrce při 4 °C. Další den byly řezy omyty v PBT pufru třikrát po dobu 5 min. Poté následovala inkubace ve vlhké komůrce za tmy s fluorescenčně značenými sekundárními protilátkami po dobu 120 min. (1:500 „DyLight594- conjugated Goat Anti-Mouse IgG“ (Jackson ImmunoResearch, USA), 10% (w/v) kozí sérum v PBT pufru). Po skončení inkubace byly řezy omyty v PBT třikrát po dobu 5 min. Všechny omývací kroky PBT pufrém byly prováděny při laboratorní teplotě použitím orbitální třepačky nastavené na 75 ot/min. Na takto připravených řezech byla provedena metoda TUNEL za pomoci komerční soupravy „In Situ Cell Death Detection Kit,

Fluorescein“ (Roche, USA), byl dodržován postup podle protokolu výrobce. Po omytí byla na řezy nanášena směs roztoků komerční soupravy (terminální deoxynukleotidyltransferasy a fluorescenčně značeného dUTP v poměru 1:10). Na negativní kontrolu, která byla opět ohraničena pomocí PapPenu, byl nanášen pouze roztok fluorescenčně značeného dUTP bez přidání terminální deoxynukleotidyltransferasy. Řezy byly inkubovány ve vlhké komůrce při 37 °C jednu hodinu. Po skončení inkubace byly řezy omyty v PBT třikrát po dobu 5 min. Po omytí bylo na řezy nanášeno médium stabilizující fluorescenci – DAPI Fluoromount-G[®]. Po překrytí řezů krycím sklem byly vytvořeny trvalé preparáty. Preparáty byly dokumentovány pomocí konfokálního mikroskopu Zeiss.

5. Výsledky

5.1. Delece *Neurod1* pomocí *Isl1-Cre*

K analýze účinku *Neurod1* delece na formování a funkci Langerhansových ostrůvků pankreatu byl použit Cre-loxP systém pro vytvoření podmíněné delece *Neurod1* genu v *Isl1* pozitivních buňkách. Konkrétně byly *Isl1-Cre* myši (Yang et al 2006) zkríženy s homozygotními floxovanými *Neurod1* myšmi (Goebbels et al 2005) za vytvoření heterozygotů *Isl1-Cre*^{+/-} *Neurod1*^{+f} a homozygotů *Isl1-Cre*^{+/-} *Neurod1*^{ff} (*Neurod1CKO*). *Neurod1*^{+f} nebo *Neurod1*^{ff} (*wt*) myši byly použity jako kontroly.

Rozdílné genotypy vyprodukované křížením *Isl1-Cre*^{+/-} a *Neurod1*^{ff} linií byly zjištěny pomocí genotypizace (viz 4.2.4. Genotypizace). Výsledky genotypizace jsou ukázány na obrázcích 5.1. a 5.2. Heterozygotní mutantní myši s delecí *Neurod1* nesly *Cre* rekombinázový gen a jednu floxovanou *Neurod1* alelu. Homozygotní mutantní s delecí *Neurod1* obsahovali gen pro *Cre* rekombinázu a obě floxované alely pro *Neurod1* gen (*Neurod1CKO*).

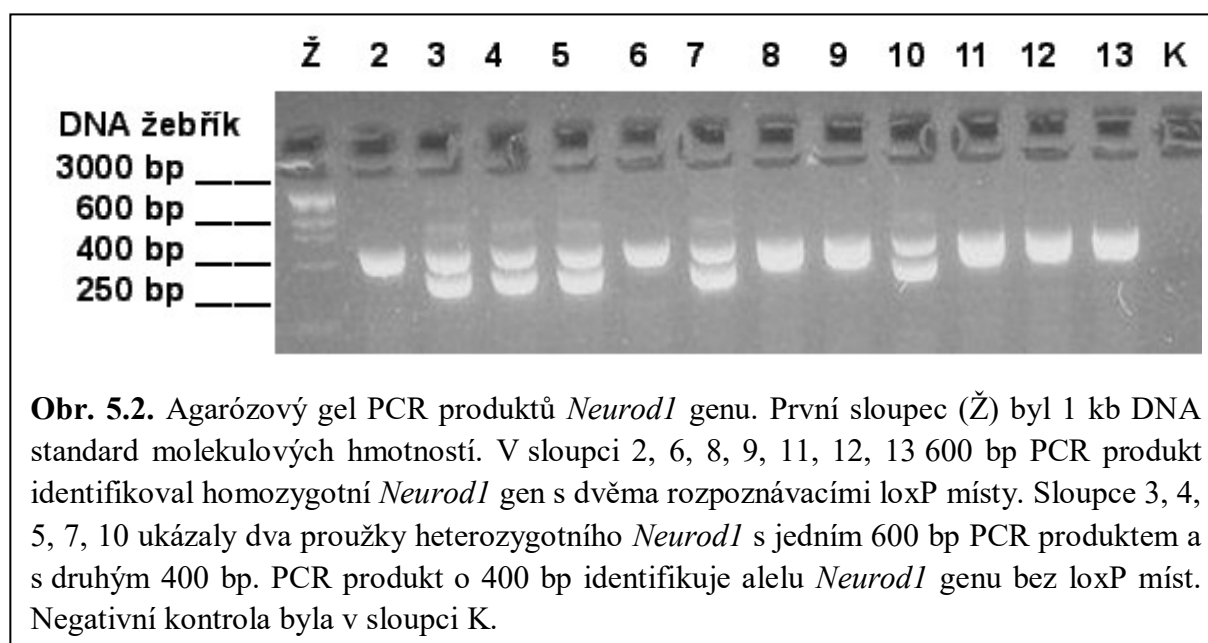
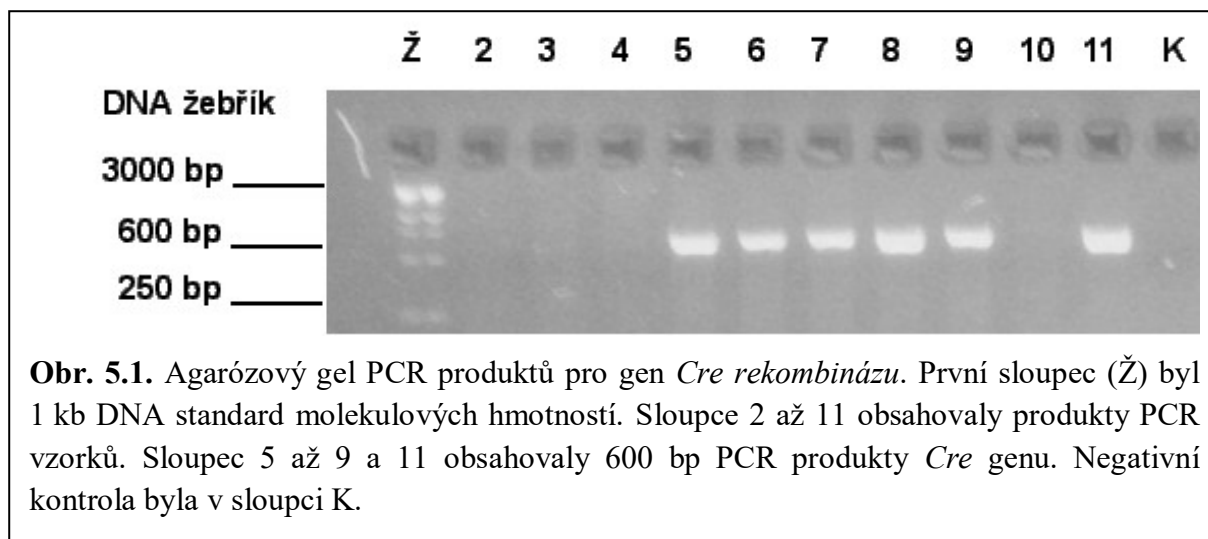
Bylo získáno 368 myší z 64 vrhů (viz Tabulka 5.1.) *Neurod1CKO* mutantů přežilo pouze 37 % (viz Tabulka 5.2.). *Neurod1CKO* mutantní byli vzhledově nerozlišitelní od kontrolních jedinců a bez jakýkoliv známek změn externího fenotypu. Ačkoliv jejich tělesná hmotnost byla významně snížena v prvním týdnu po narození, v následujících týdnech zvýšili svoji hmotnost o 32 % (viz Obr. 5.3. A). Průměrná hmotnost *Neurod1CKO* myší byla však o 9 % nižší než hmotnost *wt* myší. Pravidelné měření glukózy v krvi během 1. – 4. týdnu po narození ukázalo, že homozygotní *Neurod1CKO* mutantní krmení dle libosti byli mírně hyperglykemičtí (nad 13,9 mmol/l glukózy v krvi, viz Obr. 5.3. B). U *Neurod1CKO* jedinců byla větší variabilita v hladinách glukózy v krvi (od 5,3 mmol/l do 20,2 mmol/l) oproti *wt* myším (v průměru 6,98 mmol/l glukózy v krvi). Velký rozptyl hodnot glukózy v krvi naznačil problémy s funkcí β -buněk u mutantů.

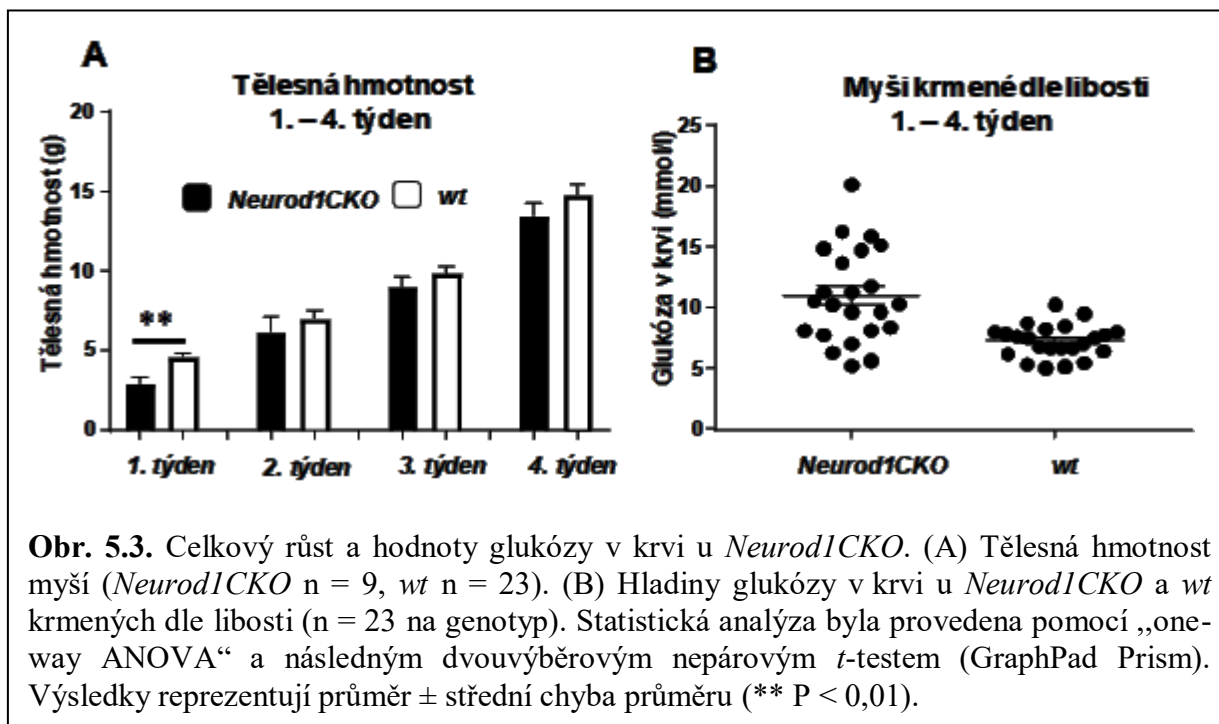
Tabulka 5.1. Celkové počty myší

Myši (n)	ht	<i>Neurod1CKO</i>	<i>wt</i>
368	74	34	260

Tabulka 5.2. Očekávané a získané procento myší

Genotyp	ht	<i>Neurod1CKO</i>	wt
Očekáváno (%)	25	25	50
Získáno (%)	20,11	9,24	70,65



