

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Reprodukční a vývojová biologie



**Bc. Jessica Malfatti**

Funkční role Islet1 ve vývoji pankreatu  
Functional role of Islet1 in pancreatic development

Diplomová práce

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

Praha, 2021

**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, 26.7. 2021

.....

Jessica Malfatti

## **Poděkování**

Největší poděkování bych ráda věnovala všem členům Laboratoře molekulární patogenetiky. Naučili mě vše od nejzákladnějších laboratorních metod, až po ty pokročilé, ale kromě toho mě dokázali naučit o věcech přemýšlet a vždy mě podpořili. Zejména děkuji své školitelce RNDr. Gabriele Pavlíkové, Ph. D. za přínosné konzultace a trpělivost. Dále děkuji Ing. Romaně Bohuslavové, Ph. D. a Mgr. Ondřeji Smolíkovi za skvělou pomoc při experimentální práci. V neposlední řadě děkuji své rodině a příteli, že při mně po celou dobu studia stáli.

## Abstrakt

*Diabetes mellitus* je onemocnění vyznačující se ztrátou a nefunkčností inzulín produkujících buněk vedoucí k hyperglykemií, která dlouhodobě škodí organismu. Pro budoucí možnou terapii je klíčové pochopení funkce jednotlivých faktorů účastnících se diferenciaci a maturace endokrinních buněk pankreatu. Cílem této práce bylo objasnit funkční roli ISL ve vývoji pankreatu. ISL1 je exprimován ve všech endokrinních buňkách Langerhansových ostrůvků, avšak stále není jasné, jakou má tento transkripční faktor funkci, a to především v časném pankreatogenezi. Globální delece *Isl1* genu je embryonálně letální, proto byl pro studium vývoje pankreatu použit modelový organismus s tkáňově specifickou delecí *Isl1* pomocí Cre-loxP systému. V této práci byl studován efekt delece *Isl1* v Neurod1-Cre pozitivních buňkách na strukturu Langerhansových ostrůvků, buněčné zastoupení endokrinních buněk a relativní expresi genů v časném embryonálním vývoji. Byla zjištěna defektní architektura ostrůvků spolu s postnatální absencí  $\alpha$ -buněk a snížená exprese genů důležitých pro specifikaci  $\alpha$  linie buněk a jejich následnou funkci. Sekundárním výstupem byla optimalizace protokolu pro efektivní sortování endokrinních buněk pomocí fluorescenční průtokové cytometrie, která v budoucnu umožní specifické molekulárně biologické analýzy. Pomocí tohoto myšího modelu byla prokázána důležitost ISL1 ve vývoji endokrinních buněk a v architektuře Langerhansových ostrůvků.

## Klíčová slova

Pankreas, *diabetes mellitus*, transkripční faktor ISL1, endokrinní buňky, myší model

## **Abstract**

*Diabetes mellitus* is characterized by the dysfunction and reduction of insulin-producing cells, resulting in hyperglycemia, which in long term harms the organism. For future therapy, it is crucial to understand the function of various factors participating in the differentiation and maturation of endocrine pancreatic cells. The aim of this study was to unravel the functional role of ISL1 during the development of the pancreas. ISL1 is expressed in all endocrine cells of the islets of Langerhans but its function remains unclear, especially during early pancreatogenesis. As the global deletion of this gene is embryonically lethal, we used the tissue specific deletion of *Isl1* in *Neurod1* positive cells using the Cre-loxP system. In this work we studied the effect of this deletion on the structure of islets of Langerhans, the formation of endocrine cell types and relative expression of genes during early pancreatic development. A defective architecture of islets together with postnatal absence of  $\alpha$ -cells was found in the *Isl1* deletion mutant. Also, the expression of genes important for the specification of  $\alpha$ -cell lineage and their subsequent function was decreased. The secondary outcome was the optimization of a protocol for effective sorting of endocrine cells using fluorescent flow cytometry, which will enable molecular biological analyses in the future. Using this mouse model the importance of ISL1 in development of endocrine cells and the architecture of Langerhans islets was demonstrated.

## **Key words**

Pancreas, *diabetes mellitus*, transcription factor ISL1, endocrine cells, mouse model

## Seznam zkratek

ARX	Aristaless related homeobox gene	„Aristaless related” homeoboxový gen
BMP	Bone morphogenetic protein	kostní morfogenetický protein
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CXCL12	C-X-C motif Chemokine Ligand 12	chemokinový ligand 12 s C-X-C motivem
DMSO	Dimethyl sulfoxide	dimethylsulfoxid
E	Embryonic day	embryonální den
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGTA	Ethylene glycol bis(2-aminoethyl ether) tetraacetic acid	kyselina ethylenglykol- di- (2-aminoethylether)-tetraoctová
ESC	Embryonic stem cells	embryonální kmenové buňky
f	Flox	flox
F	Forward	přímý
FACS	Fluorescence-activated cell sorting	buněčná separace pomocí průtokové cytometrie
FBS	Fetal bovine serum	fetální bovinní sérum
FEV	Fifth ewing variant protein	„fifth ewing variant protein”
GHRL	Ghrelin	ghrelin
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	hypoxantin fosforibosyltransferáza 1
ht	Heterozygous	heterozygot
iPSCs	Induced pluripotent stem cells	indukované pluripotentní kmenové buňky
ISL1	ISL LIM homeobox 1	ISL LIM homeoboxový gen 1

<i>Isl1</i> CKO	<i>Isl1</i> conditional knock-out	<i>Isl1</i> kondicionální knock-out
IRX	Iroquois Homeobox 1	iroquois homeoboxový gen 1
MAFA	Transcription factor MafA	transkripční faktor MafA
MAFB	Transcription factor MafB	transkripční faktor MafB
MODY	Maturity-onset diabetes of the young	diabetes s projevem v časně dospělosti
MPC	Multipotent progenitor cells	multipotentní progenitorové buňky
mRNA	Messenger ribonucleic acid	mediátorová ribonukleová kyselina
mt	Mutant	mutant
NaN <sub>3</sub>	Sodium azide	azid sodný
NEUROD1	Neuronal differentiation 1	neurogenní diferenciační faktor 1
NEUROG3	Neurogenin 3	neurogenin 3
P	Postnatal day	postnatální den
PAX4	Paired domain gene 4	párová doména transkripčního faktoru 4
PAX6	Paired domain gene 6	párová doména transkripčního faktoru 6
PBS	Phosphate-buffered saline	fosfátový pufr
PCR	Polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
PDX1	Pancreatic duodenal homeobox 1	pankreatický a duodenální homeoboxový gen 1
PEG10	Paternally expressed gene 10	paternálně exprimovaný gen 10
PFA	Paraformaldehyde	paraformaldehyd
POU3F4	POU class 3 homeobox 4	POU třída 3 homeoboxový gen 4
R	Reverse	zpětný
RT-qPCR	Quantitative real-time PCR	kvantitativní PCR v reálném čase

SDS	Sodium dodecyl sulfate	dodecylsulfát sodný
T1D	Type 1 <i>diabetes mellitus</i>	<i>diabetes mellitus</i> prvního typu
T2D	Type 2 <i>diabetes mellitus</i>	<i>diabetes mellitus</i> druhého typu
Wt	Wild type	„wild type“



# Obsah

1. Úvod.....	11
2. Přehled literatury.....	12
2.1. <i>Diabetes mellitus</i> .....	12
2.1.1. <i>Diabetes mellitus</i> prvního typu (T1D) .....	12
2.1.2. <i>Diabetes mellitus</i> druhého typu (T2D) .....	13
2.1.3. Monogenní <i>diabetes mellitus</i> .....	14
2.2. Moderní terapie a nové možnosti .....	15
2.3. Morfologie pankreatu.....	17
2.3.1. Langerhansovy ostrůvky.....	17
2.3.2. $\alpha$ -buňky .....	19
2.3.3. $\beta$ -buňky .....	20
2.4. Vývoj pankreatu .....	21
2.4.1. Primární tranzice.....	21
2.4.2. Sekundární tranzice.....	23
2.4.3. Terciální tranzice .....	23
2.5. Transkripční regulace.....	24
2.5.1. Role transkripčních faktorů a jejich důležitost během vývoje.....	24
2.5.2. PDX1.....	25
2.5.3. Neurogenin 3 (NEUROG3) .....	25
2.5.4. Neurogenní diferenciační faktor 1 (NEUROD1).....	26
2.5.5. „Fifth ewing variant protein” (FEV).....	26
2.5.6. „Aristaless related” homeoboxový gen ( <i>Arx</i> ) .....	26
2.5.7. PAX4.....	27
2.5.8. Transkripční faktory MAFA (MAFA) a MAFB (MAFB).....	28
2.5.9. ISL1.....	28
3. Cíle práce .....	30
4. Materiál a metody .....	31
4.1. Materiál .....	31
4.1.1. Modelový organismus.....	31
4.1.2. Chemikálie .....	33

4.1.3.	Enzymy .....	34
4.1.4.	Primery.....	34
4.1.5.	Protilátky.....	35
4.1.6.	Roztoky .....	35
4.1.7.	Komerční soupravy.....	36
4.1.8.	Přístroje.....	36
4.1.9.	Počítačové programy .....	37
4.2.	Metody .....	37
4.2.1.	Extrakce myších embryí .....	37
4.2.2.	Izolace DNA .....	37
4.2.3.	Rychlá DNA extrakce .....	37
4.2.4.	Polymerázová řetězová reakce.....	38
4.2.5.	Genotypizace.....	38
4.2.6.	Barvení hematoxylinem a eosinem.....	39
4.2.7.	Příprava vzorků pro imunohistochemické barvení .....	40
4.2.8.	Imunohistochemické barvení .....	40
4.2.9.	Příprava vzorků na průtokovou cytometrii .....	40
4.2.10.	Buněčná separace pomocí fluorescenční průtokové cytometrie (FACS).....	41
4.2.11.	Izolace RNA.....	42
4.2.12.	Reverzní transkripce.....	42
4.2.13.	Kvantitativní PCR v reálném čase (RT-qPCR).....	43
5.	Výsledky .....	45
5.1.	Fenotyp tkáňově specifické delece genu <i>Isl1</i> ( <i>Isl1</i> CKO).....	45
5.2.	Struktura Langerhansových ostrůvků .....	46
5.3.	Relativní exprese vybraných genů v E12,5.....	51
5.4.	Sortování endokrinních buněk Langerhansových ostrůvků pomocí fluorescenční průtokové cytometrie (Fluorescent Activated Cell Sorting, FACS).....	53
6.	Diskuze .....	56
7.	Závěr .....	59
	Seznam literatury .....	60

# 1. Úvod

*Diabetes mellitus* je jedním z nejčastějších onemocnění postihujících jak děti, tak dospělé. Navíc každým rokem počet lidí trpících diabetem roste. Například v České republice bylo evidováno přes 900 tisíc lidí s tímto onemocněním (World Health Organization, 2016). Vyznačuje se hyperglykémií způsobenou destrukcí  $\beta$ -buněk, poškozením sekrece inzulínu nebo sníženou senzitivitou buněk. Pacienti jsou často odkázáni na každodenní dodávání inzulínu, dodržování speciální diety, či užívání léků. Buněčná terapie pomocí *in vitro* diferencovaných  $\beta$ -buněk, případně celých Langerhansových ostrůvků by mohla být slibnou léčbou. Pro tento cíl je však nezbytné objasnit proces vývoje Langerhansových ostrůvků, diferenciaci jednotlivých typů buněk a zejména molekulární mechanismy, které se v nich figurují. Pro schopnost  $\beta$ -buněk správně odpovídat na hladinu glukózy v krvi je nutná jejich maturace, které napomáhají i ostatní buňky Langerhansova ostrůvku. ISL LIM homeoboxový gen 1 (ISL1) je důležitým faktorem účastnícím se vývoje pankreatu, který je exprimován ve všech endokrinních buňkách Langerhansova ostrůvku. Jeho funkční role však stále nebyla plně objasněna.

## 2. Přehled literatury

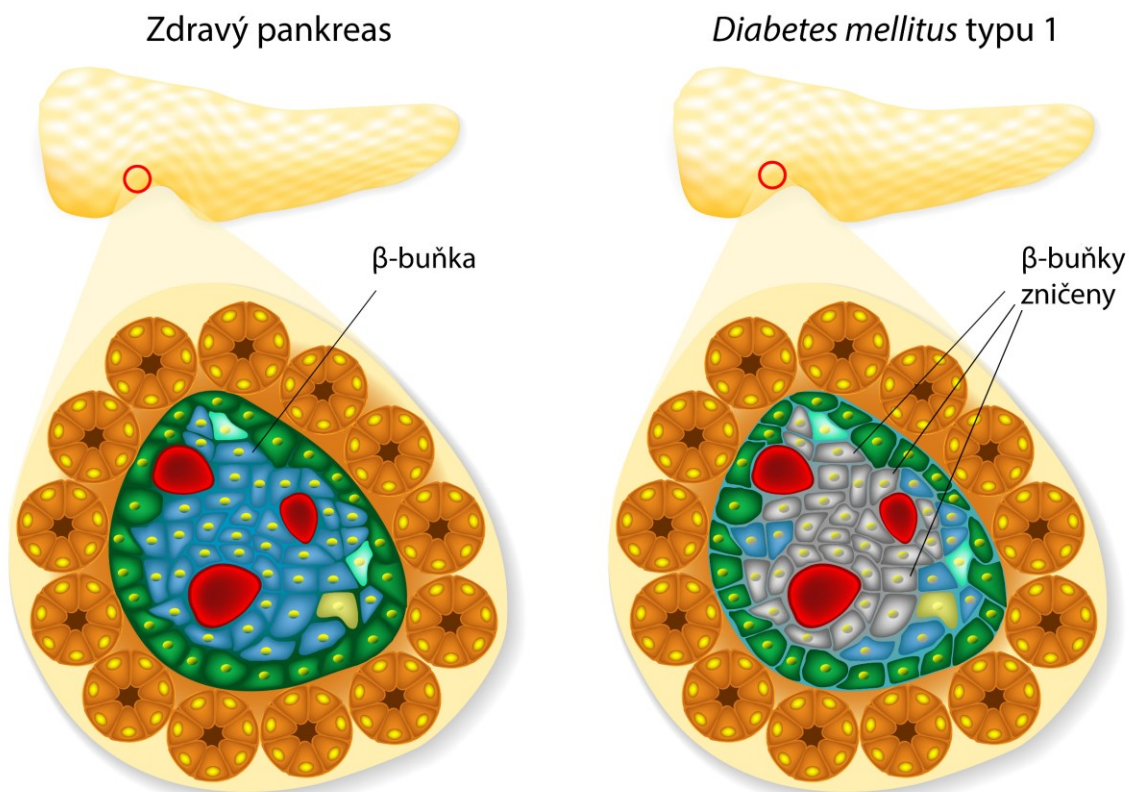
### 2.1. *Diabetes mellitus*

*Diabetes mellitus* je závažné onemocnění vyznačující se hyperglykemií, která v dlouhodobém měřítku poškozuje další orgány. K *diabetu mellitu* dochází poškozením sekrece inzulínu, absencí inzulín produkujících  $\beta$ -buněk či jejich sníženou senzitivitou odpovídat na hladinu glukózy v krvi (“Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.,” 2014). Příčin diabetu je mnoho, od autoimunitní destrukce  $\beta$ -buněk až po genetické mutace, a proto kategorizujeme *diabetes mellitus* do několika různých subtypů.

#### 2.1.1. *Diabetes mellitus prvního typu (T1D)*

Diabetes prvního typu se nejčastěji objevuje v dětství (Daneman, 2006)\*. Ve většině případů je způsoben autoimunitní destrukcí inzulín produkujících  $\beta$ -buněk a pacienti jsou proto po celý život závislí na externím dodávání inzulínu (Obr. 2.1). Často navíc trpí dalšími autoimunitními chorobami, například Graves-Basedowovou nemocí, myasthenií gravis nebo vitiligem.

## Langerhansovy ostrůvky



**Obr. 2.1:** Porovnání Langerhansova ostrůvku zdravého člověka a diabetika 1. typu. Modře jsou vyznačeny  $\beta$ -buňky u zdravého člověka, šedě destruované  $\beta$ -buňky u člověka trpícího T1D. Upraveno a převzato z (<https://www.diabetes-children.ca/en/type-1-diabetes/type-1-diabetes/>).

### 2.1.2. *Diabetes mellitus* druhého typu (T2D)

Diabetes druhého typu postihuje obvykle dospělé, u dětí není tak častý (Dabelea et al., 2014). Příčinou je nezdravý životní styl a obezita, jejichž důsledkem vzniká inzulínová rezistence (Druet et al., 2006; Ginsberg et al., 1975). Inzulín se váže na inzulínové receptory v membránách cílových buněk a zprostředkovává tak vstup glukózy do buněk, která je v nich poté využita jako zdroj energie. U T2D je inzulín produkován, ale cílové buňky na něj nedokáží odpovědět, a proto nedochází k dostatečnému využití glukózy. Z tohoto důvodu  $\beta$ -buňky produkují více inzulínu a následkem toho postupem času dochází k jejich dysfunkci či destrukci. Dojde ke snížení produkce inzulínu, což může v pozdější fázi onemocnění způsobit, že se pacienti stanou kompletně

závislými na dodávání inzulínu jako u T1D. U lidí trpících T2D je proto velmi důležitá speciální dieta, případně medikace pro zvýšení senzitivity buněk k inzulínu.

### **2.1.3. Monogenní *diabetes mellitus***

Monogenní diabetes je způsoben genetickými mutacemi. Dělí se na neonatální a „maturity-onset diabetes of the young” (MODY) podle věku pacientů. Neonatální je zjištěn hned u novorozenců, kdežto MODY se typicky projeví později ale do 25. roku života. Existuje velké množství MODY podle toho, který gen je poškozen. Ve většině případů se jedná o mutace v genech pro transkripční faktory, ale může to být i mutace genu pro glukokinázu (Bennett et al., 2011). Například u MODY4 dochází k mutaci v pankreatickém a duodenálním homeoboxovém genu 1 (*Pdx1*). MODY6 je způsoben mutací v neurogenním diferenciacním faktoru 1 (*Neurod1*), což je jeden z klíčových genů důležitých pro diferenciaci endokrinních buněk pankreatu (Staffers et al., 1997).

## 2.2. Moderní terapie a nové možnosti

V současnosti se léčba diabetu soustředí na srovnání hladiny glukózy v krvi pomocí dodávání inzulínu či dalších léků například na zvýšení senzivity buněk k inzulínu. To ale neobnovuje přirozenou funkci  $\beta$ -buněk, což znamená, že je pacient odkázán na doživotní léčbu. S nárůstem nových technologií se otevírají možnosti moderních terapií, které by optimálně mohly obnovit funkci a životnost  $\beta$ -buněk, a tak vyléčit diabetes úplně. Jedná se o genové terapie, buněčné terapie pomocí kmenových buněk, transdiferenciace, či různé metody pro podpoření proliferace.

V případě genových terapií se zkouší vložit inzulínový gen nebo *Pdx1* například do střevních, jaterních či svalových buněk. V případě inzerce *Pdx1* je cílem konvertovat jaterní buňky do inzulín produkujících  $\beta$ -buněk (H. Li et al., 2008; Shternhall-Ron et al., 2007). Inzerce inzulínového genu do střevních buněk zase způsobí, že začnou produkovat inzulín (Ahmad et al., 2012). Genové terapie jsou však velmi kontroverzním tématem současnosti, jelikož s sebou nesou velká rizika nádorového bujení (Anguela & High, 2019)\*.

Další možností jsou transdiferenciace, což znamená, že se jeden typ buněk přeprogramuje v jiný, v tomto případě v inzulín produkující  $\beta$ -buňky. Nejvhodnější jsou acinární a duktální buňky, jelikož mají společné prekurzory, tím pádem i některé transkripční faktory a transdiferenciace je jednodušší (Kim & Lee, 2016)\*. Dále se zkouší transdiferencovat glukagon produkující  $\alpha$ -buňky na  $\beta$ -buňky (Thorel et al., 2010). Tyto pokusy je ale velmi obtížné reprodukovat a aplikovat na člověka, jelikož stále zůstává mnoho neznámých interakcí a faktorů.

Výskyt kmenových buněk v endokrinní části slinivky je stále sporný, jelikož se v ní množí dělením především diferencované buňky (Tschen et al., 2009). Regenerace Langerhansových ostrůvků je proto velmi špatná. Možnost transplantace funkčních  $\beta$ -buněk má proto obrovský potenciál vyléčit diabetes, nebo alespoň pomoci pacientům tvořit vlastní inzulín a nebýt tak odkázáni na jeho každodenní dodávání. Transplantace slinivky či Langerhansových ostrůvků jsou již možné, ale množství dostupných orgánů je velmi omezené (Hering et al., 2005).

Slibnou metodou jsou buněčné terapie s využitím *in vitro* diferencovaných  $\beta$ -buněk, případně celých Langerhansových ostrůvků. Embryonální kmenové buňky (ESCs) jsou pluripotentní, to znamená, že je možné z nich diferencovat téměř všechny buněčné typy, včetně endokrinních buněk slinivky. Ovšem získání ESCs z embryí je s ohledem na etiku velmi kontroverzní. Využitím indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPSCs) je možné obejít nutnost imunokompatibility dárce a příjemce, jelikož lze vytvořit buněčnou terapii přímo na míru

pacientovi. Pacienti s darovanými ostrůvky totiž musí užívat imunosupresiva, jelikož by jejich imunitní systém darované ostrůvky zničil. Nabízí se také řešení pomocí mikroenkapsulace ostrůvků či  $\beta$ -buněk do speciálního materiálu, jež je ochrání před imunitním systémem, ale zároveň bude propustný pro kyslík, živiny a signální molekuly. Například pokusy enkapsulace  $\beta$ -buněk do polysacharidu alginátu v kombinaci s chemokinovým ligandem 12 s C-X-C motivem (CXCL12) značí slibné výsledky, jelikož chrání před útokem imunitního systému a transplantované štěpy přežívají (Alagpulinsa et al., 2019). V roce 2014 byl publikován protokol pro získání velkého počtu funkčních  $\beta$ -buněk schopných správně reagovat na glukózové stimuly (Pagliuca et al., 2014). Avšak již v této publikaci autoři zmiňují, že je to teprve začátek, jelikož maturovaným  $\beta$ -buněkám *in vivo* pomáhají i okolní buňky, například  $\alpha$ -buňky, naladit správnou senzitivitu pro optimální produkci inzulínu.

