فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۲۳، جلد ۶، شماره ۴، پائیز ۹۲، صفحه ۴۵ تا ۵۲

بیان ژن Neurogenin- 3 در بافت پانکراس انسان بالغ

آناهیتا شاعر [۱]، نگارآذرپیرا[۲]، اکبروحدتی[۱]، محمدحسین کریمی [۲]، مهرداد شریعتی[۱]
۱– دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات فارس، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، فارس.ایران. anahita.shaer@yahoo.com
۲–مرکز تحقیقات پیوند وترمیم اعضا، دانشگاه علوم پزشکی، شیراز، فارس. ایران.

تاریخ دریافت:۹۲/۶/۳۰ تاریخ پذیرش:۹۲/۹/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: NGN3 پروتئینی است که در انسان توسط ژن Neurog3 رمزگذاری و در سلول‌های پروجنیتور اندوکرین بیان می-شود. برای تکامل سلول‌های اندوکرین در پانکراس و روده این ژن مورد نیاز است. هدف از این پژوهش بررسی نحوه‌ی بیان ژن NGN3 در بافت پانکراس انسان بالغ است

روش کار: بافت پانکراس بالغ انسان با رعایت ضوابط قانونی از نمونه‌های پانکراس که جهت پیوند به بیماران دیابتی فراهم شده‌اند، تهیه شد. بعد از استخراج RNA وسنتز DNA، بیان ژنNGN3 با استفاده از تکنیک‌های PCR (Polymerase Chain Reaction) مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته ها: نتایج ارزیابی نشان داد که در بافت پانکراس بالغ انسان ژن NGN3 بیان می‌شود.

نتیجه‌گیری: طبق بررسی هایی که تا کنون انجام شده است بیان NGN3 مربوط به دوره کوتاهی در زمان تکامل پانکراس و تولید سلول های اندوکرین به خصوص سلول های بتا می باشد و نتایج این تحقیق می تواند بیانگر این نکته باشد که احتمالاً در پانکراس بالغ جمعیتی از سلول‌های زاینده اندوکرین وجود دارد.

واژه های کلیدی: پانکراس، سلول های زاینده اندوکرین، NGN3.

مقدمه

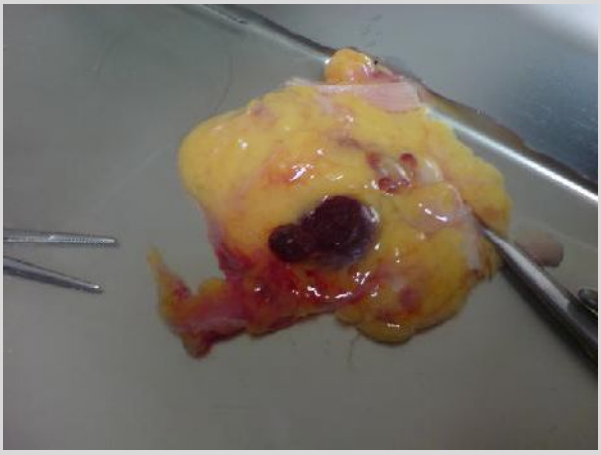
پانکراس عضوی بزرگ با اندازه تقریبی حدود شش اینچ و جایگاه اصلی هضم غذا و ترشحات داخلی در بدن به شمار می آید (۱۸). این عضو در بخش بالایی شکم و در پشت معده قرار گرفته است (۲۴). پانکراس از اطراف توسط معده، روده کوچک، کبد احاطه شده و با این اعضاء در ارتباط می باشد (۱۸). این عضو شبیه گلابی است، در یک انتها باریک و در انتهای دیگر پهن است، شامل سه بخش اصلی و دو دسته سلول اختصاصی می باشد (۲۴). بخش پهن آن سر، بخش میانه بدنه و قسمت باریک دم نامیده می‌شوند (۱۸). پانکراس نقش اساسی در تنظیم و هموستازی غذایی در بدن دارد. پانکراس یک غده بزرگ مختلط در بدن می‌باشد که دارای دو بخش اگزوکرین و اندوکرین است. بخش اگزوکرین شامل آسینی‌ها و مجاری می-باشد که تولید و انتقال آنزیم‌های گوارشی به دئودنوم بر عهده دارند. بخش اندوکرین شامل جزایر لانگرهانس می‌شود که مهم‌ترین هورمون‌هایش در رابطه با متابولیسم گلوکز است. هورمون‌ها شامل گلوکاگون، انسولین، سوماتواستاتین و پلی‌پپتید پانکر-اتیک است (۴). تکامل پانکراس در انسان از هفته هفتم بارداری شروع می‌گردد (۱۹). در تکامل این غده تعدادی از فاکتور نسخه‌برداری دخیل هستند که یکی از مهم‌ترین این فاکتورها(NGN3) Neurogenin- 3 می باشد. NGN3 پروتئینی است که در انسان به‌وسیله ژن Neurog3 رمزگذاری می‌شود (۱۷). NGN3 در سلول‌های پروجنیتور اندوکرین بیان می‌شود و برای تکامل سلول‌های اندوکرین در پانکراس و روده مورد نیاز است (۳۰). NGN3 به خانواده فاکتورهای نسخه-

