

**Einfluss des genetischen Hintergrundes auf den diabetischen Status  
und die postnatale Entwicklung des endokrinen Pankreas bei GIPR<sup>dn</sup>  
transgenen diabetischen Mäusen**

von Judith Susanne Annika Röder

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

**Einfluss des genetischen Hintergrundes auf den diabetischen Status  
und die postnatale Entwicklung des endokrinen Pankreas bei GIPR<sup>dn</sup>  
transgenen diabetischen Mäusen**

von Judith Susanne Annika Röder  
aus Würzburg

München, 2016

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl: Univ.-Prof. Dr. Walter Hermanns

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. Nadja Herbach

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Nadja Herbach

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Bernhard Aigner

Tag der Promotion: 06. Februar 2016

Für meine Familie

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Literatur</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Diabetes mellitus</b>	<b>3</b>
2.1.1 Definition und Beschreibung	3
2.1.2 Diagnose	4
2.1.3 Klassifikation von Diabetes mellitus	6
2.1.4 Diabetische Tiermodelle	8
<b>2.2. Entwicklung des endokrinen Pankreas</b>	<b>14</b>
2.2.1 Embryonale Entwicklung	14
2.2.2 Postnatale Entwicklung	16
2.2.3 Regulation der Replikation und Apoptose	18
2.2.4 Regeneration im endokrinen Pankreas	23
2.2.5 Entwicklung des endokrinen Pankreas bei Diabetes-Patienten	32
2.2.6 Einfluss des genetischen Hintergrundes auf die Pankreasentwicklung	35
<b>2.3. Enteroinsuläre Achse</b>	<b>41</b>
2.3.1 Neuronale Komponenten	41
2.3.2 Hormonelle Komponenten	42
<b>2.4. GIPR<sup>dn</sup> transgene Mäuse</b>	<b>50</b>
2.4.1 Mutation des humanen GIP Rezeptors	51
2.4.2 Transgenes Mausmodell	52
2.4.3 Charakterisierung GIPR <sup>dn</sup> transgener Mäuse	53
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>57</b>
<b>3.1. Tierkollektiv</b>	<b>57</b>
<b>3.2. Genotypisierung</b>	<b>58</b>
3.2.1 Primer	58
3.2.2 DNA-Extraktion	59

3.2.3 PCR	60
3.2.4 Gelelektrophorese	60
<b>3.3. Untersuchung von 10 Tage alten Mäusen</b>	<b>61</b>
<b>3.4. Klinische Verlaufsuntersuchungen</b>	<b>63</b>
3.4.1 Körpergewicht	63
3.4.2 Blutglukose frei gefüttert	63
3.4.3 Insulintoleranztest	63
3.4.4 Untersuchung mittels Stoffwechselkäfigen	63
3.4.5 Oraler Glukosetoleranztest	64
<b>3.5. Pankreaspräparation und Weiterverarbeitung</b>	<b>64</b>
<b>3.6. Färbung des Pankreasgewebe</b>	<b>65</b>
3.6.1 Hämalaun-Eosin-Färbung	66
3.6.2 Immunhistochemie Insulin und Cleaved Caspase-3	67
3.6.3 Immunhistochemie Proliferating Cell Nuclear Antigen	69
<b>3.7. Quantitativ stereologische Analyse des Pankreas</b>	<b>70</b>
<b>3.8. Datenpräsentation und statistische Analyse</b>	<b>72</b>
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>74</b>
<b>4.1. Körpergewichte</b>	<b>74</b>
<b>4.2. Blutglukose</b>	<b>77</b>
<b>4.3. Insulintoleranztest</b>	<b>79</b>
<b>4.4. Area under curve Glukose Insulintoleranztest</b>	<b>81</b>
<b>4.5. Oraler Glukosetoleranztest</b>	<b>82</b>
<b>4.6. Area under curve Glukose oraler Glukosetoleranztest</b>	<b>84</b>
<b>4.7. Harnvolumen in 24 Stunden</b>	<b>85</b>
<b>4.8. Wasserverbrauch in 24 Stunden</b>	<b>86</b>
<b>4.9. Futterverbrauch in 24 Stunden</b>	<b>87</b>

<b>4.10. Pankreasgewichte</b>	<b>88</b>
<b>4.11. Volumendichte der Inseln im Pankreas</b>	<b>92</b>
<b>4.12. Volumendichte der Betazellen in den Inseln</b>	<b>93</b>
<b>4.13. Volumendichte der isolierten Betazellen im Pankreas</b>	<b>94</b>
<b>4.14. Gesamtinselvolumen</b>	<b>95</b>
<b>4.15. Gesamtbetazellvolumen</b>	<b>98</b>
<b>4.16. Gesamtvolumen der isolierten Betazellen</b>	<b>101</b>
<b>4.17. PCNA-positive Kernanschnittprofile in den Inseln</b>	<b>104</b>
<b>4.18. Cleaved-Caspase 3-positive Kernanschnittprofile in den Inseln</b>	<b>107</b>
<b>4.19. Qualitativ histologische Befunde am endokrinen Pankreas</b>	<b>110</b>
4.19.1 Inselmorphologie	110
4.19.2 PCNA Immunhistochemie	112
<b>5. Diskussion</b>	<b>114</b>
5.1. Diskussion genereller Aspekte der Studie	114
5.2. Klinische Untersuchungen	116
5.3. Quantitativ-stereologische Untersuchungen	121
5.4. Einfluss des genetischen Hintergrundes auf den Diabetes und das endokrine Pankreas	128
<b>6. Ausblick</b>	<b>131</b>
<b>7. Zusammenfassung</b>	<b>132</b>
<b>8. Summary</b>	<b>135</b>
<b>9. Quellen</b>	<b>137</b>
<b>10. Danksagung</b>	<b>157</b>

## 1. Einleitung

Diabetes mellitus (DM) Typ 2 ist eine sehr weit verbreitete Krankheit und die Prävalenz nimmt stetig zu. In Deutschland stieg der Anteil der an Diabetes erkrankten Menschen an der Gesamtbevölkerung zwischen 1989 und 2007 von 5,9 % auf 8,9 %, was vor allem durch eine erhöhte Prävalenz des Typ 2 Diabetes mellitus verursacht ist (DIABETES, 2010). In den USA leiden sogar 18–30% der älteren Bevölkerung an der Erkrankung (GUNASEKARAN & GANNON, 2011).

Die Betazellmasse unterliegt über das ganze Leben hinweg dynamischen Veränderungen und kann sich dem Insulinbedarf anpassen. Im Rahmen der Entstehung eines Typ 2 Diabetes mellitus kann die Betazellmasse daher initial expandieren, um eine ausreichende Insulinproduktion und -ausschüttung zu gewährleisten. Im Verlauf der Erkrankung kommt es jedoch zur Erschöpfung der Betazellen und zu einem Verlust an funktioneller Betazellmasse. Bei Typ 2 DM kann das Pankreas zwar Insulin produzieren, Menge und Qualität der Insulinausschüttung sind jedoch nicht ausreichend, um normoglykämische Verhältnisse zu erreichen. Die genauen Ursachen für die Entstehung eines Typ 2 DM sind noch nicht geklärt.

Es werden seit langer Zeit Tiermodelle verwendet, um die Ursachen, Folgen und Behandlungsmöglichkeiten von Typ 2 DM zu erforschen. Ein interessantes Modell ist die GIPR<sup>dn</sup> transgene Maus, bei welcher durch die Expression eines dominant negativen glucose-dependent insulinotropic polypeptide Rezeptors (GIPR<sup>dn</sup>) in den Betazellen das Substrat GIP zwar noch gebunden wird, allerdings keine Signaltransduktion eingeleitet werden kann. Dies führt zu einem Ausfallen der Funktion von GIP und zur Entwicklung eines früh einsetzenden hochgradigen diabetischen Phänotyps und einer gestörten postnatalen Pankreasentwicklung (HERBACH et al., 2011).

Es gibt Hinweise darauf, dass der genetische Hintergrund einer Maus Einfluss auf die Ausprägung eines DM und die Insel- bzw. Betazellmasse ausübt. Bei Streptozotocin diabetischen Mäusen wurde festgestellt, dass einige Stämme als High Responder reagierten und starken Diabetes bekamen, während andere Stämme nur einen schwachen Diabetes entwickelten und als Low Responder eingeteilt wurden (GURLEY et al., 2006). Bei der Typ 2 diabetischen *db/db*-Maus konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der genetische Hintergrund die Ausprägung des diabetischen Phänotyps moduliert (COLEMAN, 1992). Darüber hinaus belegt eine Studie, dass

der genetische Hintergrund der Maus die Inselzahl und Inselmasse signifikant beeinflusst (BOCK et al., 2005).

Dies wirft die Frage auf, ob der genetische Hintergrund bei der GIPR<sup>dn</sup> transgenen Maus einen Einfluss auf die postnatale Expansion der Betazellmasse und den Schweregrad des Diabetes mellitus aufweist. GIPR<sup>dn</sup> transgene Mäuse, welche ursprünglich auf dem genetischen Hintergrund des Auszuchtstammes CD1 gezüchtet wurden, wurden im Vorfeld der Untersuchungen über zehn Generationen auf die Inzuchtstämme BALB/c, DBA/2, FVB/N und C57BL/6J sowie den Auszuchtstamm NMRI zurück gekreuzt. Es erfolgten in dieser Studie vielfältige klinische Untersuchungen sowie qualitativ histologische und quantitativ stereologische Auswertungen des endokrinen Pankreas der beiden Linien F.CD1-GIPR<sup>dn</sup> und B6.CD1-GIPR<sup>dn</sup>. Die genaue Charakterisierung der beiden Mäuselinien kann einen wichtigen Beitrag zur Klärung der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 2 leisten.

## 2. Literatur

### 2.1. Diabetes mellitus

#### 2.1.1 Definition und Beschreibung

Diabetes mellitus umschließt eine heterogene Gruppe von chronischen Stoffwechselerkrankungen, bei denen es aufgrund mangelnder Insulinproduktion und gestörter Insulinsekretion der Betazellen des endokrinen Pankreas oder/und erniedrigter Insulinsensitivität eine Hyperglykämie entsteht. Infolge der andauernden Hyperglykämie steigt das Risiko an Langzeitfolgeschäden zu erkranken, insbesondere handelt es sich dabei um Schäden am Nervensystem, dem kardiovaskulären System der Nieren und anderen Organsystemen (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013).

Bei den Vorstufen von Diabetes mellitus spricht man von gestörter Glukosetoleranz (Impaired glucose tolerance – IGT) und beeinträchtigter Nüchternblutglukose (Impaired fasting glucose – IFG) (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013).

Die Pathogenese des Diabetes mellitus umfasst mehrere Faktoren, die sich je nach Diabetes Typ unterscheiden und noch nicht vollständig bekannt sind. Bei Typ 1 Diabetes mellitus kommt es zur Zerstörung von Betazellen durch autoimmune Reaktionen (Typ1a) oder durch bisher unbekannte Mechanismen (Typ1b, idiopathisch). Typ 2 Diabetes mellitus ist verursacht durch eine Insulinresistenz in Kombination mit dem Mangel an funktioneller Betazellmasse mit daraus resultierender reduzierter und gestörter Sekretion von Insulin. Des Weiteren sind andere spezifische Formen des Diabetes bekannt, bei denen Mutationen in diabetesrelevanten Genen (z.B. dem Glukokinase- oder Insulingen, GCK bzw. INS) für die Entstehung des Diabetes verantwortlich sind (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2010). Zusätzlich unterscheidet man den Schwangerschaftsdiabetes, der vermutlich durch plazentare Hormone ausgelöst wird (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013).

Die Symptome des Diabetes mellitus unterscheiden sich in Abhängigkeit vom Diabetestyp, schließen jedoch immer Hyperglykämie, Polyurie, Polydipsie und Polyphagie mit ein. Oftmals ist als Folge die Immunabwehr geschwächt und die Wundheilung verschlechtert.

Spätfolgen von langanhaltender Hyperglykämie sind kardiovaskuläre Erkrankungen, z.B. Angina pectoris, Myocardinfarkt, Schlaganfall, periphere Gefäßerkrankungen und kongestives

Herzversagen. Diabetes mellitus Patienten sterben am häufigsten an kardiovaskulären Komplikationen (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013). Nierenversagen und Erblinden durch Retinopathie sind ebenfalls gefürchtete Spätfolgen einer langanhaltenden Hyperglykämie (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013). Durch exzessiv hohe Blutglukosewerte und hohen Blutdruck können Nerven im ganzen Körper geschädigt werden, was zu Verdauungsproblemen, erektiler Dysfunktion, Problemen beim Urinieren und anderen Störungen führen kann. Außerdem kann ein Verlust der Hautsensibilität in den Gliedmaßen entstehen (periphere Neuropathie), was zu einem erhöhten Infektionsrisiko führt, da kleine Verletzungen unbemerkt bleiben können. Durch eine verschlechterte Wundheilung, Infektion und verzögerte Therapie kann sogar die Amputation der betroffenen Gliedmaße notwendig sein (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013). Das Risiko für Schlafapnoe ist eventuell ebenfalls erhöht (MESLIER et al., 2003).

## 2.1.2 Diagnose

Für die Diagnosestellung des Diabetes mellitus gibt es drei Möglichkeiten. Bei deutlichen Symptomen genügt oftmals eine einfache Plasmaglukosebestimmung (nicht nüchtern). Bei Werten  $\geq 200$  mg/dl ist die Diagnose eindeutig. Die WHO empfiehlt den oralen Glukosetoleranztest (oGTT) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006), aber in der Praxis wird oftmals eine Nüchternplasmaglukosebestimmung aus Kostengründen, Einfachheit und besserer Reproduzierbarkeit durchgeführt (THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 1997), wobei die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse des oGTT durch genaues Einhalten der Blutentnahmzeiten und eine zuverlässig vorbereitete Diät erhöht werden kann (KANEKO et al., 1998).

Tabelle 2.1 Methoden für die Diagnosestellung für Diabetes mellitus bei Menschen nach der WHO 2006, Mayfield 1998

1. Plasmaglukose  $\geq 200$  mg/dl und Symptome
2. Nüchternplasmaglukose  $\geq 126$  mg/dl (mindestens 8 Stunden nüchtern)
3. oGTT  $\geq 200$  mg/dl (Plasmaglukose 2 Stunden nach oraler Gabe von 75 g Glukose)

Es hat sich in verschiedenen Studien gezeigt, dass bei der Erstdiagnose mit ausschließlich Nüchternplasmaglukosebestimmung viele diabetische Patienten (30%) nicht als solche diagnostiziert wurden (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006), weil sie ausschließlich im oGTT bei

der Blutentnahme nach 2 Stunden relevant erhöhte Blutglukosewerte aufwiesen. Wichtig in der Diagnosestellung ist eine Abgrenzung von Diabetikern und Menschen mit gestörter Glukosetoleranz oder Nüchternblutglukose.

Tabelle 2.2 Diagnostische Kriterien für Diabetes mellitus nach der American Diabetes Association 2003

<b>Diabetes</b>	
Nüchternblutglukose	$\geq 7,0$ mmol/l
2-h-Glukose*	$\geq 11,1$ mmol/l
<b>IGT</b>	
Nüchternblutglukose	Nicht angegeben
2-h-Glukose*	$\geq 7,8$ mmol/l, $< 11,1$ mmol/l
<b>IGF</b>	
Nüchternblutglukose	5,6 bis 6,9 mmol/l
2-h-Glukose*	Messung nicht empfohlen

\* venöse Plasmaglukose 2 Stunden nach oraler Glukosezufuhr von 75g

Eine weitere mögliche Methode zur Diagnosestellung ist die Messung von glykiertem Hämoglobin (HbA1c). Glykiertes Hämoglobin kann ohne spezielle Vorbereitung wie Fasten jederzeit gemessen werden und spiegelt beim Menschen die durchschnittlichen Plasmaglukosewerte der letzten 2–3 Monate wieder. Daher stellt dieser Test den Goldstandard für die Langzeitkontrolle des Blutzuckerspiegels bei Diabetikern dar. Die Genauigkeit des Messergebnisses kann allerdings beeinträchtigt werden, z.B. durch eine vorliegende Anämie, Urämie, Schwangerschaft oder Abnormitäten des Hämoglobins. Daher kommt die WHO Arbeitsgruppe zum Schluss, dass die HbA1c-Methode für eine Diagnose im Moment nicht etabliert genug ist (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

Bei der Maus sind Nüchternglukosewerte von  $> 140$  mg/dl bei den meisten Stämmen noch physiologisch. Bei männlichen Tieren sind die Nüchternglukosewerte sogar meist noch höher (zwischen 140 mg/dl und 220 mg/dl) (CLEE & ATTIE, 2007). Nüchtern gemessene Werte von über 250 mg/dl sind bei jedem Mäusestamm und beiden Geschlechtern als erhöht zu interpretieren, daher könnte man dies als Grenze festlegen, ab wann Diabetes bei der Maus diagnostiziert wird (CLEE & ATTIE, 2007).

### 2.1.3 Klassifikation von Diabetes mellitus

Es gibt drei Haupttypen von Diabetes mellitus und mehrere spezielle, seltene Formen, die unter zwei Subtypen zusammengefasst werden. In der Humanmedizin erfolgt die Einteilung hauptsächlich nach der Ätiologie.

Tabelle 2.3 Übersicht über die verschiedenen Diabetes mellitus Formen nach der International Diabetes Foundation (2013), dem Expert Committee of the Diagnosis and Classification on Diabetes Mellitus (2010), Lehmann & Spinas (2000) und der WHO (2006)

#### *Typ 1 Diabetes mellitus*

Diabetes mellitus Typ 1 beruht auf einer verminderten Insulinproduktion bedingt durch die autoimmune Zerstörung von Betazellen des Pankreas. Die genauen Ursachen für den Untergang der Betazellen sind noch unklar. Die Krankheit tritt meistens plötzlich auf und setzt häufig in der Jugend oder dem frühen Erwachsenenalter ein. Typ 1 Diabetiker können ohne tägliche Insulinsubstitutionen nicht überleben. Zusätzlich zu den bereits aufgezählten Symptomen zeigen die Patienten plötzlichen Gewichtsverlust, extreme Müdigkeit und konstanten Hunger. Außerdem können sie eine lebensbedrohliche diabetische Ketoazidose entwickeln. Früher nannte man Typ 1 Diabetes mellitus juvenilen oder insulin-abhängigen Diabetes aufgrund des Alters beim Einsetzen bzw. der Notwendigkeit der Insulinsubstitution. Da es mittlerweile zunehmend ältere Menschen gibt, bei denen sich ein Typ 1 Diabetes entwickelt (Inzidenz bei Erwachsenen von 50%), ist die Bezeichnung juveniler Diabetes überholt.