Všechny tyto moderní terapie představují nové možnosti pro léčbu diabetu, ale zároveň také ukazují, kolik toho ještě nebylo objasněno a jak je důležitý další výzkum vývoje a diferenciací jednotlivých buněk Langerhansových ostrůvků.



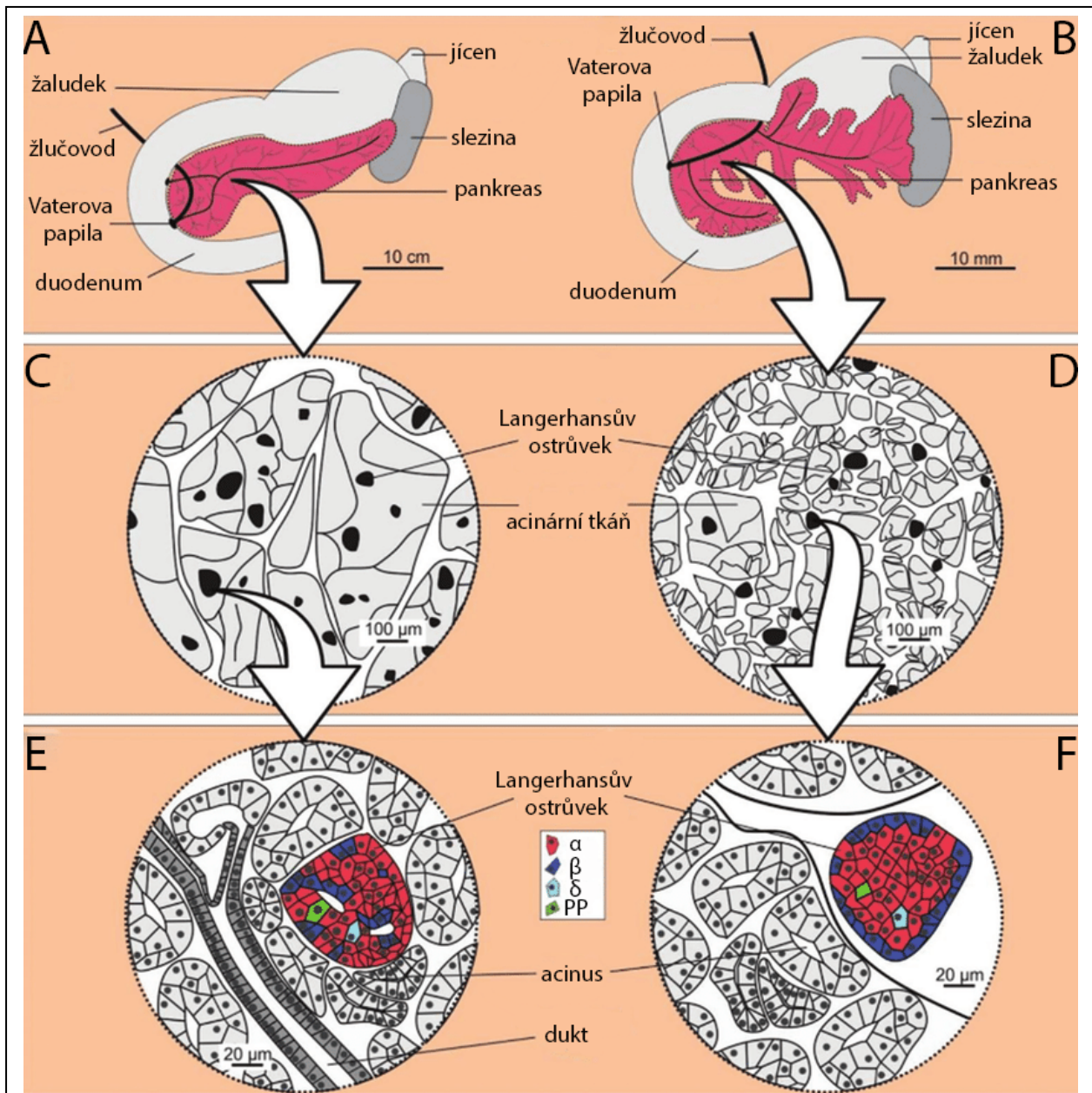
## 2.3. Morfologie pankreatu

Pankreas je jedním z orgánů trávicí soustavy. Nachází se pod žaludkem a ústí do duodena, do kterého vylučuje trávicí enzymy (Obr. 2.2). Až 95 % pankreatické tkáně je tvořeno acinárními a duktálními buňkami exokrinní části (Larsen & Grapin-Botton, 2017)\*. Acinární buňky produkují trávicí enzymy, například proteázy, lipázy a amylázy, ve formě inaktivních prekurzorů, které jsou aktivovány až v duodenu. Tam jsou dopraveny pomocí kanálků, které jsou tvořeny duktálními buňkami. Jen malou část tkáně pankreatu zaujímají endokrinní buňky. Je jich 5 typů a společně tvoří útvary zvané Langerhansovy ostrůvky.

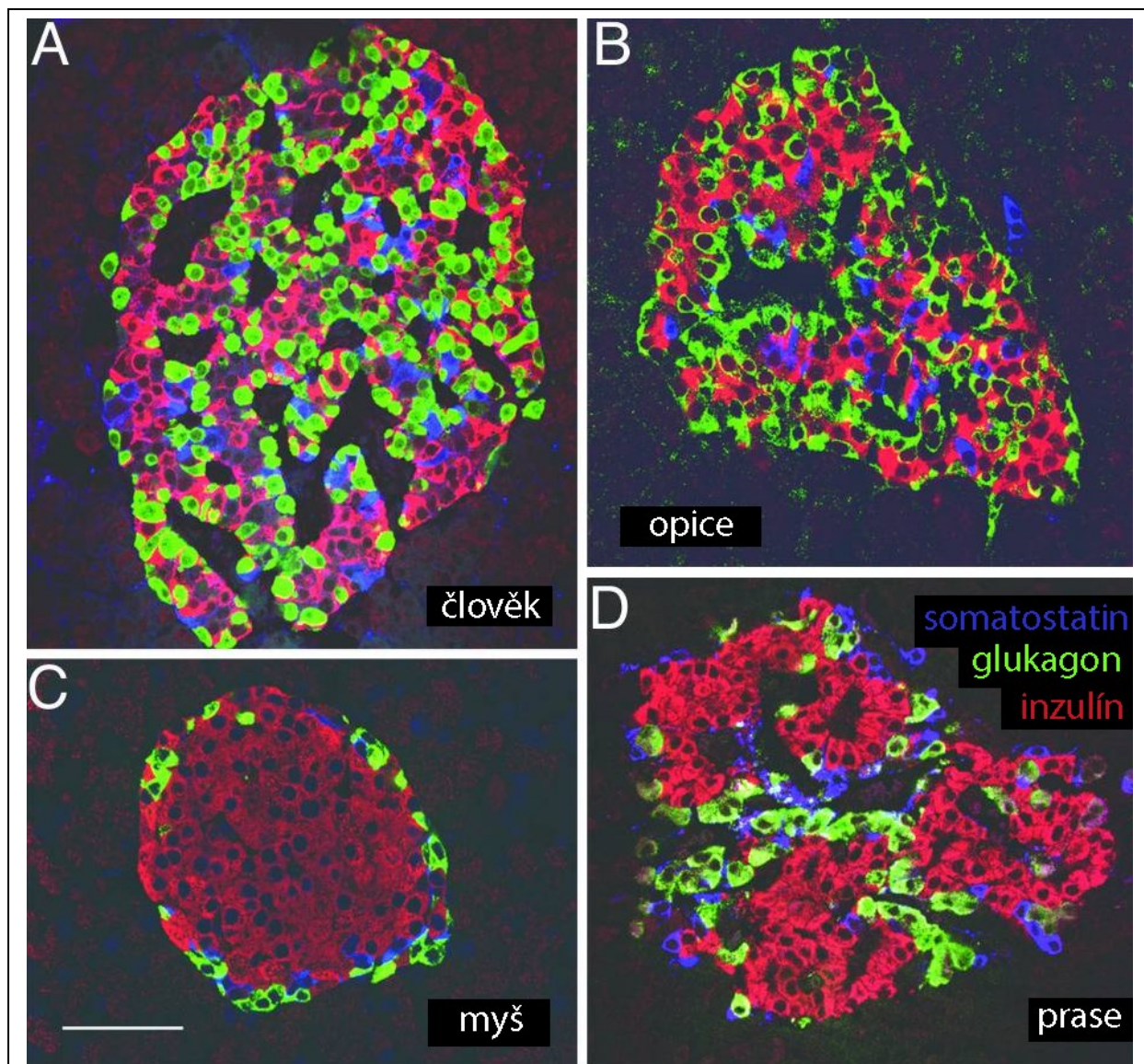
### 2.3.1. Langerhansovy ostrůvky

Langerhansovy ostrůvky obsahují zejména  $\alpha$ -buňky produkující glukagon a  $\beta$ -buňky produkující inzulin. Menší množství endokrinních buněk zastupují  $\delta$ -buňky produkující somatostatin,  $\epsilon$ -buňky produkující ghrelin a PP-buňky produkující pankreatický polypeptid. Ostrůvek je silně vaskularizován, aby se hormony dostaly do krevního řečiště. Samotná struktura ostrůvku je dána jeho postupným vývojem a procentuálním zastoupením jednotlivých buněk (Sharon et al., 2019). Jako první diferencují  $\alpha$ -buňky, a až o pár dní později  $\beta$ -buňky. To může být důvodem, proč se  $\alpha$ -buňky u myši nachází spíše na okrajích a  $\beta$ -buňky uvnitř ostrůvku.

U myši je tato struktura dobře viditelná, kdežto u člověka a dalších organismů, jako je například prase a opice, je ostrůvek komplexnější, složen z menších „poloostrůvků“ a zastoupení  $\alpha$ -buněk je značně vyšší (Obr. 2.3). Jednotlivé „poloostrůvky“ spolu během vývoje fúzí, což ve výsledku může způsobovat chaotické rozmístění buněk. V případě lidského ostrůvku existuje tzv. „sendvičová“ struktura, což znamená, že je vrstva  $\beta$ -buněk obklopena dvěma vrstvami  $\alpha$ -buněk (Bosco et al., 2010). To by mohlo zvyšovat kontakt mezi buňkami a zajišťovat lepší vaskularizaci. Myší pankreas je narozdíl od lidského více rozvětven (Obr. 2.2). Míra odlišnosti vývoje myšího pankreatu od lidského je velmi nízká a velká část *in vivo* studií je proto realizována právě na myším modelu, což je i předmětem této diplomové práce. Teoretický přehled literatury se z toho důvodu dále zaměřuje na vývoj pankreatu myši.



**Obr. 2.2:** Anatomie lidského a myšního pankreatu. Lidský pankreas (A), pankreatická tkáň (C) a struktura Langerhansova ostrůvku (E). Myší pankreas je oproti lidskému více větvený (B), acinární tkáň je znatelně menší (D), ale velikost Langerhansových ostrůvků je srovnatelná (F). Upraveno a převzato z (Dolenšek et al., 2015).



**Obr. 2.3:** Struktura Langerhansova ostrůvku u různých organismů. Typická struktura myšího ostrůvku s okrajem z glukagon produkujících  $\alpha$ -buněk (zeleně) a vnitřkem tvořeným inzulín produkujícími  $\beta$ -buňkami (červeně). Komplexnější struktura ostrůvku u člověka, opice a prasete. Měřítko 50  $\mu$ m. Upraveno a převzato z (Cabrera et al., 2006).

### 2.3.2. $\alpha$ -buňky

U myší jsou  $\alpha$ -buňky detekovány již v embryonálním dni 9,5 (E9,5) (Gradwohl et al., 2000). Produkují hormon glukagon, který je důležitý pro udržení správné hladiny glukózy v krvi (Sutherland & de Duve, 1948). Při hypoglykémii spouští glykogenolýzu, což je proces, při kterém je přeměňován jaterní glykogen na glukózu, a tím se hladina glukózy v krvi navyšuje. Také

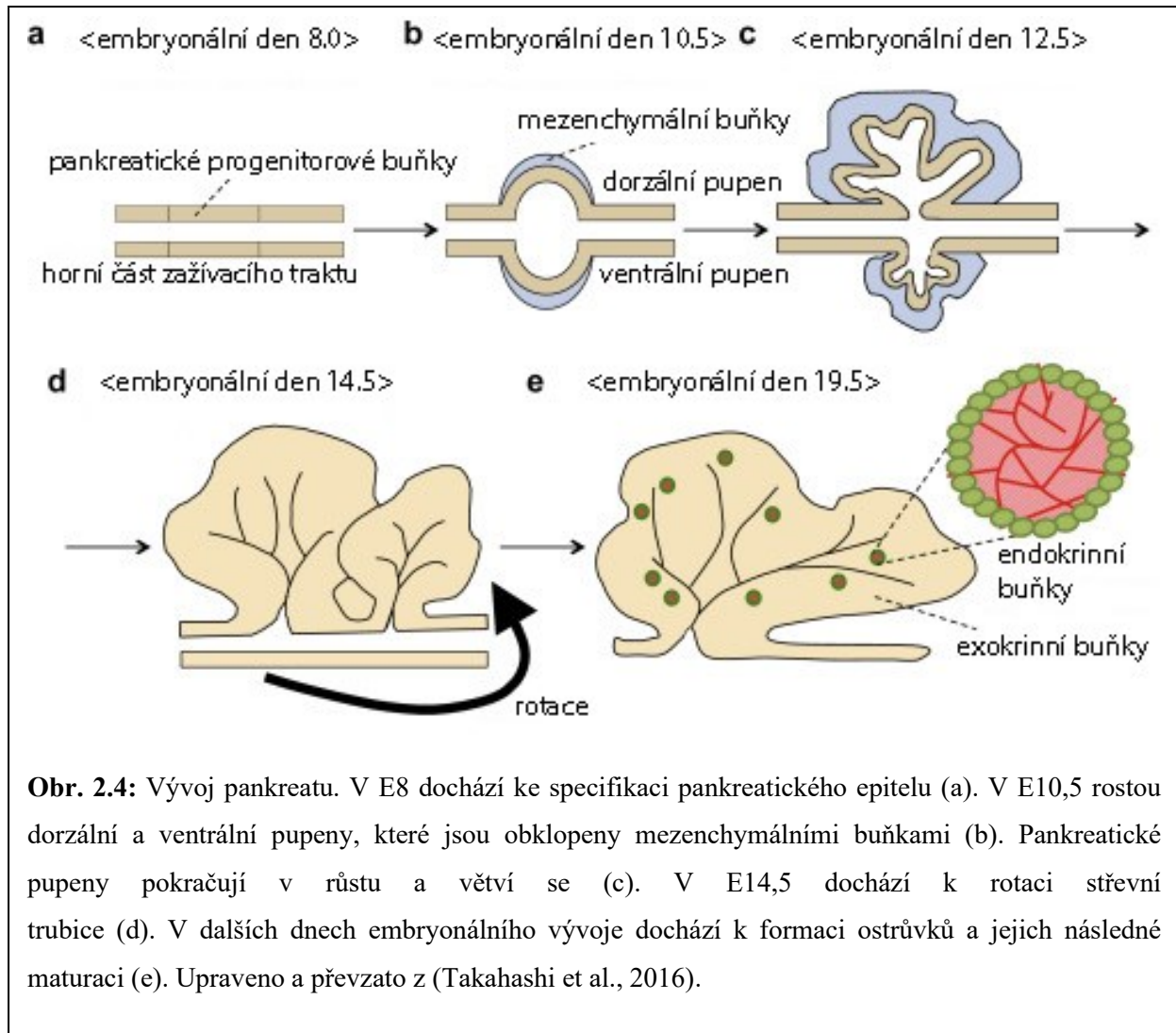
ovlivňuje glukoneogenezi, tedy syntézu glukózy z laktátu či aminokyselin. Má tedy opačnou funkci než inzulín. Sekrece glukagonu je závislá na vápenatých iontech, jelikož je zprostředkována  $\text{Ca}^{2+}$  dependentní exocytózou (Barg et al., 2000). Diferenciací buňky získávají unikátní vlastnosti, a proto každý typ buněk má své specifické markery. Všechny endokrinní buňky ostrůvků exprimují párovou doménu transkripčního faktoru 6 (PAX6) (Turque et al., 1994). Některé markery jsou specifické pouze pro  $\alpha$ -buňky. Paternálně exprimovaný gen 10 (PEG10), POU třída 3 homeoboxový gen 4 (POU3F4) a iroquois homeoboxový gen 1 (IRX1) patří mezi specifické markery  $\alpha$ -buněk (Byrnes et al., 2018; Heller et al., 2005; Petri et al., 2006).

### 2.3.3. $\beta$ -buňky

Nejpočetnější buňky Langerhansových ostrůvků jsou  $\beta$ -buňky. U myši jejich diferenciace začíná od E13,5 (Sharon et al., 2019). Tím však jejich vývoj nekončí, protože maturují až postnatálně. Produkuje hormon inzulín, který zajišťuje využití glukózy cílovými buňkami, které jsou na inzulínu závislé. Maturované  $\beta$ -buňky mají správně nastavenou citlivost produkce inzulínu. Inzulín sekretují v malém množství neustále. Jakmile však stoupne hladina glukózy v krvi, začnou  $\beta$ -buňky sekretovat více inzulínu, který zprostředkuje využití glukózy buňkami. Svalové a tukové buňky obsahují inzulínem regulované glukózové transportéry 4 (GLUT4), pomocí kterých dochází k transportu glukózy do cytosolu (James et al., 1988). Za normálního stavu se nachází uvnitř buňky, ale po inzulínovém stimulu jsou translokovány k plasmatické membráně, kde zprostředkovávají glukózový transport (Piper et al., 1991).

## 2.4. Vývoj pankreatu

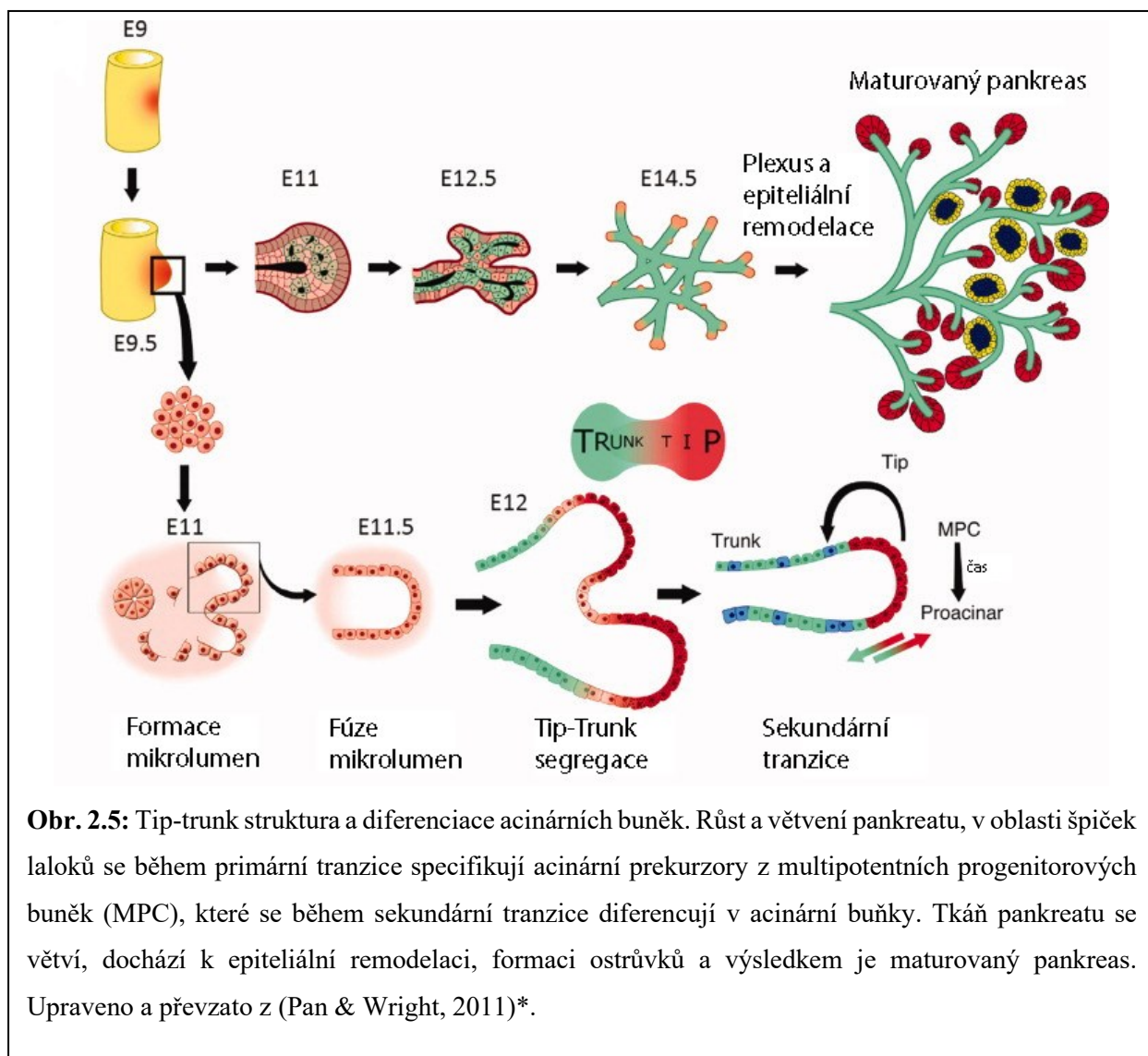
Vývoj pankreatu lze rozdělit do 3 fází; primární, sekundární a terciální tranzice. Během nich dochází ke vzniku pankreatických pupenů, diferenciaci prekurzorů v různé buněčné typy a formaci jednotlivých buněčných struktur, zejména Langerhansových ostrůvků (Obr. 2.4). Později dochází k buněčné maturaci vedoucí ke správné funkci a produkci hormonů a trávicích enzymů. Celý tento klíčový proces je řízen kombinací řady transkripčních faktorů a vnitřních i vnějších signálů.