برداری(basic helix- loop- helix (bHLH تعلق دارد که در تعیین سلول‌های پیش‌ساز عصبی در اکتودرم عصبی مؤثر هستند (۷). قابل توجه است که موش‌های فاقد NGN3 فاقد ۴ سلول اندوکرین پانکراس بوده و تولید انسولین، گلوکاگون، سوماتواستاتین و تولید پلی-پپتید پانکراتیک در آن‌ها دیده نمی‌شود (۱۳). بررسی-ها در زمان تکامل جنین موش نشان داده است که همه-ی تیپ‌های سلول‌های اندوکرینی در دوره کوتاهی به-طور موقت NGN3 را بیان می‌کنند. NGN3 در روز E ۱۳/۵ در جنین موش بیان می‌شود و اوج بیان آن در روز ۱۵/۵ می‌باشد و بعد از آن بیان NGN3 متوقف شده و هیچ سلول NGN3 مثبتی بعد از تولد و در پانکراس بالغ دیده نمی‌شود. در واقع موش‌های فاقد NGN3 فقط به سمت سلول‌های غیر اندوکرین پیش می‌روند (۱۴، ۸). ژن تارگت NGN3، $Neuro\ D_1$ است که فوراً در پایین دست NGN3 بیان می‌شود. این ژن در موش‌های فاقد NGN3 بیان نمی‌شود و بیان ژنPdx_1 (Pancreatic and duodenal homeobox1) در موش فاقد $Neuro\ D_1$ تأثیر نمی‌پذیرد. بیان ژن $Neuro\ D_1$ در سلول‌های اندوکرین پانکراس و دیگر بافت‌های غیر پانکراتیک مثل روده و مغز یافت می-شود. عملکرد ژن$Neuro\ D_1$، فعال کردن ژن انسولین و پیش بردن بیشتر تمایز به سمت سلول‌های islet عملکردی می‌باشد. در واقع تکامل سلول‌های islet در یک مرحله پیش بلوغی در موش‌های فاقد $Neuro\ D_1$ متوقف می‌شود. این مسأله نشان‌دهنده اهمیت نقش این ژن در تشکیل اولیه isletها می‌باشد (۲۷). در رابطه با NGN3 تولید نسخه‌های NGN3 و پروتئین NGN3 در دو مرحله رخ می‌دهد. ابتدا در حدود روزE ۸/۵ تا E۱۱ اتفاق می افتد و شروع ثانویه در حدود روز E۱۲ به‌طور قابل توجهی می‌باشد. نسخه‌های NGN3 به میزان بیشتری در اپیتلیوم پانکراس در مقایسه با پروتئین NGN3 پخش می‌شوند که نشان‌دهنده‌ی تنظیم پس ترجمه‌ای توسط نسخه‌های NGN3 است که نقش مهمی در تکامل پانکراس دارند (۱۵). هدف از این پژوهش بررسی نحوه‌ی بیان ژن NGN3 در بافت پانکراس انسان بالغ است.