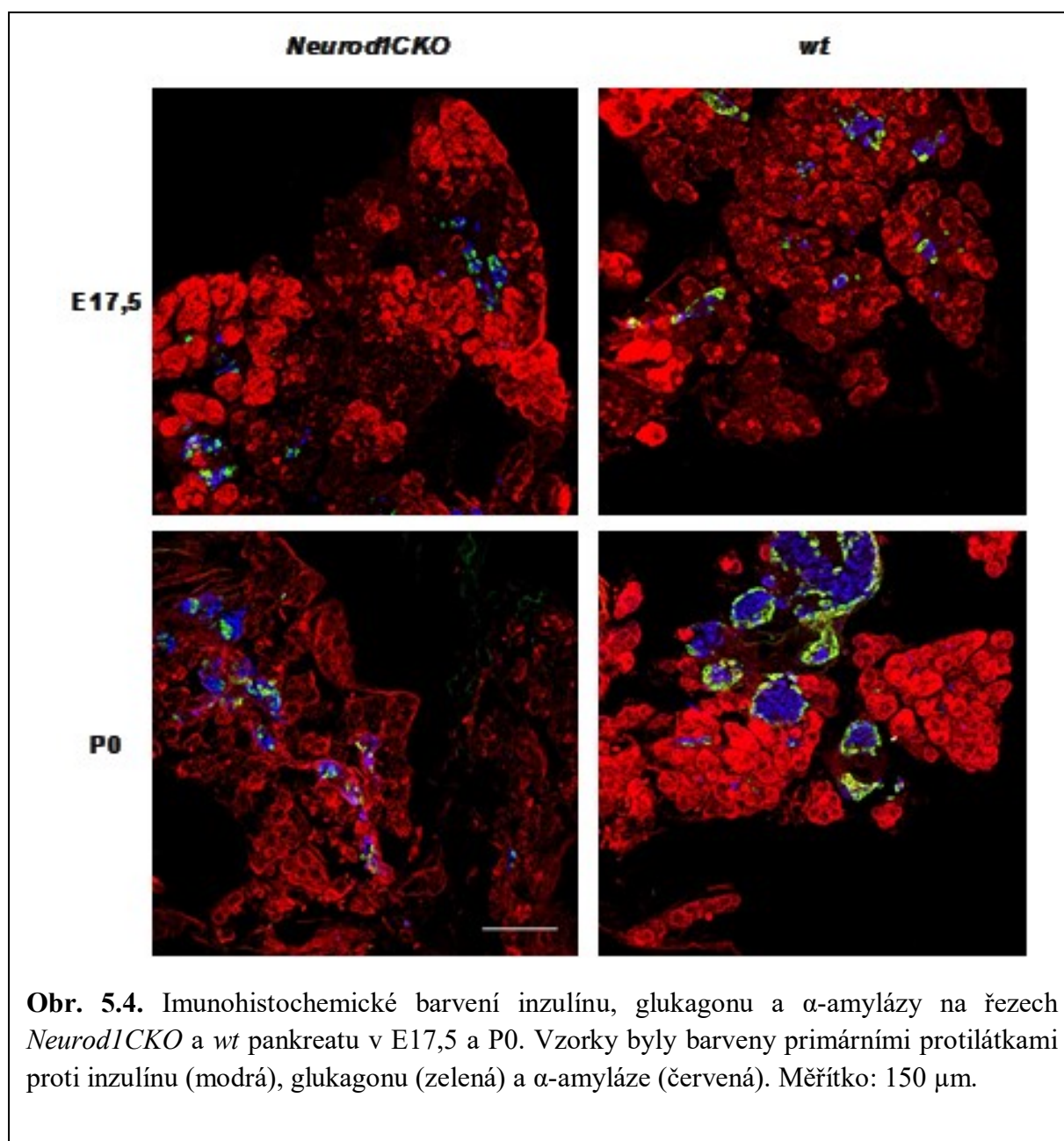


5.2. Porovnání exokrinní a endokrinní části pankreatu

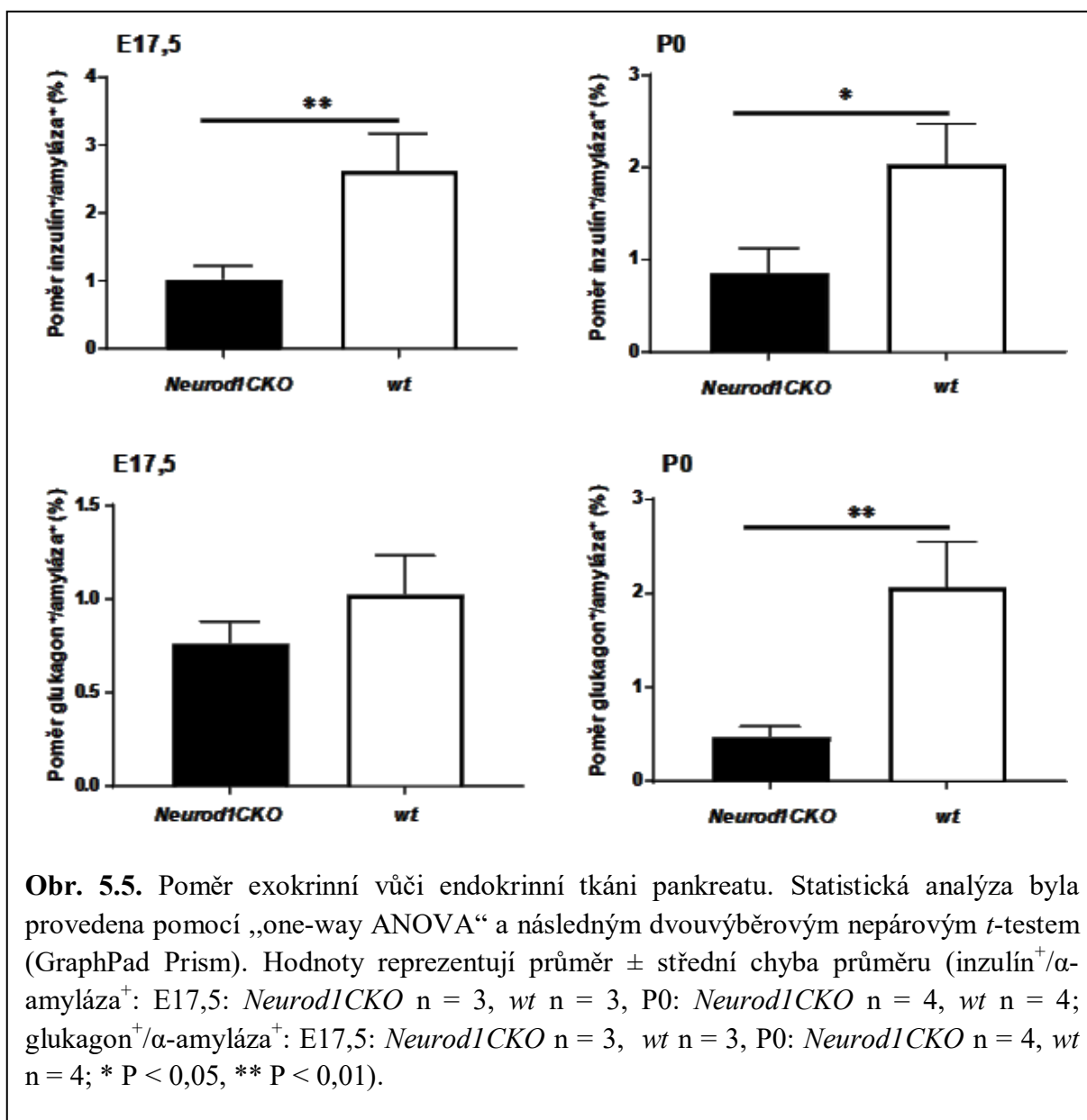
Pro analýzu struktury pankreatu, a to konkrétně porovnání množství exokrinní tkáně k tkáni endokrinní u *wt* myši a *Neurod1CKO* mutantů, byl vybrán věk E17,5 a P0. Počty použitých pankreatů jsou uvedeny v tabulce 5.3. Řezy z vibratomu byly barveny protilátkami proti inzulínu (produkovaném β -buňkami), glukagonu (produkovanému α -buňkami) a α -amyláze (produkované acinárními buňkami exokrinního pankreatu, viz Obr. 5.4.) (Baeyens et al 2005). U *Neurod1CKO* glukagon produkující α -buňky neležely pouze okraje ostrůvků jako u *wt*, ale byly také detekovány ve středu ostrůvků. Plocha exokrinní tkáně (značené protilátkou proti α -amyláze) byla poté porovnána s plochou inzulín⁺ buněk a s plochou glukagon⁺ buněk (viz Obr. 5.5.) Poměr inzulín⁺ buněk k α -amyláze⁺ buňkám byl statisticky významně snížený u *Neurod1CKO* oproti *wt* v E17,5 a i v P0. Poměr glukagon⁺ buněk k α -amyláze⁺ buňkám byl také snížený u *Neurod1CKO* v obou věcích, ale pouze v P0 bylo snížení statisticky významné.

