

Immunhistochemische Charakterisierung der Zellen des endokrinen Pankreas bei Wachstumshormon-transgenen Mäusen

B.G.A. Holtmann

Zusammenfassung: Das endokrine Pankreas transgener Mäuse, die Kopien eines Genkonstruktes bestehend aus dem Metallothionein I-Promotor der Maus (mMT) und dem Strukturgen für humanes oder bovines Wachstumshormon (hGH bzw. bGH) im Genom tragen, wurde immunhistochemisch untersucht. Als Vergleichstiere dienten nicht transgene Mäuse der NMRI-Auszuchtpopulation (Pop). Die Darstellung der endokrinen Zellpopulationen der Langerhansschen Inseln mittels indirekter Immunperoxidase-Technik und DAB als Chromogen führte zu einer rotbraunen Anfärbung der A-, B-, D- und PP-Zellen. Mit Hilfe eines indirekten immunalkalischen Phosphatase-Verfahrens wurde hGH oder bGH im Pankreas transgener Mäuse als Hinweis auf eine Transgen-Expression nachgewiesen. GH-haltige Zellen färbten sich infolge des als Chromogen eingesetzten Fast Blue BB blau. Unter Verwendung speziesdifferenter Antikörperpräparationen gelang die simultane intrazelluläre Darstellung von GH (hGH bzw. bGH) und Insulin. Als wesentlich erwies sich die Verwendung des indirekten immunalkalischen Phosphatase-Verfahrens in der 1. Reaktionsfolge und die nachfolgende Anwendung des Immunperoxidase-Verfahrens. Dies führte zu einer blaubraunen Farbmischung im Großteil der B-Zellen als Ausdruck einer simultanen Präsenz der beiden Hormone. Schwierigkeiten ergaben sich bei Verwendung speziesidentischer Primärantikörper zur Simultandarstellung von GH einerseits und der Inselhormone (Glukagon, Somatostatin oder PP) andererseits. Die hierbei notwendige Säureinkubation beeinträchtigte die Farbqualität des blauen Fast Blue BB-Reaktionsproduktes, so daß eine eindeutige Differenzierung zwischen einfach und doppelt markierten Zellen nicht mehr möglich war. Die Umkehr der Reaktionsfolge (Immunperoxidase in der 1. und immunalkalische Phosphatase in der 2. Reaktionsfolge) ergab eine unspezifische Farbmischung, die eine Auswertung der Präparate nicht mehr ermöglichte. Die immunhistochemische Darstellung der endokrinen Zellpopulation im Pankreas transgener Mäuse ließ im Vergleich zu Kontrolltieren keine Unterschiede in der Verteilung der verschiedenen Zelltypen erkennen: Die B-Zellen nehmen überwiegend eine zentrale Position innerhalb der Langerhansschen Inseln ein und sind von einem schmalen Saum in der Inselperipherie gelegener A-, D- und PP-Zellen umgeben. Die durchgeführten Untersuchungen ergaben Hinweise auf ein unterschiedliches Expressionsmuster bei hGH- und bGH-transgenen Mäusen. Während bei den mMT-bGH-transgenen Tieren GH-haltige Zellen nur im endokrinen Pankreas zu beobachten waren, zeigte bei den mMT-hGH-transgenen Mäusen auch das exokrine Gewebe eine deutlich positive Reaktion. Die bei mMT-bGH-transgenen Mäusen erhobenen Befunde sprechen für eine selektive Expression des Transgens durch die B-Zellen, wohingegen bei den hGH-transgenen Tieren auch andere Inselzellen an der Expression beteiligt sind. Ihre Identifizierung als A-, D- oder PP-Zellen war aufgrund der Schwierigkeiten bei der simultanen Darstellung von Antigenen unter Anwendung von Primärantikörpern aus derselben Tierspezies nicht möglich. Linienunterschiede wurden bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tieren nicht beobachtet.

Summary: Immunohistochemical investigation of the endocrine pancreas was carried out on transgenic mice which carried copies of a gene construct consisting of the murine metallothionein I-promoter (mMT) and the structural gene for human or bovine growth hormone (i.e. hGH or bGH) in their genome. Non-transgenic mice of the basic NMRI population (Pop) served for comparison. Visualization of endocrine cell populations in the islets of Langerhans, using an indirect immunoperoxidase technique with DAB as the chromogen, expressed itself as a ruddy brown coloration of the A-, B-, D- and PP-cells. As an indication of transgene expression, hGH/bGH were able to be demonstrated in the pancreas of transgenic mice with the help of an indirect immunoalkaline phosphatase procedure. Cells containing GH took on a blue color as a result of the Fast Blue BB chromogen employed. Simultaneous intracellular visualization of GH (i.e. hGH or bGH) and insulin was successfully achieved through the use of antibody preparations from different species. In this

context, it proved essential to carry out the indirect immunoalkaline phosphatase method in the first reaction sequence, with subsequent use of the immunoperoxidase procedure. This led to a blue/brown mixture of color in a large portion of the B-cells, as an expression of the simultaneous presence of both hormones. Difficulties were encountered when primary antibodies from the same species were used when attempting the simultaneous demonstration of GH on the one hand, and islet hormones (glucagon, somatostatin or PP) on the other. The acidic incubation necessary under these conditions impaired the color quality of the Fast Blue BB reaction product to the extent that clear-cut differentiation between single- and double-labelled cells was no longer possible. Reversal of the reaction order (initial immunoperoxidase treatment, followed by immunoalkaline phosphatase) resulted in a non-specific mixture of color, which prohibited evaluation of the samples. As opposed to the situation in control animals, immunohistochemical visualization of the endocrine cell population in the pancreas of transgenic mice revealed no differences in distribution of the various cell types. B-cells occupy a predominately central position within the islets of Langerhans and are surrounded by a small border of A-, D- and PP-cells located in the periphery of the islets. The investigations performed provided indications of a different expression pattern in hGH and bGH transgenic mice. Whereas in mMT-bGH transgenic animals cells containing GH could only be found in the endocrine pancreas, mMT-hGH transgenic mice showed a clearly visible reaction in the exocrine tissue. The findings in mMT-bGH transgenic mice suggest selective expression of the transgene in the B-cells, whereas other islet cells are also seen to participate in expression in the case of hGH-transgenic animals. Assignment of cells to the A-, D- or PP-populations was not possible on account of the difficulties encountered while attempting the simultaneous demonstration of antigens when using primary antibodies from the same species of animal. Lineage differences were not observed between animals investigated in the context of this study.