مواد و روش‌ها

در این بررسی نمونه‌های بافت پانکراس انسان بالغ و سالم با رعایت کامل نکات اخلاقی از نمونه‌های مرگ مغزی که جهت پیوند به بیماران دیابتی در بخش تحقیقات پیوند بیمارستان نمازینگهداری می گردد، تهیه شد. نمونه های دریافت شده برای جلوگیری از تخریب و نابودی RNA توسط آنزیم های بخش اگزوکرین که در فاصله کوتاهی بعد از خارج شدن پانکراس از بدن آزاد می شود در مایع (شرکت سیگما.امریکا) RNAlater قرار گرفتند. RNAlater یک ترکیب مایع وغیر سمی برای نگه داری بافت است که در زمان استفاده به داخل بافت نفوذ کرده وکار محافظت از RNA سلولی را بر عهده دارد بدون آن‌که کیفیت RNA سلولی به خطر بیفتد. پانکراس در شرایط کاملاً استریل در زیر هود به تکه هایی در ابعاد ۴۰mm –۵۰mm برش زده (شکل۱) و در شرایط کاملاً استریل چند بار در محلول بافر PBS(Phosphate Buffer Saline) شسته شد. کل RNA از تکه های کوچک بافت در اون چینی اتوکلاو شده هم‌زمان با ریختن آنزیم RNAase مربوط به کیت استخراج RNA (شرکت سیناژن، ایران) مطابق پروتکل کیت استخراج شد. سنتز DNA با استفاده از آنزیم نسخه برداری معکوس MMULV (شرکت سیناژن، ایران) در دستگاه ترموسایکلر با برنامه ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹ دقیقه و در ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سنتز شد. توالی، طول و شرایط هر کدام از پرایمرها در جدول ۱ خلاصه شده است. واکنش

زنجیره ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction، PCR) یکی از بهترین روش های افزایش و تکثیر مولکول هدف می باشد. این روش از نظر اصول عملی، تشابه زیادی به همانند سازی DNA داشته و در واقع بر گرفته از آن است. واکنش زنجیره ای پلیمراز در حجم نهایی۲۰µl با استفاده از آنزیمTag (شرکت سیناژن، ایران) در دستگاه ترمو سایکلر با شرایط *Denaturation* ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی-گراد، *Annealing* ۱ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی-گراد و *Extention* ۱ دقیقه در دمای ۶۷ درجه سانتی-گراد انجام گرفت. تعداد سیکل ۴۰ و یک سیکل Extention نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. برای بررسی محصولات PCR تولید شده از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز۲/۵٪ استفاده گردید. غلظت ژل آگارز به طول قطعه DNA تکثیر شونده بستگی دارد .سپس با قراردادن ژل در اتاقک دستگاه UV illuminator و تاباندن اشعه ماورابنفش موقعیت و کیفیت قطعات تکثیر شده قابل مشاهده و بررسی گردید و توسط دستگاه عکس برداری از ژل انجام شد.



شکل ۱- بافت پانکراس انسان

جدول ۱- اسامی ژن‌ها و توالی مربوط به پرایمرهای بالادست (F) و پایین دست (R)

نام ژن		توالی پرایمر	اندازه bp
NGN3	F	CAATCGAATGCACAACCTCA	۲۵۴
	R	GGGAGACTGGGGAGTAGAGG	
β- Actin	F	GATCGGCGGCTCCATCCTG	۷۴
	R	GACTCGTCATACTCCTGCTTBC	

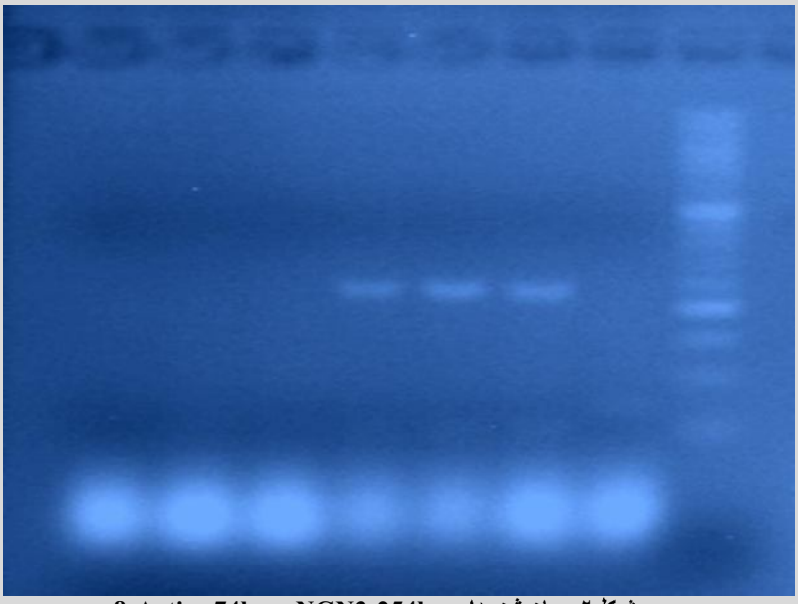
نتایج

به منظور ارزیابی بیان ژن NGN3 در بافت پانکراس انسان بالغ محصول PCR روی ژل آگارز الکتروفورز و سطوح بیان ژن مورد نظر به صورت درصدی از بیان – β Actin تعیین و بیان ژن NGN در بافت پانکراس بالغ دیده شد(شکل ۲).