#### *Diabetes mellitus Typ 2*

Bei Typ 2 Diabetes mellitus kann Insulin produziert werden, Menge und Qualität der Insulinausschüttung sind jedoch nicht ausreichend und/oder es liegt eine Insulinresistenz von Muskel, Fettgewebe und Leber vor. Diese Form ist die häufigste Diabetesform und macht weltweit 90% der humanen Diabetesfälle aus (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008). Typ 2 DM kommt meistens bei Erwachsenen vor. Die genauen Ursachen für Diabetes mellitus Typ 2 sind nicht bekannt, aber es gibt eine Reihe von Risikofaktoren wie Adipositas, unsunde Ernährung, Bewegungsmangel, fortgeschrittenes Alter sowie genetische Faktoren (erstgradige Verwandte, welche an Typ 2 DM erkrankt sind). In der Regel lässt sich Typ 2 Diabetes mit einer ausgewogenen Diät und Bewegung behandeln und eine Insulintherapie ist zumindest initial nicht nötig.

Die Bezeichnungen Altersdiabetes und Nicht-insulin-abhängiger Diabetes sind veraltet, weil in den letzten Jahren immer mehr jüngere Menschen von dieser Diabetesform betroffen sind und auch häufiger auf Insulinsubstitution nicht mehr verzichtet werden kann.

### *Spezielle Diabetes mellitus Typen*

#### *Subtyp A*

Der Diabetes ist verursacht durch spezielle Mutationen, die einen genetischen Defekt der Betazellfunktion oder der Insulinaktion auslösen.

- Genetischer Defekt der Betazellfunktion (MODY – maturity-onset diabetes of the young)
  - MODY 1: defekter HNF (hepatocyte nuclear factor)-4a, Chromosom 20
  - MODY 2: defekte Glukokinase, Chromosom 7
  - MODY 3: defektes HNF-1a, Chromosom 12
  - MODY 4: Defekt des Insulin Promotor Faktor-1 (IPF-1)
  - MODY 5: defekter HNF-1 $\beta$ , mitochondrialer Diabetes und andere
- Genetischer Defekt der Insulinaktion (Typ A Insulinresistenz, Lerechaunismus, Rabson-Mendenhall-Syndrom: defekter Insulinrezeptor, Lipoatrophischer Diabetes und andere)

#### *Subtyp B*

Der Subtyp B wird assoziiert mit Erkrankungen und pathologischen Veränderungen, die den Diabetes auslösen.

- Erkrankungen des exokrinen Pankreas (Pankreatitis, Trauma/Pankreatomie, cystische Fibrose, Neoplasien, Haemochromatose und andere)
- Endokrine Erkrankungen (Cushing Syndrom, Akromegalie, Conn's Syndrom, Hyperthyreoidismus, Pheochromocytom und andere)
- Chemisch ausgelöst (Steroide, Pentamidine, Dioxide, Thiazide, Nikotin und andere)
- Infektionen (Kongenitale Rubella, Masern, Coxsackie Viruse, Cytomegalie-Virus)
- Seltene Formen von immunogenem Diabetes (Stiff-Man Syndrom, Anti-Insulin-Rezeptor Antikörper und andere)
- Andere genetische Syndrome, die mit Diabetes einhergehen (Down Syndrom, Klinefelter Syndrom, Turner Syndrom, myotonische Dystrophie und andere)

## *Gestationsdiabetes*

Schwangere Frauen können ab der 24sten Woche der Schwangerschaft Diabetes und einen dauerhaft erhöhten Blutglukosespiegel entwickeln. Die Insulinwirkung wird vermutlich durch plazentare Hormone blockiert. Der Diabetes verschwindet normalerweise nach der Geburt und ist während der Schwangerschaft meistens durch gesunde Ernährung kontrollierbar.

### 2.1.4 Diabetische Tiermodelle

Tiermodelle, insbesondere Nager und Schweine, wurden in der Diabetesforschung bereits intensiv genutzt, um mehr über die Ätiologie, Pathogenese, Entwicklung und die Therapie zu erfahren. Im Folgenden werden einige Beispiele kurz dargestellt.

#### 2.1.4.1 Diabetes mellitus Typ 1

##### 2.1.4.1.1. NOD-Mäuse

Die Nonobese Diabetes Mouse ist ein Mausmodell, das einen, dem humanen Typ 1 Diabetes mellitus sehr ähnlichen Diabetes entwickelt. Diese Inzuchtlinie entstand in Japan im Rahmen eines Katarakt-Forschungsprojekts (MAKINO et al., 1980). Weibliche NOD-Mäuse entwickeln ab der 6. Inzucht Generation eine Diabetesinzidenz von 60-80 %, während nur 10 % der männlichen Tiere einen Diabetes entwickeln, was mit Sexualhormonen zusammenhängt, die ein wichtiger Modulator der Diabetesentstehung bei der NOD Maus darstellen (LEITER et al., 1987). So entwickeln kastrierte männliche Tiere eine höhere Inzidenz für Diabetes und ovariokommierte weibliche Tiere eine niedrigere Inzidenz als die unkastrierten Wurfgeschwister (MAKINO et al., 1981). Beim Menschen hat das Geschlecht hingegen keinen Einfluss auf die Entstehung des Typ 1 DM. Wie beim humanen Typ 1 Diabetes mellitus ist das Einsetzen des Diabetes bei der NOD Maus plötzlich. Es findet im Alter zwischen 90 und 120 Tagen statt, was einem frühen Erwachsenenalter des Menschen entspricht. Symptome sind Hyperglykämie, Glukosurie, Hypercholesterinämie, Ketonurie, Polyurie, Polydipsie und Polyphagie (LEITER et al., 1987). Es kommt zu einem Verlust des Ansprechens der Betazellen auf Insulinsekretagoga Glukose und Arginin, zu einer Verringerung des Insulingehaltes des Pankreas und einer Zunahme von histopathologischen Läsionen im Pankreas (KANO et al., 1986), vor allem Insulitis mit Infiltration durch Leukozyten. Die Insulitis geht einher mit dem Verlust von Betazellen und

einer Zunahme von Alpha- und PP-Zellen (MATSUSHIMA et al., 1982; OHNEDA et al., 1984). Das Einsetzen des Diabetes in NOD Mäusen kann durch verschiedene Maßnahmen verhindert werden (GRANT et al., 2013). Damit unterscheidet sich das Mausmodell vom humanen Typ 1 Diabetes mellitus. Ferner unterscheidet sich die Insulitis dieses Modells von der des humanen Typ 1 Diabetikers.

#### 2.1.4.1.2. STZ-induzierter Diabetes

Streptozotocin wurde 1956 als antibiotisch wirkende Substanz des Bakteriums *Streptomyces achromogenes* entdeckt (VAVRA et al., 1958). Die selektive toxische Wirkung gegen Betazellen wurde Mitte der 60er Jahre ermittelt und bereits kurz danach in der Diabetesforschung genutzt (MANSFORD & OPIE, 1968). Streptozotocin verursacht Nekrosen in den Betazellen und löst dadurch Diabetes zum Beispiel bei Ratten, Mäusen, Hunden, Meerschweinchen und Affen aus. Eine einmalige hohe Dosis (160–170 mg/kg KGW) ist im Versuch mit Mäusen ausreichend, um in 70–80 % der Versuchstiere einen hochgradigen Diabetes auszulösen. Allerdings ist die Mortalität der Tiere bei einer derartigen Dosis hoch (20 Tage nach Injektion 70 % und 45 Tage nach Injektion 100 %) (YIN et al., 2006). Kavernag et al. konnten 2011 demonstrieren, dass eine Dosis von 45 mg/kg ausreicht, um bei Affen (äthiopische Grünmeerkatze – *Chlorocebus aethiops*) Diabetes auszulösen, ohne zu starke toxische Begleiterscheinungen zu induzieren. Bei 30 % der Versuchstiere, die mit Streptozotocin behandelt wurden, entstehen innerhalb von 6–7 Monaten Nierentumoren (STEFFES & MAUER, 1984) und bei Ratten werden häufig zystische Veränderungen in Leber und Nieren beobachtet.

#### 2.1.4.2 Diabetes mellitus Typ 2

##### 2.1.4.2.1. Obese Mouse (*ob/ob*)

Die *ob/ob* Maus wurde 1949 in den Jackson Laboratories in Maine entdeckt. Obese Mäusen fehlt funktionelles Leptin, ein Hormon, welches Sättigung induziert. Die fehlende Leptinwirkung am Hypothalamus (Sättigungsregion) führt zu gesteigerter Nahrungsaufnahme und Adipositas. Die Tiere weisen Hyperinsulinämie, Hyperglykämie und ab 6 Monaten Insulinresistenz auf (LINDSTROM, 2007). Die meisten Symptome wie Hyperglykämie klingen wieder ab, aber die Insulinresistenz bleibt zeitlebens bestehen (WESTMAN, 1968). Ab Tag 30 besteht eine ver-

minderte Insulinsekretion auf Glukosestimulation (EDVELL & LINDSTROM, 1995). Die Gesamtinselvolumina sind bis zu 10fach höher als bei gesunden Kontrollmäusen und bestehen hauptsächlich aus Betazellen. Die Inselzellhypertrophie ist vermutlich bedingt durch eine Anpassung an den höheren Insulinbedarf (LINDSTROM, 2007). Die Obesemaus eignet sich gut für Studien von Diabetes mellitus Typ 2, allerdings entwickeln *ob/ob* Mäuse keine Langzeitfolgeschäden wie die diabetische Nephropathie, dafür aber andere Erkrankungen wie kongenitaler Hypothyreodismus (EDVELL & LINDSTROM, 1995), was ihren Nutzen in der Diabetesforschung einschränkt. Außerdem hängt die Ausprägung des diabetischen Phänotyps vom genetischen Hintergrund ab.

#### 2.1.4.2.2. Diabetes Mouse (*db/db*)

Die Diabetes Maus ist ein Tiermodell mit einem autosomal rezessiven Leptinrezeptorgendefekt, entdeckt in den Jackson Laboratories 1966. Die Mäuse entwickeln Fettleibigkeit, Hyperinsulinämie, Insulinresistenz, Hyperglykämie und Dyslipidämie. Hyperinsulinämie lässt sich bereits mit 10 Tagen feststellen. Ab einem Alter von einem Monat sind die Blutglukosewerte leicht erhöht. Die Insulinspiegel beginnen ab 5 Monate abzufallen, die Inselzellen degenerieren, das Körpergewicht nimmt ab und die Hyperglykämie nimmt stark zu, da die verbleibenden Betazellen nicht mehr genug Insulin produzieren können, um den Glukosehaushalt stabil zu regulieren (DE ANGELIS et al., 2009). Allerdings ist die Ausprägung der Symptome und die Schädigung des endokrinen Pankreas abhängig vom genetischen Hintergrund. Die Diabetes Maus auf C57Bl/6K Hintergrund entwickelt einen deutlichen Diabetes, einhergehend mit Betazellnekrose, Inselatrophie, relativem Insulinmangel, Gewichtsverlust und einem frühen Tod. In der eng verwandten C57Bl6/J Maus kommt es dagegen zu einer schwachen Ausprägung des Diabetes mit Betazellhyperplasie und milder Hyperglykämie (GAPP et al., 1983). Die *db/db* Maus ist das Mausmodell in der Diabetesforschung, das die beständige und ausgeprägteste Albuminurie, renale und glomeruläre Hypertrophie und mesangiale Matrixexpansion zeigt (SHARMA et al., 2003). Daher ist die Diabetes Maus als Modell für die Erforschung der Pathogenese der diabetischen Nephropathie geeignet, der mittlerweile häufigsten Ursache für Nierenversagen. Allerdings fehlt bei der *db/db* Maus das Auftreten von spät auftretenden renalen Alterationen wie Glomerulosklerose, glomerulointerstitialer Fibrose und tubulärer Atrophie, welche bei der diabetischen Nephropathie des Menschen regelmäßig vorkommen.

#### 2.1.4.2.3. New Zealand obese Mouse (NZO)

Die NZO Maus ist ein viel genutzt und untersuchtes Mausmodell in der Diabetesforschung, das die meisten Symptome des Typ 2 Diabetes mellitus aufweist, wie früh einsetzende Adipositas, Insulinresistenz, Dyslipidämie und Hypertension. Es kommt zu vermehrter Apoptose in den Inseln und Betazellversagen als Folge der Gluko- und Lipotoxizität. Dies führt zu Hypoinsulinämie und Hyperglykämie (KLUGE et al., 2012). Als Folge der Hyperglykämie entstehen bei diesem Mausmodell diabetische Spätkomplikationen wie Gefäßschäden, Atherosklerose und pathologischer Angiogenese (BALWIERZ et al., 2009).

#### 2.1.4.2.4. Kuo Kondo Mouse (KK)

Die KK Maus bietet ein nützliches Tiermodell, um einen Adipositas-assoziierten Typ 2 Diabetes mellitus zu untersuchen. Die KK Maus wird erst im adulten Leben adipös und entwickelt eine Inselzellhyperplasie, Hyperinsulinämie sowie Insulinresistenz. Durch restriktive Fütterung lässt sich der diabetische Phänotyp der KK Maus gut behandeln (REES & ALCOLADO, 2005).

### 2.1.4.3 Tiermodelle für Inkretinhormone

Um Funktion und Wirkung der Inkretinhormone genauer zu untersuchen, wurden verschiedene genetisch modifizierte Mausmodelle mittels gene targeting generiert. Man vermutete, diese knockout Mäuse würden einen manifesten Diabetes mellitus entwickeln, tatsächlich aber zeigen alle derzeit bekannten Inkretinhormonknockout Modelle nur milde Symptome eines Diabetes mellitus.

#### 2.1.4.3.1. GIPR-/ Maus

Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) ist ein Inkretinhormon, welches nach der Nahrungsaufnahme in die Blutbahn frei gesetzt wird und über die Bindung an spezifische Rezeptoren (GIPR) der Betazellen die Insulinsekretion in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration steigert. Um seine Rolle als Botenstoff zwischen Darm und Betazellen zu untersuchen, wurden GIPR knockout (GIPR-/-) Mäuse kreiert (MIYAWAKI et al., 1999). Während sich die knockout Tiere im intraperitonealen Glukosetoleranztest und in Nüchternglukosewerten nicht von den Wildtypen unterscheiden, sind die Glukosewerte im oralen Glukosetoleranzwert gegenüber den Kontrolltieren erhöht. Die Insulinspiegel der GIPR-/- Mäuse sind 15 Minuten

nach oraler Glukosegabe signifikant niedriger als bei Kontrolltieren. Die Glukosehomöostase verschlechtert sich bei diesen Knockoutmäusen, wenn eine fettreiche Diät verabreicht wird (MIYAWAKI et al., 1999). Insgesamt sind die Veränderungen in der Glukosehomöostase aber nur gering ausgeprägt, da das zweite physiologisch aktive Inkretinhormon glucagon like peptide-1 (GLP-1) den fehlenden GIP-Effekt kompensieren kann. Die GLP-1 Spiegel von GIPR-/- Mäusen sind zwar vergleichbar mit denen der gesunden Tiere, die Insulinantwort auf GLP-1 ist jedoch bei GIPR-/- Mäusen 40-60 % höher als bei Kontrollen. Dies beruht wahrscheinlich auf einer gesteigerten intrazellulären cAMP-Antwort der Betazellen nach GLP-1 Stimulation (PAMIR et al., 2003). Die Betazellfläche pro Gesamtpankreasfläche ist bei GIP knockout Tieren signifikant erhöht (PAMIR et al., 2003). Durch die milde Ausprägung der Glukoseintoleranz ist die GIPR-/- als Modell für Diabetes mellitus nicht geeignet.

#### 2.1.4.3.2. GLP-1R -/- Maus

GLP-1 (Glucagon-like peptide 1) ist ein Inkretinhormon und Neuropeptid, das die Insulinsekretion und das Sättigungsgefühl nach Nahrungsaufnahme steigert. Zur Abklärung, wie wichtig GLP-1 im Zusammenhang mit der Insulinsekretion und der Nahrungsaufnahme ist, wurde ein Mausmodell geschaffen, bei dem das GLP-1 Rezeptorgen (GLP-1R) ausgeschaltet wurde (SCROCCHI et al., 1996). Sowohl die Nüchternblutglukosespiegel als auch die Glukosekonzentrationen im oralen und intraperitonealen Glukosetoleranztest waren bei GLP-1R Knockoutmäusen geringgradig erhöht. Die Insulin- und Glukagonspiegel waren nicht signifikant verändert gegenüber den Kontrolltieren. Körpergewicht und Nahrungsaufnahme von GLP-1R-/- Mäusen wichen nicht von den Werten bei Kontrollen ab. Dies wurde durch eine gesteigerte GIP Sekretion und ein verbessertes Agieren von GIP an den Betazellen erklärt, die das Ausfallen der GLP-1/GLP-1R Achse kompensiert (PEDERSON et al., 1998). Flamez et al. konnten an isolierten Betazellen von GLP-1-/- Mäusen ein erhaltenes Ansprechen der Betazellen auf Glukose nachweisen (FLAMEZ et al., 1998). Neben der insulinotropen Wirkung ist GLP-1 auch ein beeinflussender Faktor in der Inselentwicklung. Bei fehlender Aktion von GLP-1 zeigt sich in den Inseln eine gestörte Komposition und Verteilung der hormonproduzierenden Zellen. Es liegen mehr Alphazellen im Zentrum der Inseln. Diese sind in den Inseln im Mäusepankreas normalerweise im Außenbereich angesiedelt. Auch die Inseln selbst weisen Veränderungen auf, es gibt deutlich mehr kleine und mittelgroße Inseln als bei Kontrolltieren (LING et al.,

2001). Die Betazellmasse ist allerdings nicht verringert. Obwohl sich morphologische Veränderungen im Pankreas finden lassen und sich eine gestörte Glukosehomöostase feststellen lässt, sind die Veränderungen zu mild, um als Tiermodell für die Diabetesforschung geeignet zu sein.