Tabulka 5.3. Počty pankreatů použitých k porovnání exokrinní a endokrinní tkáně

Věk	Neurod1CKO	wt
E17,5	3	3
P0	4	4



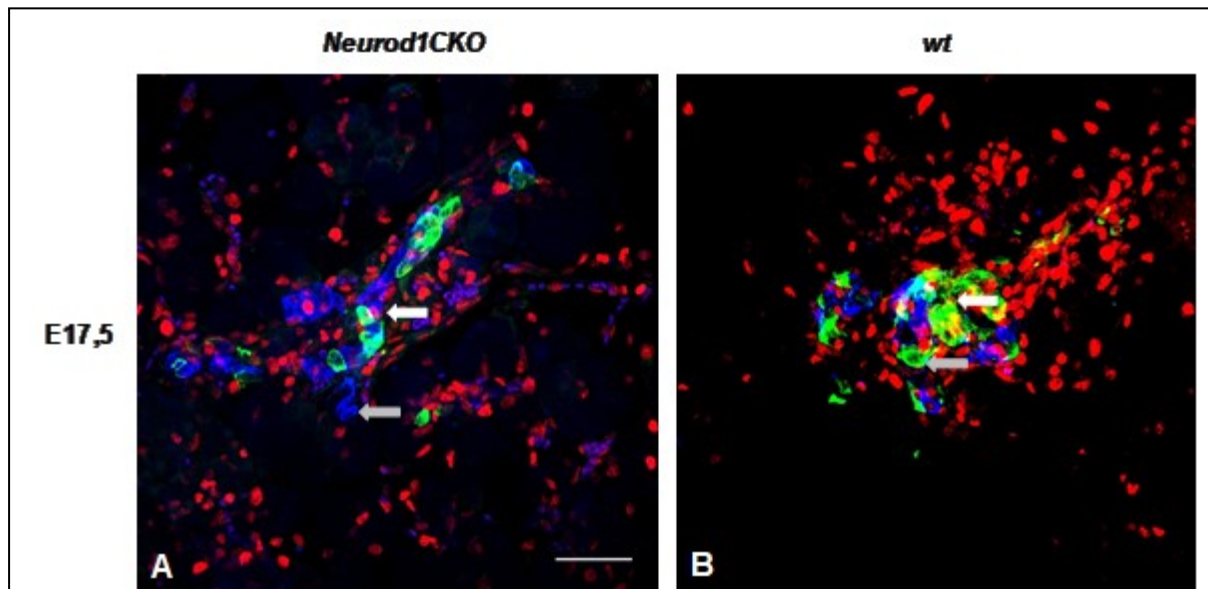
Obr. 5.4. Imunohistochemické barvení inzulínu, glukagonu a α -amylázy na řezech *Neurod1CKO* a *wt* pankreatu v E17,5 a P0. Vzorokly byly barveny primárními protilátkami proti inzulínu (modrá), glukagonu (zelená) a α -amyláze (červená). Měřítok: 150 μ m.



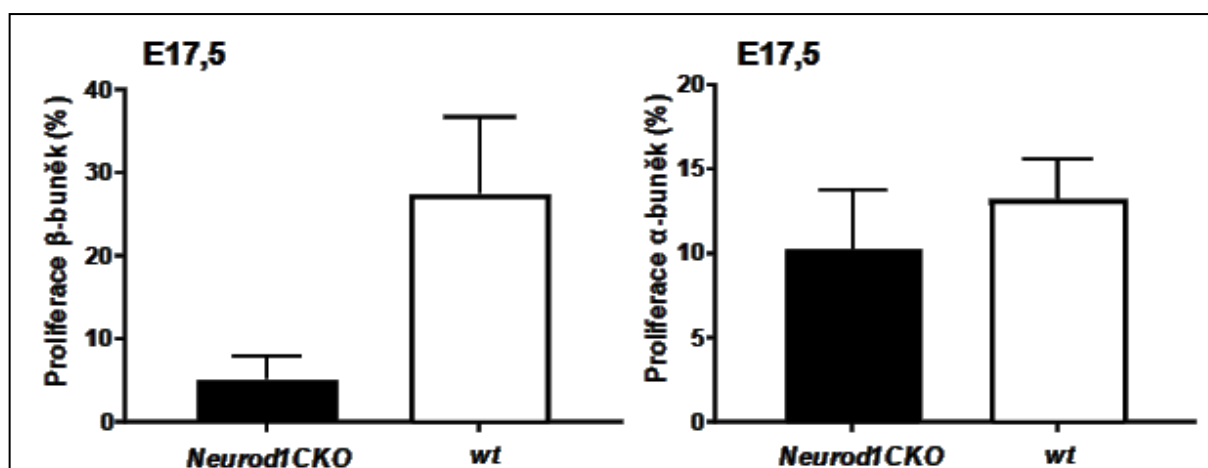
5.3. Analýza buněčné proliferace

Ki67 byl použit pro vyhodnocení proliferační aktivity v pankreatech *Neurod1CKO* mutantů a *wt*. Ki67, marker proliferačních buněk, je exprimován ve všech fázích buněčného cyklu (Gao et al 2009). Pro analýzu proliferace byl vybrán věk E17,5, protože v tomto embryonálním věku bylo zjištěno snížené množství endokrinní tkáně u *Neurod1CKO* v porovnání s *wt*. Řezy pankreatů byly barveny protilátkami proti Ki67 (exprimovaném v buněčných jádrech), inzulínu (produkovaném β-buňkami) a glukagonu (produkovanému α-buňkami, viz Obr. 5.6.). Byly použity tři pankreaty od kontrolních jedinců a tři pankreaty od jedinců *Neurod1CKO*. Byl spočítán celkový počet inzulín produkujících β-buněk (viz Obr. 5.6.A šedá šipka), glukagon produkujících α-buněk (viz Obr.

5.6.B šedá šipka), proliferujících β -buněk (viz Obr. 5.6.A bílá šipka) a proliferujících α -buněk (viz Obr. 5.6.B bílá šipka). Výsledky analýzy proliferace α - a β -buněk jsou zobrazeny na Obr. 5.7. U *Neurod1CKO* mutantů byla snížena proliferace jak u inzulín produkujících β -buněk, tak i u glukagon produkujících α -buněk. Výsledky ale nebyly statisticky významné.



Obr. 5.6. Imunohistochemické barvení inzulínu, glukagonu a Ki67 na pankreatických řezech *Neurod1CKO* a *wt* v E17,5. Vzorčky byly barveny primárními protilátkami proti inzulínu (modrá), glukagonu (zelená) a Ki67 (červená). Inzulín proliferující β -buňka je ukázána na snímku A (bílá šipka), stejně jako β -buňka (šedá šipka). Glukagon proliferující α -buňka je vyznačena na snímku B (bílá šipka) a α -buňka také na snímku B (šedá šipka). Měřítko: 50 μ m.



Obr. 5.7. Analýza proliferace inzulín a glukagon proliferujících buněk. Statistická analýza byla provedena pomocí „one-way ANOVA“ a následným dvouvýběrovým nepárovým *t*-testem (GraphPad Prism). Hodnoty reprezentují průměr \pm střední chyba průměru (β -buňky: *Neurod1CKO* = 3, *wt* n = 3; α -buňky: *Neurod1CKO* n = 3, *wt* n = 3).

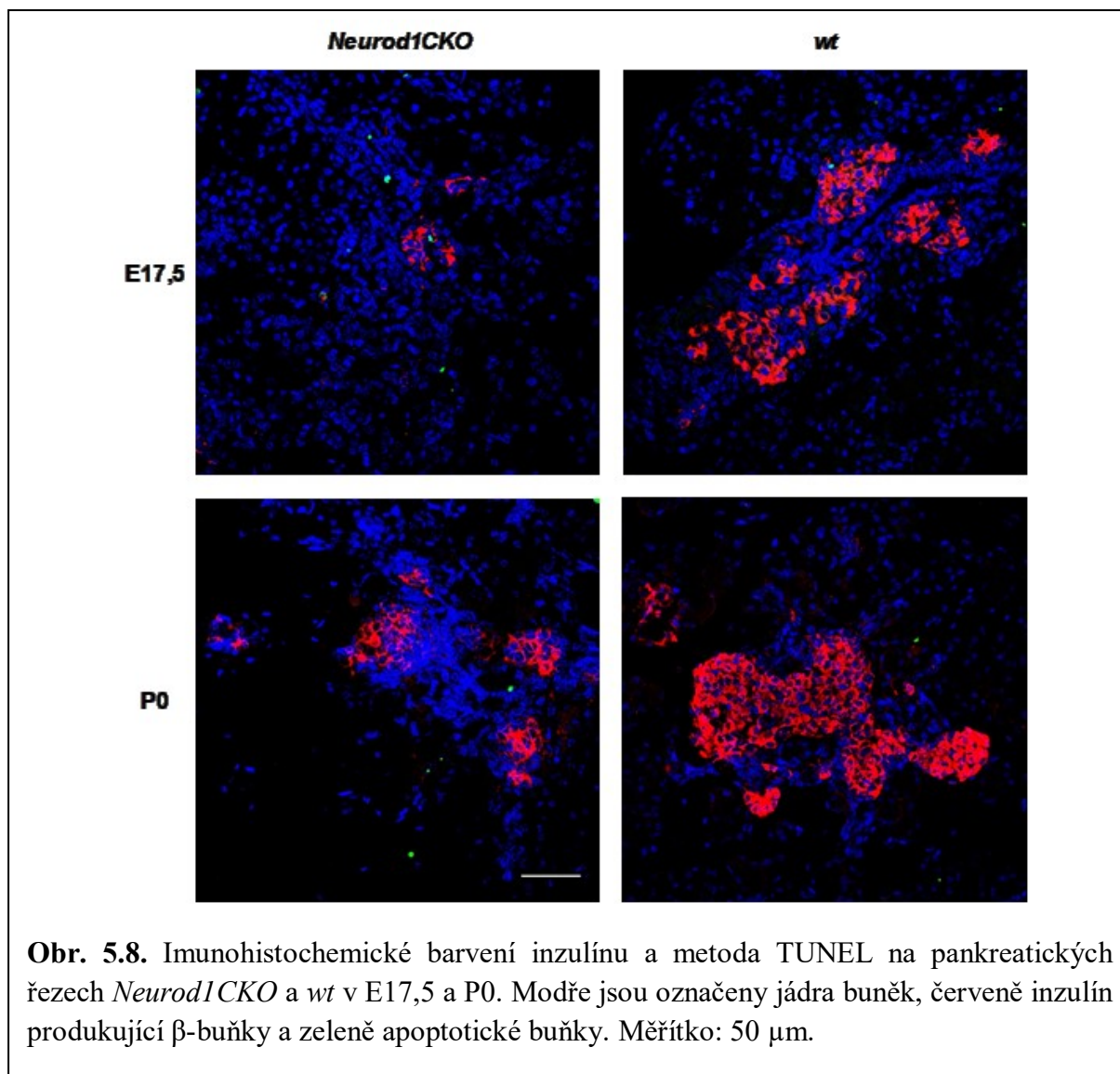
5.4. Analýza apoptózy

Abnormální diferenciace buněk během embryonálního vývoje může vyvolat apoptózu. Také apoptóza může představovat jeden možný mechanismus vedoucí ke snížení počtu endokrinních buněk. Vzhledem k tomu, že transkripční faktor NEUROD1 je důležitý v procesu diferenciace endokrinních buněk pankreatických ostrůvků, bylo vyhodnoceno množství apoptotických buněk v endokrinní tkáni pankreatu, konkrétně β -buněk, u *Neurod1CKO* a *wt* myší. Analýza apoptózy byla provedena pomocí kombinace imunohistochemického barvení a metody TUNEL (viz 4.2.9.) na pankreatech v E17,5 a P0. Počty použitých vzorků jsou uvedeny v tabulce 5.4., kdy od každého vzorku jedince bylo analyzováno šest řezů pankreatu.