### 2.4.1. Primární tranzice

Primární tranzice je období od E9,5 do E12,5 charakteristické vznikem pankreatických pupenů, počátečním větvením struktury a první diferenciací endokrinních buněk (Pan & Wright, 2011)\*. V E8,5 dochází ke specifikaci pankreatické domény v endodermu primitivní trávicí trubice. Tato

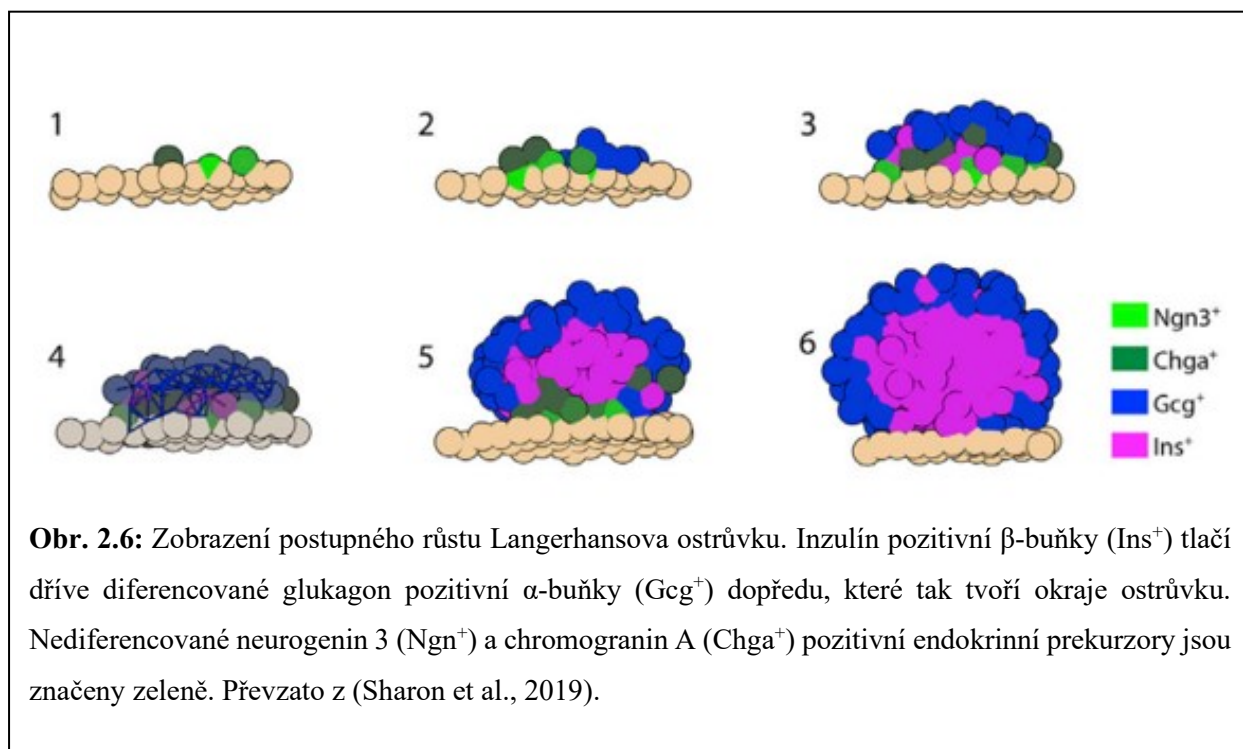
doména je dána expresí PDX1. Z té poté v E9,5 pučí dorzální a ventrální pankreatické pupeny. Důležitou signální roli hraje i okolní mezoderm a mezenchym, který větví se pupeny obklopuje. Expresí PDX1 je indukována mezodermem (Kumar et al., 2003). Mezenchym později ovlivňuje diferenciaci a je nezbytný pro správný vývoj pankreatu. Větví se pupeny zaujímají takzvanou tip-trunk strukturu, kde vrcholy výběžků (tip) jsou v kontaktu s okolním mezenchymem (Obr. 2.5). Ten podporuje diferenciaci v acinární prekurzory a inhibuje diferenciaci v endokrinní prekurzory (Z. Li et al., 2004). Naopak část vzdálenější od mezenchymu (trunk) se diferencuje v duktální a endokrinní buňky (Zhou et al., 2007). Pro primární tranzici je charakteristická zejména diferenciací endokrinních  $\alpha$ - a  $\epsilon$ -buněk (Heller et al., 2005). Ostatní endokrinní buňky jsou diferencovány až v období sekundární tranzice.



**Obr. 2.5:** Tip-trunk struktura a diferenciací acinárních buněk. Růst a větvení pankreatu, v oblasti špiček laloků se během primární tranzice specifikuji acinární prekurzory z multipotentních progenitorových buněk (MPC), které se během sekundární tranzice diferencují v acinární buňky. Tkáň pankreatu se větví, dochází k epiteliální remodelaci, formaci ostrůvků a výsledkem je maturovaný pankreas. Upraveno a převzato z (Pan & Wright, 2011)\*.

### 2.4.2. Sekundární tranzice

Období sekundární tranzice je od E12,5 do E16,5 a vyznačuje se masivní diferenciací buněk (Dassaye et al., 2016)\*. V této oblasti dochází k diferenciaci acinárních buněk, kdežto v trunčkové oblasti diferencují duktální a endokrinní buňky. V E14,5 jsou diferencovány inzulín produkující  $\beta$ -buňky a formují se Langerhansovy ostrůvky ve formě tzv. „proto-islets“, které dále rostou a mohou spolu i fúzovat (Sharon et al., 2019). Nově diferencované buňky vytlačují již dříve diferencované buňky dále do prostoru, čímž vzniká u myši typická struktura ostrůvku s  $\beta$ -buňkami uvnitř a okrajem z  $\alpha$ -buněk (Obr. 2.6).

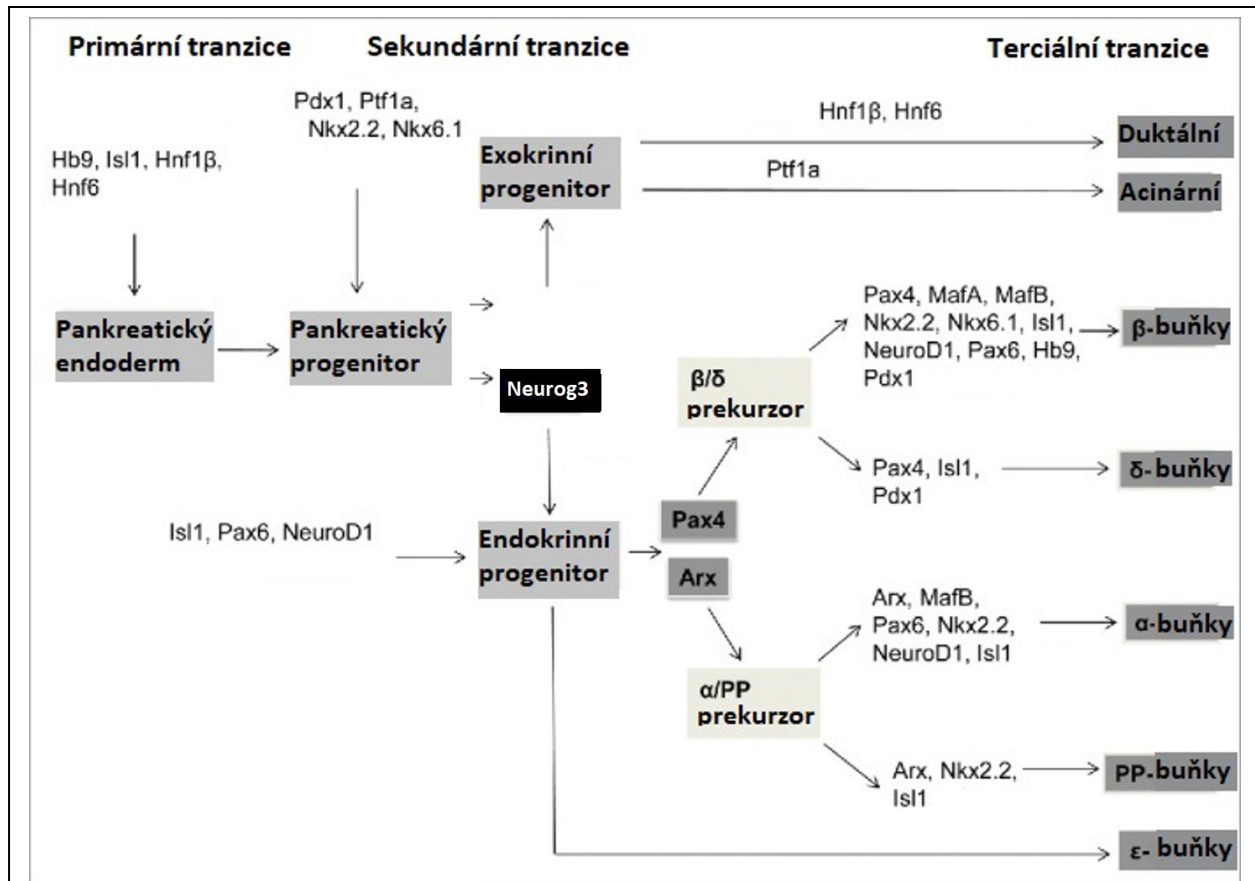


### 2.4.3. Terciální tranzice

Terciální tranzice je období u myši od E16,5 až do postnatálního období. Dochází k maturaci jednotlivých buněk a finální formaci Langerhansových ostrůvků. Ostrůvky se vyvíjí postupným růstem, kdy nově diferencované buňky vytlačují ty starší dále do prostoru (Obr. 2.6). Struktura ostrůvku je důležitá pro mezibuněčnou komunikaci, jelikož  $\alpha$ -buňky tímto způsobem přispívají ke správné funkci  $\beta$ -buněk (Sharon et al., 2019). Maturace  $\beta$ -buněk je důležitá pro optimální míru sekrece inzulínu po glukózovém stimulu. Struktura ostrůvku tedy ovlivňuje funkci buněk.

## 2.5. Transkripční regulace

Během vývoje pankreatu dochází k rozsáhlé diferenciaci progenitorových buněk na velmi specificky funkční buňky. Celý tento proces je regulován sítí transkripčních faktorů (Obr. 2.7).



**Obr. 2.7:** Schéma diferenciaci buněk pankreatu a zapojení jednotlivých transkripčních faktorů do diferenciačního procesu. Specifikace pankreatického endodermu a jednotlivých progenitorových buněk během primární tranzice. Expresí NEUROG3 dochází ke specifikaci endokrinních progenitorů a následné diferenciaci  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ - a PP-buněk v průběhu sekundární a terciální tranzice. Také probíhá diferenciaci duktálních a acinárních buněk z exokrinních progenitorů. Upraveno a převzato z (Dassaye et al., 2016)\*.

### 2.5.1. Role transkripčních faktorů a jejich důležitost během vývoje

Transkripční faktory ovlivňují transkripci genů, a jsou tedy nepostradatelné během vývoje a diferenciaci buněk. Dochází totiž k aktivaci nebo represi různých genů, což způsobuje, že z uniformních prekurzorů se diferencují naprosto odlišné buňky. Transkripční faktory mohou mít



funkci jednu a být specifické pro určitý typ buněk, nebo mohou mít funkcí více a působit v několika naprosto odlišných buňkách. Narušení exprese jednoho transkripčního faktoru může způsobit vážné následky a kompletně ovlivnit další osud dané buňky. S každým objevem nového transkripčního faktoru nebo nové funkce se posouváme dále k co nejbližšímu pochopení tohoto složitého mechanismu, který se v buňkách během vývoje odehrává. To nám může objasnit příčiny různých patologií, a ideálně je i pomoci léčit. Vývoje pankreatu se účastní nespočet transkripčních faktorů, ale jejich funkční role často ještě není plně známa. Také nejsou jasné molekulární mechanismy, kterými se buňky během diferenciací řídí.

### 2.5.2. PDX1

PDX1 je klíčovým faktorem pro vývoj pankreatu a později i pro funkci  $\beta$ -buněk. Je prvním specifikačním faktorem pankreatu, jelikož je exprimován v části primitivní střevní trubice, ze které později vyrůstají pankreatické pupeny. Při absenci či defektu v *Pdx1* genu dochází ke kompletní agenezi pankreatu, tedy pankreas se zastavuje ve vývoji (Stoffers et al., 1997). Během vývoje je PDX1 exprimován ve všech typech pankreatických buněk, jak v exokrinních, tak i v endokrinních prekurzorech. V maturovaných buňkách pankreatu je jeho exprese specifická pouze pro  $\beta$ -buňky, jelikož funguje jako regulátor exprese inzulinového genu (Ohlsson et al., 1993). PDX1 interaguje se Swi/Snf chromatin remodelujícím komplexem, který reguluje rozvolnění chromatinu, což umožní navázání PDX1 na enhancer inzulinového genu, a tak aktivuje jeho transkripci (Spaeth et al., 2019).

### 2.5.3. Neurogenin 3 (NEUROG3)

NEUROG3 je specifikačním faktorem pankreatických endokrinních prekurzorů, a je tedy exprimován ve všech prekurzorech endokrinních buněk pankreatu během vývoje (Gu et al., 2002; Schwitzgebel et al., 2000). Jeho exprese začíná u myši od E9,5 a dále roste až do E15,5, a následně prudce klesá, jelikož dochází k masivní diferenciaci buněk (van Gurp et al., 2019). Diferencované buňky ho poté již neexprimují. U myších mutantů s deletovaným *Neurog3* genem nedochází k vývoji endokrinní části pankreatu a kompletně chybí Langerhansovy ostrůvky.

#### 2.5.4. Neurogenní diferenační faktor 1 (NEUROD1)

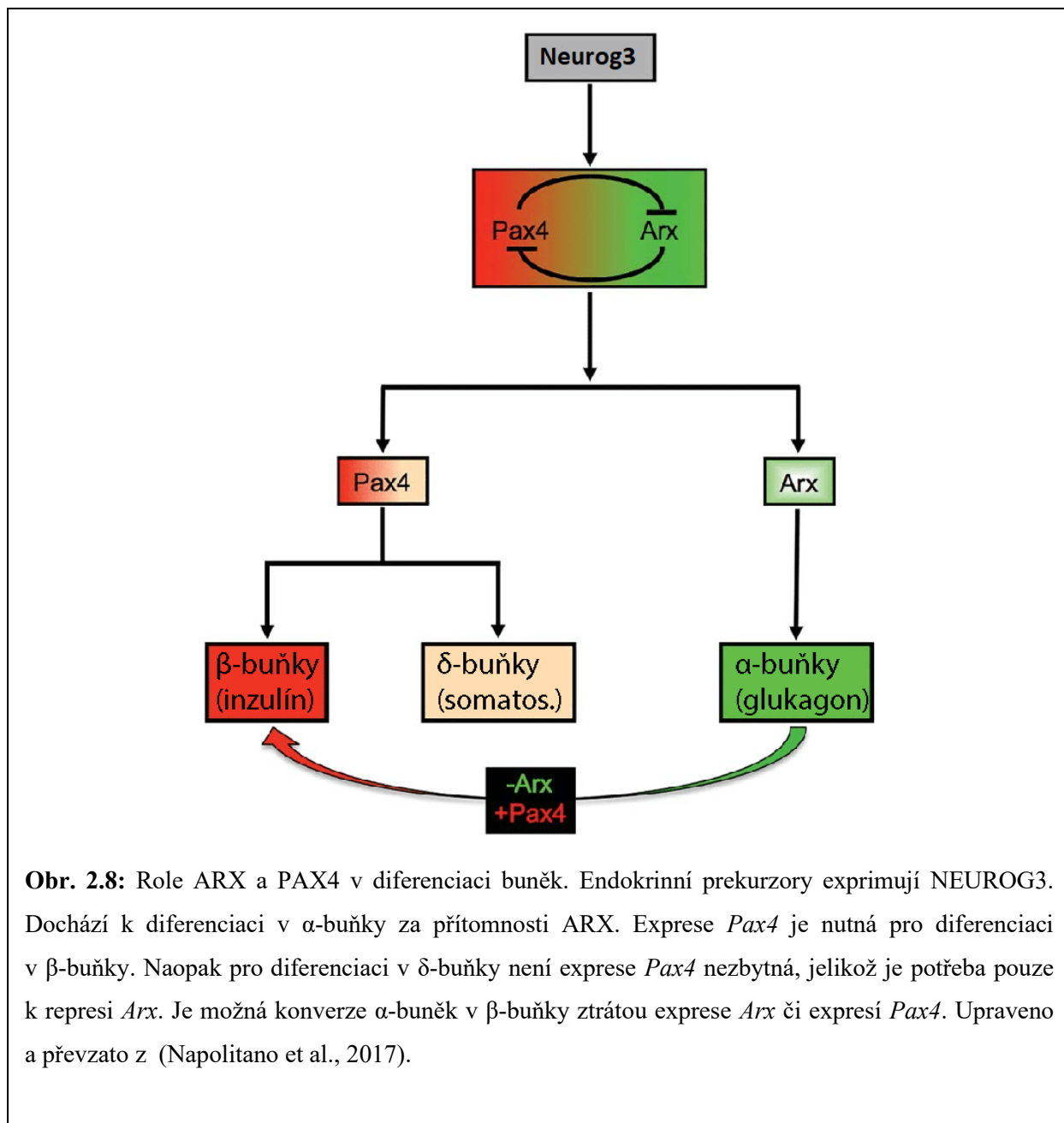
Dalším velmi důležitým transkripčním faktorem je NEUROD1. Kromě pankreatu je exprimován také v mozku a střevních buňkách, ve kterých aktivuje expresi sekretinu (Mutoh et al., 1997). V pankreatu je exprimován od E9,5 a to ve všech endokrinních prekurzorech, avšak v dospělosti se nachází téměř výhradně v  $\alpha$ - a  $\beta$ -buňkách. Reguluje expresi hormonů u  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\delta$ -buněk (Dumonteil et al., 1998; Itkin-Ansari et al., 2005). Je také důležitý pro správnou formaci Langerhansových ostrůvků. Bylo zjištěno, že myši s homozygotní delecí *Neurod1* mají zmenšené ostrůvky s poškozenou strukturou a velmi redukováným počtem  $\beta$ -buněk (Naya et al., 1997). Počet ostatních endokrinních buněk byl také snížen, což značí, že je NEUROD1 důležitý jak pro přežívání tak i pro správnou morfogenezi endokrinní části pankreatu.

#### 2.5.5. „Fifth ewing variant protein” (FEV)

Prekurzory endokrinních buněk se vyznačují vysokou expresí NEUROG3, která postupně klesá s postupující diferenciací buněk. Existuje však několik diferenačních mezistavů mezi prvními prekurzory a finálními diferencovanými buňkami (Yu et al., 2019). Je pro ně specifická například vysoká exprese transkripčního faktoru FEV (Byrnes et al., 2018). FEV je exprimován také v serotoninergních neuronech, kde reguluje transkripci genů důležitých pro jejich maturaci (Wyler et al., 2016).

#### 2.5.6. „Aristaless related” homeoboxový gen (*Arx*)

Endokrinní prekurzory jsou diferencovány do jednoho z 5 typů endokrinních pankreatických buněk. O osudu těchto prekurzorů rozhoduje exprese dalších transkripčních faktorů. Důležitou roli hrají zejména ARX a párová doména transkripčního faktoru 4 (PAX4). *Arx* leží „downstream“ od *Neurog3* a je exprimován v endokrinních prekurzorech od E9,5 (Collombat et al., 2003). Zpočátku jsou exprimovány v prekurzorech oba tyto faktory, ale nakonec převládne exprese jednoho z nich, a tak dojde ke specifikaci určitého typu endokrinních buněk (Obr. 2.8). ARX a PAX4 jsou antagonisté, navzájem se reprimují a potlačují diferenciaci v určité typy buněk. Expresí faktoru ARX jsou buňky předurčeny se diferencovat do  $\alpha$ -, či PP-buněk. Naopak, pokud převládne exprese PAX4, budou se buňky dále diferencovat do  $\beta$ -, či  $\delta$ -buněk. U myši s delecí *Arx* bylo zjištěno vyšší množství *Pax4* mediátorové ribonukleové kyseliny (mRNA) a ve výsledku byl snížen počet  $\alpha$ -buněk a navýšen počet  $\beta$ - a  $\delta$ -buněk.



**Obr. 2.8:** Role ARX a PAX4 v diferenciaci buněk. Endokrinní prekursori exprimují NEUROG3. Dochází k diferenciaci v  $\alpha$ -buňky za přítomnosti ARX. Exprese *Pax4* je nutná pro diferenciaci v  $\beta$ -buňky. Naopak pro diferenciaci v  $\delta$ -buňky není exprese *Pax4* nezbytná, jelikož je potřeba pouze k represi *Arx*. Je možná konverze  $\alpha$ -buněk v  $\beta$ -buňky ztrátou exprese *Arx* či expesí *Pax4*. Upraveno a převzato z (Napolitano et al., 2017).

### 2.5.7. PAX4

PAX4 je důležitý pro specifikaci  $\beta$  a  $\delta$  linie buněk (Sosa-Pineda et al., 1997). Je nezbytný pro diferenciaci  $\beta$ -buněk. Při dvojité delecí *Arx* i *Pax4* chyběly  $\alpha$ - i  $\beta$ -buňky, kdežto počet  $\delta$ -buněk byl navýšen (Collombat et al., 2005). To značí, že u  $\delta$ -buněk je PAX4 potřeba pouze pro represi ARX, ale ne pro finální diferenciaci. O roli PAX4 v diferenciaci  $\epsilon$ -buněk není mnoho známo, objasněná byla pouze skutečnost, kdy PAX4 reprimuje kromě ARX i expresi ghrelinu (GHRL),

jelikož při delecí *Pax4* je také navýšen počet  $\epsilon$ -buněk (Q. Wang et al., 2008). PAX4 je exprimován v pankreatických pupenech od E9,5 a stejně jako *Arx* leží „downstream“ od *Neuog3*. Jeho exprese je nejvyšší okolo E13,5, a poté se snižuje, až úplně vymizí. Tento expresní profil umožňuje ze začátku reprimovat expresi *Arx* a o pár dní později aktivovat diferenciaci  $\beta$ -buněk (Smith et al., 1999).