#### 2.1.4.3.3. DIRKO Maus

Nachdem sowohl das Ausschalten des GIP Rezeptors, als auch das des GLP-1 Rezeptors nur milde Veränderungen in der Glukosehomöostase zur Folge hatten, wurde ein neues Tiermodell entwickelt, bei dem beide Rezeptoren ausgeschaltet wurden, die double incretin receptor knockout (GIPR-/-/GLP-1R-/-) Maus (PREITNER et al., 2004). Das Körpergewicht von DIRKO Mäusen glich dem der Kontrollen, Blutglukose bei nüchternen und frei gefütterten Tieren waren unverändert und auch die Glukagonwerte zeigten keine Abweichungen gegenüber Kontrollen. Die weiblichen transgenen Tiere zeigten in der Studie von Preitner et al. nüchtern teilweise signifikant erniedrigte Insulinwerte. Im oralen Glukosetoleranztest wiesen Doppelknockoutmäuse jedoch eine signifikante Erhöhung der Glukosewerte auf, sowohl im Vergleich mit Kontrollen, als auch im Vergleich mit den Einfachknockoutmäusen (GLP-1-/- und GIPR-/-). Weibliche Tiere zeigen dabei eine deutlich stärkere Erhöhung als männliche. Die gemessenen Insulinspiegel wiesen auf eine erniedrigte Insulinsekretion von 60 % verglichen mit Kontrollen und 40 % im Vergleich zu GLP-1 -/- Mäusen auf (Preitner et al. 2004). Auf exogene Insulinzufuhr reagierten die Doubleknockoutmäuse wie Kontrollen (HANSOTIA et al., 2004). Obwohl sowohl GIP als auch GLP bei DIRKO Mäusen in seiner Wirkung blockiert sind, konnten bei diesen Tieren nur geringe Veränderungen der Glukosehomöostase festgestellt werden, wenn auch etwas stärkere Abweichungen gegenüber den beiden Einfachknockoutmäusen (HANSOTIA & DRUCKER, 2005). Es wurde spekuliert, dass noch andere, unbekannte Kompensationsmechanismen existieren müssen, die die fehlende GIP und GLP-1 Wirkung kompensieren und eine normale Entwicklung des endokrinen Pankreas ermöglichen. Anders als bei der GLP-1 -/- Maus ist die Morphologie der Inseln bei der DIRKO Maus nicht verändert.

## 2.2. Entwicklung des endokrinen Pankreas

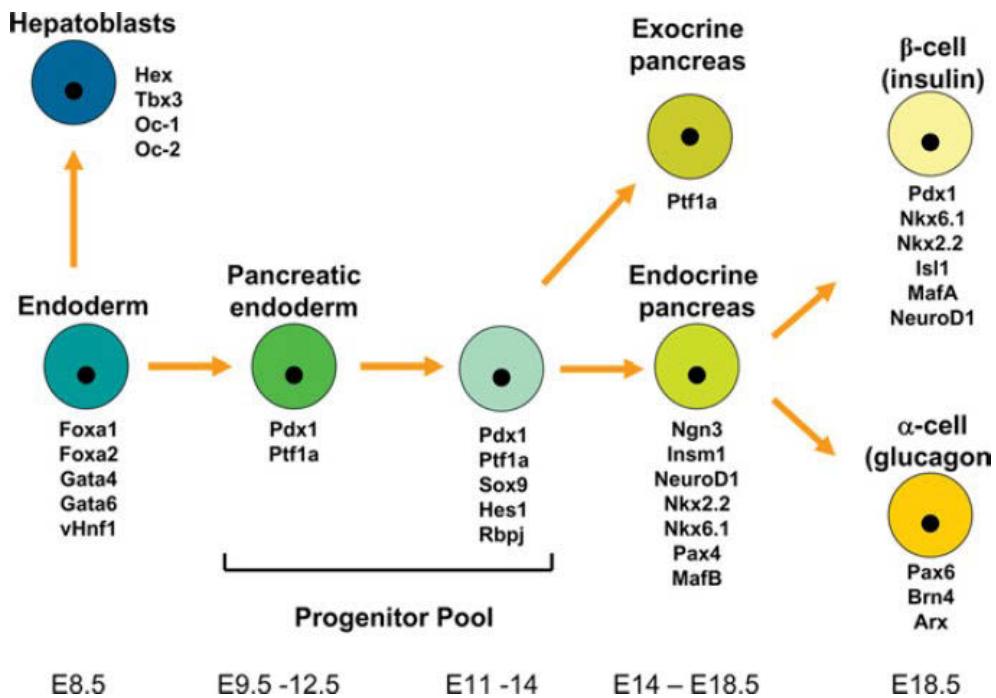
### 2.2.1 Embryonale Entwicklung

Aus dem embryonalen Entoderm entsteht das Darmrohr, aus dem der Verdauungstrakt hervorgeht. Am 9. Tag der Embryogenese (E 9) beginnt bei der Maus die Entstehung des Pankreas. Aus dem Epithelium des Vorder- und Mitteldarms wachsen eine ventrale und eine dorsale Pankreasanlage, die miteinander verschmelzen (BOUWENS & ROOMAN, 2005). Dabei ist die dorsale circa einen Tag früher sichtbar, als die ventrale Pankreasanlage. Das Verschmelzen der beiden Anlagen erfolgt zwischen E 16 und E 17 (SEYMOUR et al., 2004). Bereits ab E 9,5 lassen sich Zellen detektieren, die Glukagon und teilweise auch Insulin produzieren. Somatostatin und pankreatisches Polypeptid lässt sich erst ab E 15 nachweisen. Acini und Pankreasgänge sind ab E 14,5 als differenzierte Strukturen histologisch sichtbar (SEYMOUR et al., 2004). Inseln, die bereits ihre charakteristische Architektur haben, formen sich erst am Ende der Gestation, circa an E 18,5 (HERRERA et al., 1991). Das wachsende Pankreasepithel ist umgeben von mesenchymalen Zellen, welche die Expansion und Differenzierung des Organs fördern, indem sie Wachstumsfaktoren exprimieren. Die Proliferation von Progenitorzellen wird stimuliert von fibroblast growth factors (FGFs) (ELGHAZI et al., 2002). Bhushan et al. konnten mittels einer transgenen Maus zeigen, dass das Ausschalten des mesenchymalen fibroblast growth factor-10 (Fgf10) eine Hypoplasie der dorsalen und ventralen Pankreasanlage zur Folge hat (BHUSHAN et al., 2001). Der Transkriptionsfaktor islet 1 (Isl1) wird für die Entwicklung und Differenzierung der dorsalen Knospe benötigt, was ebenfalls anhand einem transgenen Mausmodell gezeigt werden konnte (AHLGREN et al., 1997). Mehrere andere Transkriptionsfaktoren beeinflussen die Bildung des Pankreas. Ein wichtiger ist der homeodomain transcription factor Pdx1 (pancreatic and duodenum homeobox 1), der vom Entoderm exprimiert wird. Alle pankreatischen Zelltypen leiten sich von Pdx1 exprimierenden Progenitorzellen ab. Allerdings spielt Pdx1 nur während der Knospung eine Rolle, danach fördern andere Faktoren die Pankreasentwicklung (MURTAUGH & MELTON, 2003). Auch der basic helix-loop-helix Transkriptionsfaktor (bHLH) Ptf1a (pancreas transcription factor 1a) ist ein vom Entoderm exprimierter Transkriptionsfaktor, der für die Entwicklung der ventralen Pankreasanlage benötigt wird, dessen Expression sich allerdings ab E 13,5 nur noch auf die Vorläuferzellen der Azini beschränkt (KRAPP et al., 1998). Studien an genmanipulierten Mäusen konnten zeigen, dass an der Ent-

wicklung der dorsalen Pankreasanlage zudem Hlx9 (homeobox transcription factor), N-Cadherin und das homeodomain Gen Pbx1 beteiligt sind (HARRISON et al., 1999; LI et al., 1999; ESNI et al., 2001; KIM et al., 2002). Bereits am embryonalen Tag 9,5 (E 9,5) beginnt die Differenzierung von endokrinen Zellen. Zunächst formen sich hauptsächlich Alphazellen, die allerdings noch unreif sind und außer Glukagon auch Insulin sezernieren (TEITELMAN et al., 1993). Ein signifikantes Auftreten von Betazellen kann man ab E 13,5 feststellen (HERRERA et al., 1991), man spricht von diesem Zeitpunkt als eine sekundäre Transition, also einem Wandel. Die adulten Betazellen stammen allerdings nicht von den co-exprimierenden frühen Alphazellen ab, was man zunächst vermutete. Durch sogenannte lineage studies zeigte sich, dass sowohl Beta- als auch Alphazellen von Progenitorzellen abstammen, die zuvor nicht Glukagon bzw. Insulin produziert haben (HERRERA, 2000). Für die Entwicklung der endokrinen Zellen spielt vor allem das bHLH Protein Neurogenin 3 (Ngn3) eine Schlüsselrolle, welches ausschließlich in den endokrinen Vorläuferzellen exprimiert wird und fortlaufend mit der Differenzierung herrunterreguliert wird (MURTAUGH & MELTON, 2003). Für die Betzellentwicklung sind speziell die beiden NK-homeodomain Gene Nkx2.2 und Nkx6.1 von besonderer Bedeutung. In Nkx2.2 Mutanten fehlt die Insulinexprimierung komplett und in Nkx6.1 Mutanten kommt es zwar während der Embryogenese noch zur Bildung von insulinproduzierenden Zellen, aber die sekundäre Transition an E 13,5 findet nicht statt und es kommt nicht zur normalerweise stattfindenden enormen Zunahme von Betazellen (SCHWITZGEBEL et al., 2000). Zwei Transkriptionsfaktoren aus der Pax-Familie (paired box) sind besonders wichtig für die Entwicklung der endokrinen Zellen. So führt ein Verlust von Pax 4 und Pax 6 zu dem Fehlen jeglicher endokriner Zellen (GRADWOHL et al., 2000). Pax 4 unterstützt die Spezifizierung des Betzell-Phänotyps (BOUWENS & ROOMAN, 2005) zwischen E 14 und E 17 und ist nach der Embryogenese nicht mehr von Bedeutung. Pax 6 wird dagegen auch postnatal noch von allen Inselzellen exprimiert. Sobald die Zellen anfangen Hormone zu sezernieren, hören sie auf sich zu teilen und sind sogenannte postmitotische Zellen (JENSEN et al., 2000). Nur 10–20 % des Wachstums der Betazellen in der embryonalen und fetalnen Phase geht auf Replikation zurück (SWENNE & ERIKSSON, 1982). Für die Entstehung der restlichen 80 % sind undifferenzierte Vorläufer- oder Progenitorzellen verantwortlich, ihre Proliferation nennt man Neogenese. Wenngleich es noch Diskussionen um das Vorhandensein dieser Progenitorzellen im adulten Pankreas gibt, ist die Existenz von Progenitorzellen in der fetalnen und neonatalen Phase mehrfach belegt (BOUWENS et al., 1994; KAUNG, 1994; BOUWENS & DE BLAY, 1996; BONNER-WEIR et al.,

2000; BONNER-WEIR & SHARMA, 2006). Diese Progenitorzellen sind aber schon kurz nach der Geburt inaktiv und es ist fraglich, ob sie zeitlebens überhaupt noch einmal aktiviert werden können (siehe 2.2.4). Klar ist jedenfalls, dass in der fetalen Entwicklung ein „kritisches Fenster“ gibt (BOUWENS & ROOMAN, 2005), in dem die ungefähre Anzahl der Betazellen festgelegt wird. Liegt während dieses Fensters, in dem die Zunahme der Betazellmasse sehr hoch ist, z.B. eine Mangeldurchblutung des Fetus vor, kann es zu einer verminderten Betazellexpansion kommen und die spätere Anzahl von Betazellen ist nicht in der Lage, den Körper ausreichend mit Insulin zu versorgen, obgleich sich die Betazellmasse noch durch Replikation verändert.

Abbildung 2.1: Einfaches schematisches Diagramm für die Stufen der Pankreasentwicklung in der Maus (DOCHERTY, 2009) Das Diagramm zeigt die involvierten Transkriptionsfaktoren in die Spezifizierung der Abstammungslinien. Der embryonale Tag (E) wird an der Basis der Abbildung angezeigt.

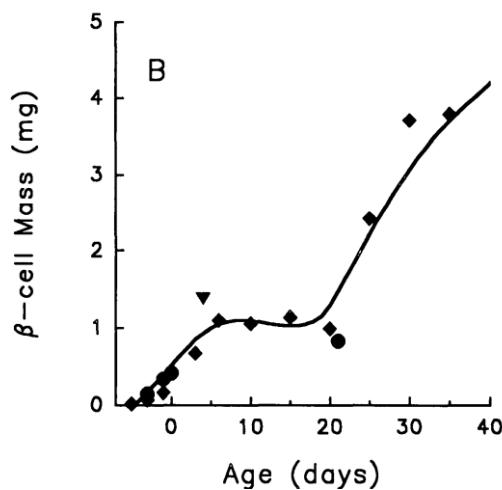


## 2.2.2 Postnatale Entwicklung

In der neonatalen Periode nimmt die der Betazellmasse weiterhin stark zu, jedoch nicht mehr so ausgeprägt wie in der späten fetalen Wachstumsphase (KAUNG, 1994). Nichtsdestotrotz kommt es zu einer massiven Expansion der Betazellmasse, v.a. durch Replikation (FINEGOOD et al., 1995; BONNER-WEIR et al., 2000). Die Betazellmasse ist definiert als die Masse aller Betazellen im Pankreas und ist direkt proportional zum Betazellvolumen (WEIR & BONNER-WEIR, 2013). In der Ratte findet in den ersten 100 Lebenstagen eine starke Zunahme der Betazellmasse statt, danach nimmt sie nur noch langsam zu. Zwischen Tag 5 und Tag 20 findet

kaum eine Massenzunahme statt, was passend zu dem geringen Wachstum des Pankreas in dieser Phase ist (FINEGOOD et al., 1995). Die Betazellmasse entwickelt sich zeitlebens parallel zum Körpergewicht (MONTANYA et al., 2000). In C57Bl/6/129 Mäusen wurde ein 10facher Anstieg der Betazellmasse zwischen der vierten Lebenswoche und dem sechsten Lebensmonat gemessen, der linear zur Zunahme des Körpergewichts verlief (BONNER-WEIR et al., 2000).

Abbildung 2.2: Betazellmassenzunahme in den ersten 40 Lebenstagen bei der Ratte (FINEGOOD et al., 1995)



In der ersten Lebenswoche lassen sich bei der Ratte noch Inselvorläuferzellen finden, die neonatale Inseln umranden und eine höhere Replikationsaktivität aufweisen (BOUWENS et al., 1994) und als Anzeichen für Neogenese gewertet werden. Laut Bonner-Weir und Sharma (2006) lassen sich zwei Neogenesewellen finden, eine direkt nach der Geburt und eine nach Absetzen (Tag 24). Außerdem konnte festgestellt werden, dass sich bei Ratten die Anzahl der Betazellen zwischen Tag 20 und Tag 30 verdreifacht und mindestens 30 % der neuen Betazellen nicht durch Replikation entstanden sind (FINEGOOD et al., 1995; BONNER-WEIR et al., 2004). Finegood et al fanden in einer Studie zur Dynamik der Betazellmasse im wachsenden Rattenpankreas bis zum Absetzen signifikante Neogeneseraten. Jedoch sinkt die Neogeneserate am 10. Lebenstag auf ein basales Niveau. In einer Studie zur postnatalen Entwicklung des Pankreas beim Menschen konnte eine ähnliche Wachstumskurve wie bei der Maus aufgewiesen werden (MEIER et al., 2008). Die größte Zunahme an Betazellmasse fand in den ersten zwei Lebensjahren statt. In diesem Zeitraum findet auch die größte Körpergewichtszunahme statt. Es handelt sich bei der Betazellmassenzunahme überwiegend um eine Größenzunahme der bereits bestehenden Inseln durch Betazellreplikation. Etwa 12 % der Betazellzunahme

ging auf neu entstandene Inseln, meistens in Duktusnähe, zurück, was als Hinweis auf Neogenese gewertet werden kann. Kassem et al. konnten zeigen, dass die Betazellreplikationsrate beim Menschen schon in den ersten 6 Lebensmonaten steil abfällt und danach basale Werte erreicht (KASSEM et al., 2000). Während bei der Ratte in verschiedenen Studien eine Apoptosewelle zur Zeit des Absetzens festgestellt werden konnte (FINEGOOD et al., 1995; SCAGLIA et al., 1997), wurden beim Menschen keine erhöhten postnatalen Apoptoseraten identifiziert (MEIER et al., 2008). Beim Menschen findet die gesteigerte Apoptose der Betazellen bereits perinatal statt, in einem zeitlichen Rahmen von 2 Monaten vor und nach der Geburt (KASSEM et al., 2000). Man findet bei jungen Mäusen immer wieder Inseln, deren Form an Sanduhren erinnert und von denen man vermutet, dass sie entweder fusionieren oder sich teilen. Mit Hilfe weiblicher hemizygoter H253 Mäuse konnten Hinweise darauf erbracht werden, dass tatsächlich eine Inselteilung im Mäusepankreas stattfindet (SEYMOUR et al., 2004). Diese transgenen Mäuse weisen eine Mutation (*lacZ* Transgen) auf einem X-Chromosom auf, welche die Expression von  $\beta$ -Galaktosid ( $\beta$ -gal) verändert. Normalerweise wird  $\beta$ -Galaktosid in allen Geweben gleichmäßig exprimiert, doch bei hemizygoten H253 Weibchen wird nach zufälliger Inaktivierung eines X-Chromosoms in der frühen embryonalen Entwicklung  $\beta$ -Galaktosidase in einer Zelle entweder exprimiert oder nicht, was zu einem Mosaik aus  $\beta$ -gal-positiven und  $\beta$ -gal-negativen Zellen führt. Wenn alle neu entstehenden Zellen in einer Insel dieser transgenen Tiere von einer einzigen Zelle abstammen, wird die Insel eine homogene  $\beta$ -Galaktosidase-Expression aufweisen, was sich im Versuch tatsächlich bestätigte. Bei sanduhrförmigen Inseln konnte eine homogene  $\beta$ -Galaktosidase-Expression in den beiden Seiten der Sanduhr nachgewiesen werden. Dies wurde als Hinweis auf Inselteilung gewertet, da bei Inselfusion eine inhomogene Zusammensetzung der beiden Anteile auftreten könnte. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass sich Inseln in ihrer Zusammensetzung bezüglich der  $\beta$ -Gal-Expression stärker unterscheiden, je weiter sie voneinander entfernt liegen (SEYMOUR et al., 2004). Unabhängig davon ist bekannt, dass sich Inseln in der perinatalen Periode durch die Aggregation von endokrinen Zellen formen (DELOUR et al., 1991), was diesen neuen Ergebnissen jedoch nicht widerspricht.