Tabulka 5.4. Počty pankreatů použitých k analýze apoptózy

Věk	<i>Neurod1CKO</i>	<i>wt</i>
E17,5	3	3
P0	3	3

U žádného testovaného vzorku nedocházelo ke zvýšené apoptóze. V Langerhansových ostrůvcích byly pouze detekovány ojedinělé apoptotické buňky (viz Obr. 5.8.). Výsledek byl srovnatelný mezi *Neurod1CKO* a *wt*.



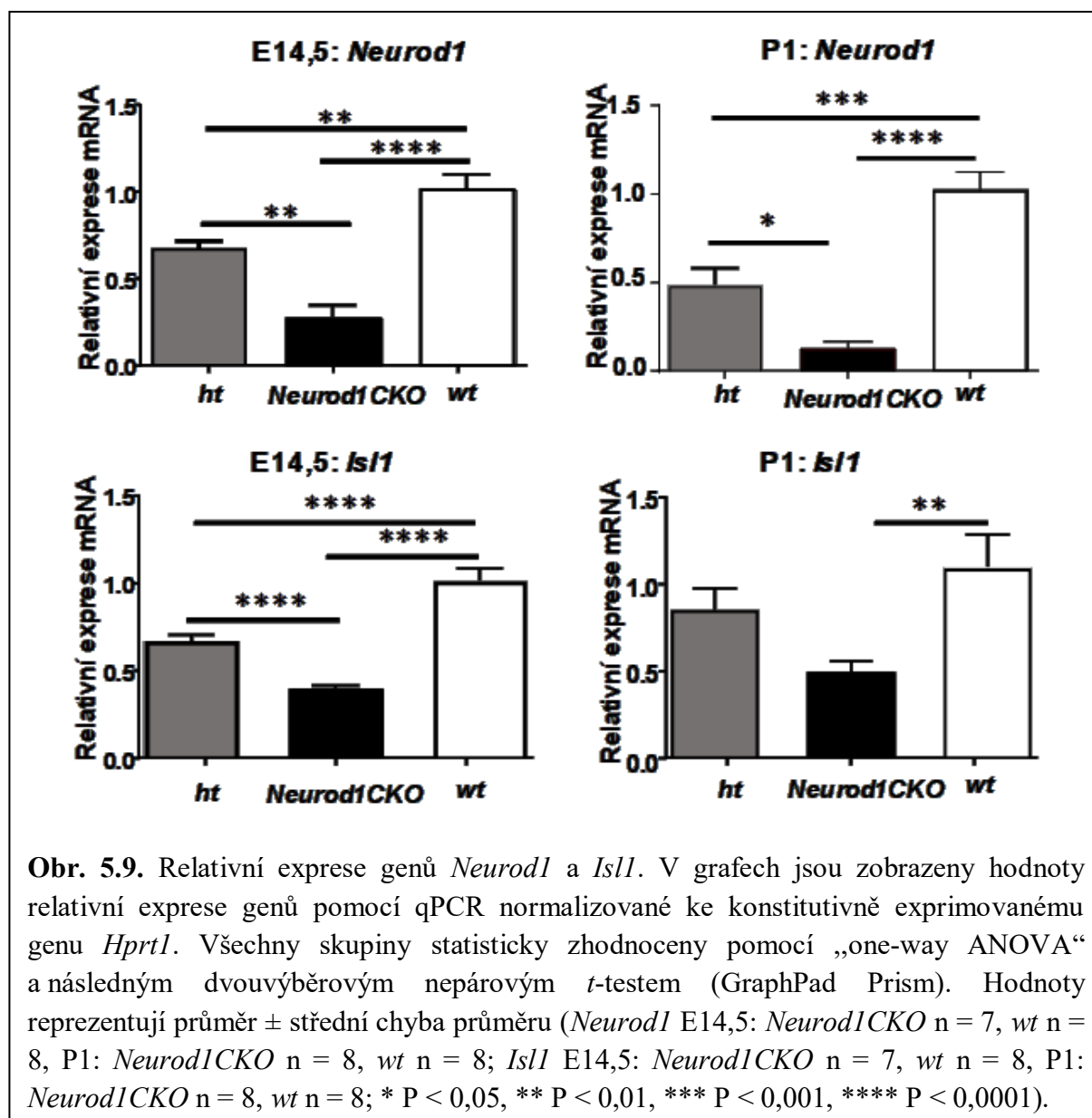
5.5. Relativní exprese vybraných genů

Relativní exprese 11 genů byla změřena pomocí qPCR a normalizována ke konstitutivně exprimovanému genu *Hprt1*. Pomocí dvouvýběrového nepárového *t*-testu byla relativní exprese genů u *Neurod1CKO* porovnána s kontrolními vzorky. Byly vybrány geny, které ovlivňují vývoj a funkci pankreatu. qPCR analýzy byly provedeny ve v embryonálním věku E14,5 a jeden den po narození ve věku P1. Počty vyizolovaných pankreatů použitých na qPCR jsou uvedeny v tabulce 5.5.

Tabulka 5.5. Počty pankreatů použitých na qPCR

Věk	<i>Neurod1CKO</i>	<i>wt</i>
E17,5	7	8
P0	8	8

NEUROD1 je důležitý pro diferenciaci a reguluje expresi inzulinu a glukagonu. Naproti tomu ISL1 reguluje expresi všech hormonů produkovaných buňkami Langerhansových ostrůvků a je potřebný pro proliferaci a samotné přežívání buněk endokrinního pankreatu (Du et al 2009, Dumonteil et al 1998, Naya et al 1995). Relativní exprese těchto genů jsou ukázány v grafech na obrázku 5.9. Množství mRNA *Neurod1* bylo statisticky významně sníženo o polovinu u *ht Isl1-Cre^{+/-} Neurod1^{f/-}* oproti *wt* v E14,5 a i v P1, potvrzující funkčnost delece *Neurod1* genu. U *Neurod1CKO* mutantů bylo v obou věcích množství mRNA *Neurod1* statisticky významně sníženo, jak oproti *wt*, tak i oproti *ht*. U *Isl1* genu došlo k statisticky významnému snížení množství mRNA u *Neurod1CKO* mutantů proti *wt* a *ht* v E14,5. U *ht* jedinců bylo statisticky významné snížení množství mRNA *Isl1* oproti *wt* v E14,5. V P1 byla snižená exprese u *Neurod1CKO* oproti *wt* a *ht*, mezi *wt* a mutantem šlo o snížení statisticky významné.



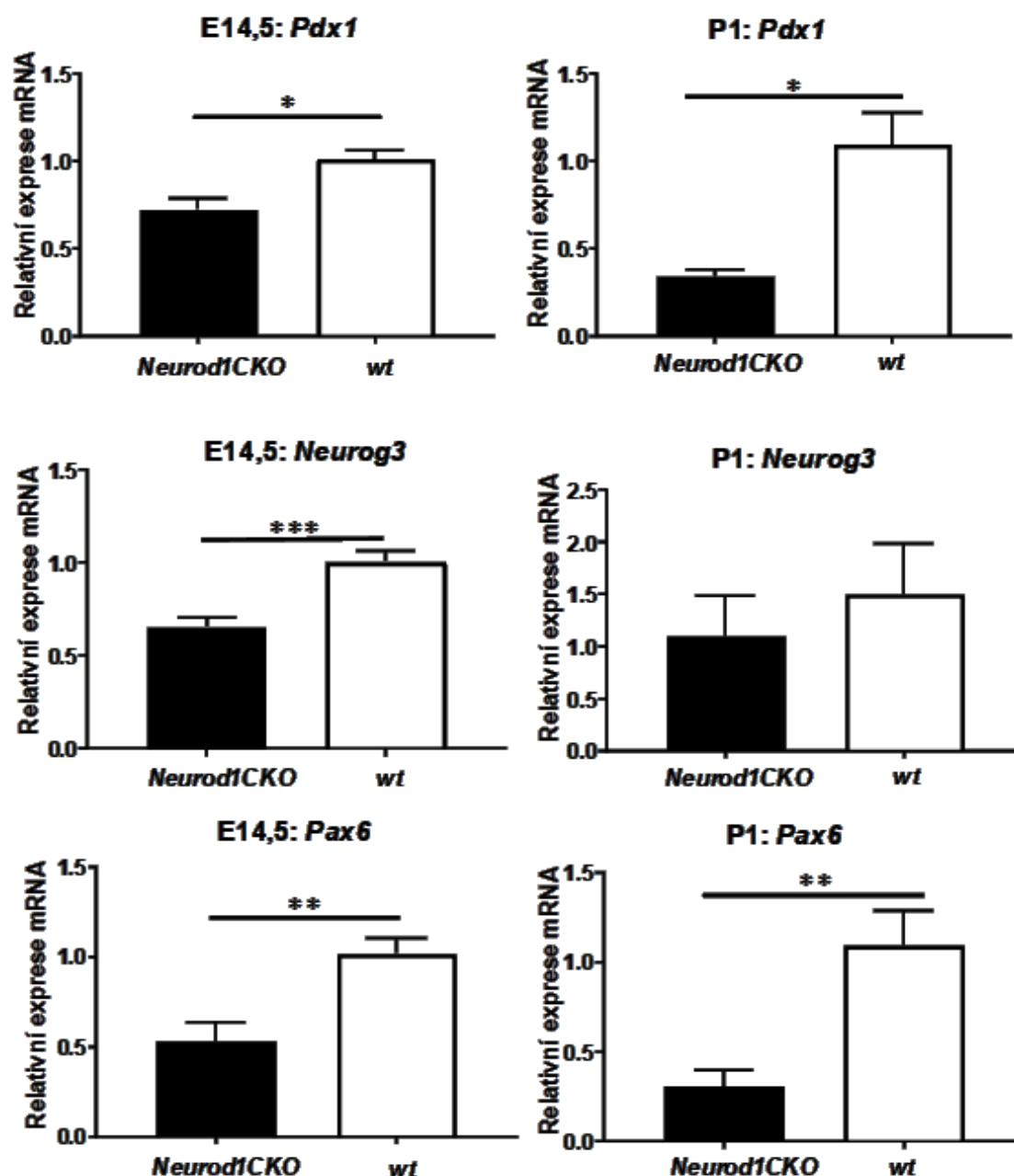
Obr. 5.9. Relativní exprese genů *Neurod1* a *Isl1*. V grafech jsou zobrazeny hodnoty relativní exprese genů pomocí qPCR normalizované ke konstitutivně exprimovanému genu *Hprt1*. Všechny skupiny statisticky zhodnoceny pomocí „one-way ANOVA“ a následným dvouvýběrovým nepárovým *t*-testem (GraphPad Prism). Hodnoty reprezentují průměr ± střední chyba průměru (*Neurod1* E14,5: *Neurod1CKO* n = 7, *wt* n = 8, P1: *Neurod1CKO* n = 8, *wt* n = 8; *Isl1* E14,5: *Neurod1CKO* n = 7, *wt* n = 8, P1: *Neurod1CKO* n = 8, *wt* n = 8; * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001, **** P < 0,0001).