### 2.5.8. Transkripční faktory MAFA (MAFA) a MAFB (MAFB)

Další transkripční faktory, které se podílí na diferenciaci  $\alpha$ - a  $\beta$ -buněk jsou MAFA a MAFB. MAFA je specifický pouze pro  $\beta$ -buňky, kdežto MAFB je exprimován během vývoje v endokrinních prekurzorech v  $\alpha$ - a v  $\beta$ -buňkách (Nishimura et al., 2006). V dospělém pankreatu je již exprese MAFB specifická pouze pro  $\alpha$ -buňky a v  $\beta$ -buňkách není detekována. MAFA je exprimován od E13,5 v inzulín produkujících  $\beta$ -buňkách, které se diferencovaly během sekundární tranzice (Matsuoka et al., 2004). Je to další z transkripčních faktorů regulujících expresi inzulínového genu, a je proto důležitý pro maturaci, přežití a funkci  $\beta$ -buněk. Naproti tomu MAFB je exprimován již během primární tranzice a je detekován i v E10,5 nejen v glukagon produkujících buňkách, ve kterých funguje jako aktivátor exprese glukagonu, ale také v budoucích  $\beta$ -buňkách (Artner et al., 2006; Nishimura et al., 2006).  $\beta$ -buňky během vývoje exprimují MAFB, později zahájí i expresi MAFA, ale v dospělosti již exprimují pouze MAFA. Tento časový přechod mezi expresí MAFB a MAFA je důležitý pro správný vývoj a maturaci  $\beta$ -buněk.

### 2.5.9. ISL1

Klíčovým faktorem pro vývoj pankreatu a zejména buněk Langerhansových ostrůvků je ISL1. Také je nepostradatelný pro vývoj nervového systému a srdce (Cai et al., 2003; Pfaff et al., 1996). Globální delecí *Isl1* způsobí selhání vývoje kardiovaskulárního systému, a je tedy embryonálně letální. Jeho exprese začíná v E9,5 v pankreatických pupenech a okolním mezenchymu (Dong et al., 1991). *Isl1* je exprimován v dorzálním mezenchymu, ale ve ventrálním je exprimován s 1-2 denním zpožděním (Ahlgren et al., 1997). U myši s globální delecí *Isl1* se nevytváří dorzální mezenchym, a jelikož je okolní mezenchym důležitým induktorem diferenciaci acinárních buněk, dochází k defektům v diferenciaci exokrinních buněk. Během vývoje, ale i v dospělosti je ISL1 exprimován ve všech endokrinních buňkách pankreatu (Du et al., 2009). Myši s deletovaným *Isl1* mají méně endokrinních buněk a sníženou hormonální produkci. Dále mají výrazně sníženou

expresi transkripčního faktoru MAFA. *Isl1* leží totiž „upstream“ a přímo ovlivňuje expresi *MafA*. To značí jeho důležitost pro maturaci a následnou funkci buněk. ISL1 reguluje expresi všech hormon produkujících buněk. V  $\beta$ -buňkách přímo interaguje s NEUROD1 a reguluje expresi inzulínu (Zhang et al., 2009). Jeho funkce během vývoje endokrinní tkáně není stále plně objasněna.

### 3. Cíle práce

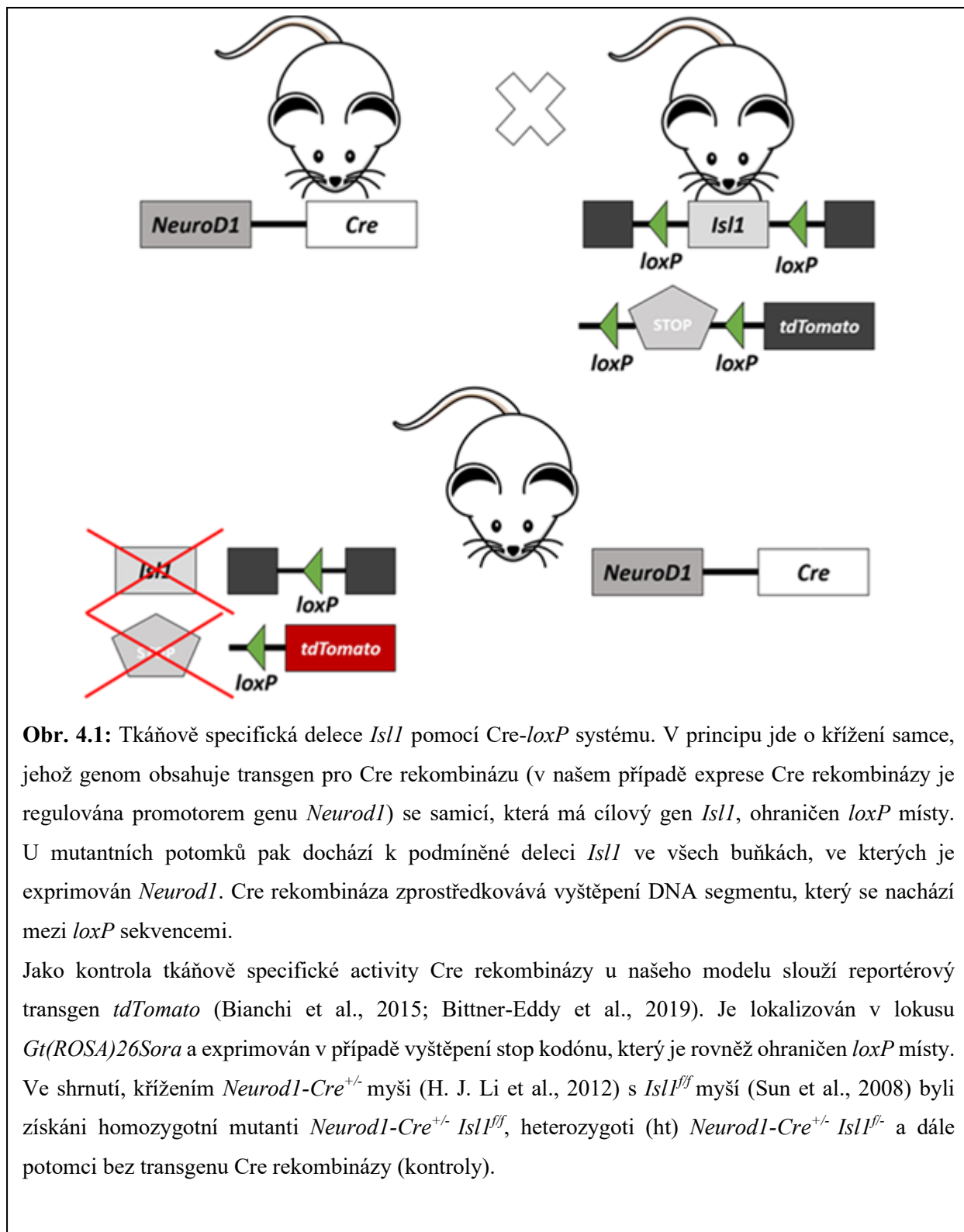
- Zhodnocení fenotypu u kontrolních myší a *Neurod1-Cre<sup>+/-</sup> Isl1<sup>fl/fl</sup>* (*Isl1CKO*)
- Srovnání exprese vybraných genů podílejících se na časném vývoji pankreatu
- Optimalizace metody sortování endokrinních buněk Langerhansových ostrůvků pomocí fluorescenční průtokové cytometrie

## 4. Materiál a metody

### 4.1. Materiál

#### 4.1.1. Modelový organismus

Pro experimentální práci byl zvolen zvířecí model myši domácí (*Mus musculus*). Všechna práce se zvířaty proběhla podle zákona číslo 246/1992 Sb. a jeho následné vyhlášky číslo 419/2012 Sb. Myším byl zaveden světelný režim v intervalu 12 hodin s neomezeným přístupem k potravě. Březost byla zjišťována podle přítomnosti vaginální zátky u samic. Ta byla kontrolována každé ráno a v případě její přítomnosti bylo poledne téhož dne kanonicky stanoveno jako E0,5. Z důvodu embryonální letality myši s globální delecí *Isl1*, byla u modelu použita tkáňově specifická delece *Isl1* pomocí *Cre-loxP* systému (Obr. 4.1) (Hernandez et al., 2006; McLellan et al., 2017).





#### 4.1.2. Chemikálie

Agaróza, Sigma-Aldrich, USA

Azid sodný ( $\text{NaN}_3$ ), Sigma-Aldrich, USA

Dihydrogenfosforečnan draselný, Penta, Česká republika

Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich, USA

Dodecylsulfát sodný (SDS), Sigma-Aldrich, USA

Dulbecco fosfátový pufr, Sigma-Aldrich, USA

Eosin, Diapath S.P.A., Itálie

Ethidium bromid, Sigma-Aldrich, USA

Ethylakohol, Penta, Česká republika

Fetální bovinní sérum (FBS), Sigma-Aldrich, USA

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

DPX montovací medium, Sigma-Aldrich, USA

Glycerol, Amresco, USA

Glykogen (20 mg/ml), Sigma-Aldrich, USA

Hoechst 33258, Thermo, USA

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, Penta, Česká republika

Chlorid draselný, Penta, Česká republika

Chlorid lithný, Sigma-Aldrich, USA

Chlorid sodný, Penta, Česká republika

Chloroform, Penta, Česká republika

Izopropanol, Penta, Česká republika

Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), Sigma-Aldrich, USA

Kyselina ethylenglykol-di-(2-aminoethylether)-tetraoctová (EGTA), Sigma-Aldrich, USA

Kyselina boritá, Sigma-Aldrich, USA

Mayerův hematoxylin, Diapath S.P.A., Itálie

Methanol, Sigma-Aldrich, USA

Oslí sérum, Jackson ImmunoResearch, USA

Paraformaldehyd (PFA), Sigma-Aldrich, USA

n-Propylgalát, Sigma-Aldrich, USA

Tris, Sigma-Aldrich, USA

Triton X-100, Sigma-Aldrich, USA

Trizol Reagent, Invitrogen, USA

Tween20, Amresco, USA

Voda bez DNáz a RNáz, Sigma-Aldrich, USA

#### 4.1.3. Enzymy

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

Trypsin, Sigma-Aldrich, USA

#### 4.1.4. Primery

Název primeru	Sekvence	Použití
<i>Neurod1-Cre F</i>	CCATTTTGCAGTGGACTCCT	genotypizace
<i>Neurod1-Cre R</i>	ACGGACAGAAGCATTTTCCA	genotypizace
<i>Isl1 F</i>	CTCTGGAACATCCCACATTG	genotypizace
<i>Isl1 R</i>	GATGCAACCCCTGTTCTAC	genotypizace
<i>tdTomato wt F</i>	AAGGGAGCTGCAGTGGAGTA	genotypizace
<i>tdTomato wt R</i>	CCGAAAATCTGTGGGAAGTC	genotypizace
<i>tdTomato mt F</i>	CTGTTCTGTACGGCATGG	genotypizace
<i>tdTomato mt R</i>	GGCATTAAAGCAGCGTATCC	genotypizace
<i>Arx F</i>	TTTTCTAGGAGCAGCGGTGT	qPCR
<i>Arx R</i>	GGGCCATAGTGGAAAAGAGC	qPCR
<i>Gcg F</i>	CAGAAGAAGTCGCCATTGCC	qPCR
<i>Gcg R</i>	AAGTCCCTGGTGGCAAGATT	qPCR
<i>Hprt1 F</i>	GCTTGCTGGTGAAAAGGACCTCTCGAAG	qPCR
<i>Hprt1 R</i>	CCCTGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGCAT	qPCR
<i>MafB F</i>	GCAGGTATAAACGCGTCCAG	qPCR
<i>MafB R</i>	TGAATGAGCTGCGTCTTCTC	qPCR
<i>Neurog3 F</i>	AGTGCTCAGTTCCAATTCCAC	qPCR
<i>Neurog3 R</i>	CGGCTTCTTCGCTTTTTGCTG	qPCR
<i>Peg10 F</i>	CCCTCATCCTTCGTGGCATC	qPCR
<i>Peg10 R</i>	CTCGTGGTTGGCGTCTTTTG	qPCR

<i>Pou3f4 F</i>	CTGCCTCGAATCCCTACAGC	qPCR
<i>Pou3f4 R</i>	CTGCAAGTAGTCACTTTGGAGAA	qPCR
<i>Fev F</i>	AAACATCTCTGCCGTTCCCC	qPCR
<i>Fev R</i>	TGGGAGCTTTAATGGGGCTG	qPCR

#### 4.1.5. Protilátky

Primární	Typ	Host	Společnost	Ředění
Glukagon	monoklonální	myš	Abcam	1:400
Insulin	polyklonální	morče	Abcam	1:50
PAX6	polyklonální	králík	BioLegend	1:100
PDX1	polyklonální	králík	Abcam	1:2000

Sekundární	Host	Společnost	Ředění
Alexa Fluor® 405 Anti-Guinea Pig	osel	Jackson ImmunoResearch	1:500
Alexa Fluor® 488 Anti-Mouse	osel	Jackson ImmunoResearch	1:500
Alexa Fluor® 594 Anti-Rabbit	osel	Jackson ImmunoResearch	1:500

#### 4.1.6. Roztoky

Antifade:

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

Blokační roztok (oslí serum):

2,5% (w/v) oslí sérum; 0,5% (w/v) Tween®20, 0,05% (w/v) TritonX-100 v PBS

Elektroforetický pufr 0,5x TBE:

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

FACS pufr:

Dulbecco PBS, 10mM EGTA, 2% (w/v) FBS

Fosfátový pufr (PBS):

10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150mM NaCl, 2mM KCl, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 7,4

Lyzační pufr:

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

Disociační pufr:

93,1% (w/v) voda bez DNáz a RNáz, 50mM chlorid sodný, 10mM Tris-HCl (pH = 8,3), 0,45% (w/v) TritonX-100, 0,45% (w/v) Tween®20

#### **4.1.7. Komerční soupravy**

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

Komerční souprava pro kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci, TATAA SYBR® GrandMaster® Mix, TATAA Biocenter, Švédsko

Komerční souprava pro reverzní transkripci, Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase, Thermo Scientific, USA

#### **4.1.8. Přístroje**

Analytické váhy 154AI, Bel engineering, Itálie

Centrifuga Z216 MK, Hermle, Německo

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

Fotoaparát SP- 565 UZ, Olympus, Japonsko

Konfokální mikroskop Zeiss CZ LSM880 2P, Německo

Mikrovlnná trouba MCE30, Hitachi, Japonsko

Mikrotom RM2255, Leica Biosystems, Německo

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

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

Termocykler, Biometra, Německo

Vibratom, Leica Biosystems, Německo

Vortex MIXER S0200, LabnetInternational, USA

#### **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. Extrakce myších embryí**

Březi myši byly usmrceny cervikální dislokací. Následně byly matkám operativně vyjmuty vajíčky s embryi. Ty byly vloženy do Petriho misky s PBS a chlazeny na ledu. Poté byla pod binolupou opatrně mikrodisektována jednotlivá embrya tak, aby nedošlo k porušení spoje s placentou. Pomocí fluorescenčního mikroskopu byla eventuálně vybrána Cre-pozitivní embrya s aktivovanou expresí tdTomato pro zpracování na cytometrii. Část ocasní tkáně každého embrya byla využita ke genotypizaci.

### **4.2.2. Izolace DNA**

Vzorky určené ke genotypizaci byly lyzovány v 600  $\mu$ l lyzačního pufru s 8  $\mu$ l proteinázy K. Zkumavky byly ponechány přes noc v 55 °C a další den centrifugovány při 14000 G a 18 °C po dobu 12 minut. K supernatantu bylo přidáno 600  $\mu$ l isopropyl alkoholu, čímž došlo k vysrážení DNA. Poté byla DNA promyta nejprve 70% ethanolem, centrifugována po dobu 10 sekund, 100% ethanolem a znovu centrifugována 10 sekund. Výsledná peleta byla usušena v termobloku při teplotě 55 °C. Následně bylo přidáno 100  $\mu$ l vody bez DNáz a RNáz a vzorky byly inkubovány při 55°C 2 hodiny. Koncentrace DNA byla změřena pomocí spektrofotometru Nanodrop 1000.

### **4.2.3. Rychlá DNA extrakce**

Pro rychlé určení genotypu myších embryí bylo využito metody rychlé DNA extrakce (McClive & Sinclair, 2001). U dospělých myší bylo nutné provést klasickou izolaci DNA (viz kapitola 4.2.2), ale u myších embryí bylo možné využít rychlé DNA extrakce, jelikož embryonální tkáň lze rychleji lyzovat a extrahovat z ní DNA. Pomocí této metody bylo možné

zjistit genotypy embryí během krátké doby, což umožnilo například spojovat vzorky stejného genotypu. Tkáň byla disociována v 50  $\mu$ l disociačního pufru s 1  $\mu$ l proteinázy K. Část tkáně byla vložena do stripu a lyzována v PCR cykleru při 55 °C po dobu 5 minut a následně při 95 °C po dobu 10 minut.

#### 4.2.4. Polymerázová řetězová reakce

Nejprve byl připraven PCR mix podle Tab. 1. Na jeden vzorek bylo napipetováno 19  $\mu$ l mixu do mikrozkušavky a přidán 1  $\mu$ l DNA. Po zvortexování a centrifugování byly vloženy do termocykleru na 35 cyklů. Průběh reakce byl nastaven podle Tab. 2.

**Tab. 1:** Složení PCR mixu pro jednu reakci

Chemikálie	Objem [ $\mu$ l]
Voda bez DNáz a RNáz	13
5x Master Mix	4
Forward primer	1
Reverse primer	1

**Tab. 2:** Průběh PCR

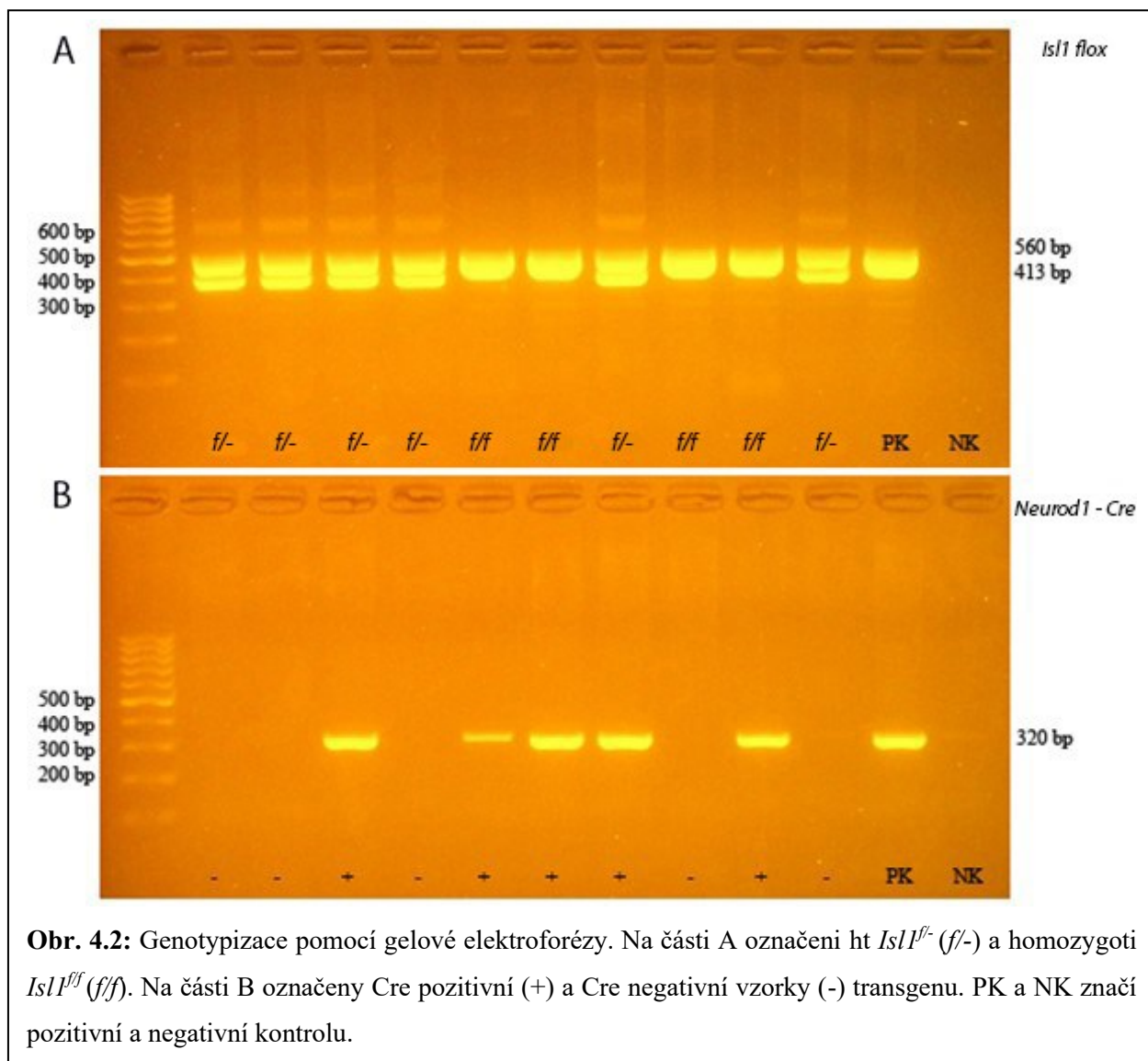
Krok reakce	Teplota	Čas[ $\mu$ min]
Iniciace reakce	95 °C	5:00
Denaturace DNA	95 °C	0:30
Nasednutí primerů	63 °C	0:30
Elongace	72 °C	0:30
Terminální elongace	72 °C	5:00

↑  
↓  
cyklus

#### 4.2.5. Genotypizace

K detekci výsledných PCR produktů byla použita horizontální gelová elektroforéza. Byl připraven gel z 2% agarózy v 0,5x zředěném TBE pufru s ethidiumbromidem (0,4  $\mu$ g/ml). Do první jamky byly nanášeny 3  $\mu$ l markeru „GeneRuler 50 bp DNA Ladder“. Do zbylých jamek bylo nenaseno 8  $\mu$ l jednotlivých PCR produktů. Napětí bylo nastaveno na 130 V a po 30 minutách bylo

zkontrolováno dostatečné rozdělení pod UV v translunimátoru. Výsledek byl zaznamenán fotoaparátem a zobrazen na počítači (Obr. 4.2).