### 2.2.3 Regulation der Replikation und Apoptose

Betazellen bei erwachsenen Mäusen besitzen nur eine begrenzte Kapazität sich zu teilen und zu erneuern sowie eine geringe Apoptoserate (TETA et al., 2005). Bei der Ratte beträgt die

durchschnittliche Lebensdauer einer Betazelle ein bis drei Monate (FINEGOOD et al., 1995). Wenngleich die Replikationsrate in adulten Nagern nur 3 % beträgt, würde dies, bei abwesender Betazellapoptose, innerhalb eines Monats, zu einer Verdopplung der Betazellmasse führen (HELLERSTRÖM et al., 1988). Ausgereifte Betazellen scheinen nicht sehr gut auf mitotische Stimulation anzusprechen (BOUWENS & ROOMAN, 2005). Wachstumshormone, Prolaktin, GLP-1 und Exendin fördern das Inselwachstum im Pankreas (LEE & NIELSEN, 2009), aber auch eine Vielzahl anderer Regulatoren spielt in die Betazellmassendynamik mit hinein. Die Regulation der Betazellreplikation ist weiterhin Gegenstand vieler Studien.

Generell wird die Zellteilung und das Zellwachstum im Körper initiiert durch Cycline (D-type cyclins) und der Eintritt in den Zellzyklus wird durch Cdk4 und Cdk6 (cyclin-dependent kinases) reguliert (positive Regulatoren). Dem gegenüber stehen die negativen Regulatoren, die Cdk-Inhibitoren. Die D-Cycline bilden Komplexe mit den Kinasen, was zur Phosphorylierung und Deaktivierung des Retinoblastoma Proteins (pRb) führt, was wiederum der Zelle den Eintritt in den Zellzyklus erlaubt (LEE & NIELSEN, 2009). Anhand verschiedener Mausmodelle, zum Beispiel den Cdk4-/- Mäusen (MARTÍN et al., 2003), konnte gezeigt werden, dass Cyclin D1 und die Cdk4 speziell für die Replikation von Betazellen benötigt wird. Dementsprechend weisen Cdk4-/- Mäuse eine Reduktion der Betazellzahl auf und zeigen insulinabhängigen Diabetes. Die Wirkung von Cyclin D wurde ebenfalls anhand eines transgenen Mausmodells nachgewiesen. Bei Überexpression von Cyclin D1 kam es zu einem mehr als dreifachen Anstieg der Betazellmasse. Mittels Immunhistochemie konnte gezeigt werden, dass die Apoptoseraten normal waren, die Replikation im Vergleich zu den Wildtypen aber signifikant zugenommen hatte (ZHANG et al., 2005). Das Cyclin D2-/- Mausmodell wurde generiert, um den Einfluss von Cyclin D2 auf die Pankreasentwicklung zu untersuchen (GEORGIA & BHUSHAN, 2004). Transgenen Mäuse weisen im Alter von 14 Tagen eine vierfache Reduktion der Betazellmasse und deutlich kleinere Inseln auf und zeigen klinisch eine Glukoseintoleranz. Mittels Immunhistochemie konnte bewiesen werden, dass dies auf eine nicht mehr stattfindende Replikation zurückgeht. Mittels RT-PCR und immunhistochemischer Untersuchungen zu mehreren Zeitpunkten der Embryogenese konnte gezeigt werden, dass Cyclin D2 und D3 zu jedem Zeitpunkt in kleineren Mengen im Pankreas exprimiert wird. Cyclin D1 wurde in dieser Studie erst am Ende der postnatalen Phase gefunden, allerdings nur in den transgenen Tieren. Dies könnte bedeuten, dass eine Hochregulierung von Cyclin D1 stattfand, um den Verlust von Cyclin D2 bei Cyclin D2-/- Mäusen zu kompensieren. Da dies erst spät in der postnatalen Phase möglich war, ist

davon auszugehen, dass die Regulation der Replikation von Betazellen spezifisch auf Cyclin D2 angewiesen ist (GEORGIA & BHUSHAN, 2004). Die Cyclin D2 Expression wird durch mehrere Faktoren gesteuert, zum Beispiel über Wachstumshormone und Prolaktin, durch Zwischen-schaltung der Janus Kinase 2 und der STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5) (FRIEDRICHSEN et al., 2003). Die Inkretinhormone GLP-1 und GIP induzieren die Expression von Cyclin D1, indem sie die Promoter Aktivität des Cyclins aktivieren (FRIEDRICHSEN et al., 2006). Des Weiteren übt die Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) Einfluss auf die Expression von Cyclin D1 und D2 aus. In einer Studie mit einem transgenen Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung von GSK3 $\beta$  Betazellen vor stressbedinger Apoptose schützt und mit der Induktion von Cyclin D1 und D2 einhergeht (SRINIVASAN et al., 2005). Die negative Regulierung der Cdk/Cyclin-Komplexe wird von zwei Gruppen von Cdk-Inhibitoren gesteuert: Die INK4 Familie (p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup>, p19<sup>INK4d</sup>) und die Cip/Kip-Familie (p21<sup>Cip1</sup>, Waf1/Sdil, p27<sup>Kip1</sup>, p57<sup>Kip2</sup>). Die INK4 Familie bindet spezifisch an Cdk4 und Cdk6 und verhindert D-Cyclin-Aktivität und die Cip/Kip Familie bildet Cdk1- und Cdk2-Komplexe (SALAS et al., 2014).

Durch das Kreieren von Knockout-Mäusen (p27<sup>-/-</sup> Mäuse) konnte bewiesen werden, dass die Proliferation von Betazellen ohne den Einfluss von p27 aus der Cip/Kip Familie deutlich erhöht ist (GEORGIA & BHUSHAN, 2006), wohingegen p21 k.o. Mäuse keinerlei Abweichungen in der Inselarchitektur und Betazellmasse aufweisen, obwohl p21 ebenfalls ein Zellzyklusinhibitor ist, das bei Stimulation der Proliferation durch Cyclin D1 und Cdk4 hochreguliert wird, um den Zellzyklus der Betazellen zu arretieren (COZAR-CASTELLANO et al., 2006)(a und b). Die negative Regulierung der Replikation ist in Betazellen stärker ausgeprägt als die positive. Im Gegensatz zu anderen Zellen exprimieren Betazellen von Nagern keine Cdk6. Die bekannten Zellzyklusinhibitoren werden aber alle exprimiert (SALAS et al., 2014).

Der Einfluss von p16/INK4A auf die Replikation wurde bei 1 und 8 Monate alten C57Bl/6 Mäuse untersucht, die per Parabiose (operative Verbindung zweier Organismen) miteinander verbunden wurden. Nach 3 Wochen wurden die Pankreaten untersucht. Die Betazellreplikation bei 8 Monate alten Mäusen, die ihren Kreislauf mit 1 Monate alten Mäusen geteilt hatten, stieg signifikant an im Vergleich zu Kontrolltieren, die nicht der Parabiose unterzogen wurden, und solchen, die mit gleich alten Tieren verbunden waren. In einem parallelen Versuch wurden vier Gruppen von Mäusen einer Inseltransplantation unterzogen. Dabei zeigte sich, dass

die Transplantation von Inseln von jungen Tieren in alte Tiere keine Steigerung der Replikation bringt, die Replikationsrate betrug nur 0,5 %. Dagegen replizierten Inselzellen alter Mäuse in jungen Mäusen mit 2 %, was fast der Proliferationsrate der vierten Gruppe entspricht, bei der Inseln junger Mäuse in junge Mäuse implantiert wurden. Sowohl die Ergebnisse aus dem Transplantationsversuch, als auch die aus dem Parabiose-Versuch sprechen dafür, dass systemische Faktoren die Betazellreplikation zumindest teilweise regulieren. Allerdings wurden die Expression von p16/INK4A, p18, p21 und p27 gemessen und es gab keine Veränderung durch die Verknüpfung von junger und alter Zirkulation. Auch die Messung von Seruminsulin und IGF-1 ergab keine Unterschiede (SALPETER et al., 2013). Es muss also noch weiter nach den Faktoren gesucht werden, die die Veränderungen in der Betazellreplikation auslösen.

Die Wichtigkeit von Wnt (Proteingruppe, die Signale von Rezeptoren an der Oberfläche einer Zelle weiterleitet in die Zelle) für die Regulierung der Betazellmasse wurde mit einem transgenen Mausmodell bestätigt. Unter Einfluss eines Wnt Antagonisten zeigten die Mäuse eine deutliche Reduzierung der Pankreasmasse (75 %) und der absoluten Betazellzahlen (50 %). Die Tiere konnten diesen massiven Verlust aber mit noch unklaren Mechanismen kompensieren (PAPADOPOLOU & EDLUND, 2005). *In vitro* konnte eine dreifach erhöhte Replikation bei MIN6 (murine Insulinoma) Zellen nach Behandlung mit Wnt3a festgestellt werden (RULIFSON et al., 2007).

Die Betazellreplikation wird auch autokrin geregelt. Es gibt eine Vielzahl von Studien, die den Effekt von Glukoseinfusionen oder einmaligen Applikationen auf das Pankreas untersuchen. Dabei gibt es bei Maus und Ratte sehr unterschiedliche Ergebnisse. Vermutlich variieren die Resultate in Abhängigkeit von der Tierart, Stamm, Glukosekonzentration und der Dauer der Glukosegabe. Nichtsdestotrotz konnte mehrfach festgestellt werden, dass Glukose die Betazellreplikation steigern kann (BONNER-WEIR et al., 1989; SWENNE, 1992; GUILLEMAIN et al., 2007; JETTON et al., 2008). Eventuell geschieht dies auch über eine Aktivierung von Cyclin D2, welche in der Studie von Alonso et al. (2007) nachgewiesen werden konnte. Auch eine vermehrte Expression von Pax4 wurde schon auf Glukosestimulus nachgewiesen (BRUN et al., 2008).

Demgegenüber steht die Glukotoxizität: Dauerhaft erhöhte Glukosespiegel führen zu einer Schädigung der Betazellen (LEE & NIELSEN, 2009). So kann ein lang anhaltender Überschuss an Glukose Diabetes mellitus Typ 2 hervorrufen. Generell sinken im Alter physiologisch aber

die Blutglukosewerte und es wird vermutet, dass eventuell dieser Umstand eine niedrigere Replikation der Betazellen auslösen kann (SALPETER et al., 2013). Um den Effekt von Insulin auf die Betazellen zu untersuchen, wurden Insulin-Rezeptor Knockout Mäuse erzeugt, bei denen eine niedrigere Betazellmasse festgestellt werden konnte (OTANI et al., 2004). Im Gegensatz dazu führt eine länger anhaltende Hyperinsulinämie zu einem Wachstum der Betazellmasse, was anhand transgener IR/IRS Mäusen (heterozygote Nullmutation für den Insulinrezeptor (IR) und das Insulinrezeptorsubstrat (IRS)) belegt werden konnte (BRÜNING et al., 1997), die 5 bis 50fach erhöhte Plasmainsulinwerte hatten. Allerdings kann es infolge Hyperinsulinämie durch ein Insulinom oder Inseltransplantation in der Ratte auch zu einer signifikanten Reduktion der Betazellmasse kommen, die nicht immun-mediert ist und auf verstärkte Apoptose zurückzuführen ist (BLUME et al., 1995). Daher ist zwar klar, dass Insulin einen Einfluss auf die Betazellmassendynamik hat, aber der genaue Mechanismus ist noch unbekannt.

Inkretinhormone sind Hormone, die nach Nahrungsaufnahme aus enteroendokrinen Zellen in die Blutbahn freigeetzt werden. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) und Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) fördern die Insulinsekretion. Außerdem wurde eine Wirkung von GLP-1 als Wachstums- und Differenzierungsfaktor auf Betazellen schon mehrmals nachgewiesen. Buteau et al. (1999) zeigten, dass GLP-1 die Bindung des Transkriptionsfaktors PDX-1 in Beta(INS-1)zellen fördert. Bei alten diabetischen Ratten konnte durch GLP-1 Stimulation ein Massenzuwachs an endokrinen Inselzellen nachgewiesen werden (PERFETTI et al., 2000). Mithilfe des GLP-1 Analogon Exendin-4 gelang die Identifikation mehrerer GLP-1-Effekte: Stimulation der Betazellreplikation und Neogenese (XU et al., 1999), Vergrößerung der Inseln und Stimulation der Pdx-1 Expression (STOFFERS et al., 2000). GLP-1 Rezeptor knockout Mäuse (GLP-1R-/-) entwickeln nur eine milde Hyperglykämie, vermutlich durch eine Kompenstation durch Hochregulation der GIP-GIPR-Achse. GLP-1R-/- weisen aber Abweichungen in der Inseltopografie auf – es liegen mehr Alphazellen im Zentrum der Insel und die Inselanzahl ist gegenüber den Kontrollen signifikant reduziert. Bei GLP-1R-/- Mäusen liegt eine Verschiebung zu einem Überwiegen von mittelgroßen Inseln, während bei Kontrollen große Inseln überwiegen. Allerdings ist die Betazellmasse gegenüber Kontrolltieren unverändert (LING et al., 2001).

Die Zufuhr von GIP stimuliert nachweislich die Proliferation von Betazellen (INS-1), was durch BrdU-Inkorporation bewiesen werden konnte. Allerdings lösen nur höhere Dosen von GIP ei-

nen statistisch signifikanten Anstieg der Replikationsrate aus. GIP stimuliert *in vitro* konzentrationsabhängig und in Abhängigkeit von gleichzeitiger Glukosegabe die Signalwege von PKA (Proteinkinase A)/cAMP, MAPK (mitogen-activated protein kinase), PKA/CREB und PI3K(Phosphoinositide 3-kinase)/Proteinkinase B. Vermutlich arbeiten GIP und Glukose synergistisch auf Replikation (TRUMPER et al., 2002) und wirken *in vitro* als antiapoptotischer Faktor auf Betazellen (INS-1) (TRUMPER et al., 2002). Die Signalwege sind dabei im Wesentlichen die gleichen, wie bei der mitotischen Wirkung. Die Aktivität der Caspase 3, ein Enzym der Apoptose, wird ebenfalls durch GIP reduziert (BAGGIO & DRUCKER, 2007). Neben der PI3K/PKB ist auch eine Inaktivierung des Transkriptionsfaktor Foxo 1 (Forkhead) durch GIP und die damit verbundene Unterdrückung der Expression des Bax-Gens verantwortlich für das Betazellüberleben, da so vor Apoptose geschützt wird (KIM et al., 2005).

#### 2.2.4 Regeneration im endokrinen Pankreas

Die Mechanismen, die bei der Regeneration des endokrinen Pankreas eine Rolle spielen, werden intensiv erforscht, da die Regeneration des Pankreas bei der Therapie von Diabetes, Pankreaskarzinomen und anderen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt. Dabei besteht seit über 100 Jahren ein Disput, ob es Stammzellen oder Vorläuferzellen gibt, aus denen neue endokrine Zellen, insbesondere Betazellen entstehen können, oder ob nur Replikation für die Regeneration im adulten Pankreas verantwortlich ist. Als dritte Möglichkeit ist auch die Transdifferenzierung von Azinuszellen zu Inselzellen im Gespräch (GRANGER & KUSHNER, 2009). Die Befürworter der Neogenese weisen in verschiedenen Studien darauf hin, dass die immunhistochemisch nachgewiesene Replikation nach Verletzung des Pankreas nicht ausreicht, um das Ausmaß der Betazellzunahme zu erklären (BOUWENS & ROOMAN, 2005). Die Lokalisation von Stammzellen wird im Epithelium von Duktus vermutet (ZAJICEK et al., 1990; BONNER-WEIR et al., 1993), in den Inseln (ZULEWSKI et al., 2001) oder im Knochenmark (IANUS et al., 2003). Auch eine Neogenese von ganzen Inseln wird diskutiert. Durch die Häufung von aus Progenitorzellen entstandenen Betazellen könnten neue Inseln entstehen (BONNER-WEIR et al., 1993; FINEGOOD et al., 1995; BONNER-WEIR et al., 2000). Um die Regeneration untersuchen zu können, gibt es unterschiedliche Verfahrensweisen.

Eine selektive Zerstörung von Betazellen mit daraus resultierendem Diabetes mellitus kann durch Streptozotocin erreicht werden, wenngleich Streptozotocin auch Leber- und Nierentox-

isch ist (BOUWENS, 2006). Die intravenöse Applikation von Streptozotocin führt bei neonatalen Ratten zwar zu einer vermehrten Replikation der Betazellen, eine vollständige Wiederherstellung der Organfunktion wird jedoch nicht erreicht (BONNER-WEIR et al., 1981). Bei toxischer Destruktion der Betazellen spielt die Menge an Betazellen eine Rolle bei der Regeneration des endokrinen Pankreas. In einer Studie von Rooman und Bouwens konnte 2004 demonstriert werden, dass bei einer Behandlung mit Gastrin und EGF die Regeneration nach nahezu vollständiger Zerstörung der Betazellen durch Alloxan so erfolgreich stattfindet, dass eine Kontrolle der Glukosehomöostase wieder möglich ist, was bei einer subtotalen Zerstörung durch Streptozotocin nicht passiert. Die Betazellzunahme betrug über 30 %, allerdings waren Replikation, Apoptose und Zellgröße der Betazellen unverändert. Dies legt nahe, dass die Massenzunahme der Betazellen durch Neogenese verursacht war. Bestätigt wurde dies in der Immunhistochemie, die einen Zustrom von replizierenden, insulin-negativen Zellen in Inseln aufzeigte. Diese Zellen exprimierten Cytokeratin, was auf ihre Herkunft aus exokrinen Duktus hinweist, und teilweise gab es Übergangszellen, die sowohl Cytokeratin, als auch Insulin exprimierten. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf Vorläuferzellen, die für Neogenese verantwortlich sind (ROOMAN & BOUWENS, 2004).