Geny pro *Pdx1*, *Neurog3* a *Pax6* jsou markery prekursorů endokrinního pankreatu. Z prekursorových buněk exprimujících PDX1 se vyvíjí nejenom buňky endokrinního pankreatu, ale i všechny ostatní typy buněk celého pankreatu. U dospělých jedinců je exprese PDX1 omezena pouze na β -buňky. Prekuzory všech typů buněk Langerhansových ostrůvků během vývoje pankreatu exprimují NEUROG3. PAX6 je také přítomen během vývoje ve všech buňkách endokrinního pankreatu (Gu et al 2002, Ohlsson et al 1993, Sander et al 1997). Relativní exprese těchto genů jsou zobrazeny v grafech na obrázku 5.10. Množství mRNA *Pdx1* bylo statisticky významně sníženo u *Neurod1CKO* mutantů oproti *wt* v E14,5 a i v P1. U *Neurog3* bylo množství mRNA významně sníženo u *Neurod1CKO* oproti *wt* v E14,5. Exprese *Neurog3* v prekurzorech endokrinních buněk se snižuje s jejich postupující diferenciací. Tomuto snížení exprese odpovídal vysoký PCR počet cyklů (počet cyklů 33) ukazující velmi nízkou hladinu mRNA *Neurog3* a to jak u *wt* tak i u *Neurod1CKO* v P1. V E14,5 a v P1 bylo množství mRNA *Pax6* statisticky významně sníženo u *Neurod1CKO* v porovnání s *wt*.

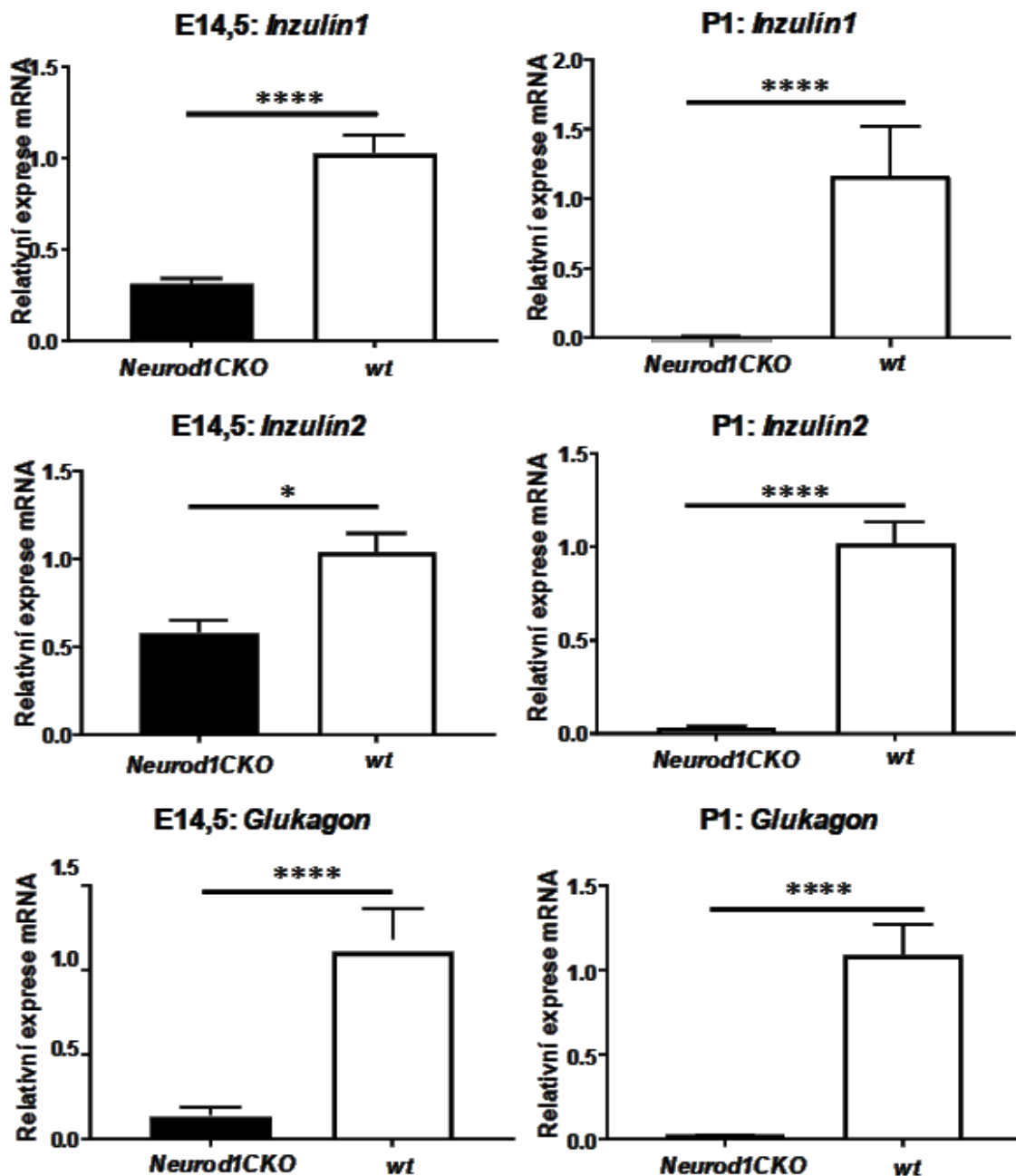
Inzulín s glukagonem fungují jako antagonisté a jsou nezbytní pro zachování glukózové homeostáze. Při poklesu hladiny glukózy v krvi glukagon zajišťuje její produkci z jater. Inzulín naopak snižuje hladinu glukózy v krvi zajištěním vstupu glukózy do buněk a tím její využití tkáněmi. U myši jsou dva geny pro inzulín, a to *Inzulín 1* a *Inzulín 2* (Cordell et al 1979, Freychet et al 1988, Fu et al 2013)*. Relativní exprese genů *Inzulín 1*, *Inzulín 2* a *Glukagon* jsou zobrazeny v grafech na obrázku 5.11. Množství mRNA *Inzulínu 1*, *Inzulínu 2* a *Glukagonu* bylo statisticky významně sníženo u *Neurod1CKO* mutantů oproti *wt* v E14,5 a v P1.

MafB je během vývoje pankreatu exprimován v inzulín a v glukagon produkujících buňkách. Prostřednictvím přepnutí exprese z *MafB* na *MafA* dochází k diferenciaci β -buněk (Nishimura et al 2006). Množství mRNA *MafB* a *MafA* bylo statisticky významně sníženo u *Neurod1CKO* mutantů oproti *wt* v E14,5 (viz. Obr. 5.12.). Množství mRNA *MafA* u *Neurod1CKO* bylo statisticky významně sníženo také v P1. Naproti tomu exprese *MafB* nebyla u *Neurod1CKO* změněna oproti *wt* (počet cyklů 40).

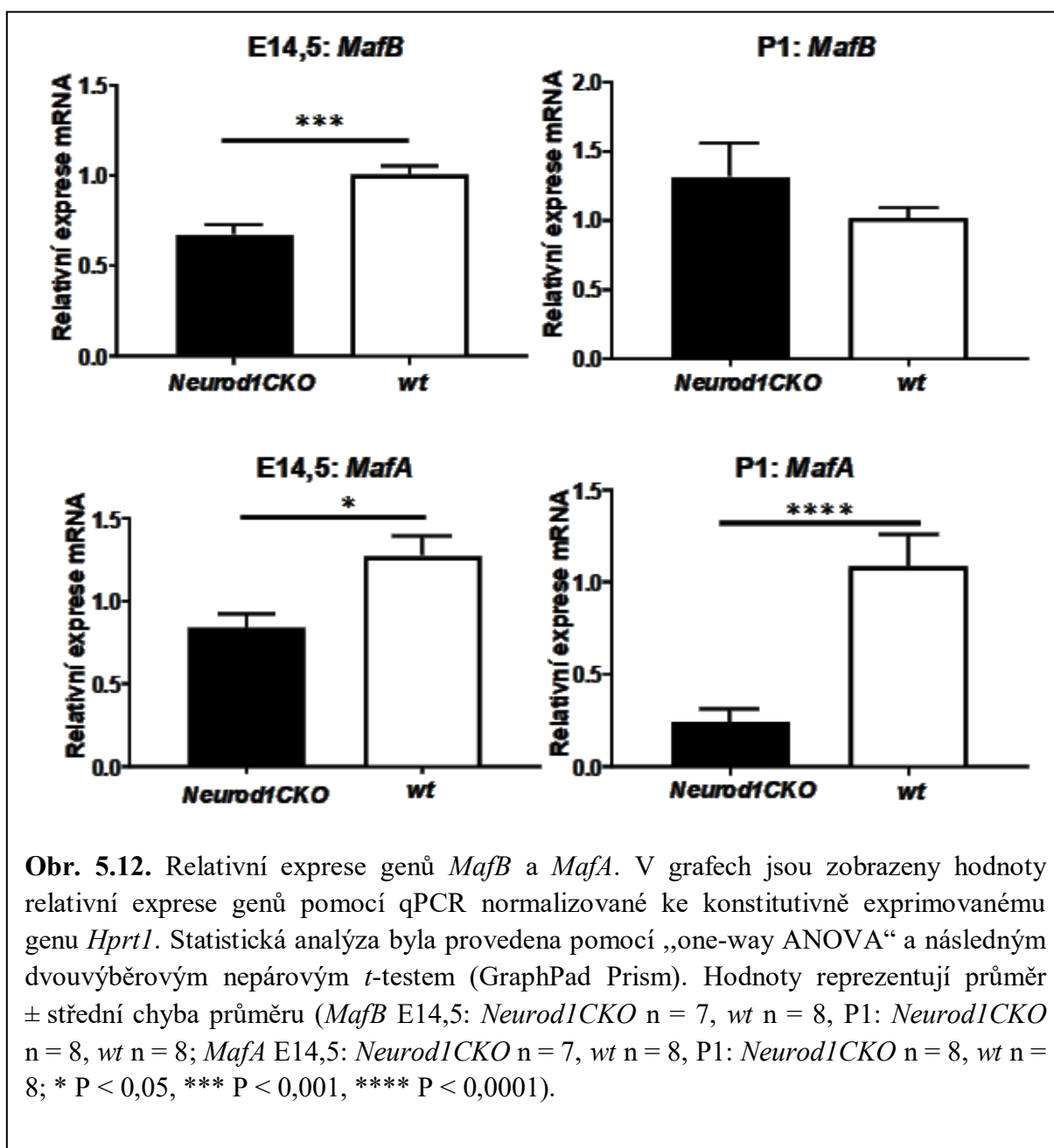
PTF1A je důležitý pro správný vývoj exokrinní části pankreatu (Krapp et al 1998). Relativní exprese genu *Ptf1a* je zobrazena v grafech na obrázku 5.13. V E14,5 i v P1 množství mRNA u mutantů bylo sníženo v porovnání s *wt*, v P1 šlo o změnu statisticky významnou.