**Obr. 4.2:** Genotypizace pomocí gelové elektroforézy. Na části A označení ht *Isl1<sup>f/-</sup>* a homozygoti *Isl1<sup>f/f</sup>*. Na části B označeny Cre pozitivní (+) a Cre negativní vzorky (-) transgenu. PK a NK značí pozitivní a negativní kontrolu.

#### 4.2.6. Barvení hematoxylinem a eosinem

Myší pankreaty byly zalaty do parafínového bločku a krájeny na mikrotomu. Byla zvolena tloušťka řezů 8  $\mu\text{m}$ . Před barvením bylo potřeba jednotlivé vzorky zbavit parafínu inkubací 20 minut v xylenu. Poté byly vzorky zavodněny inkubací v sestupné ethanolové řadě, po 5 minutách v 100%, 96%, 90%, 80% a nakonec v 70% ethanolu. Nejprve byly vzorky barveny v hematoxylinu po dobu 3 minut a následně oplachovány pod tekoucí vodou. Poté byly na pár vteřin ponořeny do

roztoku eosinu. Nakonec byly vzorky odvodněny vzestupnou ethanolovou řadou a xylenem. Výsledné vzorky byly zamontovány do DPX montovacího média.

#### **4.2.7. Příprava vzorků pro imunohistochemické barvení**

Po disekci byly pankreaty fixovány 1 hodinu v 4% PFA. Následně byly odvodněny vzestupnou metanolovou řadou (25%, 50%, 75% a 100%) a uchovávány v 100% metanolu v -20 °C. Před použitím byly vzorky sestupnou metanolovou řadou převedeny do PBS. Poté byly pankreaty zality 4% agarózou do bločku. Ty byly umístěny do inkubátoru při 37 °C na 10 minut, a poté dány do lednice na 10 minut. Na vibratomu byly krájeny řezy o tloušťce 80 µm. Uchovávány byly v destičkách obsahujících PBS s 0,1% NaN<sub>3</sub>.

#### **4.2.8. Imunohistochemické barvení**

Řezy byly blokovány blokačním roztokem minimálně 1 hodinu. Následně byl blokační roztok odsán a byly přidány primární protilátky. Destička se vzorky byla zalepena parafilmem a umístěna na kývačku do 4 °C na 48-72 hodin. Poté byl roztok primárních protilátek odsán a řezy byly 5x promyty PBS po 30 minutách. Znovu následovala blokace blokačním roztokem po dobu 1 hodiny. Roztok byl odsán a byly přidány příslušné sekundární protilátky. Destička s řezy byla obalena alobalem, aby nedošlo k nežádoucí excitaci fluoroforů, a opět umístěna na třepačku do 4 °C přes noc. Další den byly řezy 5x promyty PBS po 30 minutách. U vybraných barvení byl během prvního promývání přidán Hoechst 33258 (1:2000) pro barvení buněčných jader. Imunohistochemicky obarvené řezy byly montovány na sklíčko do Antifade roztoku, překryty krycím sklíčkem a uchovávány ve tmě při 4°C.

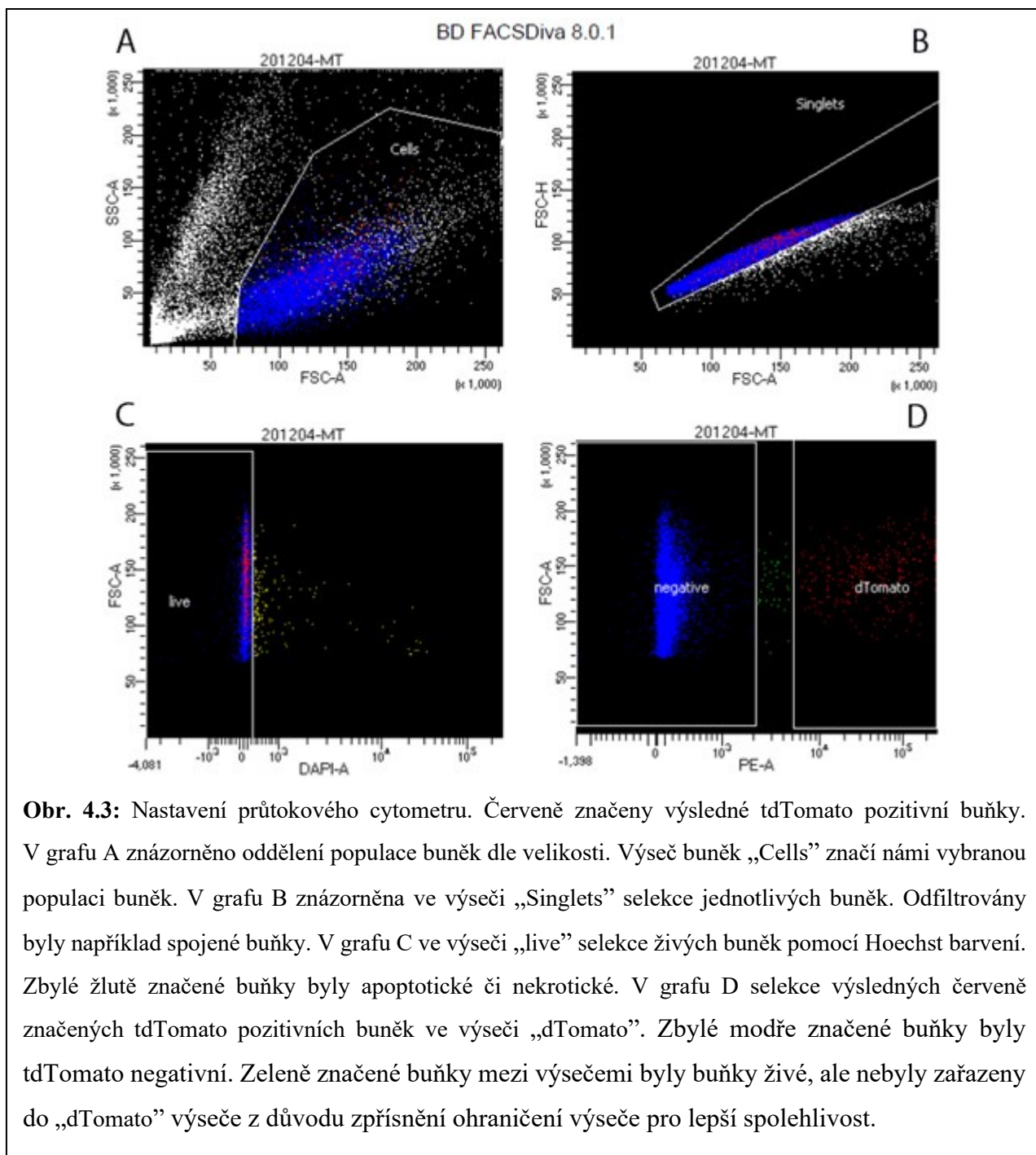
#### **4.2.9. Příprava vzorků na průtokovou cytometrii**

Vypreparované pankreaty z myších embryí byly enzymaticky štěpeny v 300 µl 0,05% roztoku trypsinu s 0,53 mM EDTA, 5-6 minut (podle velikosti tkáně) v termobloku při 37 °C a třepání 900 RPM. Štěpení tkáně bylo zastaveno přidáním 600 µl FACS pufru. Poté byly vzorky centrifugovány 10 minut při 800 G a 4 °C. Supernatant byl odebrán pipetou a peleta byla rozpuštěna v 500 µl FACS pufru. Těsně před průtokovou cytometrií byly vzorky přefiltrovány pomocí sterilních filtrů „CellTrics 50 µm” do čistých zkumavek.



#### 4.2.10. Buněčná separace pomocí fluorescenční průtokové cytometrie (FACS)

K přefiltrovaným vzorkům bylo přidáno Hoechst 33258 barvivo (1 µg/ml) pro barvení buněčných jader. Díky tomu bylo možné oddělit populace živých a mrtvých buněk (Obr. 4.3). tdTomato pozitivní buňky byly sbírány do zkumavek obsahujících 300 µl Trizol Reagentu, a poté uchovány v -80 °C.



**Obr. 4.3:** Nastavení průtokového cytometru. Červeně značeny výsledné tdTomato pozitivní buňky. V grafu A znázorněno oddělení populace buněk dle velikosti. Výseč buněk „Cells” značí námi vybranou populaci buněk. V grafu B znázorněna ve výseči „Singlets” selekce jednotlivých buněk. Odfiltrovány byly například spojené buňky. V grafu C ve výseči „live” selekce živých buněk pomocí Hoechst barvení. Zbylé žlutě značené buňky byly apoptotické či nekrotické. V grafu D selekce výsledných červeně značených tdTomato pozitivních buněk ve výseči „dTomato”. Zbylé modře značené buňky byly tdTomato negativní. Zeleně značené buňky mezi výsečemi byly buňky živé, ale nebyly zařazeny do „dTomato” výseče z důvodu zpřísnění ohraničení výseče pro lepší spolehlivost.

#### 4.2.11. Izolace RNA

Izolované myší pankreaty byly homogenizovány v 300  $\mu$ l Trizol Reagent roztoku pomocí injekčních stříkaček. Následně byly vzorky zahřáty v termobloku na 55 °C po dobu 3 minut, a poté vortexovány cca 10 vteřin. Proces byl opakován třikrát. Dále bylo ke každému vzorku přidáno 60  $\mu$ l chloroformu, vzorky byly vortexovány 15 vteřin a ponechány stát 5 minut. Poté byly centrifugovány 15 minut při 14000 G ve 4 °C. Tím byly vizuálně odděleny 2 fáze. Spodní růžová organická a horní vodná obsahující RNA. Horní fáze byla pomocí pipety přenesena do nové zkumavky. Dále bylo přidáno 0,5  $\mu$ l glykogenu (20 mg/ml) a 170  $\mu$ l isopropanolu. Pomocí vortexu byly vzorky promíchány a uloženy do -80 °C po dobu alespoň 30 minut, aby došlo k precipitaci RNA. Vzorky byly poté centrifugovány 30 minut při 14000 G a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a pelety s RNA omyty 500  $\mu$ l 75% ethanolu a znovu centrifugovány 5 minut při 7500 G při 4 °C. Omývání pelety bylo provedeno celkem třikrát. Následně byly pelety usušeny v termobločku při 55 °C a resuspendovány ve 20  $\mu$ l vody bez RNáz.

Pro lepší čistotu RNA byla provedena purifikace přidáním 8M LiCl, tedy na 20  $\mu$ l roztoku RNA byl přidán 1  $\mu$ l 8M LiCl. Po krátkém zvortexování a centrifugaci bylo přidáno 56  $\mu$ l 100% ethanolu. Vzorky byly znovu vortexovány, krátce centrifugovány a ponechány přes noc v -80 °C. Poté byly centrifugovány 30 minut při 14000 G a 4 °C a znovu 3x omyty 500  $\mu$ l 75% ethanolu. Mezi promýváním byly centrifugovány 5 minut při 7500 G a 4 °C. Poté byly pelety usušeny v termobločku při 55 °C a resuspendovány ve 12  $\mu$ l vody bez RNáz. Koncentrace RNA byla změřena na Nanodropu.

#### 4.2.12. Reverzní transkripce

Byla použita komerční souprava pro reverzní transkripci „Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase” od firmy Thermo Scientific. Před samotnou reverzní transkripcí byly vzorky ošetřeny dsDNázou. Ke vzorku se 100 ng celkové RNA byl přidán 1  $\mu$ l 10X dsDNázového pufru a 1  $\mu$ l dsDNázy. Po krátkém promíchání na vortexu a centrifugaci byl vzorek inkubován 2 minuty při 37 °C a 5 minut při 55 °C. Poté byla ke vzorku přidána směs primerů, dNTP a vody podle Tab. 3, aby finální objem vzorku byl 15  $\mu$ l. Po promíchání na vortexu a centrifugaci byl vzorek inkubován 5 minut při teplotě 65 °C. Poté bylo přidáno 5  $\mu$ l směsi podle Tab. 4. Vzorek byl opět zvortexován a centrifugován. Dále byl inkubován 10 minut při 25 °C, 15 minut při 50 °C a 5 minut při 85 °C. Finální cDNA byla poté naředěna v poměru 1:3 vodou bez DNáz a RNáz.

**Tab. 3:** Složení směsi primerů a dNTP

<b>Chemikálie</b>	<b>Objem [μl]</b>
Oligo (dT) <sub>18</sub> primer	0,25
Random hexamer primer	0,25
10mM dNTP mix	1
Voda bez DNáz a RNáz	do 15

**Tab. 4:** Složení směsi pro RT

<b>Chemikálie</b>	<b>Objem [μl]</b>
5X RT Buffer	4
Maxima H Minus Enzyme Mix	1

#### 4.2.13. Kvantitativní PCR v reálném čase (RT-qPCR)

Nejprve byly pro každý gen připraveny směsi primerů, SYBRGreenu a vody podle Tab. 5. Dávkovací pipetou byly napipetovány 96 nebo 384 jamkové destičky po 6 μl na jamku. K tomu byly přidány 4 μl cDNA. Destička byla přelepena fólií, centrifugována a vložena do termocykleru. Byl nastaven program podle Tab. 6 se 40 cykly. Ke zpracování výsledků byly použity programy Bio-Rad CFX Manager a GraphPad Prism.

**Tab. 5:** Složení směsi pro qPCR

<b>Chemikálie</b>	<b>Objem [μl]</b>
SYBRGreen	5
Voda bez DNáz a RNáz	0,5
Forward primer (10 μM)	0,25
Reverse primer (10 μM)	0,25

**Tab. 6:** Průběh qPCR

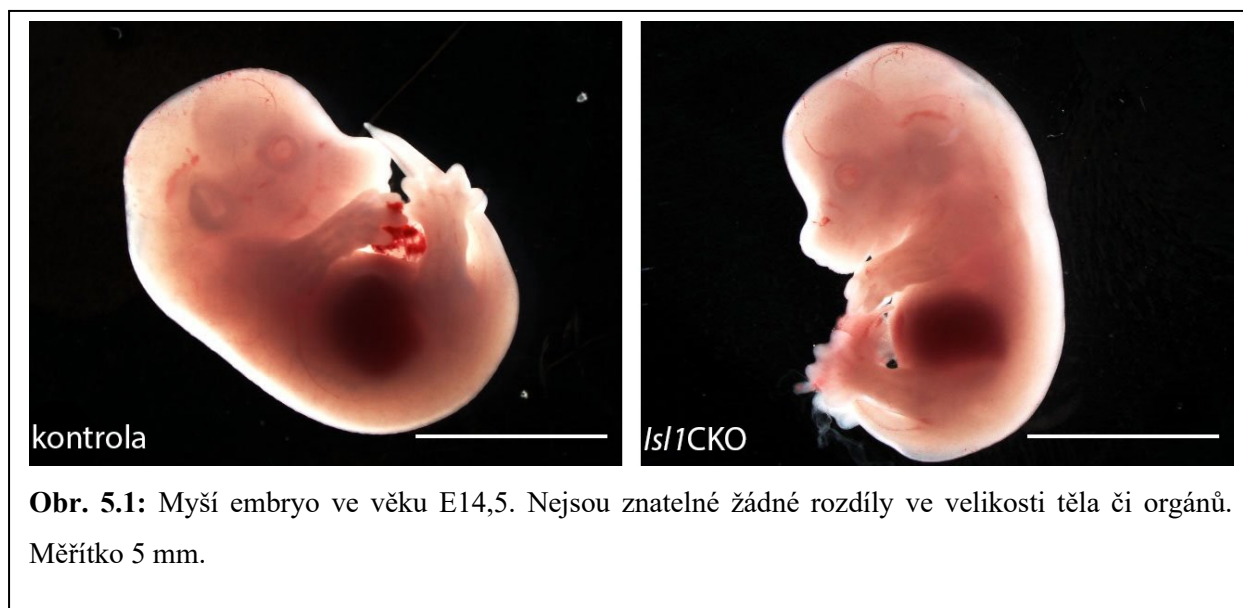
<b>Krok reakce</b>	<b>Teplota</b>	<b>Celkový čas [min]</b>
Iniciace reakce	95 °C	30:00
Denaturace DNA	95 °C	5:00
Nasednutí primerů	60 °C	5:00
Elongace	72 °C	30:00

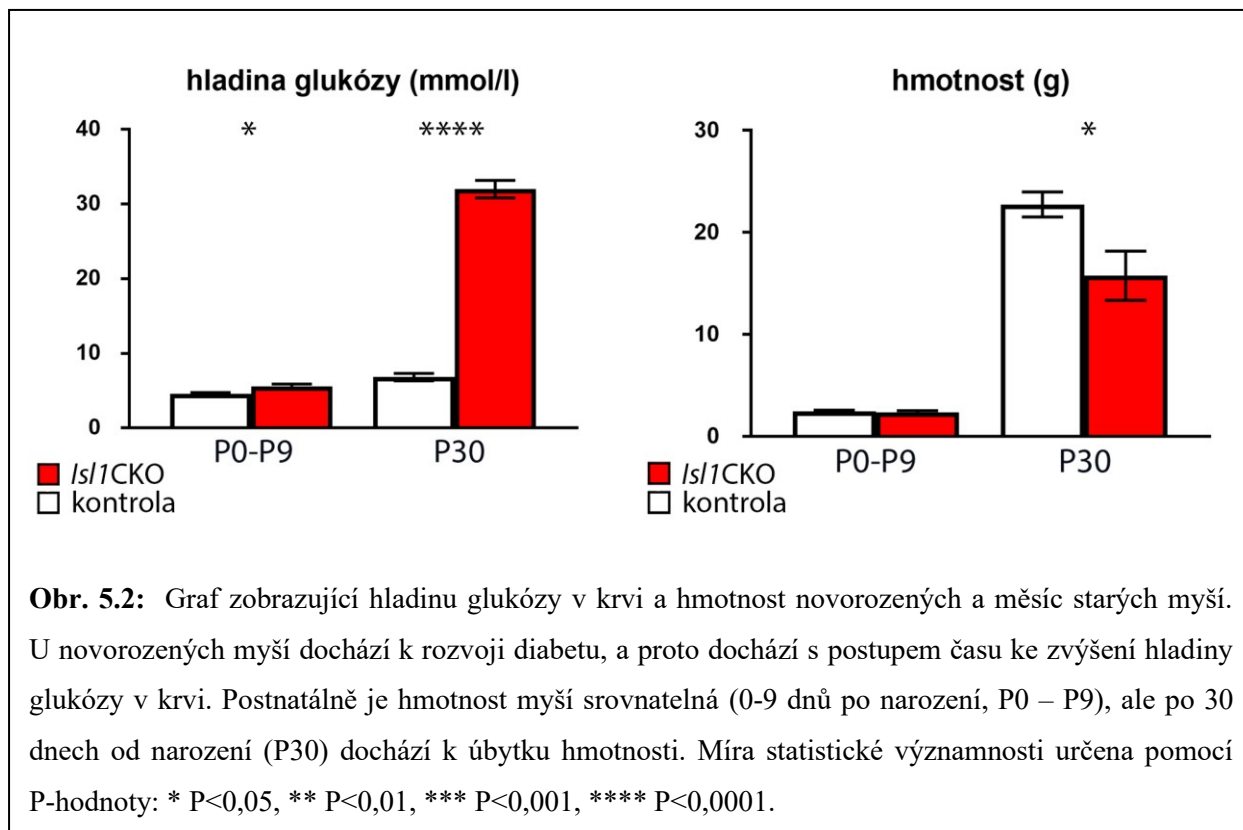
↑  
= 40 cyklů  
↓

## 5. Výsledky

### 5.1. Fenotyp tkáňově specifické delece genu *Isl1* (*Isl1*CKO)

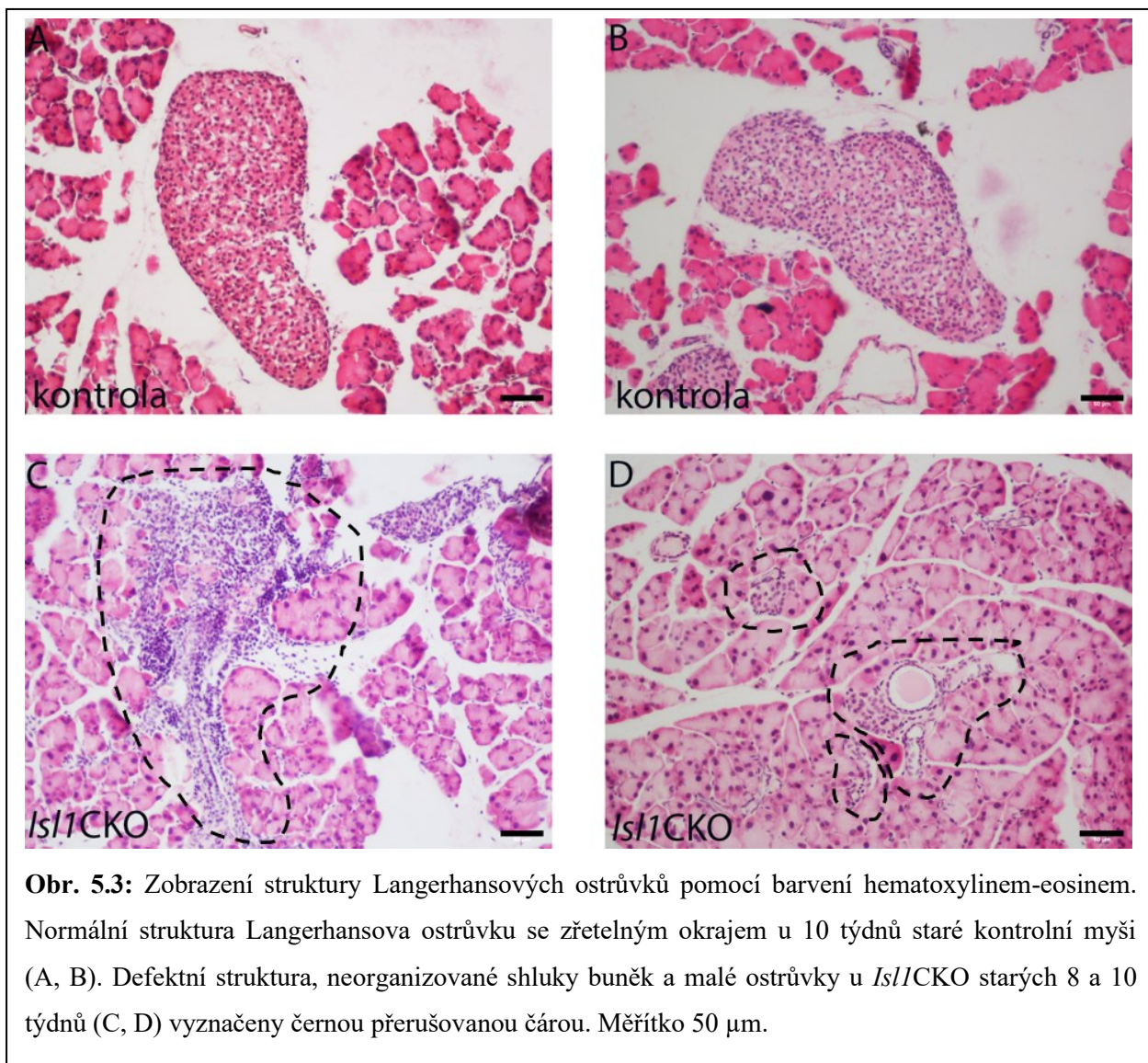
Pro zjištění funkční role ISL1 během vývoje pankreatu byl gen *Isl1* tkáňově specificky deletován v *Neurod1* pozitivních buňkách pomocí Cre-loxP systému křížením *Neurod1-Cre<sup>+/-</sup>* a *Isl1<sup>fl/fl</sup>* myši (viz kapitola 4.1.1 Modelový organismus). Genotyp jednotlivých myší či embryí byl určen pomocí PCR a elektroforézy (viz kapitola 4.2.5 Genotypizace). Výsledný mutantní fenotyp *Neurod1-Cre<sup>+/-</sup> Isl1<sup>fl/fl</sup>* (postrádající obě alely genu *Isl1*) byl označen jako *Isl1*CKO. Heterozygoti *Neurod1-Cre<sup>+/-</sup> Isl1<sup>fl/fl</sup>* (s jednou funkční alelou genu *Isl1*) vykazovali fenotyp srovnatelný s kontrolní skupinou (žádná z alel *Isl1* nebyla deletována), tedy bez zjevných morfologických či fyziologických defektů. Z hlediska externího fenotypu, *Isl1*CKO embrya morfologicky nebyla nijak odlišná (Obr. 5.1). Po narození se u *Isl1*CKO během 1 měsíce rozvinul diabetes spojený s hyperglykemií a postupným úbytkem tělesné hmotnosti (Obr. 5.2). Normoglykemické myši mají hladinu glukózy do 13,9 mmol/l (Klueh et al., 2006). U *Isl1*CKO myši v postnatálním dni věku P30 byla detekována hladina glukózy až třikrát vyšší.