Die Pankreatektomie ist eine chirurgische Methode, um die Regeneration im Pankreas zu untersuchen. Dabei ist entscheidend, wieviel Pankreasgewebe entfernt wird. Bei einer subtotalen Pankreatektomie von circa 90-95 % können bei Ratten bis zu 80 % des exokrinen Pankreas regeneriert werden. Dagegen können Pankreatektomien mit weniger Massenreduktion nicht zu einem bedeutenden Wachstumsstimulus im exokrinen Pankreas führen (PEARSON et al., 1977). Im endokrinen Pankreas sind die Verhältnisse ähnlich. Bei einer Zwei-Drittel-Pankreatektomie kommt es nur zu geringer Regeneration von 30–40 % innerhalb von 4 Wochen (LEAHY et al., 1988) und es lassen sich keine Hinweise auf Stamm- oder Vorläuferzellen finden, die sich zu Betazellen differenzieren (DOR et al., 2004). Bei subtotaler Pankreatektomie dagegen konnte eine Verdopplung der verbleibenden Betazellmasse innerhalb einer Woche festgestellt werden (PLACHOT et al., 2001). Außerdem wurden proliferierende Duktuszellen gefunden, die sich zu Betazellen differenzierten (BONNER-WEIR et al., 1993). Mittels BrdU Immunhistochemie konnte gezeigt werden, dass nach 90 %iger Pankreatektomie zunächst der Hauptduktus anfängt zu proliferieren. Anschließend folgen kleinere Pankreasgänge und es formen sich kleine Areale im exokrinen Pankreas mit fokalem Verteilungsmuster, die aus prolife-

rierenden Duktuszellen bestehen. 60 Stunden nach der Operation weisen nur noch diese Areale Replikation auf. 3 Tage post operationem machen proliferierende Duktuszellen 12,8 % des Pankreasvolumen aus, 7 Tage nach der Operation sind dagegen nur noch wenige der Areale auffindbar. Dafür hat das Volumen von Inseln und exokrinen Pankreas zugenommen und die neuen Inseln und Azinuszellen sind von alten nicht mehr unterscheidbar (BONNER-WEIR, 2000). Ein kritischer Punkt bei der Untersuchung der Pankreasregeneration nach Pankreatektomie könnte das Eintreten einer Hyperglykämie sein, die mindestens eine Reduktion der Betazellmasse um 70 % der benötigt. Eventuell wird ohne den Stimulus von Glukose nur die Replikation aktiviert, die den Verlust nicht ausgleichen kann und es kommt nicht zur Neogenese (BOUWENS & ROOMAN, 2005).

Eine weitere Methode, die Regeneration des Pankreas zu untersuchen, ist die chirurgische Duktusligatur. Dabei wird ein Teil des Hauptduktus abgebunden, was dazu führt, dass die exokrinen Produkte distal der Ligatur nicht ablaufen können, ins Interstitium fließen und zu einer Entzündung führen. Dies betrifft circa 50 % des Pankreas. In der ersten Woche post operationem kommt es bereits zur Hyperplasie, wobei die Betazellzahl innerhalb von 7 Tagen um 80 % zunimmt. Nachdem die Replikation nur gering erhöht ist, liegt der Verdacht nahe, dass die Zunahme von Betazellen durch Neogenese verursacht ist. Dies wird auch bestätigt durch das Auffinden von Zellen, die Zwischentyp von Duktuszelle und endokriner Zelle sind (WANG et al., 1995).

Eine wichtige Rolle in der Diskussion über die Existenz von Neogenese spielt lineage tracing, die Technik der Verfolgung der genetischen Abstammung einer Zelle oder Zelllinie. Dabei werden Zellen markiert, um ihre Entwicklung verfolgen zu können. Die Technik erlaubt dem Untersucher, den genauen Ursprung jeder neuen Betazelle zu bestimmen. Ein Problem, welches den absoluten Beweis der Existenz von Neogenese im Moment nicht erlaubt, ist, dass noch keine Faktoren identifiziert wurden, die exklusiv nur in den Duktuszellen exprimiert werden (GRANGER & KUSHNER, 2009). Unter der transkriptionellen Kontrolle des humanen carbonic anhydrase II (CAII) Promotors werden Gene in Duktuszellen und Ganglienzellen exprimiert, wodurch die genetisch gekennzeichnete Verfolgung von Duktuszellen möglich ist. Es wurden mittels Cre-loxP System transgene Mäuse generiert, in denen der CAII Promotor die Expression entweder von Cre Rekombinase oder von inducible Cre Rekombinase in Duktuszellen

steuert. Durch Duktusligatur wurde die Pankreasregeneration ausgelöst und durch Tamoxifengabe im Alter von 4 Wochen wurde bei Tieren mit induzierbarer Cre Rekombinase die Markierung der neonatalen Expansion des Pankreas unterdrückt. Das Ergebnis der Studie bestätigte die Annahme, dass es zu einer Transdifferenzierung von Duktuszellen zu Betazellen kommt, denn es wurde eine substanzliche Anzahl von genetisch markierten Zellen in Inseln gefunden (BONNER-WEIR et al., 2008). Dieses Ergebnis widerspricht der Studie von Dor et al. von 2004. Diese Arbeitsgruppe benutzte Tamoxifeninduzierbare Cre-Mäuse, die Cre-Rekombinase unter der transkriptionellen Kontrolle des Insulinpromotors exprimieren, um voll entwickelte Betazellen, die das Insulingen exprimierten, zu markieren. Auf diese Weise wurden nur ältere Zellen und replizierte Zellen markiert, jedoch keine jungen, aus Stammzellen entstandenen Zellen, da diese noch kein Insulingen exprimieren. In dieser Studie waren 98 % der Betazellen im adulten Tier 9 Monate nach der Tamoxifen-Injektion markiert, auch in kleinen Inseln. Außerdem war die Frequenz markierter Betazellen nach 70 %iger Pankreatektomie im verbleibenden Pankreasgewebe der Markierungsfrequenz im regenerierten Gewebe sehr ähnlich, was zu dem Schluss führte, dass Neogenese nicht zur Regeneration im Pankreas beiträgt (DOR et al., 2004). Ähnliche Ergebnisse wurden von Teta et al. 2007 präsentiert. Die Hypothese, dass Zellen mehrfach mittels lineage tracing Technik markiert werden können, ließ sich im Magen-Darm-Trakt und der Haut bestätigen. Dadurch wurde eine Möglichkeit gefunden zu testen, ob eine Zelle den Zellteilungszyklus mehrfach durchlaufen hat. Es wurden zwei verschiedene Thymidin-Analoga eingesetzt, die über das Trinkwasser appliziert wurden: 5-chloro-2-desoxyuridin (CldU) und 5-ido-2-desoxyuridin (IdU). Die Arbeitsgruppe verwendete zwei unterschiedliche BrdU-Antisera und folgte der Hypothese, dass diese mit unterschiedlicher Affinität an die beiden Thymidin-Analoga binden würden. Da jedes Analogon theoretisch einen unterschiedlichen Zellteilungszyklus detektieren müsste, ging man davon aus, dass man mit dieser Technik mehr als einen Zyklus markieren kann. In der postnatalen Phase wurden zunächst noch sehr viele Zellen einfach markiert, nach 6 Wochen dann nur noch wenige. Eine doppelte Markierung in der postnatalen Phase gab es fast nicht. Auch eine längere Applikation der Thymidinanaloga von 2-10 Monaten führte nicht zu doppelt markierten Zellen. Die Pankreasregeneration wurde abgeklärt, indem trächtige Tiere und Mäuse, die entweder einer 50 % Pankreatektomie oder einer Extandin-4 Behandlung unterzogen wurden, untersucht wurden. Dabei wurden kaum doppelt markierte Zellen gefunden. Keine einzige Insel bestand nur aus doppelt markierten Zellen und keine gefundene doppelt markierte Betazelle lag in der

Nähe eines Duktus. Damit widersprachen alle Ergebnisse der Existenz von Neogenese. Allein die Applikation von ClDU 1 Monat lang und IdU 8 Monate lang im Anschluss führte dazu, dass viele Zellen mehrfach markiert waren. Dies wurde aber als Beweis dafür erachtet, dass die Betazellen nicht postmitotisch sind, sondern den Zellteilungszyklus mehrmals durchlaufen können (TETA et al., 2007). Weiterhin wurden zwei Versuche durchgeführt, in denen Sox9-markierte Duktuszellen postnatal und nach Pankreasschädigung verfolgt wurden. Die Arbeitsgruppe konnte dabei die Differenzierung zu Betazellen in der postnatalen Entwicklung nachweisen, eine spätere Entwicklung von Dukus- zu endokrinen Zellen nach Dukusligatur blieb aber aus (KOPP et al., 2011). Dagegen konnten Furuyama et al. eine Umwandlung von Duktuszellen zu endokrinen Zellen 8 Wochen nach Gabe von Tamoxifen in der postnatalen Phase mittels Cre-basiertem lineage tracing nachweisen. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass sich embryonale pancreatische Sox9-exprimierende Progenitorzellen in alle adulten Zelltypen differenzieren können, dass ihre Kapazität für eine Differenzierung in endokrine Zellen sich jedoch schon kurz nach der Geburt verringert (Furuyama et al., 2011). Die Art der Schädigung des Pankreas nimmt Einfluss darauf, wie regeneriert wird, ebenso wie die Masse an geschädigtem Gewebe (LYSY et al., 2012). Es konnte gezeigt werden, dass Duktuszellen bei massiver Schädigung des gesamten Pankreas sowohl Azinus-, als auch Betazellen nachbilden. Wenn jedoch selektiv nur Azinuszellen geschädigt werden, bilden sie auch nur diese nach (CRISCIMANNA et al., 2011). Die Abstammungslinienvorfolgung wird natürlich auch in der Frage um die Transdifferenzierung von Azinuszellen zu endokrinen Zellen benutzt. Desai et al. führten eine ausführliche Studie mit drei Versuchsgruppen durch. Es wurden weder in physiologischen Pankreata, noch nach Pankreatektomie oder Extandin-4 Behandlung Anzeichen für Transdifferenzierung von Betazellen Azinuszellen gefunden (DESAI et al., 2007). Dagegen konnte Zhou et al 2008 die Umprogrammierung von Azinuszellen in betzell-ähnliche Zellen demonstrieren, indem die Azinuszellen mit Adenoviren infiziert wurden, die die Transkriptionsfaktoren Ngn3, Mafa und Pdx1 exprimierten. Die neu entstandenen Zellen waren in Größe, Struktur und Form nicht unterscheidbar von endogenen Inselbetazellen und sie exprimierten Gene, die für die Betazellfunktion unerlässlich sind. Außerdem sezernierten sie Insulin (ZHOU et al., 2008).

Glukose hat einen Einfluss auf die Regulation der Replikation von Betazellen (siehe 2.2.3). In einer Studie von Lipsett und Finegood (2002) wurde der Einfluss von Hyperglykämie auf die Betazellneogenese untersucht. Dabei wurden Sprague Dawley Ratten über verschiedene Zeiträume von 0 bis 6 Tage mit einer 50 %igen Glukoselösung infundiert. Nach 2, 3 und 4 Tagen

Infusion ließen sich fokale Areale von Neogenese finden. Die Replikation der Duktuszellen war zu diesem Zeitpunkt nicht erhöht, während die Replikation in den Zellen in den Arealen gegenüber dem Hauptduktus zweifach und gegenüber kleineren Pankreasgängen 15-40 Fach erhöht waren. Die Duktuszellreplikation war außerdem in den mit Glukose infundierten Tieren signifikant niedriger als in den mit Saline infundierten Kontrolltieren. Diese Fakten, zusammen mit dem Befund, dass die Duktus-assoziierte Betazellmasse sich in Glukose infundierten und Saline infundierten Ratten nicht unterscheidet, die Azinus-assoziierten einzelnen Betazellen nach 3 und 4 Tagen Glukoseinfusion jedoch 70 % erhöht sind, ließen den Schluss zu, dass die Betazellneogenese infolge Hyperglykämie durch Transdifferenzierung von Azinuszellen verursacht wird (LIPSETT & FINEGOOD, 2002).

In einer Autopsiestudie von Butler et al. wurden die Veränderungen im Pankreas in Folge von Schwangerschaftsdiabetes untersucht. Dabei konnten keine gesteigerten Replikationsraten oder erniedrigte Apoptoseraten Betazellen festgestellt werden. Trotzdem war das relative Betazellvolumen im Pankreas erhöht. Die Tatsache, dass vermehrt kleine Inseln und Insulin-produzierende Zellen in den Duktus gefunden werden konnten, lässt vermuten, dass das erhöhte relative Betazellvolumen aus Neogenese resultiert (BUTLER et al., 2010).

Faktoren, die die Regeneration im Pankreas regeln, sind bis heute größtenteils unbekannt (ZHOU et al., 2012). Man weiß aber, dass eine Behandlung mit Gastrin, Betacellulin und GLP-1-Analoga nach Zerstörung von Betazellen und Induktion eines Diabetes mellitus zu einer Verbesserung oder sogar zu einem Wiedererlangen der Glukosehomöostase führt (BOUWENS & ROOMAN, 2005). Die Wirkung von GLP-1 auf die Entwicklung und die Regeneration des endokrinen Pankreas wurde in zahlreichen Studien untersucht. Dabei beschränkt man sich nicht auf GLP-1 alleine, sondern untersucht auch die Wirkung von GLP-1 Rezeptoragonisten und –antagonisten und DPPIV (Dipeptidylpeptidase IV)-Inhibitoren, die dem Abbau von GLP-1 entgegenwirken und so seine Wirkung verlängern. So zeigte sich, dass eine Behandlung mit GLP-1, GLP-1 Rezeptoragonisten und DPPIV-Inhibitoren die Betazellmasse in Tiermodellen steigert und neue, insulinpositive Zellen in glukoseintoleranten Tieren schafft (PERFETTI et al., 2000). Bei Mäusen, mit STZ-induzierten Diabetes, führt eine Behandlung mit dem DPPIV-Inhibitor DA-1229 über 13 Wochen zu einer deutlichen Zunahme der Betazellmasse. Sowohl Replikation, nachgewiesen durch BrdU, als auch Anzeichen auf Neogenese, nämlich einzelne, isolierte Betazellen mit Pdx-1 Expression, trugen zu diesem Anstieg der Betazellmasse bei (CHO et al.,

2011). GLP-1 und Pdx-1 spielen auch eine wichtige Rolle in der Differenzierung von Duktuszellen zu Betazellen (HUI et al., 2001). Exendin-4 wirkt sich ebenfalls nachweislich auf die Betazellproliferation aus. So zeigen neugeborene Wistar-Ratten, die sofort nach der Geburt mit STZ behandelt werden, infolge Exendin-4 Applikation eine signifikante Zunahme der Betazellmasse infolge Hyperplasie (TOURREL et al., 2001).

De Leon et al führten eine 70 %ige Panreatektomie in GLP-1R-/ Mäusen durch und untersuchten gleichzeitig noch eine weitere Gruppe von Wildtypmäusen, denen nach 70 %iger Panreatektomie der GLP-1 Antagonist Ex 9-39 GLP-1 verabreicht wurde. Während Ex 9-39 die Glukoseintoleranz nach der Operation nicht verschlimmert und auch keinen Einfluss auf die Betazellregeneration hat, zeigten die GLP-1R-/ Mäuse eine signifikante Glukoseintoleranz und einen signifikanten Defekt der Betazellregeneration gegenüber Kontrolltieren (DE LEÓN et al., 2003). Die Betazellproliferation wird von GLP-1 über den EGF Rezeptor induziert (BUTEAU et al., 2003).

Bei der diabetischen NOD Maus konnte mit einer Kombinationsbehandlung von GLP-1 und Gastrin ein normoglykämischer Zustand hergestellt werden. Die beiden Wirkstoffe zusammen, aber nicht einer alleine, führen zu einer stark ausgeprägten Regeneration der Betazellmasse und außerdem zu einer Herunterregulierung der Immunantwort in der NOD Maus (SUAREZ-PINZON et al., 2008). Bei Ratten wurde eine Duktusligatur zur Zerstörung des Pankreas mit den Beatzellen durchgeführt und die Tiere wurden einer 7–10 tägigen Infusion mit Gastrin unterzogen. Eine morphometrische Auswertung zeigte, dass sich die Betazellmasse im abgebundenen Pankreasteil nach der Gastrinbehandlung verdoppelte. Die Replikation- und Apoptoseraten waren aber unverändert und die Massenzunahme war auch nicht durch eine Hypertrophie zustande gekommen. Dafür ließen sich isolierte Betazellen im exokrinen Pankreas und kleine Betazellansammlungen finden, die durch die Gastrininfusion im abgebundenen Teil des Pankreas entstanden waren. Man kam zu dem Schluss, dass Gastrin die Neogenese stimuliert (ROOMAN et al., 2002). Dies ließ sich in einer späteren Studie bestätigen. Nach Durchführung einer 95 % igen Panreatektomie und 14 tägiger Gastrin Behandlung zeigten die Versuchsratten eine reduzierte Hyperglykämie und eine angestiegene Betazellmasse. Gastrin fördert die Regeneration der Betazellmasse durch eine Steigerung von Neogenese und Replikation, wobei als Anzeichen für Neogenese isolierte Betazellen im exokrinen Pankreas und

Duktuszellen, die Pdx1 exprimieren, gesehen wurden. Außerdem war die Apoptoserate erniedrigt (TÉLLEZ et al., 2011).

In einer weiteren Studie wurden Mäuse nach einer 90 %igen Pankreatektomie zur Hälfte zusätzlich mit STZ behandelt. In diesen Mäusen ging man davon aus, dass gar keine Betazellmasse mehr intakt geblieben ist, da STZ die Apoptose der restlichen 10 % der Betazellen nach 90% Pankreatektomie auslöst. Das heißt, alle später gefundenen Betazellen sind durch Neogenese entstanden. Es wurde dann sowohl bei Kontrolltieren, bei denen Saline statt STZ verabreicht wurde, als auch in den STZ-behandelten Mäusen nach Anwendung von Exendin-4 die Betazellproliferation und Neogenese, sowie die Apoptose untersucht. Anhand der Ergebnisse kam man zu dem Schluss, dass Exendin-4 die Betazellproliferation und die Neogenese verbessert und die Apoptose reduziert, indem es die Expression von dem endoplasmatischen Retikulum stressresponsiven Gens und anderen Faktoren abschwächt (KWON et al., 2009). Die Überexpression des GLP-1 Gens, sowie von den Cyclin D2 und CDK4 Genen steigert in durch STZ zerstörten Inseln das Vorhandensein von Progenitorzellen im Pankreas und deren Differenzierung zu Inselzellen (CHEN et al., 2012).

Der Insulin-growth-factor II (IGF-II) spielt bei der Embryogenese eine wichtige Rolle für die Zellteilung und Differenzierung von Betazellen. Mithilfe transgener Mausmodelle konnte gezeigt werden, dass IGF-II auch im adulten Tier bei der Regeneration von Betazellen bedeutend ist. In Abwesenheit von IGF-II in der MIGKO (pIns-c-MycERTAM/IGF-II+/2) Maus, einer genetisch veränderten Maus, die kein IGF-II exprimiert, ist die Wiederherstellung der ursprünglichen Betazellzahl und der Gesamtbetazellmasse nach Schädigung des Pankreas beeinträchtigt und verzögert (ZHOU et al., 2012).