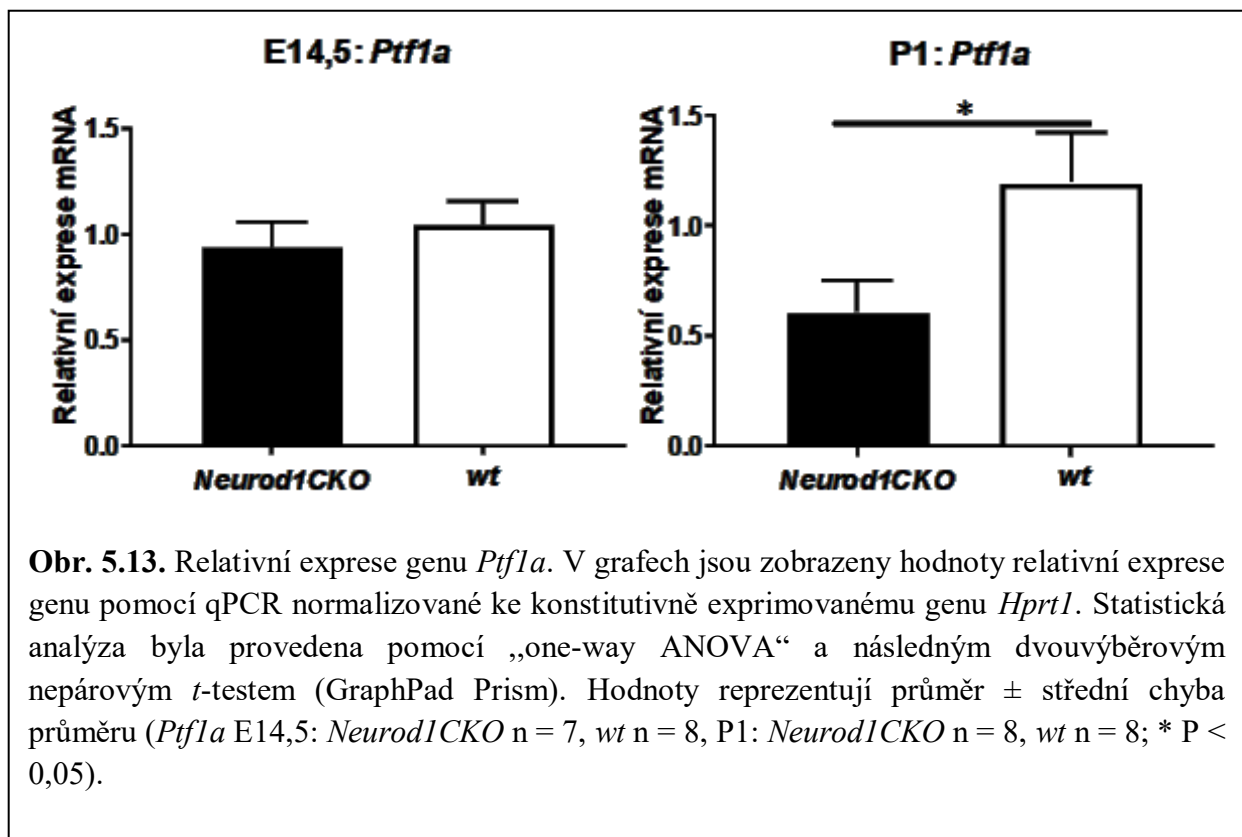
Obr. 5.10. Relativní exprese genů *Pdx1*, *Neurog3* a *Pax6*. V grafech jsou zobrazeny hodnoty relativní exprese genů pomocí qPCR normalizované ke konstitutivně exprimovanému genu *Hprt1*. Statistická analýza byla provedena pomocí „one-way ANOVA“ a následným dvouvýběrovým nepárovým *t*-testem (GraphPad Prism). Hodnoty reprezentují průměr ± střední chyba průměru (*Pdx1* E14,5: *Neurod1CKO* n = 7, *wt* n = 8, P1: *Neurod1CKO* n = 8, *wt* n = 8; *Neurog3* E14,5: *Neurod1CKO* n = 7, *wt* n = 8, P1: *Neurod1CKO* n = 8, *wt* n = 8; *Pax6* E14,5: *Neurod1CKO* n = 7, *wt* n = 8, P1: *Neurod1CKO* n = 8, *wt* n = 8; * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001).



Obr. 5.11. Relativní exprese genů *Inzulín 1*, *Inzulín 2* a *Glukagon*. V grafech jsou zobrazeny hodnoty relativní exprese genů pomocí qPCR normalizované ke konstitutivně exprimovanému genu *Hprt1*. Statistická analýza byla provedena pomocí „one-way ANOVA“ a následným dvouvýběrovým nepárovým *t*-testem (GraphPad Prism). Hodnoty reprezentují průměr ± střední chyba průměru (*Inzulín 1* E14,5: *Neurod1CKO* n = 7, *wt* n = 8, P1: *Neurod1CKO* n = 8, *wt* n = 8; *Inzulín 2* E14,5: *Neurod1CKO* n = 7, *wt* n = 8, P1: *Neurod1CKO* n = 8, *wt* n = 8; *Glukagon* E14,5: *Neurod1CKO* n = 7, *wt* n = 8, P1: *Neurod1CKO* n = 8, *wt* n = 8; * P < 0,05, **** P < 0,0001).



Obr. 5.12. Relativní exprese genů *MafB* a *MafA*. V grafech jsou zobrazeny hodnoty relativní exprese genů pomocí qPCR normalizované ke konstitutivně exprimovanému genu *Hprt1*. Statistická analýza byla provedena pomocí „one-way ANOVA“ a následným dvouvýběrovým nepárovým *t*-testem (GraphPad Prism). Hodnoty reprezentují průměr \pm střední chyba průměru (*MafB* E14,5: *Neurod1CKO* n = 7, *wt* n = 8, P1: *Neurod1CKO* n = 8, *wt* n = 8; *MafA* E14,5: *Neurod1CKO* n = 7, *wt* n = 8, P1: *Neurod1CKO* n = 8, *wt* n = 8; * P < 0,05, *** P < 0,001, **** P < 0,0001).



6. Diskuze

6.1. Podmíněná delece *Neurod1* genu ovlivňuje funkci endokrinní tkáně pankreatu a postnatální přežívání

Tato práce byla zaměřena na analýzu tvorby a struktury pankreatických Langerhansových ostrůvků v unikátním modelu podmíněné delece transkripčního faktoru NEUROD1. Pro stanovení úlohy NEUROD1 během vývoje pankreatu a při zrání β -buněk byl použit *Isl1-Cre* k deleci floxovanému *Neurod1* genu a k vytvoření nové podmíněné mutantní delece *Neurod1*.

Transkripční faktor NEUROD1 je důležitý pro vývoj endokrinních buněk, diferenciaci a zachování buněk endokrinního pankreatu, včetně aktivace inzulinového genu. NEUROD1 je exprimován v nejčasnějších buněčných prekurzorech a předpokládá se, že se účastní regulace diferenciaci všech endokrinních buněk ve vyvíjejícím se pankreatu (Naya et al 1997, Naya et al 1995). U dospělých myši je NEUROD1 exprimován v buňkách endokrinního pankreatu, kde se podílí na regulaci sekrece inzulinu v β -buňkách (Goebbels et al 2005). Bylo ukázáno, že *Neurod1* gen je nezbytný pro zachování funkčnosti myších β -buněk (Gu et al 2010). Globální delece *Neurod1* je postnatálně letální v důsledku těžké hyperglykémie, kdy myši umírají do 3 – 5 dnů po narození (Naya et al 1997). Homozygotní myši mají po cíleném narušení *Neurod1* genu snížený počet diferencovaných α - a β -buněk a dochází k selhání tvorby ostrůvků (Naya et al 1997). Přesto role NEUROD1 v jednotlivých fázích vývoje endokrinních buněk pankreatu včetně postnatální fáze vývoje není stále objasněna. Z důvodu postnatální letality globální *Neurod1* delece je nezbytné generovat podmíněné delece *Neurod1* genu.

Pro tuto práci byli použiti mutanti s podmíněnou delecí *Neurod1* (*Neurod1CKO*), kteří byli vytvořeni pomocí *Islet1-Cre*^{+/-} myšního kmene. *Islet1-Cre*^{+/-} myši mají vložené *Cre* do endogenního *Isl1* lokusu, nahrazující endogenní *Isl1* ATG (Yang et al 2006). *Islet1-Cre*^{+/-} myší linie má tedy aktivní pouze jednu alelu *Isl1* genu. Naše výsledky společně s publikovanými výsledky jiných laboratoří ukazují, že tato haploinsuficience *Isl1* genu neovlivňuje vývoj ani funkci endokrinní tkáně pankreatu. Transkripční faktor ISL1 je nezbytný pro diferenciaci endokrinních prekurzorových buněk během vývoje dorsálního pankreatu v primární přeměně od E9, protože buněčná diferenciaci selhává ve vyvíjejícím se dorsálním pankreatu u myši s deletovaným *Isl1* (Ahlgren et al 1997). ISL1 je také důležitý pro vývoj pankreatu během sekundární přeměny, ve které endokrinní buňky proliferují, diferencují a zrají (Du et al 2009). Kromě toho je ISL1 nezbytný pro udržování funkčnosti

všech hormon produkujících buněk. ISL1 interaguje s NEUROD1 a váže se na inzulinový promotor, kde reguluje inzulinovou transkripci v β -buňkách (Ediger et al 2014).

Neurod1CKO myši byly vzhledově nerozeznatelné od kontrolních *wt* jedinců. V prvním týdnu postnatálního vývoje však byla tělesná hmotnost mutantů výrazně snížena. Také byla významně zvýšená postnatální úmrtnost *Neurod1CKO* v porovnání s *wt* v prvním týdnu po narození. Pravidelná měření glukózy v krvi v prvních čtyřech týdnech po narození ukázala, že *Neurod1CKO* myši krmené dle libosti byly hyperglykemické ve srovnání s kontrolami. Výsledky měření glukózy v krvi naznačuje problémy s funkcí β -buněk. Tyto první analýzy ukazují variabilitu fenotypu u *Neurod1CKO* mutantů. Tato variabilita může být způsobena použitím Cre-loxP systému. Produkované fenotypy jsou často ovlivněny kombinačními účinky nástupu Cre exprese a účinnou rekombinací, které způsobují nepravidelnosti a variabilitu mezi jednotlivci a výslednými fenotypy.