بحث و نتیجه گیری

فاکتورهای نسخه برداری میانجی های کلیدی در کنترل فعالیت های سلول هستند. بیان ژن‌های اختصاصی سلول در سطح نسخه برداری و از طریق بر-هم‌کنش تعدادی از فاکتور های نسخه برداری با نواحی

پروموتور ژن ها کنترل می شود. مهم ترین فاکتورهای نسخه برداری که در تکامل پانکراس نقش دارند از طریق موش‌هایknockout و transgenic با استفاده از روش‌های کاهش وافزایش ژن‌های تارگت شناسایی شده اند (۲۵، ۱۶، ۱۲، ۷).



شکل۲- بیان ژن های NGN3:254bp و β-Actin :74bp

تعدادی از فاکتور های نسخه برداری که در تکامل پانکراس به‌خصوص سلول های بتا نقش دارند به این شرح می باشند: یکی از مهم‌ترین فاکتورهای نسخه برداری pdx1 که یک I.P.F.1 می باشد در تکامل پانکراس شناسایی شده است(۳۳، ۱). بیانpdx1 در دوران بزرگسالی فقط در سلول‌های بتا محدود می شود. ولی در طی مرحله تکامل بیان می گردد. و برای اثبات این مسئله مشاهده شده که موش‌هایی که فاقد pdx1 می باشند، فاقد پانکراس هستند (۱۶، ۱۲). دو فاکتور مهم دیگر که در تکامل پانکراس نقش دارند pax4 و pax6 هستند. موش‌های فاقد pax4 فاقد سلول های بتا و دلتا می باشند و موش‌های فاقد pax6 سلول های مترشحه گلوکاگون در پانکراس آن‌ها دیده نمی شود. Pax6 در تمایز سلول ها به سمت سلول های الفا اثر دارد(۲۳). فاکتور Arx محدود به islet ها و آن هم در مراحل بلوغ بیان می شود. هر چند در زمان تکامل پانکراس هم بیان می گردد. بیانArx در پایین دست بیان ژن NGN3 است و در موش‌های فاقد بیان ژن NGN3، ژن Arx بیان نمی شود(۶،۹) و در موش‌های فاقد ژن Arx مرگ قبل از بلوغ به‌خاطر هیپوگلایسمی شدید که دال بر نقش احتمالی ژن Arx در تکامل سلول های الفا است دیده می شود(۶). Brain4(Brn4) یک فاکتور نسخه برداری دومین pou است که فقط در سلول های گلوکاگون مثبت وپانکراس رت بالغ بیان شده و در سلول های آلفا نقش دارد (۱۱، ۱۰). ناحیه پروموتور ژن انسولین دارای جایگاه‌های اتصال برای فاکتورهای هموباکس Nkx6.1 و Nkx2.2 است. این فاکتورها باعث تمایز مستقیم سلول‌های تولید کننده انسولین می شوند. در موش‌های فاقد Nkx6.1 سلول های بتا مترشحه انسولین دیده نمی شود ولی سایر سلول های اندوکرین پانکراس تشکیل می شود و این مساله نشان می دهد این فاکتور نقش مستقیم در تکامل سلول های بتا دارد(۲۱).