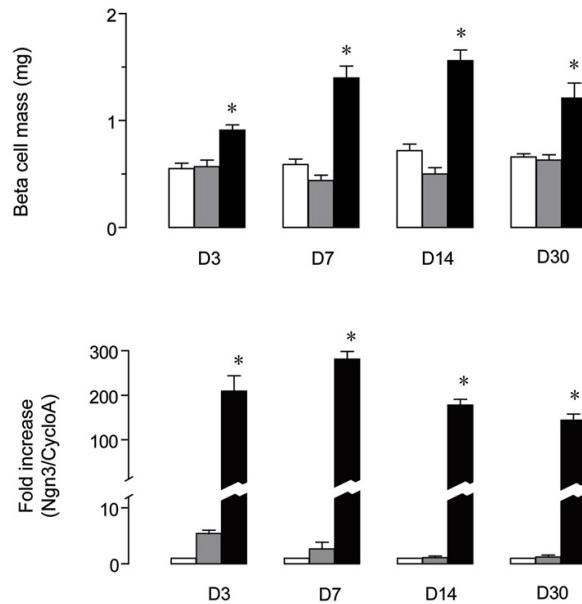
Ein weiterer Faktor in der Regulation der Regeneration ist Betacellulin. Dies ist ein Mitglied der Epidermal Growth Factor Familie, welches im humanen Pankreas die Differenzierung von Zellen der Azinuszelllinie AR42J in insulin sezernierende Zellen induziert (MASHIMA et al., 1996; SENO et al., 1996). Seine Wirkung wurde zum Beispiel in einem Mausmodell mit Alloxan induzierter Glukoseintoleranz untersucht. Die tägliche Applikation von humanem rekombinantem Betacellulin führte nach 2 und 4 Wochen nach Alloxangabe noch nicht zu Veränderungen in der Glukosetoleranz; nach 8 Wochen hingegen war die Glukosetoleranz bei den Tieren, die Betacellulin bekamen, signifikant verbessert gegenüber den Kontrollen, genauso wie

das Körpergewicht. Außerdem ließen sich neue, inselartige Ansammlungen von Betazellen finden, oft in Duktusnähe, was als Anzeichen für Neogenese gewertet wurde (YAMAMOTO et al., 2000). In einer weiteren Studie wurde die Wirkung von Betacellulin nach 90 % iger Pankreatektomie in männlichen Wistar Ratten untersucht. In den ersten 30 Tagen post operationem zeigten die mit Betacellulin behandelten Tiere eine bessere Glukosetoleranz und höhere Insulinspiegel als die Kontrollen. Nach 30 Tagen war die Betazellmasse der mit Betacellulin behandelten Tiere deutlich erhöht gegenüber Kontrollen, es gab mehr Ansammlungen von inselartigen Zellen, und die Replikation von Betazellen war gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht (LI et al., 2001). Der positive Einfluss von Betacellulin auf den Glukosehaushalt konnte auch in STZ-behandelten Mäusen bestätigt werden. Betacellulin steigerte die Anzahl von Betazellen in den Inseln und die Anzahl von insulin-positiven Inseln. Außerdem konnten mittels Immunhistochemie Hinweise darauf gefunden werden, dass intrainzuläre Vorläufer zu einer Differenzierung zu Betazellen aktiviert wurden (LI et al., 2003). Über den Mechanismus, wie Betacellulin die Proliferation und Regeneration steigert, weiß man, dass Epidermal Growth Factor Rezeptoren involviert sind. Oh et al fanden in einer Studie Hinweise darauf, dass EGF Rezeptoren ErbB-1 und ErbB-2 wichtig für die Signaltransduktion sind und ihre Aktivierung durch Betacellulin die Insulin-Rezeptor Substrat 2 (IRS-2) Genexpression steigert, sowie die Pdx1 Gentranskription (OH et al., 2011). Beide Gene spielen eine wichtige Rolle in der Betazellproliferation (KITAMURA et al., 2002; JHALA et al., 2003).

Ein weiterer wichtiger Faktor, der in die Regulation der Regeneration involviert ist, ist Neurogenin 3. Es lassen sich deutliche Hinweise darauf finden, dass Ngn3, der erste spezifische Inselzelltranskriptionsfaktor in der Embryogenese, im adulten, verletzten Pankreas die Regeneration durch Aktivierung von Betazellprogenitorzellen induziert. In einer Studie von Xu et al. konnte gezeigt werden, dass eine partielle Duktusligatur bei 8 Wochen alten Balb/c Mäusen, die Ngn3 Expression aktiviert. Es kommt zu einem über 50fachen Anstieg von Ngn3 Transkip-ten im abgebundenen Teil des Pankreas gegenüber dem unabgebundenen Teil, der mit der massiven Zunahme von Betazellmasse einhergeht. Ngn3+ Zellen im adulten Pankreas stammen aus Hormonprogenitorzellen aus der Nähe von Pankreasgängen und differenzieren sich *in vitro* zu Inselzellen (XU et al., 2008).

Abbildung 2.3 Duktusligatur aktiviert die Ngn3 Expression und lässt die Betazellmasse im adulten Pankreas ansteigen (XU et al., 2008) schwarze Balken: durch Duktusligatur abgebundener Schwanz des

Pankreas, graue Balken: unabgebundener Kopf desselben Pankreas, weiße Balken: scheinoperierter Schwanz des Pankreas;  
 \*:  $p < 0,001$  abgebundener gegenüber unabgebundener Teil



Ob diese Differenzierung tatsächlich auch *in vivo* stattfindet, wurde mit der gleichen Operationstechnik (partielle Duktusligatur), ebenfalls bei 8 Wochen alten Balb/c Mäusen, überprüft. Auch hier kam es zu einer Verdopplung des Gesamtbetazellvolumens im abgebundenen Teil des Pankreas und auch die absolute Anzahl an Inseln nahm auf mehr als das Doppelte zu. 86 % der neu entstandenen Betazellen resultierten aus Replikation. 14 % aller Betazellen aus Inseln und 40 % der Betazellen aus kleinen Inseln exprimierten Ngn3. Durch selektive Ausschaltung von Ngn3-positiven Zellen konnte gezeigt werden, dass sowohl die Replikation, als auch die Umprogrammierung von Vorläuferzellen zu Betazellen durch Ngn3 gefördert wird. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die Betazellexpansion im verletzten Pankreas durch Replikation und Neogenese erfolgt, und beides abhängig vom Vorhandensein von Ngn3-positiven Zellen ist (VAN DE CASTEELE et al., 2013).

## 2.2.5 Entwicklung des endokrinen Pankreas bei Diabetes-Patienten

Während bei Typ 1 Diabetes mellitus eine autoimmune Zerstörung von Betazellen für das Entstehen der Krankheit verantwortlich ist (TRUDEAU et al., 2000), kommt es bei Diabetes mellitus Typ 2 zu einer Insulinresistenz und/oder zum Insulinmangel. Allerdings reicht eine Insulinresistenz alleine nicht, um Typ 2 Diabetes auszulösen. Erst eine inadäquate funktionelle Masse von Betazellen, die eine Insulinresistenz nicht mehr kompensieren kann, resultiert in Diabetes mellitus Typ 2 (WEIR et al., 2013). Die Betazellmasse reagiert dynamisch auf die Verhältnisse

im Pankreas und kann sich erfolgreich einem erhöhten Bedarf anpassen. Bei Einsetzen des Diabetes kommt es zu einem Verlust an funktioneller Betazellmasse. Der Betazellmassenverlust wird vermutlich durch eine Differenzierung der Betazellen verursacht, ausgelöst durch das diabetische Milieu. Die Effekte von Glukotoxizität, Lipotoxizität und Glukolipotoxizität auf die Betazellmasse wird ebenfalls diskutiert (siehe unten). Die Zellen verlieren dadurch die Fähigkeit, auf einen Glukosestimulus hin Insulin zu produzieren. Eine inadäquate Betazellmasse wird heute als essentiell bei allen Formen von Diabetes mellitus betrachtet (WEIR et al., 2001). In einer Autopsiestudie wurden keine Hinweise auf eine reduzierte Betazellmasse bei Menschen mit Typ 2 Diabetes gefunden. Dies legt den Schluss nahe, dass der Diabetes durch eine unzureichende Insulinantwort nach Glukosestimulation verursacht ist (GUIOT et al., 2001). Allerdings widersprachen die Ergebnisse einer weiteren Autopsiestudie beim Menschen diesen Befunden. So war das relative Betazellvolumen in übergewichtigen Menschen ohne Diabetes gegenüber schlanken Nichtdiabetikern erhöht. Das relative Betazellvolumen von sowohl übergewichtigen, wie auch schlanken Typ 2 Diabetikern war gegenüber gesunden übergewichtigen und schlanken Menschen um 63 %, beziehungsweise 41 % vermindert. Die Replikationsrate war bei allen Gruppen gleich niedrig und die Neogeneserate nur abhängig vom Gewicht, nicht vom Vorhandensein einer Diabeteserkrankung. Die Apoptoserate war bei dünnen Diabetikern gegenüber gesunden dünnen Menschen 10fach und bei übergewichtigen Diabetikern 3fach gegenüber der übergewichtigen Kontrollgruppe erhöht. Daher wurde erhöhte Apoptose für den Verlust der Betazellmasse verantwortlich gemacht (BUTLER et al., 2003; WEIR et al., 2013).

Es ist allgemein anerkannt, dass es zu einem Verlust von funktioneller Betazellmasse bei Typ 2 Diabetikern kommt und dieser durch das diabetische Milieu ausgelöst wird. Hierbei könnten Glukotoxizität, Lipotoxizität und Glukolipotoxizität eine Rolle spielen (WEIR et al., 2013). Glukotoxizität lässt sich im Tiermodell mit chronischer Hyperglykämie reproduzieren (JONAS et al., 1999). Da es außerdem eine hohe Korrelation zwischen Glukotoxizität und dem Verlust der Glukose-induzierten Insulinsekretion gibt, kann dieser Faktor als wichtigster angesehen werden. Erhöhte Blutglukosewerte wirken sich auch direkt auf den Insulinspiegel im Blut aus. Die Insulinsynthese wird ausbalanciert durch die Sekretion von Insulin einerseits und die autophagische Zerstörung von Insulinsekretgranula. Dabei ist die Zerstörung von Insulingranula höher bei hohen Blutglukosewerten. Das Proinsulin/Insulin – Verhältnis bei Typ 2 Diabetikern ist erhöht, was davon kommt, dass vor allem ausgereifte Insulingranula abgebaut werden, aber

auch die verminderte Sekretion spielt eine wichtige Rolle. (WEIR et al., 2013). Das Vorhandensein von Lipotoxizität auf Betazellen zu untersuchen, erweist sich als relativ schwierig. In vitro Studien lassen sich nicht einfach auf einen Organismus übertragen, weil dafür das Wissen für die Verarbeitung von Fetten im Körper auf Zellebene nicht ausreicht. Infusionen von Lipiden sind nur in derart hohen Konzentrationen wirksam auf die Betazellen, dass keine klinische Relevanz besteht. Ergebnisse aus Studien mit verschiedenen Tiermodellen weisen nicht auf eine alleinige Lipotoxizität hin (WEIR et al., 2013).

Ein weiterer Faktor, der wichtig für den Verlust von Betazellmasse ist, ist die mit dem Alter zunehmende Reduzierung der Proliferation. Es werden weniger Zellzyklusaktivatoren und Pdx1 und mehr Zellzyklusinhibitoren exprimiert und es kommt zur Aggregation von Amyloid. Diese Änderungen sind im Alter physiologisch und können nicht alleine für die Entstehung von Diabetes verantwortlich sein, aber sie könnten verantwortlich sein für das im Alter steigende Risiko für Typ 2 Diabetes (GUNASEKARAN & GANNON, 2011).

Darüber hinaus spielen verschiedene weitere Faktoren eine Rolle beim Verlust der Betazellmasse. Erhöhte Glukosespiegel führen zu einem Anstieg von ROS (reactive oxygen species) und oxidativem Stress, aber ob dies in erhöhte Apoptoseraten und Betazelldysfunktion resultiert, ist noch unklar. Dagegen weiß man, dass Amyloid im Pankreas von Menschen mit Diabetes im Gegensatz zum Nager vorkommt und die betroffenen Patienten weniger Betazellen haben. Die Toxizität von Amyloid kommt aber nicht von den extrazellulären Ablagerungen, sondern von kleinen Fibrillen oder Oligomeren, welche die Zellmembranen schädigen können. Auch Endoplasmatischer Retikulum Stress könnte die Apoptoserate steigern, ein Mechanismus, der in den letzten Jahren gründlich untersucht wurde. Wenn eine Zelle Probleme damit hat, neu synthetisierte Proteine zu falten, wird die unfolded protein response (UPR) aktiviert. Dies schützt die Zelle normalerweise, weil es die Synthese neuer Proteine stoppt, den Zerfall ungefalteter Proteine beschleunigt und Begleitproteine aktiviert, die bei der Proteinfaltung helfen. Allerdings könnten bei alten, fragilen Zellen eher apoptotische Signalwege des ER Stress dominant sein. (WEIR et al., 2013). Es lassen sich infolge Hyperglykämie eine reduzierte Expression von wichtigen Betazell-Transkriptionsfaktoren nachweisen, eine Hochregulierung von Stress-assoziierten Genen und Änderungen im Glukosemetabolismus. Außerdem ließ sich in einer Studie mit FoxO1-defizienten Mäusen eine Dedifferenzierung von Betazellen in Nicht-Insulin-produzierende Zellen nachweisen und sogar eine Umwandlung in Alphazellen

(TALCHAI et al., 2012). Fraglich ist nur, ob sich die Mechanismen auf den Menschen übertragen lassen. Es muss auch abgeklärt werden, ob sich dedifferenzierte Betazellen in multipotente Vorläuferzellen zurückverwandeln oder einen anderen Weg der Differenzierung gehen (WEIR & BONNER-WEIR, 2013).

Diabetes mellitus Typ 2 ist meist durch ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren verursacht und entwickelt sich auch nicht plötzlich, sondern setzt langsam ein. Nach einem Modell von Weir und Bonner-Weir von 2004 kann man die Entwicklung in fünf Stadien einteilen, die aus einer Kombination von morphologischen Veränderungen und klinischen Symptomen bestehen.

Tabelle 2.4 Fünf Stufen der Entwicklung von Betazelldysfunktion zu Diabetes Typ 1 und Typ 2 (WEIR & BONNER-WEIR, 2004)

Stufe 1: Normale Blutglukosewerte durch Kompensation der Insulinresistenz mittels erhöhter Insulinsekretion und Betazellmasse
Stufe 2: Stabile Anpassung: inadäquate Betazellmasse führt zu leicht erhöhten Glukosewerten; Glukotoxizität führt zu verminderter Glukose-induzierter Insulinsekretion
Stufe 3: Unstabile Dekompensation: verschlimmerte Glukotoxizität in den Betazellen und dem Zielgewebe des Insulins verursacht einen rapiden Anstieg der Blutglukose
Stufe 4: Stabile Dekompensation: erhöhte Blutglukosespiegel, produziertes Insulin reicht aber aus, um Ketose zu verhindern
Stufe 5: nicht in DM Typ 2, nur in Typ 1, starke Reduktion der Betazellmasse, klassische Diabetessymptome und Ketose

## 2.2.6 Einfluss des genetischen Hintergrundes auf die Pankreasentwicklung

Eine wichtige Frage für das Verständnis der Entstehung des Diabetes ist, was die Anzahl und Masse von Inseln im Pankreas determiniert. Mögliche Faktoren, die Einfluss nehmen könnten, sind Körpergewicht, Pankreasgewicht und der genetische Hintergrund. Bock et al. untersuchten den Einfluss dieser Parameter auf die Größe und Struktur des endokrinen Pankreas in sieben verschiedenen Mäusestämmen. Dabei zeigte sich, dass nur der Mäusestamm einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Inselzahl aufwies. Für die Inselmasse dagegen waren alle

drei Parameter signifikant, wobei der genetische Hintergrund den stärksten Einfluss hatte. Interessanterweise gab es keine Korrelation zwischen der Inselanzahl und der Inselmasse. C57Bl/6J Mäuse zeigten zwar die geringste Insel- und Betazellmasse pro Körpergewicht, trotzdem aber die größte Anzahl von Inseln (BOCK et al., 2005). Dazu passend zeigte sich in einer anderen Studie, in der die Glukosehomöostase bei vier verschiedenen Mäusestämmen untersucht wurde, dass C57Bl/6J Mäuse signifikant erhöhte gefütterte und Nüchternblutglukosewerte gegenüber DBA/2 Mäusen hatten und nach intraperitoneale Glukoseinjektion ebenfalls höhere Glukosewerte aufwiesen (GOREN et al., 2004). Aufschlussreich dabei ist, dass der Stamm DBA/2 die höchste Insel- und Betazellmasse pro Körpergewicht von den sieben von Bock et al. untersuchten Mäusestämmen zeigte.

Auch die Proliferationsrate könnte durch den genetischen Hintergrund beeinflusst sein. Darauf weist eine Untersuchung in den zwei Stämmen C57Bl/6J und C57Bl/KsJ hin, in der die Proliferation von Betazellen durch Glukose in vitro und in vivo stimuliert wurde. Die Proliferationsrate bei C57Bl/6J Mäusen war doppelt so hoch als bei den C57Bl/KsJ Mäusen, unabhängig von der Glukosekonzentration und dem Alter der untersuchten Mäuse (SWENNE & ANDERSSON, 1984). Dies ist besonders erstaunlich, da die beiden Stämme sehr eng miteinander verwandt sind. Nun ist für die Diabetesforschung nicht nur der Einfluss des genetischen Hintergrundes auf das endokrine Pankreas in gesunden Mäusen wichtig, sondern könnte auch bei diabetischen Tieren von Relevanz sein. Eine frühe Arbeit zu diesem Thema von Coleman untersuchte den Einfluss des genetischen Hintergrundes auf die Expression der Mutationen im Diabetes Lokus (db) (COLEMAN, 1992). Durch Rückkreuzung von db/db Mäusen auf C57Bl/KsJ, DBA/2J und C57Bl/6J Hintergrund konnten die unterschiedlichen Auswirkungen der Mutation bei verschiedenen Linien untersucht werden. Dabei zeigte sich, dass die Mäuse auf C57Bl/6J Hintergrund nur milden, gut kompensierten Diabetes entwickeln, während die anderen beiden Linien einen deutlichen diabetischen Phänotyp entwickelten. Des Weiteren wurde in der Studie die Regulation des Malic-Enzyms untersucht. Dieses Enzym generiert NADPH für die Fettsäuresynthese. Man fand heraus, dass die beiden Diabetes-empfänglichen Stämme das Allel b am Malic-Enzym Regulator Lokus (Modlr) tragen und niedrige Enzymaktivität aufweisen, während die C57Bl/6J Maus die Allele a trägt und eine hohe Enzymaktivität aufweist. Um beurteilen zu können, ob die Enzymaktivität für die Entwicklung des Diabetes eine Rolle spielt, wurde eine F2 Generation aus C57Bl/6J db+ und C57Bl/KsJ db+ Mäusen produziert. Diese wurde in drei Gruppen eingeteilt nach Schweregrad ihres Diabetes. Es zeigte

sich eine Übereinstimmung zwischen diabetischen Phänotyp und Enzymaktivität, die darauf schließen lässt, dass das Gen, welches die Malic-Enzym Aktivität reguliert, verantwortlich ist für zumindest einen Teil des Einflusses des genetischen Hintergrundes auf den diabetischen Status (COLEMAN, 1992).