6.2. *Neurod1* je nezbytný pro tvorbu Langerhansových ostrůvků

Myši Langerhansovy ostrůvky mají většinu inzulin produkujících β -buněk v centru ostrůvků, zatímco ostatní buňky endokrinního pankreatu jsou rozmístěny na okraji ostrůvků. Langerhansovy ostrůvky *Neurod1CKO* mutantů takto formovány nebyly. Při porovnávání exokrinní tkáně pankreatu s tkání endokrinní byly ukázány změny v rozmístění α - a β -buněk v ostrůvcích u *Neurod1CKO* ve srovnání s *wt*. U *wt* byly glukagon produkující α -buňky rozmístěné na okraji ostrůvků, zatímco u mutantů byly α -buňky rozmístěné i v centru ostrůvků. Mimo změny ve struktuře ostrůvků bylo také detekováno významné snížení endokrinní tkáně pankreatu u *Neurod1CKO* v embryonálním věku E17,5. Od E17,5 je exprese NEUROD1 omezena na buňky endokrinního pankreatu, kde aktivuje inzulinový promotor v β -buňkách a promotor glukagonu v α -buňkách (Dumonteil et al 1998, Naya et al 1997). Podobná abnormální morfogeneze Langerhansových ostrůvků s velkým snížením β -buněčné masy byla ukázána u myši s globální delecí *Neurod1* genu (Huang et al 2002, Naya et al 1997). Tyto změny byly pozorované u embryí ve věku E17,5. Naše data potvrzují, že NEUROD1 je nepostradatelný pro správný vývoj endokrinního pankreatu.

6.3. Delece *Neurod1* ovlivňuje proliferaci endokrinních pankreatických buněk

Apoptóza může být vyvolána abnormální diferenciací buněk během embryonálního vývoje. Je známo, že NEUROD1 je důležitý v procesu diferenciaci buněk Langerhansových ostrůvků, proto byla zkoumána apoptóza u mutantů s delecí *Neurod1* genu. Studie Naya et al. (1997) ukázala, že u myši s globální delecí *Neurod1* dochází od E17,5 k zvýšené buněčné smrti u buněk endokrinního pankreatu, kde je masivní apoptóza nejvíce patrná u β -buněk.

Tyto výsledky se neshodují s výsledky u našich *Neurod1CKO* mutantů, kde nebyla detekována žádná masivní apoptóza ostrůvkových buněk v E17,5 ani v P0. V některých ostrůvcích byly pozorovány pouze ojedinělé apoptotické buňky. Počet apoptických buněk u mutantů byl srovnatelný s výsledky u kontrolních *wt* jedinců. Tyto výsledky jasně ukazují, že apoptóza není mechanismem vedoucím ke sníženému počtu endokrinních buněk pankreatu u *Neurod1CKO*.

Dalším možným mechanismem, který by mohl ovlivnit množství pankreatické endokrinní tkáně je proliferace. Naše analýzy proliferace glukagon a inzulin produkujících buněk naznačuje, že u mutantů byl tento proces negativně ovlivněn. U *Neurod1CKO* mutantů byla snižená proliferace jak glukagon, tak i inzulin produkujících buněk. Výsledky však nebyly statisticky významné, pravděpodobně to bylo z důvodu použití malého množství testovaných vzorků. Pro ověření hypotézy, že delece *Neurod1* ovlivňuje proliferaci endokrinních buněk v pankreatu, bude nutné analyzovat větší množství vzorků. Naše data nicméně ukazují, že delece *Neurod1* vede k dysfunkčnímu vývoji a ztrátě endokrinních buněk a tedy, že NEUROD1 je nezbytnou součástí sítě transkripčních faktorů pro diferenciaci funkčních endokrinních buněk z prekurzorů (Murtaugh 2007)*.

6.4. NEUROD1 ovlivňuje vývoj pankreatu již během stádia sekundární přeměny

Naše výsledky ukazující, že nedochází k apoptóze a že počet β -buněk je významně snížen v *Neurod1CKO* pankreatu v E17,5, se liší od závěrů, že se pankreas u myši bez *Neurod1* vyvíjí beze změny až do E17,5 (Naya et al 1997). Pro ověření hypotézy, že změny ve vývoji pankreatu v důsledku delece *Neurod1* začínají před E17,5, byly provedeny další analýzy vývoje pankreatu zaměřené na stádium sekundární přeměny, tedy předcházející E17,5. Byl vybrán embryonální věk E14,5 v kterém jsou již detekovatelné plně diferencované β -buňky endokrinního pankreatu (Pictet et al 1972). Byla použita metoda qPCR pro kvantitativní zhodnocení molekulárních změn na úrovni mRNA. Zkoumané geny byly vybrány s ohledem na jejich funkci ve vývoji pankreatu. Kromě věku E14,5 byly provedeny další qPCR analýzy ve věku P1.

Relativní exprese *Neurod1* potvrdila funkčnosti delece *Neurod1* genu u *Neurod1CKO* mutantů. U *Neurod1* genu byla exprese mRNA snížena o polovinu u *ht* v porovnání s *wt*, u *Neurod1CKO* pak bylo snížení exprese ještě větší, o 75 %. *Neurod1CKO* mutanti měli aktivní pouze jednu alelu *Isl1*, tomu odpovídalo statisticky významné snížení exprese *Isl1* u *Neurod1CKO* mutantů.

Transkripční faktor PDX1 je prekurzorem všech buněčných typů pankreatu a v dospělosti je pak jeho exprese omezena pouze na β -buňky (Gu et al 2002, Ohlsson et al 1993). U obou studovaných věků bylo pozorováno statisticky významné snížení exprese *Pdx1* u *Neurod1CKO* mutantů. Snížení exprese *Pdx1*, jako prekurzoru pankreatických buněk, se podílí na snížení exprese ostatních genů účastnících se formování dílčích částí pankreatu. Tomu také odpovídalo výsledné snížení funkční tkáně a zejména β -buněk u *Neurod1CKO* jedinců v porovnání s kontrolními jedinci.

NEUROG3 je během vývoje pankreatu exprimován v buňkách, které jsou prekurzory buněk endokrinní části pankreatu. Buňky s expresí NEUROG3 byly detekovány také v dospělém pankreatu (Gu et al 2002). Množství mRNA *Neurog3* bylo statisticky významně sníženo u *Neurod1CKO* mutantů v E14,5. Nedostatečná tvorba transkripčního faktoru NEUROG3 může souviset se sníženým množstvím endokrinních prekurzorů u *Neurod1CKO* mutantů.

Během vývoje pankreatu je PAX6 přítomen ve všech buňkách endokrinního pankreatu. V dospělém pankreatu je PAX6 důležitý pro diferenciaci zralých glukagon produkujících α -buněk (Sander et al 1997, St-Onge et al 1997). U obou studovaných věků bylo pozorováno statisticky významné snížení exprese *Pax6* u *Neurod1CKO* mutantů. Snížená exprese *Pax6* může opět souviset s menším množstvím endokrinní tkáně.

Inzulín produkovaný β -buňkami zajišťuje vstup glukózy do buněk a tím její využití tkáněmi. Myši mají dva geny pro inzulín, inzulín 1 a inzulín 2. NEUROD1 reguluje přímo expresi pouze *Inzulín 1* genu (Cordell et al 1979, Fu et al 2013, Gu et al 2010)*. U obou genů byla u *Neurod1CKO* mutantů statisticky významně snížená exprese v E14,5 a v P1 byla téměř nulová. Množství mRNA *Inzulínu 2* bylo sníženo o 50 % a exprese *Inzulínu 1* byla snížena o 75 % v E14,5, pravděpodobně z důvodu, že jeho expresi reguluje přímo NEUROD1. U myši s delecí *Neurod1* mimo jiné také dochází ke špatnému fungování β -buněk (Naya et al 1997), tomu pak odpovídá snížená produkce inzulínu. Výsledky korespondují s redukcí endokrinní tkáně pankreatu u *Neurod1CKO* jedinců, testované při porovnání exokrinní tkáně s tkání endokrinní.

Glukagon, který je produkován α -buňkami, podněcuje produkci glukózy z jater při poklesu hladiny glukózy v krvi (Ikeda et al 1989). Množství mRNA *Glukagonu* bylo statisticky významně sníženo u *Neurod1CKO* mutantů v E14,5 a v P1 bylo téměř nulové. NEUROD1 aktivuje glukagonový promotor (Dumonteil et al 1998), jeho delece pravděpodobně tedy přispívá i ke snížení produkce glukagonu. Výsledky opět odpovídají snížené ploše endokrinní tkáně pozorované u *Neurod1CKO* myši.

Během vývoje pankreatu je *MafB* exprimován v α - a β -buňkách (Nishimura et al 2006), tomu odpovídalo snížení exprese *MafB* u *Neurod1CKO* mutantů v E14,5. Exprese *MafB* je poté převážně omezena na diferencované α -buňky (Nishimura et al 2006). Množství mRNA *MafB* v P1 bylo nezměněno u *Neurod1CKO* v porovnání s *wt*.

Buňky pozitivní na inzulín exprimující *MafA* jsou detekovatelné od E13,5. K diferenciaci β -buněk dochází prostřednictvím přepnutí exprese *MafB* na *MafA*. Transkripční faktor MafA je pak v dospělých β -buňkách důležitý pro jejich správnou funkčnost a reguluje jejich přežití (Nishimura et al 2006). U obou studovaných věků bylo pozorováno statisticky významné snížení exprese *MafA* u *Neurod1CKO* mutantů, které opět odpovídalo snížení počtu β -buněk.

Transkripční faktor PTF1 je důležitý pro správný vývoj exokrinní části pankreatu (Krapp et al 1996). V E14,5 i P1 bylo množství mRNA *Ptfla* u *Neurod1CKO* mutantů sníženo. Snížení exprese *Ptfl* naznačuje, že nejenom vývoj endokrinní tkáně je ovlivněn *Neurod1* delecí, ale také vývoj exokrinní části pankreatu. Další experimenty musí ukázat, zda se jedná o přímý vliv anebo nepřímý v důsledku abnormalit ve vývoji endokrinní tkáně.

7. Souhrn

Tato práce byla zaměřena na studium funkční role NEUROD1 ve vývoji pankreatu.

V rámci této diplomové práce bylo zjištěno:

- Mutanti s delecí *Neurod1* pomocí *Isl1-Cre* (*Neurod1CKO*) měli sníženou schopnost přežití po narození (37 %), jinak ale byli bez známek změn externího fenotypu v porovnání s *wt* jedinci. *Neurod1CKO* myši měly průměrnou hmotnost o 9 % nižší než u *wt*. Měřením glukózy v krvi během prvních čtyřech týdnů po narození bylo zjištěno, že *Neurod1CKO* mutanti byli hyperglykemičtí.
- U *Neurod1CKO* mutantů byla zjištěna abnormální morfogeneze Langerhansových ostrůvků a celkové snížení endokrinní tkáně pankreatu v E17,5 a P0 v porovnání s *wt*.
- Delece *Neurod1* pravděpodobně ovlivňuje proliferaci endokrinních buněk pankreatu. U *Neurod1CKO* jedinců v porovnání s *wt* je patrný trend snížené proliferace α - a β -buněk v E17,5.
- U *Neurod1CKO* mutantů nedochází k masivní apoptóze buněk endokrinní části pankreatu v E17,5 ani v P0. Byly detekovány ojedinělé apoptotické buňky srovnatelně jak u *Neurod1CKO* tak i u *wt*.
- NEUROD1 ovlivňuje vývoj pankreatu již během stádia sekundární přeměny v E14,5. Pomocí qPCR bylo zjištěno, že *Neurod1* delece ovlivňuje expresi genů sloužících jako markery endokrinního pankreatu (*Pdx1*, *Neurog3*, *Pax6*), genů hormonů produkujících endokrinními buňkami (*Inzulín 1*, *Inzulín 2*, *Glukagon*), genů důležitých pro diferenciaci endokrinních buněk (*MafA*, *MafB*) a genu potřebného pro vývoj exokrinního pankreatu (*Ptf1a*).
- Tyto výsledky ukazují, že NEUROD1 ovlivňuje vývoj pankreatu již během sekundární přeměny, a že ztráta endokrinních buněk není v důsledku apoptózy během stádia dozrávání endokrinní tkáně, ale z důvodů abnormálního vývoje a produkce endokrinních prekurzorů.