## 5.2. Struktura Langerhansových ostrůvků

Pro zhodnocení míry defektu na histologické úrovni bylo provedeno morfologické zhodnocení Langerhansových ostrůvků. Hodnocením struktury maturovaných ostrůvků u 7-10 týdenních myši pomocí barvení hematoxylinem-eosinem byly zjištěny významné změny ve velikosti ostrůvků a celkovém zastoupení endokrinní tkáně u *Is1CKO* v porovnání s kontrolami (Obr. 5.3). U kontrolních myši měly ostrůvky normální strukturu se zřetelnými okraji (Obr. 5.3 – A, B). Naopak u *Is1CKO* bylo ostrůvků méně, velikostně byly menší a často byly detekovány nahodilé shluky endokrinních buněk bez jasně definovaného okraje (Obr. 5.3 – C, D).



**Obr. 5.3:** Zobrazení struktury Langerhansových ostrůvků pomocí barvení hematoxylinem-eosinem. Normální struktura Langerhansova ostrůvku se zřetelným okrajem u 10 týdnů staré kontrolní myši (A, B). Defektní struktura, neorganizované shluky buněk a malé ostrůvky u *Is11CKO* starých 8 a 10 týdnů (C, D) vyznačeny černou přerušovanou čarou. Měřítko 50  $\mu\text{m}$ .

Pro bližší určení typů buněk v ostrůvku bylo provedeno imunohistochemické barvení. Pomocí specifických protilátek bylo zkoumáno zastoupení zejména  $\alpha$ - a  $\beta$ -buněk v postnatálním a embryonálním věku.

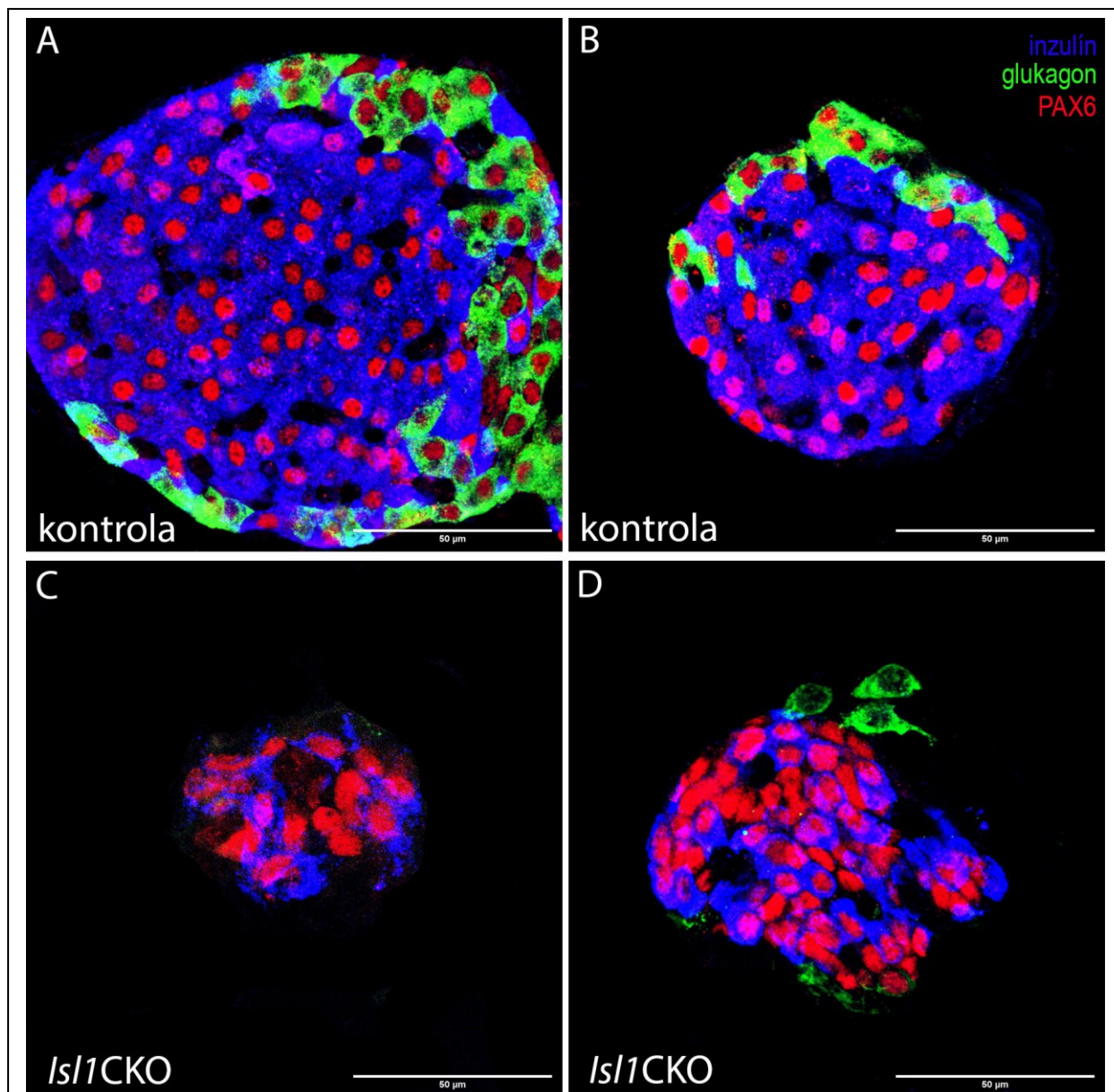
Pro detekci  $\beta$ -buněk byla použita protilátka proti inzulinu a u  $\alpha$ -buněk proti glukagonu. Dále byla použita protilátka proti PAX6. Byly použity řezy myších pankreatů věku P9, jelikož v tomto období jsou buňky ostrůvků již plně maturovány (Dassaye et al., 2016)\*. U kontrol byla zřejmá typická architektura ostrůvku, kdy okraj ostrůvků byl tvořen  $\alpha$ -buňkami a  $\beta$ -buňky byly lokalizovány zejména ve středu. Dále byla detekována exprese PAX6 v endokrinních buňkách

ostrůvku (Obr. 5.4 - A, B). Naopak u *Isl1*CKO kompletně chyběly  $\alpha$ -buňky, bylo produkováno méně inzulínu  $\beta$ -buňkami a ostrůvky byly menší. (Obr. 5.4 - C, D).

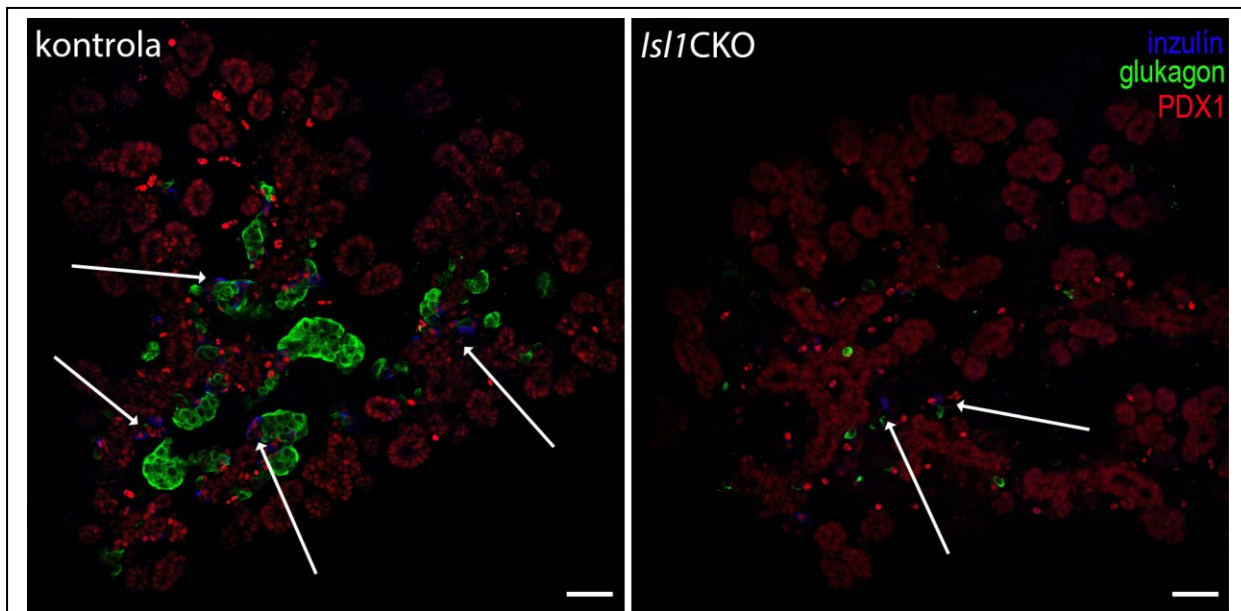
První analýzy embryonálního vývoje pankreatu byly zaměřeny na období sekundární tranzice ve věku E14,5, kdy dochází k diferenciaci endokrinních buněk (Obr. 5.5). Pomocí protilátky proti PDX1 bylo možné slabě zobrazit strukturu pankreatu, jelikož exprese PDX1 v pankreatických prekurzorech v tomto období již klesá. Protilátkou proti glukagonu a inzulínu byly zobrazeny diferencující se  $\alpha$ - a  $\beta$ -buňky. Imunohistochemickými analýzami bylo ukázáno, že u *Isl1*CKO došlo k defektu v diferenciaci endokrinních buněk. U *Isl1*CKO pankreatu chyběly shluky diferencujících se endokrinních buněk a množství glukagon pozitivních  $\alpha$ -buněk bylo výrazně redukováno. Inzulín pozitivní  $\beta$ -buňky se začínají diferencovat okolo E14,5, a proto jich bylo detekováno stále malé množství (Sharon et al., 2019).

Dále byla provedena imunohistochemická analýza embryonálního pankreatu v období primární tranzice v embryonálním věku E11,5 pomocí protilátek proti glukagonu a PDX1 (Obr. 5.6). PDX1 je exprimován ve všech typech pankreatických buněk v tomto vývojovém stadiu.  $\beta$ -buňky v této době ještě nejsou diferencovány, a proto nebyly analyzovány. Již v tomto věku byl viditelný rozdíl mezi kontrolními a *ISL1*CKO pankreaty. U kontrol diferencované glukagon pozitivní buňky vytvářely velké buněčné shluky. Naopak u *Isl1*CKO se diferencovalo mnohem méně glukagon exprimujících buněk, které neutvářely větší shluky.

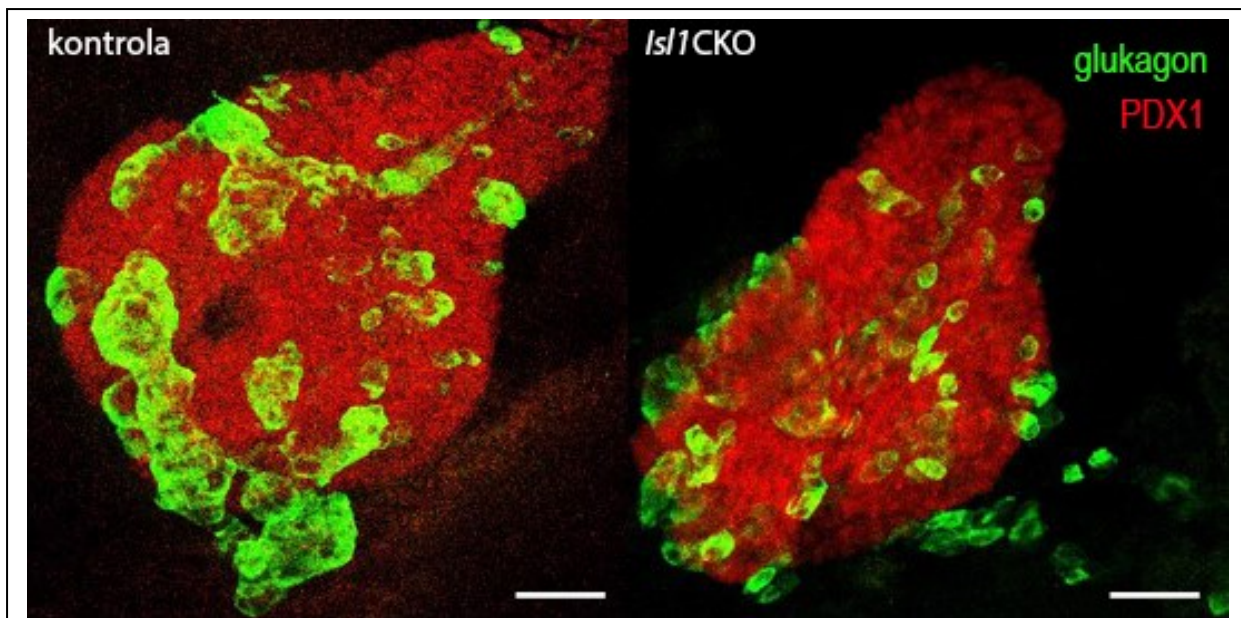




**Obr. 5.4:** Zobrazení Langerhansova ostrůvku u P9 myši pomocí konfokálního mikroskopu. Kontrolní ostrůvky mají typické okraje z  $\alpha$ -buněk (A, B). *Isl1*CKO ostrůvky jsou defektní a zcela postrádají maturované  $\alpha$ -buňky (C, D). Modře jsou zobrazeny inzulin pozitivní  $\beta$ -buňky, zeleně glukagon pozitivní  $\alpha$ -buňky, červeně PAX6 pozitivní endokrinní buňky. Měřítka 50  $\mu$ m.



**Obr. 5.5:** Zobrazení Langerhansova ostrůvku u E14,5 myši pomocí konfokálního mikroskopu. U kontrol dochází k diferenciaci buněk a formování Langerhansových ostrůvků. U *Isl1CKO* je vidět poškozená struktura a chybějící  $\alpha$ -buňky. Zeleně glukagon pozitivní  $\alpha$ -buňky, modře inzulín pozitivní  $\beta$ -buňky označeny šipkami, červeně PDX1 pozitivní pankreatické buňky. Měřítko 50  $\mu\text{m}$ .

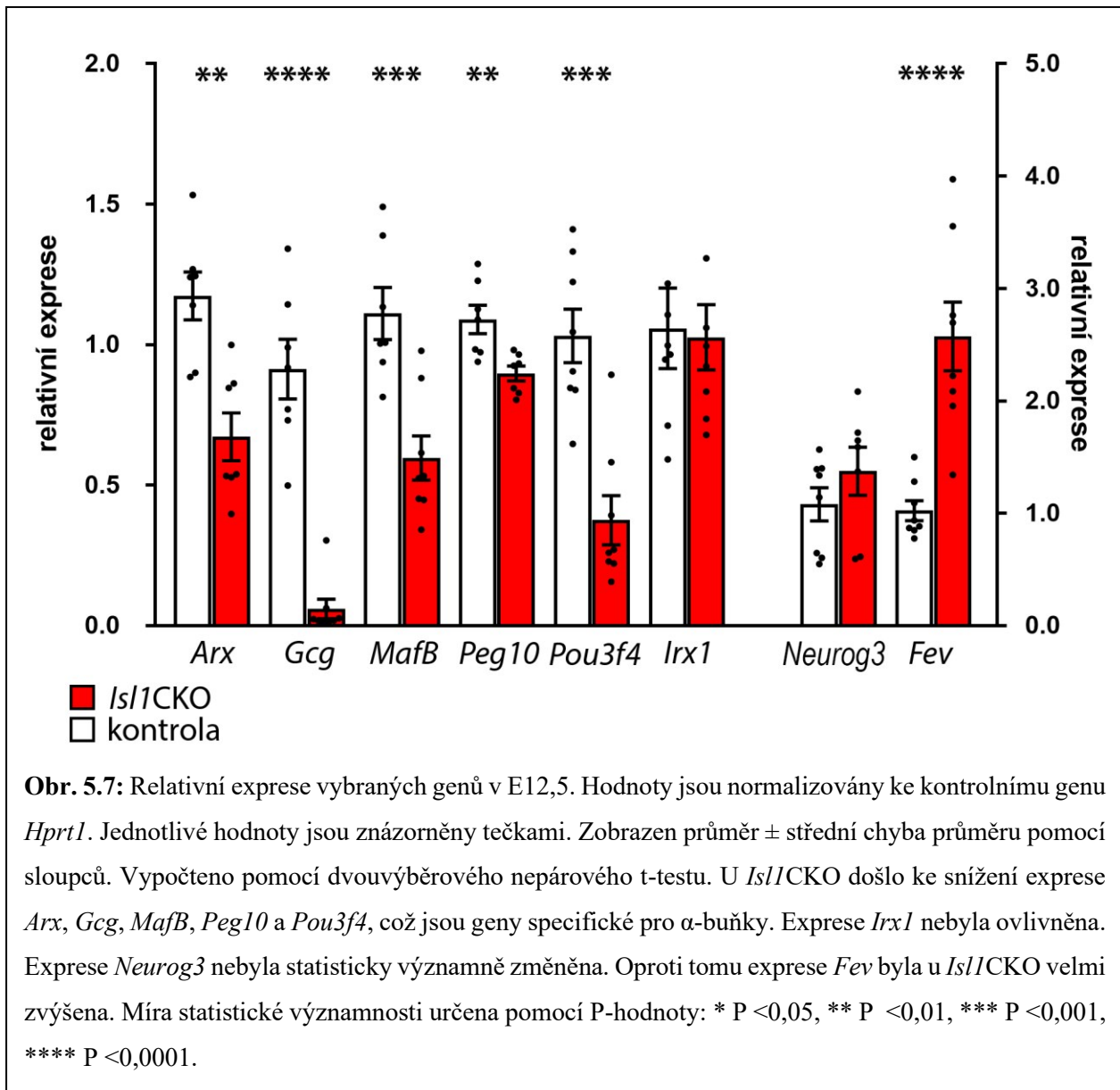


**Obr. 5.6:** Zobrazení Langerhansova ostrůvku u E11,5 myši pomocí konfokálního mikroskopu. U kontrol glukagon produkující buňky vytváří shluky. U *Isl1CKO* jsou tyto buňky chaoticky rozptýleny. Zeleně glukagon pozitivní  $\alpha$ -buňky, červeně PDX1 pozitivní pankreatické buňky. Měřítko 50  $\mu\text{m}$ .

### 5.3. Relativní exprese vybraných genů v E12,5

Vzhledem ke zjevnému defektu  $\alpha$ -buněk v E14,5 byla analýza genové exprese provedena v časnějším stádiu pankreatického vývoje a to v E12,5. Jedná se o první období vývoje, kdy lze slinivku manuálně mikrodisektovat jako morfologicky a velikostně odlišitelnou strukturu. Pro srovnání relativní exprese v E12,5 byly vybrány zejména geny důležité pro  $\alpha$ -linii, jelikož v tomto věku probíhá diferenciaci  $\alpha$ -buněk. Dále byly vybrány geny typické pro prekurzorové buňky. Exprese genů byla kvantifikována pomocí RT-qPCR a vztažena ke kontrolnímu genu *Hprt1*. Pro analýzu bylo použito 8 kontrolních a 8 *Isl1*CKO pankreatů věku E12,5 (Obr. 5.7).