In einer vorhergehenden Studie wurden acht Mäuselinien mit db/db Mutation und verschiedenen Haplotypen auf ihren diabetischen Status untersucht. Dabei zeigten die Mäuselinien mit H-2b Haplotype, nämlich die Linien C57Bl/6J und 129/J, weitgehende Resistenz gegenüber dem Diabetes. Dagegen wiesen die Linien mit H-2d Haplotype (C57Bl/6K, DBA/2J) einen deutlichen Diabetes mit Betazellnekrosen auf. Beide Haplotypen zeigten keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern. Bei den Haplotypen H-2k und H-2q dagegen hatten die weiblichen Mäuse kontrollierte Blutzuckerspiegel, während die Männchen teils starken (H-2k, Linien CBA-Lt, C3HB/FeJ), teils mittelstarken (H-2q, Linie SWR/J) und teils gar keinen (H-2k, Linie MA/J) Diabetes entwickelten. Es scheint bei den Haplotypen H-2k und H-2q die Stärke des Diabetes also nicht vom Haplotype abzuhängen, sondern vom genetischen Hintergrund und vom Geschlecht (Leitner, Coleman & Hummel, 1981). Eine hohe Abhängigkeit der Ausprägung des Diabetes von Geschlechtshormonen konnte von der Arbeitsgruppe später bestätigt werden (Leiter, Chapman & Coleman, 1989).

Eine weitere wichtige Studie wurde mit doppelt heterozygoten (DH) Knockoutmäusen durchgeführt, bei denen der Insulin Rezeptor und Insulin Rezeptor Substrat-1 ausgeschaltet ist. Bei der Züchtung auf drei verschiedene genetische Hintergründe stellte man fest, dass der diabetische Phänotyp bei den drei verschiedenen Mäuselinien sehr unterschiedlich war. Während C57Bl/6 DH Mäuse eine deutliche Hyperinsulinämie und Inselhyperplasie und bereits frühzeitig eine Hyperglykämie entwickelten, zeigten 129Sv DH nur eine milde Hyperinsulinämie und wenig Inselhyperplasie. DH Mäuse auf DBA Hintergrund zeigten mittlere Insulinwerte und entwickelten nur langsam eine Hyperglykämie, zeigten aber Anzeichen von Inseldegeneration. Während von ihnen 64 % Diabetes entwickelten, waren es bei den 129Sv DH nur unter 2 %, bei den C57Bl/6 aber 85 % (KULKARNI et al., 2003).

Die Rückkreuzung von ob/ob Mäusen auf den genetischen Hintergrund C57Bl/6 und FVB/N konnte zeigen, dass Fettleibigkeit und Hyperinsulinämie beider untersuchten Linien vergleichbar waren, die Hyperglykämie war jedoch bei Tieren mit dem C57Bl/6 Hintergrund weitaus

geringer. So hatten FVB/N ob/ob Mäuse einen 4fachen Anstieg der Blutglukosewerte gegenüber ihren Wildtypen und 2fach höhere Werte als transgene C57Bl/6 Mäuse. Dies könnte sich erklären durch das Hormon Adiponektin, dass eine Insulinresistenz in der Maus umkehren kann und somit zur Stabilisierung der Glukosehomöostase beiträgt. Adiponektin, ein Proteinhormon, das den Glukosemetabolismus beeinflusst und von Fettgewebe exprimiert wird, wurde in C57Bl/6 Mäusen im zirkulierenden Blut in normalen Mengen gefunden, trotz einer eindeutigen Insulinresistenz (YAMAUCHI et al., 2001). Bei FVB/N ob/ob Mäusen war die Adiponektinexpression 2,5fach erniedrigt gegenüber Wildtypen. Die periphere Insulinresistenz in C57Bl/6 Mäusen war nur in der Leber stärker ausgeprägt als bei FVB/N Mäusen, in den Muskeln und dem restlichen Körper war sie schwach ausgebildet. Die Elimination von Triglyceriden aus dem Blut war bei ob/ob Mäusen auf C57Bl/6 Hintergrund nicht beeinträchtigt. Die C57Bl/6 Wildtypen zeigten im Vergleich mit FVB/N Wildtypen eine deutlich schnellere Triglycerid-Clearance. Die ob/ob Mutation führt bei FVB/N ob/ob Mäusen zu einer Beeinträchtigung der Triglycerid Clearance, im Gegensatz zu den Wildtypen war diese deutlich verlangsamt, anders als bei der C57Bl/6. Der Einfluss des genetischen Hintergrundes auf die Schnelligkeit der Triglycerid-Clearance wurde als wichtiger Faktor für die Ausprägung des diabetischen Phänotyps erkannt (HALUZIK et al., 2004).

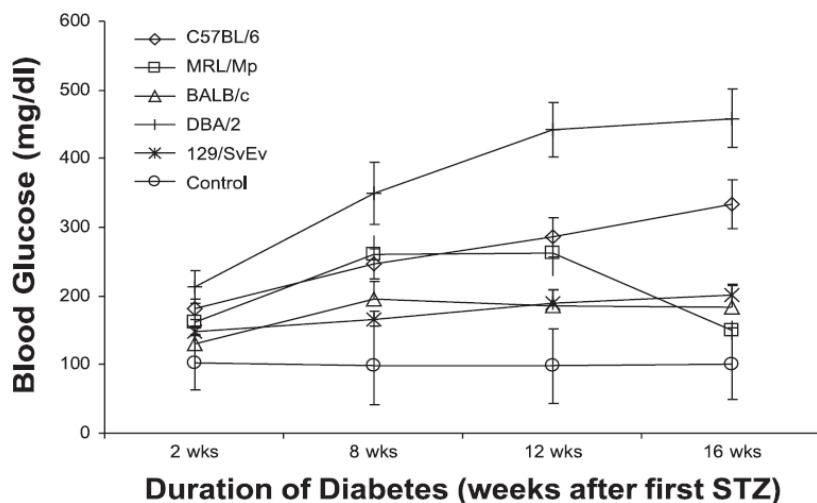
Der Mäusestamm beeinflusst die meisten Aspekte des Diabetes wie die Insulinsekretion, Insulinresistenz, die Inselanzahl und die Überlebenszeit von einzelnen Betazellen. Der Stamm C57Bl/6 ist in ihrer Empfänglichkeit für Diabetes im mittleren Raum einzuordnen. Die Glukose- und Insulinspiegel liegen zwischen den Werten anderer Mäusestämme. Die C57Bl/6 Maus ist anfällig für fütterungsbedingte Fettleibigkeit und Hyperglykämie (CLEE & ATTIE, 2007). Im Insulintoleranztest zeigt dieser Stamm eine gute Insulinsensitivität, was den Verdacht nahe legt, dass ihre Glukoseintoleranz von einem Defekt in der Insulinsekretion kommt, was sich in mehreren Untersuchungen bestätigen ließ (KAKU et al., 1988; AHREN & PACINI, 2002; KOOPTIWUT et al., 2002; TOYE et al., 2005). Dass die Regeneration auch vom genetischen Hintergrund abhängt, ist wahrscheinlich, da ihr Ausmaß bei verschiedenen Stämmen variiert. In einer Pankreatektomiestudie von De Leon et al. stellte man fest, dass die Stämme BALB/c und CD1 sich stark unterschieden in der Regeneration der Betazellmasse. Die Exposition von Inseln des Stammes DBA, der genetisch prädisponiert ist, Inselversagen zu bekommen, mit hohen Dosen von Glukose führte in vitro zu einer beeinträchtigten glukose-stimulierten Insulinsekretion,

einhergehend mit erniedrigten ATP-Spiegeln und einem niedrigeren Insulininhalt in den Betazellen. Die gleiche Behandlung von Inseln des Stammes C57Bl/6 führte nicht zu derartigen Veränderungen (ZRAIKA et al., 2006). Der Stamm FVB zeigt generell hohe Blutglukosewerte, begleitet von relativ niedrigen Insulinspiegeln (CLEE & ATTIE, 2007). Züchtet man die db/db Maus auf FVB und C57Bl/6 Hintergrund, zeigen die Tiere auf FVB Hintergrund eine größere Insulinresistenz und stärker ausgeprägte Hyperinsulinämie und Hyperglykämie als die Mäuse auf C57Bl/6 Hintergrund. Die Inseln der FVB Mäuse sind vergrößert, aber intakt (CHUA et al., 2002; LUO et al., 2006). Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass sich die beiden Mäusestämme in Allelen unterscheiden, die die Insulinresistenz fördern. Durch Kreuzung der db/db C57Bl/6 Maus auf FVB Hintergrund konnte ein Locus auf dem Chromosom 5 ausfindig gemacht werden, auf dem die FVB Allelen mit erhöhten Insulinwerten assoziiert waren. Mäuse, die in dieser Region C57Bl/6 Allele trugen, waren unfähig, die Insulinproduktion aufrecht zu erhalten, was vermuten lässt, dass durch diese Kreuzung ein Allel in der C57Bl/6 Maus entdeckt wurde, das Betazellversagen fördert (LUO et al., 2006). C57Bl/6 Mäuse besitzen viele, aber kleine Inseln, was eine schnelle Expansion der Betazellmasse durch Replikation ermöglicht (BOCK et al. 2005). Die relativ geringe Inselmasse ist aber vermutlich verantwortlich für die hohe Empfindlichkeit von dem Mäusestamm gegenüber Streptozotocin (KAKU et al., 1988; CARDINAL et al., 1998).

Die Wirkung von STZ auf verschiedene Mäuse variiert in Abhängigkeit des Stamms. In einer Studie von Gurley et al. wurde die Blutglukose ab 2 Wochen nach Injektion des STZ regelmäßig in 5 verschiedenen Mäusestämmen untersucht. Schon bei der ersten Untersuchung zeigten die verschiedenen Stämme Abweichungen in den Blutglukosewerten. Die Gruppe mit den niedrigsten Werten war der Stamm BALB/c, der Werte im Normalbereich hatte. Am stärksten sensibel gegenüber STZ war der Stamm DBA/2, der bereits nach 2 Wochen Blutglukosewerte über 200 mg/dl hatte. In den folgenden 14 Wochen fächerte sich das Verteilungsmuster auf, wobei die BALB/c und 129SvEv nur leicht erhöhte Glukosewerte hatten, während die DBA einen starken diabetischen Phänotyp mit Blutglukosewerten über 450 mg/dl aufwiesen. Bei den C57Bl/6 Mäusen nahmen die Blutglukosewerte stetig zu und erreichten 16 Wochen nach STZ-Injektion Werte im Bereich von 350 mg/dl. Bei dem Stamm MRL/Mp senkten sich die Blutglukosewerte sogar gegen Ende der untersuchten Zeitspanne wieder auf fast normale Bereiche (GURLEY et al., 2006). Man konnte die fünf verschiedenen Mäusestämme in low responders

und high responders einteilen und diese unterschiedlichen Reaktionsstärken auf das Streptozotocin wurden auf den genetischen Hintergrund zurückgeführt.

Abbildung 2.4 Blutglukosewerte nach STZ Injektion bei 5 verschiedenen Mäusestämmen (GURLEY et al., 2006)



Weiterhin wurde der Glukosemetabolismus bei vier verschiedenen Inzucht-Mäusestämmen untersucht. Die Blutglukosewerte nach 5 Stunden Fasten waren bei C57BL/6 am höchsten, gefolgt von FVB/N, DBA/2 und 129X1Sv Mäusen, welche die niedrigsten Werte aufwiesen. Es gab stammabhängige Unterschiede in der Ganzblutglukose–Plasmablutglukose–Relation, die darauf hindeuten, dass es Verschiedenheiten im Glukose-Transport durch die Erythrozyten gibt. Bei der DBA/2 ließ sich eine leichte Insulinresistenz mittels Insulininfusion feststellen. Als Antwort auf Hypoglykämie stieg Glukagon bei FVB/N Mäusen stark an (9,9fach), bei C57BL/6 Mäusen auch deutlich (4,0fach), aber bei DBA/N und 129X1/Sv Mäusen nur leicht (2,6 und 2,3fach). Auf Hyperglykämie durch Glukoseinfusion reagierten C57BL/6 und 129X1/Sv Mäuse mit stetig steigender Insulinproduktion bis auf über 500 pmol • L<sup>-1</sup>, während der FBV/N Stamm nur eine sehr schwache Erhöhung der Insulinwerte auf nicht einmal 150 pmol • L<sup>-1</sup> zeigte und Werte in dieser Region konstant beibehielt. DBA/2 Mäuse liegen mit ihren Insulinwerten dazwischen. Es konnte demonstriert werden, dass der genetische Hintergrund die Insulinaktion, -sekretion und die Regulation von Hypoglykämie beeinflusst (BERGLUND et al., 2008).

Der genetische Hintergrund beeinflusst Vorgänge im ganzen Körper. Der Einfluss des genetischen Hintergrundes auf diabetische Nephropathie wurde und wird in verschiedenen Modellen erforscht, um ein gutes Modell zu finden, das auf den Menschen übertragbare Veränderungen zeigt. In einer Studie über STZ-induzierten Diabetes wurden deutliche Unterschiede

bei fünf Mäusestämmen in der mesangialen Expansion gefunden, allerdings korrelierten diese mit den Ausprägungsgraden der Hyperglykämie und könnten durch diese bedingt sein (GURLEY et al., 2006). In einer anderen STZ-Studie wurde statt zweimal einmal am Tag für 5 Tage Streptozotocin in der gleichen Dosierung zum Induzieren des Diabetes gegeben. In diesem Modell entwickelten die fünf untersuchten Mäusestämme eine ähnlich stark ausgeprägte Hyperglykämie. Die histopathologischen Veränderungen in der Niere waren aber trotzdem sehr unterschiedlich bei den verschiedenen Stämmen. Während sich der Stamm C57Bl/6J relativ resistent gegenüber diabetischer Nephropathie zeigte, wiesen vor allem die Stämme DBA/2J und KK/HU deutliche Veränderungen auf (QI et al., 2005). Auch auf eine Überlastung der Niere mit Albumin reagieren unterschiedliche Mäusestämme verschieden. Der Mäusestamm C57Bl/6J weist nur milde Albuminurie infolge einer Überladung der Niere mit Albumin auf, während der Stamm 129S2/Sv eine wesentlich stärkere Albuminurie zeigt (ISHOLA et al., 2006).

### 2.3. Enteroinsuläre Achse

Die enteroinsuläre Achse ist eine Regulationseinheit, die alle Stimuli des Darms umfasst, die die Freisetzung der verschiedenen Hormone der Inseln beeinflussen, einschließlich hormonale, neuronale und direkte Substrat-Stimulation (CREUTZFELDT, 1979). Eingeführt wurde der Begriff enteroinsuläre Achse von Unger und Eisentraut 1969 in einer gleichnamigen Studie. Komponenten der enteroinsulären Achse, die das endokrine Pankreas beeinflussen, wurden von schon 1930 von LaBarre Inkretine benannt, während Komponenten, die das exokrine Pankreas regeln, Exkretine genannt wurden. Der Inkretineffekt bezeichnet die Tatsache, dass die orale Zufuhr von Glukose oder Aminosäuren eine schnellere und höhere Ausschüttung von Inselzellhormonen zur Folge hat als eine intravenöse Zufuhr. Circa die Hälfte des sezernierten Insulins nach oraler Glukosezufuhr wird von gastrointestinalen Faktoren freigesetzt (PERLEY & KIPNIS, 1967; NAUCK et al., 1986; NAUCK et al., 1989).

#### 2.3.1 Neuronale Komponenten

Es ist bekannt, dass die vagale Stimulation die Insulinsekretion verbessert, während eine Aktivierung des Sympathikus sie abschwächt. Man ging davon aus, dass entweder cephalische, gastropankreatische oder enteropankreatische vasovagale Reflexe den Nervus vagus nach

Nahrungsaufnahme aktivieren könnten (CREUTZFELDT, 1979). Außerdem konnte in pankreatischen Nerven das Vorhandensein von mehreren gastrointestinalen Neuropeptiden mit insulinotroper Hemmung oder Stimulation demonstriert werden. Andererseits ist der Inkretineffekt bei Menschen mit Whipple–OP oder Pankreastransplantation vollständig erhalten, daher kann eine nervale Komponente der enteroinsulären Achse zumindest beim Menschen nicht von großem Anteil sein (CREUTZFELDT, 1979). Wird allerdings der Nervus vagus selbst in seiner Überleitung unterbrochen, wird die Glukosetoleranz beeinträchtigt. In einer Studie mit Ratten konnte demonstriert werden, dass bei einer bilateralen subdiaphragmatischen Vagotomie die fettinduzierte GLP-1 Ausschüttung komplett blockiert ist. Bei einer direkten elektrischen Stimulation der Vagusäste, die Jejunum, Ileum und Colon innervieren, kommt es dagegen zu einer gesteigerten GLP-1 Sekretion (ROCCA & BRUBAKER, 1999). Bei Gabe des muscarinergen Rezeptorantagonisten Atropin wird bei Ratten eine durch Fettzufuhr ausgelöste GLP-1 Sekretion inhibiert (ANINI et al., 2002). In manchen Tierspezies kann die Insulinsekretion in Experimenten mit oraler Glukosezufuhr gesteigert werden noch vor Absorption der Glukose. Dies wird durch die oropharyngealen Geschmacksrezeptoren erreicht (PROIETTO et al., 1987).