Seznam použité literatury

- Adrian TE, Bloom SR, Bryant MG, Polak JM, Heitz PH, Barnes AJ. 1976. Distribution and release of human pancreatic polypeptide. *Gut* 17: 940-44
- Ahlgren U, Jonsson J, 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, Pfaff SL, Jessell TM, Edlund T, Edlund H. 1997. Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature* 385: 257-60
- Ashery-Padan R, Zhou X, Marquardt T, Herrera P, Toubé L, et al. 2004. Conditional inactivation of Pax6 in the pancreas causes early onset of diabetes. *Dev Biol* 269: 479-88
- Baeyens L, De Breuck S, Lardon J, Mfopou JK, Rooman I, Bouwens L. 2005. In vitro generation of insulin-producing beta cells from adult exocrine pancreatic cells. *Diabetologia* 48: 49-57
- Batterham RL, Le Roux CW, Cohen MA, Park AJ, Ellis SM, et al. 2003. Pancreatic polypeptide reduces appetite and food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 3989-92
- Boutin C, Hardt O, de Chevigny A, Core N, Goebbels S, et al. 2010. NeuroD1 induces terminal neuronal differentiation in olfactory neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 1201-6
- Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, Hirshberg B, et al. 2005. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* 53: 1087-97
- Bruning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Horsch D, et al. 1998. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell* 2: 559-69
- Collombat P, Hecksher-Sorensen J, Serup P, Mansouri A. 2006. Specifying pancreatic endocrine cell fates. *Mech Dev* 123: 501-12
- Cordell B, Bell G, Tischer E, DeNoto FM, Ullrich A, et al. 1979. Isolation and characterization of a cloned rat insulin gene. *Cell* 18: 533-43
- Du A, Hunter CS, Murray J, Noble D, Cai CL, et al. 2009. Islet-1 is required for the maturation, proliferation, and survival of the endocrine pancreas. *Diabetes* 58: 2059-69
- Dumonteil E, Laser B, Constant I, Philippe J. 1998. Differential regulation of the glucagon and insulin I gene promoters by the basic helix-loop-helix transcription factors E47 and BETA2. *J Biol Chem* 273: 19945-54
- Ediger BN, Du A, Liu J, Hunter CS, Walp ER, et al. 2014. Islet-1 Is essential for pancreatic beta-cell function. *Diabetes* 63: 4206-17
- Freychet L, Rizkalla SW, Desplanque N, Basdevant A, Zirinis P, et al. 1988. Effect of intranasal glucagon on blood glucose levels in healthy subjects and hypoglycaemic patients with insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1: 1364-6
- *Fu Z, Gilbert ER, Liu D. 2013. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev* 9: 25-53
- Gao Z, Ure K, Ables JL, Lagace DC, Nave KA, et al. 2009. Neurod1 is essential for the survival and maturation of adult-born neurons. *Nat Neurosci* 12: 1090-2
- Goebbels S, Bode U, Pieper A, Funfschilling U, Schwab MH, Nave KA. 2005. Cre/loxP-mediated inactivation of the bHLH transcription factor gene NeuroD/BETA2. *Genesis* 42: 247-52
- Gosmain Y, Marthinet E, Cheyssac C, Guerardel A, Mamin A, et al. 2010. Pax6 controls the expression of critical genes involved in pancreatic {alpha} cell differentiation and function. *J Biol Chem* 285: 33381-93
- Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F. 2000. neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1607-11
- Gu C, Stein GH, Pan N, Goebbels S, Hornberg H, et al. 2010. Pancreatic beta cells require NeuroD to achieve and maintain functional maturity. *Cell Metab* 11: 298-310

- Gu G, Dubauskaite J, Melton DA. 2002. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 129: 2447-57
- Harper ME, Ullrich A, Saunders GF. 1981. Localization of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 4458-60
- Hermansen K, Christensen SE, Orskov H. 1979. Characterisation of somatostatin release from the pancreas: the role of calcium and acetylcholine. *Diabetologia* 16: 261-6
- Herrera PL. 2000. Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages. *Development* 127: 2317-22
- Herrera PL, Huarte J, Sanvito F, Meda P, Orci L, Vassalli JD. 1991. Embryogenesis of the murine endocrine pancreas; early expression of pancreatic polypeptide gene. *Development* 113: 1257-65
- Huang HP, Chu K, Nemoz-Gaillard E, Elberg D, Tsai MJ. 2002. Neogenesis of beta-cells in adult BETA2/NeuroD-deficient mice. *Mol Endocrinol* 16: 541-51
- Chan SJ, Keim P, Steiner DF. 1976. Cell-free synthesis of rat preproinsulins: characterization and partial amino acid sequence determination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73: 1964-8
- Chang L, Chiang SH, Saltiel AR. 2004. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol Med* 10: 65-71
- Ikeda T, Hoshino T, Honda M, Takeuchi T, Mokuda O, et al. 1989. Effect of glucagon on glucose output from bivascularly perfused rat liver. *Exp Clin Endocrinol* 94: 383-6
- Karlsson O, Thor S, Norberg T, Ohlsson H, Edlund T. 1990. Insulin gene 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: 879-82
- Kawaguchi Y, Cooper B, Gannon M, Ray M, MacDonald RJ, Wright CV. 2002. The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet* 32: 128-34
- *Kharroubi AT, Darwish HM. 2015. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J Diabetes* 6: 850-67
- Kondo S, Shinomura Y, Kanayama S, Kawabata S, Miyazaki Y, et al. 1993. Somatostatin inhibits gastrin-induced histamine secretion and synthesis in the rat. *Regul Pept* 48: 373-80
- Krapp A, Knofler M, Frutiger S, Hughes GJ, Hagenbuchle O, Wellauer PK. 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, et al. 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
- *Murtaugh LC. 2007. Pancreas and beta-cell development: from the actual to the possible. *Development* 134: 427-38
- Naya FJ, Huang HP, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo FJ, et al. 1997. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev* 11: 2323-34
- Naya FJ, Stellrecht CM, Tsai MJ. 1995. Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes Dev* 9: 1009-19
- Nelson-Piercy C, Hammond PJ, Gwilliam ME, Khandan-Nia N, Myers MJ, et al. 1994. Effect of a new oral somatostatin analog (SDZ CO 611) on gastric emptying, mouth to cecum transit time, and pancreatic and gut hormone release in normal male subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 78: 329-36
- Nishimura W, Kondo T, Salameh T, El Khattabi I, Dodge R, et al. 2006. A switch from MafB to MafA expression accompanies differentiation to pancreatic beta-cells. *Dev Biol* 293: 526-39
- Nolan C, Margoliash E, Peterson JD, Steiner DF. 1971. The structure of bovine proinsulin. *J Biol Chem* 246: 2780-95
- Ohlsson H, Karlsson K, Edlund T. 1993. IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *EMBO J* 12: 4251-9

- Patzelt C, Schiltz E. 1984. Conversion of proglucagon in pancreatic alpha cells: the major endproducts are glucagon and a single peptide, the major proglucagon fragment, that contains two glucagon-like sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 5007-11
- Peng SY, Wang WP, Meng J, Li T, Zhang H, et al. 2005. ISL1 physically interacts with BETA2 to promote insulin gene transcriptional synergy in non-beta cells. *Biochim Biophys Acta* 1731: 154-9
- Pictet RL, Clark WR, Williams RH, Rutter WJ. 1972. An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas. *Dev Biol* 29: 436-67
- Prado CL, Pugh-Bernard AE, Elghazi L, Sosa-Pineda B, Sussel L. 2004. Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2924-9
- Prasadan K, Daume E, Preuett B, Spilde T, Bhatia A, et al. 2002. Glucagon is required for early insulin-positive differentiation in the developing mouse pancreas. *Diabetes* 51: 3229-36
- Rukstalis JM, Habener JF. 2007. Snail2, a mediator of epithelial-mesenchymal transitions, expressed in progenitor cells of the developing endocrine pancreas. *Gene Expr Patterns* 7: 471-9
- Sander M, German MS. 1997. The beta cell transcription factors and development of the pancreas. *J Mol Med (Berl)* 75: 327-40
- Sander M, Neubuser A, Kalamaras J, Ee HC, Martin GR, German MS. 1997. Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. *Genes Dev* 11: 1662-73
- Shields BM, Hicks S, Shepherd MH, Colclough K, Hattersley AT, Ellard S. 2010. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): how many cases are we missing? *Diabetologia* 53: 2504-8
- *Slack JM. 1995. Developmental biology of the pancreas. *Development* 121: 1569-80
- Spooner BS, Walther BT, Rutter WJ. 1970. The development of the dorsal and ventral mammalian pancreas in vivo and in vitro. *J Cell Biol* 47: 235-46
- St-Onge L, Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Mansouri A, Gruss P. 1997. Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas. *Nature* 387: 406-9
- Thor S, Ericson J, Brannstrom T, Edlund T. 1991. The homeodomain LIM protein Isl-1 is expressed in subsets of neurons and endocrine cells in the adult rat. *Neuron* 7: 881-9
- Villasenor A, Chong DC, Cleaver O. 2008. Biphasic Ngn3 expression in the developing pancreas. *Dev Dyn* 237: 3270-9
- Villasenor A, Chong DC, Henkemeyer M, Cleaver O. 2010. Epithelial dynamics of pancreatic branching morphogenesis. *Development* 137: 4295-305
- *Wessels A, Sedmera D. 2003. Developmental anatomy of the heart: a tale of mice and man. *Physiol Genomics* 15: 165-76
- Yang L, Cai CL, Lin L, Qyang Y, Chung C, et al. 2006. Isl1Cre reveals a common Bmp pathway in heart and limb development. *Development* 133: 1575-85
- Zhang H, Wang WP, Guo T, Yang JC, Chen P, et al. 2009. The LIM-homeodomain protein ISL1 activates insulin gene promoter directly through synergy with BETA2. *J Mol Biol* 392: 566-77
- Zhou Q, Law AC, Rajagopal J, Anderson WJ, Gray PA, Melton DA. 2007. A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis. *Dev Cell* 13: 103-14
- Zhuang S, Zhang Q, Zhuang T, Evans SM, Liang X, Sun Y. 2013. Expression of Isl1 during mouse development. *Gene Expr Patterns* 13: 407-12

i

*sekundární zdroj