برخلاف ژن Nkx6.1 Nkx2.2در سلول‌های آلفا، سلول‌های پلی پپتید پانکراتیک وسلول های بتا بیان می شود. موش‌های فاقد Nkx2.2 کاهش در تعداد سلول های بتا، الفا، پلی پپتید پانکراتیک را دارند که اشاره بر نقش این فاکتور در تمایز وتکامل این سه رده سلولی دارد(۲۸). نسخه هایی از انسولین وگلوکاگون به ترتیب به‌وسیله Mafa و Mafb تنظیم می شوند(۳۵، ۲). فاکتورهای نسخه برداری Neuro D1.Hes1، NGN3، bHLHدر تمایز سلول‌های بتا نیز نقش دارند. NGN3 فاکتور اختصاصی سلول های اندوکرین است که برای تکامل همه سلول های اندوکرین ضرورت دارد(۳۲، ۱۵). همه سلول های اندوکرین به‌طور گذرا در یک دوره کوتاه ژن NGN3را بیان می کنند و NGN3 در جنین موش دارای یک پیک در روزE۱۲/۵و پیک دیگر در روزE۱۵/۵ است و بعد از آن دیگر ناپدید می شود و هیچ سلول NGN3 مثبتی در مغز ویا در پانکراس در دوران بزرگسالی یافت نمی گردد که اشاره براین دارد که NGN3 نقش در یک مرحله ویژه در تکامل پانکراس دارد. در واقع موش‌های فاقد NGN3 به‌سمت سلول های غیر اندوکرین پیش می روند، بنابراین NGN3 نقش مرکزی در تمایز سلول‌های زاینده اندوکرین دارد(۳۲، ۱۵). ژن تارگتNeuro D1، NGN3 در پایین دست NGN3 فوراً بیان می شود. هیچ سلول مثبت Neuro D1 در سلول‌های موش فاقد NGN3 بیان نمی شود. بیان Neuro D1 در سلول‌های اندوکرین پانکراس، بافت‌های غیراندوکرین مثل روده و مغز دیده شده است (۱۵). تکامل پانکراس در ۳ فاز انجام می شود. NGN3 در فاز اول ودوم بیان و فعال است. در فاز اول در تمایز سلول های آلفا نقش دارد ودر فاز دوم در تمایز سلول های بتا، سلول های پلی پپتید پانکراتیک وسلول های تتا نقش دارد. تمایزبه‌طور مشخص بعد از فاز دوم تکمیل می گردد(۳).

بررسی های زیادی در رابطه با نقش احتمالی NGN3 برای درمان بیماران دیابتی و ترمیم و باز سازی سلول ها در پانکراس صورت گرفته است (۳۱، ۲۰). ۳ تا از مهم-ترین تارگت های پایین دست NGN3 که در رابطه با تمایز بخش اندوکرین پانکراس وسلول های بتا می باشند شامل:۱- neurogenic differentiation (NeuroD1) factor 1 که با ژن NGN3 در زمان تمایز سلول ها بیان می شود .۲- تارگت مهم دیگر paired box (Pax4) gene 4 است که نقش مهمی در تمایز سلول های بتا وتتا دارد. NGN3 همراه با ژنHNF1α پروموتور ژنPax4را فعال می کند وباعث القای تمایز سلولی خاص می شود.۳- فاکتور نسخه برداری دیگری که ممکن است تارگت پایین دست NGN3 باشد Nkx2.2 است زیرا همراه با این ژن بیان می شود. بررسی ها نشان داده است اختلال در بیان ژن Nkx2.2 باعث ایجاد مشکل در تمایز سلول های الفا وبتا می شود(۳). برخی از بررسی‌ها که در رابطه با تعیین بیان ژن NGN3 در پانکراس صورت گرفته است به این شرح می باشد. بررسی های Gu وهمکاران در سال ۲۰۰۲ و هم‌چنین بررسی های Xu در سال ۲۰۰۸ نشان داده است که همه سلول های اندوکرین بیان موقتی از NGN3 در مدت کوتاهی، زمانی که جنین موش تکامل می یابد را نشان می دهند. در روز ۱۳/۵ تکامل جنین ظاهر می شود و یک پیک بیان در روز ۱۵/۵ جنینی دارد و بعد به‌طور کامل ناپدید می شود و هیچ سلولی که بیان ژن NGN3 را داشته باشد بعد از تولد ودر پانکراس بالغ دیده نمی شود (۳۲، ۸). Vetere وهمکاران در سال۲۰۰۳ با بکارگیری یک سیستم القاگر Cre-ER^{TM}-LoxP نشان دادند که سلول های بیان کننده NGN3 اجداد سلول های اندوکرین جزایر پانکراس هستند و هیچ ارتباطی با سلول های اجدادی اگزوکرین در طی رشد جنین و دوران بزرگسالی در موش‌ها ندارند. NGN3 برای تحریک