Gen *Arx* je důležitý pro specifikaci  $\alpha$  linie (Collombat et al., 2003). U *Isl1*CKO byla jeho exprese signifikantně snížena. Nejvíce byla ovlivněna exprese glukagonového genu, která byla u *Isl1*CKO mutantů téměř nedetekovatelná. Dále byla významně snížena exprese *MafB*, který slouží jako aktivátor exprese glukagonu v  $\alpha$ -buňkách (Artner et al., 2006). Byl také zjištěn statisticky významný rozdíl v expresi *Peg10*, který je jedním z markerů  $\alpha$ -buněk, ale jeho role v endokrinních buňkách ještě nebyla objasněna (Byrnes et al., 2018). Exprese *Pou3f4* byla také signifikantně snížena u *Isl1*CKO v porovnání s kontrolním pankreatem. POU3F4 je specifický marker pro  $\alpha$ -buňky (Heller et al., 2004). Zajímavé je, že většina genů důležitých pro diferenciaci a funkci  $\alpha$ -buněk byla změněna, až na *Irx1*. Tento gen je totiž také specificky exprimován pouze v  $\alpha$ -buňkách (Petri et al., 2006). Exprese *Neurog3* nebyla ovlivněna. Téměř trojnásobně však byla zvýšena exprese *Fev* u *Isl1*CKO, jehož exprese je typická pro pozdní diferencující endokrinní buňky (Byrnes et al., 2018).



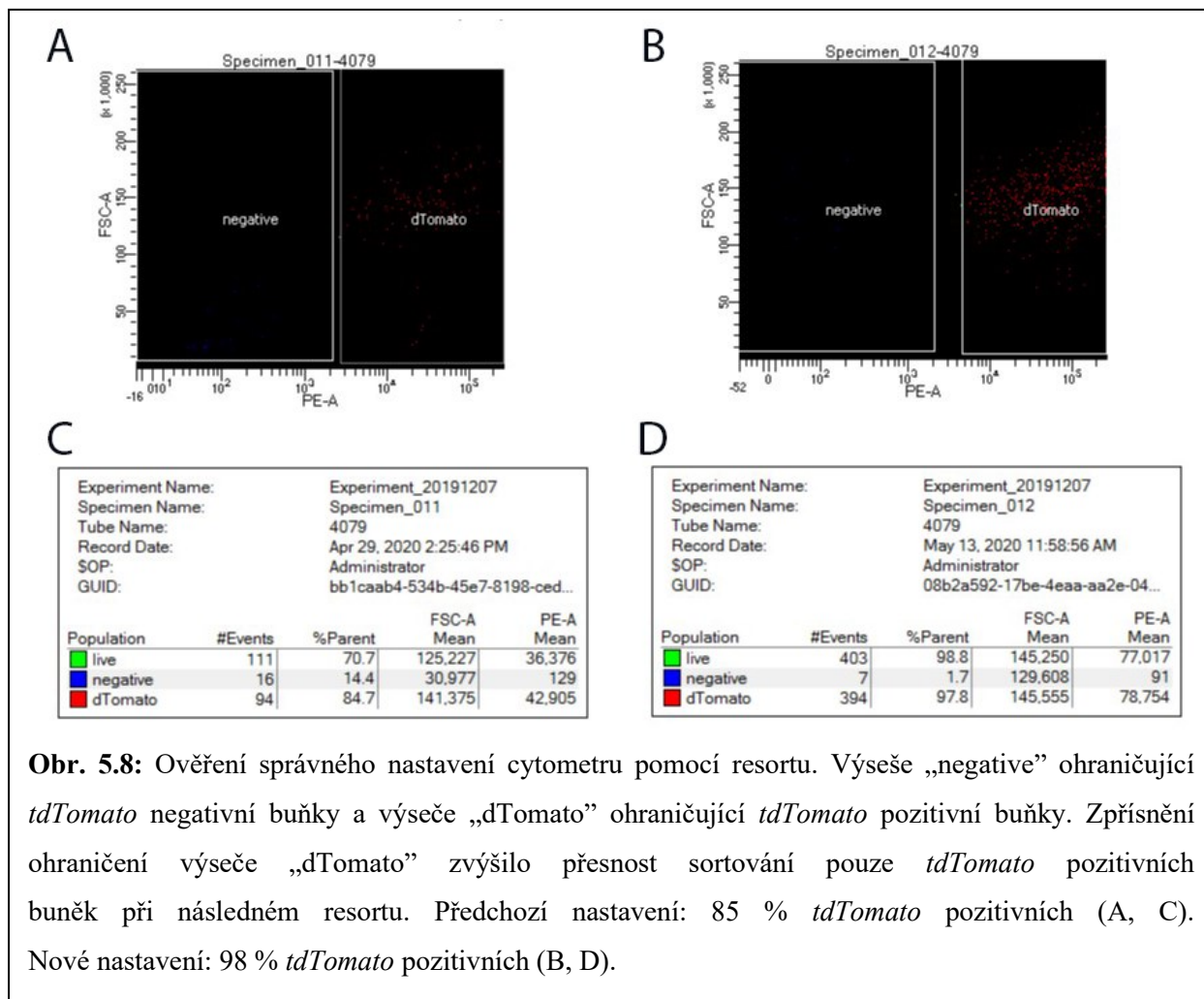
#### **5.4. Sortování endokrinních buněk Langerhansových ostrůvků pomocí fluorescenční průtokové cytometrie (Fluorescent Activated Cell Sorting, FACS)**

Jelikož je ISL1 exprimován také v okolním mezenchymu pankreatu, bylo cílem pro další plánované analýzy (RNA-seq, single cell/bulk RT-qPCR) získat pouze endokrinní buňky Langerhansových ostrůvků a zamezit tak eventuálnímu zkreslení výsledků přítomností mezenchymálních buněk ve vzorcích. Vzhledem ke skutečnosti, že nebyly detekovány žádné rozdíly ve fenotypu mezi ht a kontrolními jedinci, mohly být endokrinní buňky získány z pankreatů ht myši, neboť pro sortování buněk byla nutná exprese reportérového genu, resp. fluorescenčního proteinu, *tdTomato* (viz kapitola 4.1.1 Modelový organismus).

Pro FACS je důležité z tkáně připravit suspenzi individuálních buněk, a proto byla nutná optimalizace enzymatické disociace pancreatické tkáně. V časném embryonálním vývoji i půl dne znamená značný rozdíl ve velikosti orgánu a počtu buněk. Bylo nutné optimalizovat délku trypsinizace při zachování viability buněk. Optimální čas byl 4,5-6 minut, 4-5 minut pro menší pankreaty a 6 minut pro větší. U starších embryí než E14,5 a postnatálních myši byl čas trypsinizace prodloužen až na 8 minut při zachování 95-99% životnosti buněk.

Pro ověření spolehlivosti průtokového cytometru byl proveden resort. Sortovaný vzorek *tdTomato* pozitivních buněk byl znovu kompletně rozsortován a množství obsažených buněk porovnáno. Následně byla zpřísněna selektivita sortování jasnějším ohraničením pozitivní a negativní buněčné populace, což vedlo k navýšení přesnosti sortování z 85 % na 98 % *tdTomato* pozitivních buněk v resortu (Obr. 5.8).

Pro získání co největšího počtu buněk a minimalizaci ztrát byly před zahájením homogenizace spojovány E14,5 pankreaty stejného genotypu do jedné zkumavky. Výsledky sortování jsou uvedeny v Tab. 5.2.



**Obr. 5.8:** Ověření správného nastavení cytometru pomocí resortu. Výšeše „negative” ohraničující *tdTomato* negativní buňky a výšeče „dTomato” ohraničující *tdTomato* pozitivní buňky. Zpřísnění ohraničení výšeče „dTomato” zvýšilo přesnost sortování pouze *tdTomato* pozitivních buněk při následném resortu. Předchozí nastavení: 85 % *tdTomato* pozitivních (A, C). Nové nastavení: 98 % *tdTomato* pozitivních (B, D).

**Tab. 5.2:** Počty nasbíraných tdTomato<sup>+</sup> buněk z E14,5 pankreatů pomocí FACS

<b>Genotyp</b>	<b>Počet pankreatů</b>	<b>Doba trypsinizace [min]</b>	<b>Počet nasbíraných buněk</b>
ht	9	4,75	5295
<i>Isl1</i> CKO	9	4,75	3938
ht	9	5,00	3371
<i>Isl1</i> CKO	6	5,00	2224
ht	4	5,00	1211
<i>Isl1</i> CKO	6	5,00	1616
ht	2	5,00	1837
<i>Isl1</i> CKO	4	5,00	2054
ht	1	5,00	507
<i>Isl1</i> CKO	1	5,00	231
ht	3	5,00	2003
<i>Isl1</i> CKO	2	5,00	1008
ht	5	5,00	1977
<i>Isl1</i> CKO	4	5,00	1484
ht	3	5,00	1774
<i>Isl1</i> CKO	1	5,00	526
ht	7	5,00	3543
<i>Isl1</i> CKO	4	5,00	2168
ht	5	6,00	3946
<i>Isl1</i> CKO	7	6,00	7500
ht	5	6,00	9503
<i>Isl1</i> CKO	4	6,00	1799
ht	5	6,00	3346
<i>Isl1</i> CKO	4	6,00	1014
ht	4	6,00	2155
<i>Isl1</i> CKO	3	6,00	1833
ht	8	6,50	5843
<i>Isl1</i> CKO	3	6,50	2529

## 6. Diskuze

Pro zjištění funkční role transkripčního faktoru ISL1 ve vývoji a formaci endokrinní tkáně pankreatu byl vytvořen myší model *Neurod1-Cre<sup>+/-</sup> Isl1<sup>fl/fl</sup>* (viz kapitola 4.1.1 Modelový organismus). Jedná se o tkáňově specifickou delecí *Isl1* v *Neurod1* pozitivních buňkách. Globální delece *Isl1* je embryonálně letální z důvodu kardiovaskulárního selhání (Cai et al., 2003). V jiné studii byla použita opožděná tkáňově specifická delece *Isl1* pomocí *Pdx1<sup>late</sup>Cre* s aktivitou Cre rekombinázy od E13,5, tedy během sekundární tranzice vývoje pankreatu (Du et al., 2009). V této práci byl použit model s Cre rekombináзой regulovanou *Neurod1* promotorem a s Cre aktivitou v E9,5, tedy během primární tranzice pankreatického vývoje. *Isl1*CKO mutanti se rodili v souladu s Mendelovským rozdělením, tzn. nedocházelo k embryonální letalitě. Novorozené *Isl1*CKO myši nebyly fenotypově odlišné od kontrol a měly srovnatelnou hladinu glukózy v krvi s kontrolami, ale postnatálně u nich došlo k rozvoji diabetu. Jelikož se ISL1 podílí na aktivaci exprese inzulinu, byl diabetes očekávaným fenotypem (Zhang et al., 2009). Postnatálně také docházelo ke snížení hmotnosti mutantů oproti kontrolám, což je jedním z důsledků diabetu (Roche et al., 2005). Ht vykazovali normální fenotyp bez detekovatelných změn v endokrinní tkáni pankreatu. Toto zjištění ukazuje, že jedna funkční alela je dostatečná k udržení správné funkce pankreatu na rozdíl od haploinsuficience *Isl1* v srdci, kdy delece jedné alely *Isl1* způsobuje vrozené srdeční vady (Ma et al., 2019; Z. Wang et al., 2019; Wu et al., 2020). V případě srdce byla studována nesmyslná heterozygotní mutace, která zapříčiní předčasný vznik terminačního kodónu, v genu *Isl1* u člověka (Ma et al., 2019). Ta způsobila předčasné vytvoření stop kodónu a výsledkem byl zkrácený proteinový produkt. Přestože byl defekt pouze v jedné alele tohoto genu, jedna nemutantní alela nestačila k zachování normálního fenotypu. V případě našeho myšího modelu byl u ht v jedné alele pomocí Cre rekombinázy deletován *Isl1*, ale pouze v *Neurod1* pozitivních buňkách. Jedna funkční alela *Isl1* byla dostatečná pro vývoj endokrinní části pankreatu. V případě tohoto myšího modelu jsou ht *Neurod1-Cre<sup>+/-</sup> Isl1<sup>fl/fl</sup>* fenotypově srovnatelní s kontrolami.

Langerhansovy ostrůvky vznikají postupnou diferenciací endokrinních buněk, při čemž jsou dříve diferencované buňky tlačeny dále do vnějšího prostoru (Sharon et al., 2019). Nejprve vznikají tzv. „proto-islets“, které dále fúzí, až nakonec vznikne finální struktura Langerhansova ostrůvku. U myši jsou okraje Langerhansových ostrůvků tvořeny  $\alpha$ -buňkami, které jsou zároveň mezi prvními diferencujícími endokrinními buňkami. Langerhansův ostrůvek je ve výsledku tvořen 5 typy endokrinních buněk, které spolu navzájem interagují. Řada výzkumů se zaměřuje na *in vitro*



diferenciaci  $\beta$ -buněk z iPSC které by mohly být použity po transplantaci k biologické léčbě diabetu (Pagliuca et al., 2014; Sharon et al., 2019). Je známo, že další buněčné typy napomáhají správné maturaci a funkci  $\beta$ -buněk a jejich organizace do formy ostrůvků je proto klíčová. Z tohoto důvodu byla provedena imunohistochemická analýza, která umožnila porovnat zastoupení jednotlivých buněčných typů v ostrůvcích a jejich architekturu. Při zkoumání struktury ostrůvků v P9 bylo zjištěno, že u *Isl1*CKO kompletně chybí populace  $\alpha$ -buněk. Z tohoto důvodu jsme se dále zaměřili na embryonální vývoj, abychom zjistili, ve kterém období dochází ke ztrátě  $\alpha$ -buněk a také příčinu této ztráty. Už v E14,5 byl u *Isl1*CKO zřejmý velmi nízký počet  $\alpha$ -buněk, které byly navíc chaoticky rozprostřeny a nevytvářely základy ostrůvků. Analýzy mladších embryí, E11,5 ukázaly přítomnost glukagon produkujících buněk v *Isl1*CKO, které ale na rozdíl od kontrol nevytvářely shluky buněk. Naše výsledky tedy potvrzují, že zřejmý defekt v architektuře ostrůvku u *Isl1*CKO má původ již v období končící primární tranzice (E11,5). Již dříve bylo popsáno, že delece *Isl1* způsobuje úbytek hormon produkujících buněk v období sekundární tranzice a jejich postnatálně narušenou proliferaci (Du et al., 2009). V této práci navíc ukazujeme, že defekt ve formování  $\alpha$ -buněk a ve formování pankreatických ostrůvků se objevuje již dříve, tedy od časného embryonálního vývoje pankreatu a pojí se s narušenou diferenciací buněk.

Pro bližší určení, které transkripční faktory byly delecí *Isl1* ovlivněny byla provedena analýza relativní exprese. Z důvodu umožnění manuální disekce embryonálního pankreatu byl zvolen věk E12,5. Jelikož z imunohistochemických analýz byl zřejmý defekt v diferenciaci  $\alpha$ -buněk, byly vybrány geny specifické pro  $\alpha$ -linii: *Arx*, *Gcg*, *Irx1*, *MafB*, *Peg10* a *Pou3f4* (Artner et al., 2006; Byrnes et al., 2018; Collombat et al., 2003; Heller et al., 2004; Petri et al., 2006). Dále byla také analyzována exprese genů kódujících transkripční faktory specifické pro prekurzorové buňky: *Neurog3* a *Fev* (van Gurp et al., 2019; Yu et al., 2019). Nejvíce byla u *Isl1*CKO snížena exprese glukagonu, což se shoduje s imunohistochemickými analýzami ostrůvků, kde nebyly detekovány téměř žádné glukagon exprimující buňky. Všechny vybrané geny specifické pro  $\alpha$ -linii vykazovaly významně sníženou expresi, až na *Irx1*. Ten bude nejspíše regulován pomocí jiného mechanismu. Statisticky změněná byla také exprese *Peg10*, který je specifickým markerem  $\alpha$ -buněk, ale jeho role v endokrinních buňkách ještě není známá (Byrnes et al., 2018). Pomocí exprese genů typických pro prekurzorové buňky lze přibližně určit, v jaké fázi diferenciace se buňky nachází. V počátku je vysoká exprese *Neurog3*, která postupně klesá s průběhem diferenciace (Sharon et al., 2019). Existuje i další prekurzorové stádium buněk,

pro které je typická exprese *Fev* (Byrnes et al., 2018). Exprese *Neurog3* nebyla změněna, ale exprese *Fev* byla velmi navýšena u *Isl1*CKO v porovnání s kontrolami. To značí, že u *Isl1*CKO může být velký počet buněk zastaven v pozdním prekurzorovém stádiu. To by mohlo vysvětlovat, proč u mutantů chybí diferencované hormon produkující buňky. Pochopit diferenciaci buněk je mnohem komplikovanější, jelikož RT-qPCR pouze odhalí změny v expresi, ale nikoliv přesný mechanismus, kterým k této změně došlo. Z tohoto experimentu tedy vyplývá, že ISL1 ovlivňuje expresi genů důležitých pro diferenciaci endokrinních buněk v časném vývoji pankreatu. Na vybrané geny bude vhodné cílit další analýzy pro pochopení molekulárních mechanismů stojících za zjištěnými defekty.

ISL1 je kromě endokrinních buněk také exprimován v okolním mezenchymu (Du et al., 2009). Izolace RNA z celého pankreatu, který obsahuje i exokrinní tkáň, může při RT-qPCR dávat zkreslené výsledky. Z tohoto důvodu byla snaha provést další analýzu pouze z endokrinních buněk sortovaných pomocí fluorescenční průtokové cytometrie. Tkáňově specifická heterozygotní delece *Isl1* bez známek defektů pankreatu umožnila použít ht jako kontrolní vzorky. V předchozích publikacích již byly sortovány endokrinní buňky pankreatu například pomocí navázaného reportérového genu *eGFP* na expresi *Neurog3* (Sharon et al., 2019; Sugiyama et al., 2007). V našem myším modelu byl reportérový gen *tdTomato* u ht a *Isl1*CKO exprimován ve všech *Neurod1* pozitivních buňkách, což jsou v případě pankreatu pouze endokrinní buňky. Tento fakt umožnil cytometricky rozeznat endokrinní buňky od zbytku pankreatických buněk. Pro FACS analýzu bylo nezbytné z tkáně připravit suspenzi buněk. Odhad optimální doby trypsinizace dle velikosti orgánu byl klíčový pro efektivní zisk co největšího počtu buněk při zachování jejich maximální životnosti. Pro odhad, v předchozích publikacích z E14,5 pankreatu bylo získáno okolo 180 buněk (Sharon et al., 2019). V této práci však bylo prokázáno, že optimalizací metody je možné získat několik set endokrinních buněk z jednoho embryonálního pankreatu. Případné ztráty mohly být způsobeny nevhodně zvolenou koncentrací připraveného trypsinu, nepřesnou mikromanipulací s tkání, či příliš dlouhou statickou dobou před samotným sortováním.

Tato práce potvrzuje, že ISL1 je nepostradatelný pro správnou diferenciaci  $\alpha$ -buněk a s nimi spojenou architekturu Langerhansových ostrůvků. Molekulární mechanismus regulace exprese ovlivněných genů zůstává výzvou pro moderní molekulárně biologické analýzy. Nedávná studie například ukázala přímý vliv ISL1 na regulaci chromatinu v průběhu kardiogeneze (Gao et al., 2019).

## 7. Závěr

Cílem této práce bylo objasnit funkční roli ISL1 ve vývoji pankreatu pomocí tkáňově specifické delece *Isl1*. Tento model je životaschopný, myši se rodí v souladu s Mendelovským rozdělením, avšak postnatálně dochází u *Isl1*CKO k rozvoji diabetu.

Z výsledků této práce je zřejmé, že delece *Isl1* způsobuje defekty ve struktuře Langerhansových ostrůvků. Příčinou může být absence  $\alpha$  linie buněk, které tvoří okraje ostrůvků. Diferencují se totiž mezi prvními endokrinními buňkami a dávají vznik prvotní struktuře ostrůvků, takzvaným „proto-islets“. Dalším důvodem pro diabetický fenotyp je také významně snížená produkce inzulínu  $\beta$ -buňkami, protože ISL1 reguluje expresi inzulínu vazbou do promotoru inzulínového genu.

Srovnáním exprese vybraných genů v E12,5 bylo zjištěno, že delece *Isl1* ovlivňuje expresi genů důležitých pro funkci a diferenciaci  $\alpha$ -buněk. Došlo ke snížení relativní exprese genů *Arx*, *Gcg*, *Mafb*, *Peg10* a *Pou3f4*. Exprese glukagonu byla téměř nulová, což se shoduje s absencí glukagon pozitivních  $\alpha$ -buněk. Naopak relativní exprese *Fev* byla signifikantně zvýšena u *Isl1*CKO, což značí, že delece *Isl1* způsobuje narušení diferenciaci buněk, které poté zůstávají zastaveny v prekurzorovém stadiu.

Také byl optimalizován protokol pro efektivní sortování endokrinních buněk pomocí fluorescenční průtokové cytometrie. Výsledky ukazují, že vhodnou homogenizací tkáně a optimální inkubací v trypsinu lze sortovat až několik stovek budoucích endokrinních buněk z E14,5 pankreatu.

Tato práce potvrzuje, že ISL1 je nepostradatelným transkripčním faktorem ve vývoji a funkci pankreatu a ukazuje, že jeho absence způsobuje buněčné defekty již během časného embryonálního vývoje. Důsledky těchto defektů vedou ke změnám na úrovni endokrinní tkáně a patofyziologickému rozvoji diabetu.