تمایز در سلول های اندوکرین پانکراس لازم است. در گزارش دیگر دیده شده بیان اکتوپیک از NGN3 در جنین های جوجه تبدیل سلول های آندودرم در هر ناحیه به تیپ α ولی نه تیپ β را باعث می شود(۲۹). نتایج این پژوهش از آن نظر حائز اهمیت است که برای اولین بار بیان ژن NGN3 در بافت پانکراس انسان بالغ سالم نشان داده شده است. NGN3 فاکتور اختصاصی سلول-های اندوکرین است که برای تکامل سلول‌های اندوکرین ضرورت دارد(۱۴، ۱۳) و هرگز همراه با هورمون‌های اندوکرین در جزایر پانکراتیک بیان نمی-شود (۳۵). با این‌حال حضور جمعیتی از سلول‌های زاینده تمایز نیافته در پانکراس بالغ جای بحث دارد(۲۲). هر چند جمعیت سلول‌های زاینده در اپیتلیوم اطراف مجاری پانکراس مشاهده شده است(۳۴، ۲۳). هم‌چنین بیان NGN3 در بیوپسی‌های پاتولوژیک پانکراس مشاهده گردیده است (۵،۲۶).

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که بیان ژن NGN3 در بافت پانکراس بالغ انسان برخلاف سایر تحقیقاتی که تاکنون در برخی از حیوانات و انسان صورت گرفته است بیان می شود. که احتمالاً می تواند دال بر حضور جمعیتی از سلول های زاینده اندوکرین در پانکراس بالغ باشد. این نکته می تواند زمینه را برای تحقیقات آینده در زمینه حضور جمعیتی از سلول های زاینده اندوکرین در بافت پانکراس بالغ انسان که بتواند به سلول های بتا تبدیل شود و در درمان بیماران دیابتی کمک کند، ایجاد می کند.

منابع

1.Alipio, Z., Liao, W., Roemer, EJ., Waner, M., Fink, LM., Ward, DC. (2010). Reversal of hyperglycemia in diabetic mouse models using induced-pluripotent stem (iPS)-derived pancreatic beta-like cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 107(30);13426-31.

2.Artner, I., Blanchi, B., Raum, JC., Guo, M., Kaneko, T., Cordes, S. (2007). MafB is required for islet beta cell maturation. Proc Natl Acad Sci U S A, 104(10); 3853-8.

3.Bramswig, NC., Kaestner, KH. (2011). Transcriptional regulation of α-cell differentiation. Diabetes Obes Metab, 1; 13–20.

4.Cabrera, O., Berman, DM., Kenyon, NS., Ricordi, C., Berggren, PO‹., Caicedo, A. (2006). The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. Proc Natl Acad Sci U S A, 103(7); 2334-9.

5.Chavali, S., Mahajan, A., Tabassum, R., Dwivedi, OP., Chauhan, G., Ghosh, S. (2011). Association of variants in genes involved in pancreatic β-cell development and function with type 2 diabetes in North Indians. J Hum Genet, 56(10); 695-700.

6.Collombat, P., Mansouri, A., Hecksher-Sorensen, J., Serup, P., Krull, J., Gradwohl, G. (2003). Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. Genes Dev, 17(20); 2591-603.

7.Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M., Guillemot, F. (2000). Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. Proc Natl Acad Sci U S A, 97(4);1607-11.

8.Gu, G., Dubauskaite, J., Melton, DA. (2002). Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. Development, 129(10); 2447-57.

9. Habener, JF.,WC, Li., Rukstalis, JM., Nishimura, W., Tchipashvili, V., Sharma, A. (2010). Activation of pancreatic-duct-derived progenitor cells during pancreas regeneration in adult rats. J Cell Sci, 123(Pt 16); 2792-802.

10. Hussain, MA., Miller, CP., Habener, JF. (2002). Brn-4 transcription factor expression targeted to the early developing mouse pancreas induces ectopic glucagon gene expression in insulin-producing beta cells. J Biol Chem, 277(18); 16028-32.

11. Heller, RS., Stoffers, DA., Liu, A., Schedl, A., Crenshaw, EB., Madsen, OD., Serup, P. (2004). The role of Brn4/Pou3f4 and Pax6 in forming the pancreatic glucagon cell identity. Dev Biol, 268(1); 123-34.

12. Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T., Edlund, H. (1994). Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. Nature, 371(6498); 606-9.