## Seznam literary

- Ahlgren, U., Pfaff, S. L., Jessell, T. M., Edlund, T., & Edlund, H. (1997). Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature*, *385*(6613), 257–260. <https://doi.org/10.1038/385257a0>
- Ahmad, Z., Rasouli, M., Azman, A. Z. F., & Omar, A. R. (2012). Evaluation of insulin expression and secretion in genetically engineered gut K and L-cells. *BMC Biotechnology*, *12*, 64. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-12-64>
- Alagpulinsa, D. A., Cao, J. J. L., Driscoll, R. K., Sîrbulescu, R. F., Penson, M. F. E., Sremac, M., Engquist, E. N., Brauns, T. A., Markmann, J. F., Melton, D. A., & Poznansky, M. C. (2019). Alginate-microencapsulation of human stem cell-derived  $\beta$  cells with CXCL12 prolongs their survival and function in immunocompetent mice without systemic immunosuppression. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, *19*(7), 1930–1940. <https://doi.org/10.1111/ajt.15308>
- \*Anguela, X. M., & High, K. A. (2019). Entering the Modern Era of Gene Therapy. *Annual Review of Medicine*, *70*, 273–288. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-012017-043332>
- Artner, I., Le Lay, J., Hang, Y., Elghazi, L., Schisler, J. C., Henderson, E., Sosa-Pineda, B., & Stein, R. (2006). MafB: an activator of the glucagon gene expressed in developing islet alpha- and beta-cells. *Diabetes*, *55*(2), 297–304. <https://doi.org/10.2337/diabetes.55.02.06.db05-0946>
- Barg, S., Galvanovskis, J., Göpel, S. O., Rorsman, P., & Eliasson, L. (2000). Tight coupling between electrical activity and exocytosis in mouse glucagon-secreting alpha-cells. *Diabetes*, *49*(9), 1500–1510. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.9.1500>
- Bennett, K., James, C., Mutair, A., Al-Shaikh, H., Sinani, A., & Hussain, K. (2011). Four novel cases of permanent neonatal diabetes mellitus caused by homozygous mutations in the glucokinase gene. *Pediatric Diabetes*, *12*(3 Pt 1), 192–196. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5448.2010.00683.x>
- Bianchi, R., Teijeira, A., Proulx, S. T., Christiansen, A. J., Seidel, C. D., Rüllicke, T., Mäkinen, T., Hägerling, R., Halin, C., & Detmar, M. (2015). A transgenic Prox1-Cre-tdTomato reporter mouse for lymphatic vessel research. *PloS One*, *10*(4), e0122976. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122976>

- Bittner-Eddy, P. D., Fischer, L. A., & Costalonga, M. (2019). Cre-loxP Reporter Mouse Reveals Stochastic Activity of the Foxp3 Promoter. *Frontiers in Immunology*, *10*, 2228. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02228>
- Bosco, D., Armanet, M., Morel, P., Niclauss, N., Sgroi, A., Muller, Y. D., Giovannoni, L., Parnaud, G., & Berney, T. (2010). Unique Arrangement of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Cells in Human Islets of Langerhans. *Diabetes*, *59*(5), 1202 LP – 1210. <https://doi.org/10.2337/db09-1177>
- Byrnes, L. E., Wong, D. M., Subramaniam, M., Meyer, N. P., Gilchrist, C. L., Knox, S. M., Tward, A. D., Ye, C. J., & Sneddon, J. B. (2018). Lineage dynamics of murine pancreatic development at single-cell resolution. *Nature Communications*, *9*(1), 3922. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06176-3>
- Cabrera, O., Berman, D. M., Kenyon, N. S., Ricordi, C., Berggren, P.-O., & Caicedo, A. (2006). The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(7), 2334 LP – 2339. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510790103>
- Cai, C.-L., Liang, X., Shi, Y., Chu, P.-H., Pfaff, S. L., Chen, J., & Evans, S. (2003). Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Developmental Cell*, *5*(6), 877–889. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(03\)00363-0](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00363-0)
- Collombat, P., Hecksher-Sørensen, J., Broccoli, V., Krull, J., Ponte, I., Mundiger, T., Smith, J., Gruss, P., Serup, P., & Mansouri, A. (2005). The simultaneous loss of Arx and Pax4 genes promotes a somatostatin-producing cell fate specification at the expense of the alpha- and beta-cell lineages in the mouse endocrine pancreas. *Development (Cambridge, England)*, *132*(13), 2969–2980. <https://doi.org/10.1242/dev.01870>
- Collombat, P., Mansouri, A., Hecksher-Sorensen, J., Serup, P., Krull, J., Gradwohl, G., & Gruss, P. (2003). Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. *Genes & Development*, *17*(20), 2591–2603. <https://doi.org/10.1101/gad.269003>
- Dabelea, D., Mayer-Davis, E. J., Saydah, S., Imperatore, G., Linder, B., Divers, J., Bell, R., Badaru, A., Talton, J. W., Crume, T., Liese, A. D., Merchant, A. T., Lawrence, J. M., Reynolds, K., Dolan, L., Liu, L. L., & Hamman, R. F. (2014). Prevalence of type 1 and type 2 diabetes among children and adolescents from 2001 to 2009. *JAMA*, *311*(17), 1778–1786. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3201>

- \*Daneman, D. (2006). Type 1 diabetes. *Lancet (London, England)*, 367(9513), 847–858. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68341-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68341-4)
- \*Dassaye, R., Naidoo, S., & Cerf, M. E. (2016). Transcription factor regulation of pancreatic organogenesis, differentiation and maturation. *Islets*, 8(1), 13–34. <https://doi.org/10.1080/19382014.2015.1075687>
- Diagnosis and classification of diabetes mellitus. (2014). *Diabetes Care*, 37 Suppl 1, S81–90. <https://doi.org/10.2337/dc14-S081>
- Dolenšek, J., Rupnik, M. S., & Stožer, A. (2015). Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets*, 7(1), e1024405. <https://doi.org/10.1080/19382014.2015.1024405>
- Dong, J., Asa, S. L., & Drucker, D. J. (1991). Islet cell and extrapancreatic expression of the LIM domain homeobox gene *isl-1*. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 5(11), 1633–1641. <https://doi.org/10.1210/mend-5-11-1633>
- Druet, C., Tubiana-Rufi, N., Chevenne, D., Rigal, O., Polak, M., & Levy-Marchal, C. (2006). Characterization of insulin secretion and resistance in type 2 diabetes of adolescents. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(2), 401–404. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-1672>
- Du, A., Hunter, C. S., Murray, J., Noble, D., Cai, C.-L., Evans, S. M., Stein, R., & May, C. L. (2009). Islet-1 is required for the maturation, proliferation, and survival of the endocrine pancreas. *Diabetes*, 58(9), 2059–2069. <https://doi.org/10.2337/db08-0987>
- 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(32), 19945–19954. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.32.19945>
- Gao, R., Liang, X., Cheedipudi, S., Cordero, J., Jiang, X., Zhang, Q., Caputo, L., Günther, S., Kuenne, C., Ren, Y., Bhattacharya, S., Yuan, X., Barreto, G., Chen, Y., Braun, T., Evans, S. M., Sun, Y., & Dobrev, G. (2019). Pioneering function of *Isl1* in the epigenetic control of cardiomyocyte cell fate. *Cell Research*, 29(6), 486–501. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0168-1>
- Ginsberg, H., Kimmerling, G., Olefsky, J. M., & Reaven, G. M. (1975). Demonstration of insulin resistance in untreated adult onset diabetic subjects with fasting hyperglycemia. *The Journal*

- of Clinical Investigation*, 55(3), 454–461. <https://doi.org/10.1172/JCI107951>
- Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M., & Guillemot, F. (2000). neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(4), 1607–1611. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.4.1607>
- Gu, G., Dubauskaite, J., & Melton, D. A. (2002). Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development (Cambridge, England)*, 129(10), 2447–2457.
- Heller, R. S., Jenny, M., Collombat, P., Mansouri, A., Tomasetto, C., Madsen, O. D., Mellitzer, G., Gradwohl, G., & Serup, P. (2005). Genetic determinants of pancreatic epsilon-cell development. *Developmental Biology*, 286(1), 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.06.041>
- Heller, R. S., Stoffers, D. A., Liu, A., Schedl, A., Crenshaw, E. B. 3rd, Madsen, O. D., & Serup, P. (2004). The role of Brn4/Pou3f4 and Pax6 in forming the pancreatic glucagon cell identity. *Developmental Biology*, 268(1), 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.12.008>
- Hering, B. J., Kandaswamy, R., Ansite, J. D., Eckman, P. M., Nakano, M., Sawada, T., Matsumoto, I., Ihm, S.-H., Zhang, H.-J., Parkey, J., Hunter, D. W., & Sutherland, D. E. R. (2005). Single-donor, marginal-dose islet transplantation in patients with type 1 diabetes. *JAMA*, 293(7), 830–835. <https://doi.org/10.1001/jama.293.7.830>
- Hernandez, D., Chandan, P., Janmohamed, A., Phillips, I. R., & Shephard, E. A. (2006). Deletion of Genes From the Mouse Genome Using Cre/loxP Technology. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 320, 307–319. <https://doi.org/10.1385/1-59259-998-2:307>
- Itkin-Ansari, P., Marcora, E., Geron, I., Tyrberg, B., Demeterco, C., Hao, E., Padilla, C., Ratineau, C., Leiter, A., Lee, J. E., & Levine, F. (2005). NeuroD1 in the endocrine pancreas: localization and dual function as an activator and repressor. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 233(3), 946–953. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20443>
- James, D. E., Brown, R., Navarro, J., & Pilch, P. F. (1988). Insulin-regulatable tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein. *Nature*, 333(6169), 183–185. <https://doi.org/10.1038/333183a0>
- \*Kim, H.-S., & Lee, M.-K. (2016).  $\beta$ -Cell regeneration through the transdifferentiation of

- pancreatic cells: Pancreatic progenitor cells in the pancreas. *Journal of Diabetes Investigation*, 7(3), 286–296. <https://doi.org/10.1111/jdi.12475>
- Klueh, U., Liu, Z., Cho, B., Ouyang, T., Feldman, B., Henning, T. P., Kaur, M., & Kreutzer, D. (2006). Continuous glucose monitoring in normal mice and mice with prediabetes and diabetes. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 8(3), 402–412. <https://doi.org/10.1089/dia.2006.8.402>
- Kumar, M., Jordan, N., Melton, D., & Grapin-Botton, A. (2003). Signals from lateral plate mesoderm instruct endoderm toward a pancreatic fate. *Developmental Biology*, 259(1), 109–122. [https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(03\)00183-0](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(03)00183-0)
- \*Larsen, H. L., & Grapin-Botton, A. (2017). The molecular and morphogenetic basis of pancreas organogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 66, 51–68. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.01.005>
- Li, H. J., Kapoor, A., Giel-Moloney, M., Rindi, G., & Leiter, A. B. (2012). Notch signaling differentially regulates the cell fate of early endocrine precursor cells and their maturing descendants in the mouse pancreas and intestine. *Developmental Biology*, 371(2), 156–169. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.08.023>
- Li, H., Li, X., Lam, K. S. L., Tam, S., Xiao, W., & Xu, R. (2008). Adeno-associated virus-mediated pancreatic and duodenal homeobox gene-1 expression enhanced differentiation of hepatic oval stem cells to insulin-producing cells in diabetic rats. *Journal of Biomedical Science*, 15(4), 487–497. <https://doi.org/10.1007/s11373-008-9233-3>
- Li, Z., Manna, P., Kobayashi, H., Spilde, T., Bhatia, A., Preuett, B., Prasad, K., Hembree, M., & Gittes, G. K. (2004). Multifaceted pancreatic mesenchymal control of epithelial lineage selection. *Developmental Biology*, 269(1), 252–263. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.01.043>
- Ma, L., Wang, J., Li, L., Qiao, Q., Di, R.-M., Li, X.-M., Xu, Y.-J., Zhang, M., Li, R.-G., Qiu, X.-B., Li, X., & Yang, Y.-Q. (2019). ISL1 loss-of-function mutation contributes to congenital heart defects. *Heart and Vessels*, 34(4), 658–668. <https://doi.org/10.1007/s00380-018-1289-z>
- Matsuoka, T., Artner, I., Henderson, E., Means, A., Sander, M., & Stein, R. (2004). The MafA transcription factor appears to be responsible for tissue-specific expression of insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), 2930 LP – 2933. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306233101>



- McClive, P. J., & Sinclair, A. H. (2001). Rapid DNA extraction and PCR-sexing of mouse embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 60(2), 225–226. <https://doi.org/10.1002/mrd.1081>
- McLellan, M. A., Rosenthal, N. A., & Pinto, A. R. (2017). Cre-loxP-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations. *Current Protocols in Mouse Biology*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1002/cpmo.22>
- Mutoh, H., Fung, B. P., Naya, F. J., Tsai, M. J., Nishitani, J., & Leiter, A. B. (1997). The basic helix-loop-helix transcription factor BETA2/NeuroD is expressed in mammalian enteroendocrine cells and activates secretin gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(8), 3560–3564. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.8.3560>
- Napolitano, T., Avolio, F., Vieira, A., Ben Othman, N., Courtney, M., Gjernes, E., Hadzic, B., Druelle, N., Navarro Sanz, S., Silvano, S., Mansouri, A., & Collombat, P. (2017). GABA signaling stimulates  $\alpha$ -cell-mediated  $\beta$ -like cell neogenesis. *Communicative & Integrative Biology*, 10. <https://doi.org/10.1080/19420889.2017.1300215>
- Naya, F. J., Huang, H. P., Qiu, Y., Mutoh, H., DeMayo, F. J., Leiter, A. B., & Tsai, M. J. (1997). Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes & Development*, 11(18), 2323–2334. <https://doi.org/10.1101/gad.11.18.2323>
- Nishimura, W., Kondo, T., Salameh, T., El Khattabi, I., Dodge, R., Bonner-Weir, S., & Sharma, A. (2006). A switch from MafB to MafA expression accompanies differentiation to pancreatic beta-cells. *Developmental Biology*, 293(2), 526–539. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.02.028>
- Ohlsson, H., Karlsson, K., & Edlund, T. (1993). IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *The EMBO Journal*, 12(11), 4251–4259.
- Pagliuca, F. W., Millman, J. R., Gürtler, M., Segel, M., Van Dervort, A., Ryu, J. H., Peterson, Q. P., Greiner, D., & Melton, D. A. (2014). Generation of Functional Human Pancreatic  $\beta$  Cells In Vitro. *Cell*, 159(2), 428–439. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.040>
- \*Pan, F. C., & Wright, C. (2011). Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 240(3), 530–565. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22584>

- Petri, A., Ahnfelt-Rønne, J., Frederiksen, K. S., Edwards, D. G., Madsen, D., Serup, P., Fleckner, J., & Heller, R. S. (2006). The effect of neurogenin3 deficiency on pancreatic gene expression in embryonic mice. *Journal of Molecular Endocrinology*, *37*(2), 301–316. <https://doi.org/10.1677/jme.1.02096>
- Pfaff, S. L., Mendelsohn, M., Stewart, C. L., Edlund, T., & Jessell, T. M. (1996). Requirement for LIM homeobox gene *Isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell*, *84*(2), 309–320. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80985-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80985-x)
- Piper, R. C., Hess, L. J., & James, D. E. (1991). Differential sorting of two glucose transporters expressed in insulin-sensitive cells. *The American Journal of Physiology*, *260*(3 Pt 1), C570–80. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1991.260.3.C570>
- Roche, E. F., Menon, A., Gill, D., & Hoey, H. (2005). Clinical presentation of type 1 diabetes. *Pediatric Diabetes*, *6*(2), 75–78. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1399-543X.2005.00110.x>
- Schwitzgebel, V. M., Scheel, D. W., Conners, J. R., Kalamaras, J., Lee, J. E., Anderson, D. J., Sussel, L., Johnson, J. D., & German, M. S. (2000). Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development (Cambridge, England)*, *127*(16), 3533–3542.
- Sharon, N., Chawla, R., Mueller, J., Vanderhooft, J., Whitehorn, L. J., Rosenthal, B., Gürtler, M., Estanbouliéh, R. R., Shvartsman, D., Gifford, D. K., Trapnell, C., & Melton, D. (2019). A Peninsular Structure Coordinates Asynchronous Differentiation with Morphogenesis to Generate Pancreatic Islets. *Cell*, *176*(4), 790–804.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.003>
- Shternhall-Ron, K., Quintana, F. J., Perl, S., Meivar-Levy, I., Barshack, I., Cohen, I. R., & Ferber, S. (2007). Ectopic PDX-1 expression in liver ameliorates type 1 diabetes. *Journal of Autoimmunity*, *28*(2–3), 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2007.02.010>
- Smith, S. B., Ee, H. C., Conners, J. R., & German, M. S. (1999). Paired-homeodomain transcription factor PAX4 acts as a transcriptional repressor in early pancreatic development. *Molecular and Cellular Biology*, *19*(12), 8272–8280. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.12.8272>
- Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Torres, M., Oliver, G., & Gruss, P. (1997). The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas.

*Nature*, 386(6623), 399–402. <https://doi.org/10.1038/386399a0>

- Spaeth, J. M., Liu, J.-H., Peters, D., Guo, M., Osipovich, A. B., Mohammadi, F., Roy, N., Bhushan, A., Magnuson, M. A., Hebrok, M., Wright, C. V. E., & Stein, R. (2019). The Pdx1-Bound Swi/Snf Chromatin Remodeling Complex Regulates Pancreatic Progenitor Cell Proliferation and Mature Islet  $\beta$ -Cell Function. *Diabetes*, 68(9), 1806 LP – 1818. <https://doi.org/10.2337/db19-0349>
- Staffers, D. A., Ferrer, J., Clarke, W. L., & Habener, J. F. (1997). Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nature Genetics*, 17(2), 138–139. <https://doi.org/10.1038/ng1097-138>
- Stoffers, D. A., Zinkin, N. T., Stanojevic, V., Clarke, W. L., & Habener, J. F. (1997). Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nature Genetics*, 15(1), 106–110. <https://doi.org/10.1038/ng0197-106>
- Sugiyama, T., Rodriguez, R. T., McLean, G. W., & Kim, S. K. (2007). Conserved markers of fetal pancreatic epithelium permit prospective isolation of islet progenitor cells by FACS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(1), 175–180. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609490104>
- Sun, Y., Dykes, I. M., Liang, X., Eng, S. R., Evans, S. M., & Turner, E. E. (2008). A central role for Islet1 in sensory neuron development linking sensory and spinal gene regulatory programs. *Nature Neuroscience*, 11(11), 1283–1293. <https://doi.org/10.1038/nn.2209>
- Sutherland, E. W., & de Duve, C. (1948). ORIGIN AND DISTRIBUTION OF THE HYPERGLYCEMIC-GLYCOGENOLYTIC FACTOR OF THE PANCREAS. *Journal of Biological Chemistry*, 175(2), 663–674. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)57183-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)57183-0)
- Takahashi, Y., Takebe, T., & Taniguchi, H. (2016). Engineering pancreatic tissues from stem cells towards therapy. *Regenerative Therapy*, 3, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2016.01.002>
- Thorel, F., Népote, V., Avril, I., Kohno, K., Desgraz, R., Chera, S., & Herrera, P. L. (2010). Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. *Nature*, 464(7292), 1149–1154. <https://doi.org/10.1038/nature08894>
- Tschen, S.-I., Dhawan, S., Gurlo, T., & Bhushan, A. (2009). Age-dependent decline in beta-cell proliferation restricts the capacity of beta-cell regeneration in mice. *Diabetes*, 58(6), 1312–1320. <https://doi.org/10.2337/db08-1651>

- Turque, N., Plaza, S., Radvanyi, F., Carriere, C., & Saule, S. (1994). Pax-QNR/Pax-6, a paired box- and homeobox-containing gene expressed in neurons, is also expressed in pancreatic endocrine cells. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 8(7), 929–938. <https://doi.org/10.1210/mend.8.7.7984154>
- van Gurp, L., Muraro, M. J., Dielen, T., Seneby, L., Dharmadhikari, G., Gradwohl, G., van Oudenaarden, A., & de Koning, E. J. P. (2019). A transcriptomic roadmap to  $\alpha$ - and  $\beta$ -cell differentiation in the embryonic pancreas. *Development*, 146(12), dev173716. <https://doi.org/10.1242/dev.173716>
- Wang, Q., Elghazi, L., Martin, S., Martins, I., Srinivasan, R. S., Geng, X., Sleeman, M., Collombat, P., Houghton, J., & Sosa-Pineda, B. (2008). Ghrelin is a novel target of Pax4 in endocrine progenitors of the pancreas and duodenum. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 237(1), 51–61. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21379>
- Wang, Z., Song, H.-M., Wang, F., Zhao, C.-M., Huang, R.-T., Xue, S., Li, R.-G., Qiu, X.-B., Xu, Y.-J., Liu, X.-Y., & Yang, Y.-Q. (2019). A New ISL1 Loss-of-Function Mutation Predisposes to Congenital Double Outlet Right Ventricle. *International Heart Journal*, 60(5), 1113–1122. <https://doi.org/10.1536/ihj.18-685>
- World Health Organization. (2016). *Diabetes country profiles*. Diabetes Country Profiles. [https://www.who.int/diabetes/country-profiles/cze\\_en.pdf](https://www.who.int/diabetes/country-profiles/cze_en.pdf)
- Wu, S.-H., Wang, X.-H., Xu, Y.-J., Gu, J.-N., Yang, C.-X., Qiao, Q., Guo, X.-J., Guo, Y.-H., Qiu, X.-B., Jiang, W.-F., & Yang, Y.-Q. (2020). ISL1 loss-of-function variation causes familial atrial fibrillation. *European Journal of Medical Genetics*, 63(11), 104029. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2020.104029>
- Wyler, S. C., Spencer, W. C., Green, N. H., Rood, B. D., Crawford, L., Craige, C., Gresch, P., McMahon, D. G., Beck, S. G., & Deneris, E. (2016). Pet-1 Switches Transcriptional Targets Postnatally to Regulate Maturation of Serotonin Neuron Excitability. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 36(5), 1758–1774. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3798-15.2016>
- Yu, X.-X., Qiu, W.-L., Yang, L., Zhang, Y., He, M.-Y., Li, L.-C., & Xu, C.-R. (2019). Defining multistep cell fate decision pathways during pancreatic development at single-cell resolution. *The EMBO Journal*, 38(8). <https://doi.org/10.15252/embj.2018100164>

- Zhang, H., Wang, W.-P., Guo, T., Yang, J.-C., Chen, P., Ma, K.-T., Guan, Y.-F., & Zhou, C.-Y. (2009). The LIM-homeodomain protein ISL1 activates insulin gene promoter directly through synergy with BETA2. *Journal of Molecular Biology*, 392(3), 566–577. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.07.036>
- Zhou, Q., Law, A. C., Rajagopal, J., Anderson, W. J., Gray, P. A., & Melton, D. A. (2007). A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis. *Developmental Cell*, 13(1), 103–114. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.06.001>

---

\* sekundární zdroj