13. Kanadia, RN., Cepko, CL.(2010). Alternative splicing produces high levels of noncoding isoforms of bHLH transcription factors during development. Genes Dev, 24(3); 229-34.
14. Karumbayaram, S., Novitch, BG., Patterson, M., Umbach, JA., Richter, L., Lindgren, A. (2009). Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons. Stem Cells, 27(4); 806-11.
15. Naya, FJ., Huang, HP., Qiu, Y., Mutoh, H., DeMayo, FJ., Leiter, AB. (1997). Diabetes, defective pancreatic morphogenesis، and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. Genes Dev, 11(18); 2323-34.
16. Offield, MF., Jetton, TL., Labosky, PA., Ray, M., Stein, RW., Magnuson, MA. (1996). PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. Development, 122(3); 983-95.
17. Oropez, D., Horb, M. (2012). Transient expression of NGN3 in Xenopus endoderm promotes early and ectopic development of pancreatic beta and delta cells. Genesis, 50(3); 271-85.
18. Pansky, B. (1990). Anatomy of the pancreas. Emphasis on blood supply and lymphatic drainage. Int J Pancreatol, 7(1-3);101-8.
19. Polak, M., Bouchareb-Banaei, L., Scharfmann, R., Czernichow, P. (2000). Early pattern of differentiation in the human pancreas. Diabetes, 49(2); 225-32.
20. Rukstalis JM، Habener JF. 2009 .Neurogenin3: a master regulator of pancreatic islet differentiation and regeneration. Islets. 1(3):177-84.
21. Sander M، Sussel L، Conners J، Scheel D، Kalamaras J، Dela Cruz F، et al .2000. Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas. Development. 127(24):5533-40.
22. Seaberg, RM., Smukler, SR., Kieffer, TJ., Enikolopov, G., Asghar, Z., Wheeler, MB. (2004). Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. Nat Biotechnol, 22(9);1115-24.
23. Solar, M., Cardalda, C., Houbracken, I., Martín, M., Maestro, MA., De Medts, N. (2009). Pancreatic exocrine duct cells give rise to insulin-producing beta cells during embryogenesis but not after birth. Dev Cell, 17(6); 849-60.
24. 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.
25. Stoffers, DA., Ferrer, J., Clarke, WL., Habener, JF. (1997). Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. Nat Genet, 17(2); 138-9.
26. Stömmer, P., Kraus, J., Stolte, M., Giedl, J. (1991). Solid and cystic pancreatic tumors. Clinical histochemical، and electron microscopic features in ten cases. Cancer, 67(6); 1635-41.
27. Swales, N., Martens, GA., Bonné, S., Heremans, Y., Borup, R., Van, De. (2012). Plasticity of adult human pancreatic duct cells by neurogenin3-mediated reprogramming. PLoS One, 7(5); e37055.
28. Sussel, L., Kalamaras, J., Hartigan-O'Connor, DJ., Meneses, JJ., Pedersen, RA., Rubenstein, JL. (1998). Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells. Development, 125(12); 2213-21.
29. Vetere, A., Marsich, E., Di Piazza, M., Koncan, R., Micali, F., Paoletti, S. (2003). Neurogenin3 triggers beta-cell differentiation of retinoic acid-derived endoderm cells.Biochem J, 371(Pt 3); 831-41.
30. Wang, J., Cortina, G., Wu, SV., Tran, R., Cho, JH., Tsai, MJ. (2006). Mutant neurogenin-3 in congenital malabsorptive diarrhea. N Engl J Med, 355(3); 270-80.
31. Watada, H. (2004). Neurogenin 3 is a key transcription factor for differentiation of the endocrine pancreas. Endocr J, 51(3); 255-64.
32. Xu, X., D'Hoker, J., Stangé, G, Bonné, S., De Leu, N., Xiao, X. (2008). Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. Cell, 132(2); 197-207.
33. Yang, L., Li, S., Hatch, H., Ahrens, K., Cornelius, JG., Petersen, BE. (2002). In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 99(12); 8078-83..
34. Zhang, C., Moriguchi, T., Kajihara, M., Esaki, R., Harada, A., Shimohata, H. (2005). MafA is a key regulator of glucose-stimulated insulin secretion. Mol Cell Biol, 25(12); 4969-76.

35. Zhou, Q., Law, AC., Rajagopal, J., Anderson, WJ., Gray, PA., Melton, DA. (2007). A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis. Dev Cell, 13(1); 103-14.

.