### 2.3.2 Hormonelle Komponenten

Der Inkretineffekt beschreibt das Phänomen, dass bei oraler Glukosezufuhr eine höhere Insulinausschüttung stattfindet als bei intravenöser Glukoseapplikation. Dieser Effekt wird den gastrointestinalen Peptiden GLP-1 und GIP zugesprochen, die nach Nahrungsaufnahme sezerniert werden und wurde bereits 1964 von Elrick et al eingeführt (KAZAKOS, 2011). Die beiden Peptide zeigen ähnliche Wirkungen auf Betazellen durch ihre strukturell deutlich verwandten Rezeptoren (BAGGIO & DRUCKER, 2007).

#### 2.3.2.1 Glucagon-like-peptide 1

GLP-1 (glucagon-like-peptide 1) wurde erst 1987 identifiziert, deutlich später als glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP). Als man das Proglukagonen klonte und charakterisierte, entdeckte man das Peptid GLP-1, von dem sich zeigte, dass es die glukoseabhängige Insulinsekretion stimuliert. Da es zu 50 % homolog zu Glukagon ist, nannte man es Glucagon-like peptide-1 (BAGGIO & DRUCKER, 2007). Es wird in den L-Zellen des distalen Ileums und Colons produziert und leitet sich von Proglukagon ab (KAZAKOS, 2011). Das Proglukagon-Gen wird in den Alphazellen des endokrinen Pankreas, in den L-Zellen des Darms und in Neuronen

des Hirnstamms und Hypothalamus exprimiert, dabei transkribieren die Proglukagon-Gene in allen drei Zelltypen strukturell identische mRNA. Im Darm, ähnlich wie im Pankreas, ist eine Aktivierung des cAMP/PKA Systems (cyclisches Adenosinmonophosphat/Proteinkinase A) essentiell für die Genexpression. Ein wichtiger Regulator der Proglukagon-Genexpression ist Nahrungsaufnahme (BAGGIO & DRUCKER, 2007). Dass bereits vor direktem Kontakt von aufgenommener Nahrung und den enteroendokrinen L-Zellen die GLP-1 Ausschüttung stark ansteigt, liegt an neuronalen und endokrinen Faktoren, die die Sekretion von GLP-1 fördern. Die L-Zellen haben eine apikale Oberfläche, mit denen sie mit Nahrung in Kontakt treten und eine basolaterale Oberfläche, mit denen sie mit neuralen und vaskulären Geweben kommunizieren. Die Freisetzung von GLP-1 erfolgt biphasisch, zuerst gibt es eine frühe Phase innerhalb 10 – 15 min und anschließend eine längere Phase von 30 – 60 min. Die frühe Phase wird wohl von den Neurotransmittern GRP (gastrin-releasing peptide) und Acetylcholin und dem Peptidhormon GIP initiiert, wobei GIP beim Menschen keine Funktion auf die GLP-1 Sekretion ausübt. Die spätere, lange Phase wird von der aufgenommenen Nahrung initiiert (BAGGIO & DRUCKER, 2007). GLP-1 bindet an G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die weit verbreitet sind. GLP-1 Rezeptoren gibt es außer in den Langerhans-Inseln auch in den Nieren, der Lunge, dem Herzen und in vielen Regionen des peripheren und zentralen Nervensystems (DRUCKER, 2006). Dementsprechend hat GLP-1 eine Vielzahl von Funktionen. In den Betazellen im Pankreas stimuliert es Insulinsekretion und die Insulinbiosynthese. Außerdem wirkt es schützend auf Betazellen gegenüber Apoptose und aktiviert die Proliferation. Unter dem Einfluss von GLP-1 konnte eine Expansion der Betazellmasse durch Hemmung der Apoptose sowohl bei Nagern, als auch beim Menschen nachgewiesen werden (FARILLA et al., 2003; LI et al., 2003). GLP-1 verbessert die Glukosesensitivität von Glukose-resistenten Betazellen und damit deren Antwort auf Glukosestimulus, außerdem steigert es die Expression von Glukosetransportern und Glukokinasen (BAGGIO & DRUCKER, 2007). In Abhängigkeit von Glukose unterdrückt GLP-1 die Freisetzung von Glukagon aus Alphazellen, womit es wiederum die Freisetzung von Glukose aus der Leber hemmt. Zusammenfassend lässt sich über die pankreatischen Funktionen von GLP-1 sagen, es verbessert die Glukosetoleranz, erhöht die Betazellproliferation und –neogenese und hemmt die Betazellapoptose. Extrapankreatische Funktionen von GLP-1 sind die Verlangsamung der Entleerung des Verdauungstrakts, die Erzeugung eines Sättigungsgefühls und eine antiapoptotische Wirkung im Gehirn (KAZAKOS, 2011). GLP-1 steigert in vitro den Umbau von

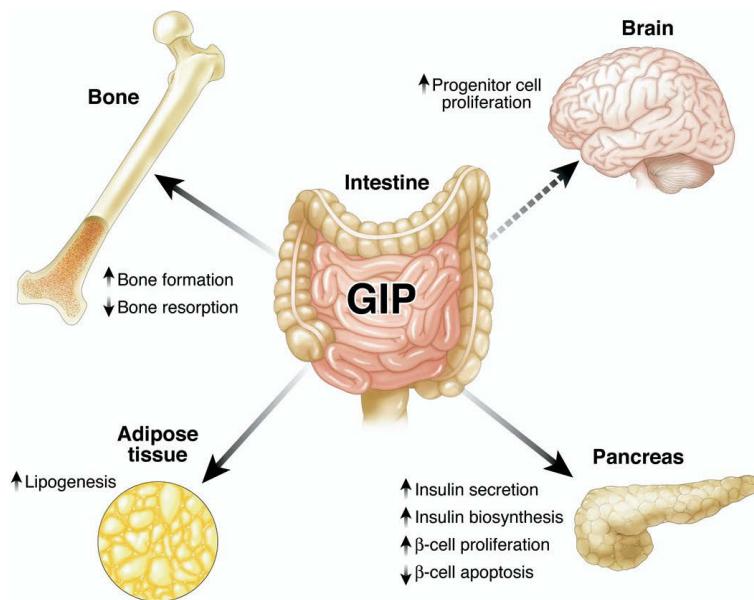
Glukose zu Glykogen in Hepatozyten und Skelettmuskeln und verbessert den insulin-stimulierten Glukosemetabolismus in Adipozyten. Eine anhaltende Aktivierung des GLP-1 Rezeptors führt in Studien zu einem Gewichtsverlust (BAGGIO & DRUCKER, 2007). Zur genaueren Erforschung von GLP-1 hat man eine Rezeptorknockoutmaus kreiert. Es zeigte sich, dass die transgenen Mäuse nur milde Veränderungen in der Glukosehomöostase aufweisen. Im oralen und intraperitonealen Glukosetoleranztest sind die Glukosewerte im Blut zwar erhöht, aber es handelt sich nur um geringe und teilweise nicht signifikante Abweichungen (SCROCCHI et al., 1996). Allerdings weisen die transgenen Mäuse eine gestörte Inselkomposition auf, was einen Einfluss von GLP-1 auf die Entwicklung der Inseln aufzeigt. Es gibt auch mehr kleine und mittelgroße Inseln, allerdings ist die Betazellmasse gegenüber Wildtypen nicht verändert (LING et al., 2001)(a). Eine gesteigerte GIP Sekretion ist verantwortlich für die milden klinischen Symptome der GLP-1 Rezeptor knockout Maus (PEDERSON et al., 1998). Die Halbwertszeit von GLP-1 im Kreislauf ist weniger als 2 Minuten und die Metaboliten werden innerhalb von 5 Minuten durch die Niere ausgeschieden. Nüchternwerte von 5 – 10 pmol/L sind im Menschen normal und nach Nahrungszufuhr steigen die Werte 2–3fach an (BAGGIO & DRUCKER, 2007).

### 2.3.2.2 Glucose-dependent insulinotropic polypeptide

GIP wurde als erstes Inkretinhormon in den 1970er Jahren identifiziert und charakterisiert. Es wurde zunächst gastric inhibitory polypeptide genannt, nach seiner Fähigkeit, die Magensäuresekretion bei Hunden zu hemmen. Nachdem sich herausgestellt hatte, dass es außerdem auch die Insulinsekretion bei Tieren und Menschen stimuliert und die Magensäuresekretion nur in pharmakologischen Dosen hemmt, wurde es in glucose-dependent insulinotropic polypeptide umbenannt (BAGGIO & DRUCKER, 2007). In einer Studie von Ebert et al. wurde aber klar, dass es nicht das einzige Inkretin sein kann, da die Entfernung von GIP aus einem Darmextrakt mittels Immunoabsorption nicht zu einer Minderung des Inkretineffekts führte (DRUCKER, 2006). Es handelt sich bei GIP um ein 42 Aminosäuren langes Polypeptid, welches in den K-Zellen des Duodenums produziert wird und durch Nahrungsaufnahme sezerniert wird. Während beim Menschen Fett der potenteste Stimulator für GIP ist, sind es bei Nagern und im Schwein Kohlenhydrate. Das humane GIP Gen liegt im langen Arm des Chromosom 17 und umschließt 6 Exons, wobei die Mehrheit der GIP-kodierenden Sequenzen im Exon 3 lokalisiert ist. Wie die Genexpression genau reguliert wird, ist noch unbekannt. Studien weisen aber darauf hin, dass die Promotoraktivität von zwei cAMP-responsiven Elementen reguliert

wird. Außerdem konnten Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, wie für Sp1 (specificity protein 1), Ap1 (activator protein) und Ap2 und Pdx1. Im Nager finden sich noch Bindungsstellen für Isl-1 (Insulin gene enhancer protein). Die Aminosäuresequenz der cDNA von GIP lässt darauf schließen, dass GIP aus einem Vorläuferhormon, dem ProGIP entsteht. Dieses Prohormon, bestehend aus 153 Aminosäuren, kodiert nicht nur GIP, sondern auch ein Signalpeptid, ein N-terminales Peptid und ein C-terminales Peptid (BAGGIO & DRUCKER, 2007). In vitro konnte man mehreren Faktoren einen fördernden Effekt auf die GIP-Sekretion nachweisen, nämlich eine Aktivierung der Adenylatcyclase, erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration,  $\text{K}^+$ -medierte Depolarisation, Glukose, GRP und  $\beta$ -adrenerge Stimulation. GIP fördert die Insulinsekretion durch die Aktivierung von cAMP/Proteinkinase A und cAMP/Epac2 (exchange protein directly activated by cAMP 2) und nutzt zusätzlich noch den Phospholipase 2 und Spezifische Proteinkinase Weg. Außerdem stimuliert es die Insulin-Gentranskription und -biosynthese in den Betazellen sowie die Expression von Glukosesensoren auf der Betazelle. GIP hat auch einen protektiven Effekt auf Betazellen. So verbessert es das Überleben der Betazellen unter Einfluss von Streptozotocin, Glukolipotoxizität oder Glukoseentzug und fördert die Proliferation. Bei GIPR knockout Mäusen ist dieser protektive Effekt beeinträchtigt und die Betazellproliferation ist erniedrigt (BAGGIO & DRUCKER, 2007). GIP stimuliert verschiedene Wachstumsfaktor-Wege wie MAPK, PI3K und Proteinkinase B, welche in der Regulation der Betazellmasse eine wichtige Rolle spielen (siehe 2.2.3). Außerdem hat es anabole Effekte im Fettgewebe, wie die Förderung von Fettsäuresynthese, Verbesserung des Insulin-stimulierten Einbaus von Fettsäuren in Triglyceride, Hochregulierung der Lipoprotein Lipase Synthese und Reduktion der durch Glukagon verursachten Lipolyse. GIP verbessert auch die Knochenformation über eine Stimulation von Osteoblastenproliferation und Apoptosehemmung (BAGGIO & DRUCKER, 2007). Im zentralen Nervensystem verbessert es das Zellüberleben (NYBERG et al., 2005). Eine Zufuhr von GIP erhöht die Proliferation von hippocampalen Vorläuferzellen in vivo bei Ratten (BAGGIO & DRUCKER, 2007)

Abbildung 2.5 Funktionen von GIP in peripheren Geweben (BAGGIO & DRUCKER, 2007)



Zur genaueren Abklärung der Funktionen von GIP hat man ein transgenes Mausmodell geschaffen, bei dem der GIP Rezeptor ausgeknockt ist (MIYAWAKI et al., 1999). Ähnlich wie in der GLP-1 knockout Maus entwickelt auch die GIP knockout Maus keine starken Veränderungen in der Glukosehomöostase. Lediglich im oralen Glukosetoleranztest zeigten die Knockout-Tiere deutlich erhöhte Glukosekonzentrationen und nach 15 Minuten niedrige Insulinwerte. Auch hier findet eine Kompensation durch das andere Inkretinhormon, in diesem Fall GLP-1 statt. GLP-1 wird zwar nicht vermehrt ausgeschüttet, aber die Insulinantwort auf GLP-1 ist um 40–60 % erhöht und die cAMP Aktivierung doppelt so hoch wie bei Wildtypen (PAMIR et al., 2003). Da jeweils ein Inkretinhormon einspringt, sobald das andere ausfällt, war die logische Konsequenz, ein Mausmodell zu generieren, in dem beide Rezeptoren ausgeschaltet sind. Erstaunlicherweise haben auch diese Doppelknockoutmäuse normale Nüchternblutglukosewerte und die frei gefütterten Blutglukosewerte sind ebenfalls im gleichen Bereich wie bei Wildtypen. Nur im oralen Glukosetoleranztest zeigten die transgenen Versuchstiere signifikant erhöhte Glukosewerte und um 60 % erniedrigte Insulinwerte gegenüber den Wildtypen (PREITNER et al., 2004).

Basalwerte von GIP im Blut liegen bei 0,06 und 0,1 nmol/l und steigen nach Nahrungszufuhr auf 0,2 bis 0,5 nmol/l. Es wird in weniger als zwei Minuten bei Nagern und innerhalb von 5 bis 7 Minuten beim Menschen von der Dipeptidylpeptidase (DPPIV) abgebaut, wobei es etwas weniger empfänglich für die DPPIV ist als GLP-1, wie sich in Studien zeigte, in denen das Enzym

Menschen intravenös zugeführt wurde (KIEFFER et al., 1995). GIP Metaboliten werden hauptsächlich durch die Niere aus dem Körper geschleust, aber auch die Leber und die Extremitäten steuern auch einen Teil bei (BAGGIO & DRUCKER, 2007).

### 2.3.2.3 Dipeptidyl-Peptidase IV (DPPIV)

Sowohl GIP als auch GLP-1 besitzen die Aminosäure Alanin an ihrer zweiten Position der Aminosäuresequenz und sind damit exzellente Substrate für die Dipeptidyl-Peptidase IV (DRUCKER, 2006). Dies ist eine Serinproteinase, die spezifisch Proteine mit Alanin oder Prolin an der 2. Position spaltet und damit ihre Aktivität hemmt oder aufhebt. Außer den Inkretin-hormonen bindet die DPPIV auch Kollagen und die Adenosin Deaminase und spielt eine Rolle für die T-Zell Proliferation und Costimulation. Das Enzym wird weitverbreitet exprimiert, man findet es in Nieren, Lunge, Leber, Darm, Milz, Hoden, Pankreas, zentralem Nervensystem, Nebenniere und auf Zellen wie den Lymphozyten und Makrophagen. Da sie auch auf Endothelzellen in Blutgefäßen der Darmmukosa, benachbart zu L-Zellen, liegen, ist mehr als die Hälfte des GLP-1s, das den Blutkreislauf erreicht, bereits inaktiviert. Außerdem liegt DPPIV auch löslich im zirkulierenden Blut vor (BAGGIO & DRUCKER, 2007).

### 2.3.2.4 GIP-Rezeptor

Der humane GIP-Rezeptor ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor. Sein Gen liegt auf dem Chromosom 19 in der Bande q13.3 und beinhaltet 14 Exons. Er existiert in zwei Isoformen mit 466 und 493 Aminosäuren und wird in Pankreas, Magen, Darm, Fettgewebe, Nebennierenrinde, Milz, Hoden, Endothelzellen, Herz, Hypophyse, Trachea, Knochen, Thymus, Lunge, Nieren, Schilddrüse und in verschiedenen Regionen im zentralen Nervensystem exprimiert. Welche Faktoren seine Expression regulieren, ist noch nicht ganz klar. Es gibt Bindungsstellen am Gen für cAMP-responsive Elemente und Transkriptionsfaktoren wie Oct-1, Sp1 und Sp3 (BAGGIO & DRUCKER, 2007). Seine Aktivierung ist an die Aktivierung der Adenylatcyclase gekoppelt, an einen intrazellulären  $Ca^{2+}$  Anstieg und einen Arachidonsäure Ausstrom. Es kommt durch die Bindung von GIP an den GIPR zu einem Anstieg von cAMP und die Proteinkinase A wird aktiviert (DRUCKER, 2006). In vitro Studien weisen darauf hin, dass die N-terminale Domäne und der erste extrazelluläre Loop des Rezeptors essentiell für die hohe Bindungsaffinität von GIP sind, während ein anderer Teil der N-terminalen Domäne und die erste transmembrane Domäne wichtig für die Bindung von cAMP und die Aktivierung des Rezeptors sind. Der

GIP Rezeptor unterliegt sehr schnellen und reversiblen homologen Desensibilisierungen und zielgerichteter Mutagenese im Bereich des C-terminalen Endes. Zusätzlich tragen noch die G-Protein-Rezeptor Kinase 2 und  $\beta$ -Arrestin 1 zur Desensibilisierung des Rezeptors bei (BAGGIO & DRUCKER, 2007). Mehr über die Struktur und das Bindungsverhalten von dem GIP Rezeptor konnte in einer Studie von Parthier et al. herausgefunden werden. Die Feinstrukturanalyse der extrazellulären Domäne des GIP Rezeptors im Komplex mit dem Liganden GIP zeigt eine N-terminale  $\alpha$ -Helix auf, die umschlossen von zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern ist, von denen jedes zwei kurze  $\beta$ -Fäden umfasst, sowie zwei kurze helikale C-terminale Segmente. Stabilisiert wird der Komplex von drei Disulfidbrücken, von denen eine von der N-terminalen  $\alpha$ -Helix zu einem  $\beta$ -Faltblatt geht, eine zwischen den zwei  $\beta$ -Faltblättern besteht und die letzte das C-terminale Ende eng an das zentrale  $\beta$ -Faltblatt bindet. Das N-terminale Ende von GIP hat aber keinen direkten Kontakt zur extrazellulären Domäne des Rezeptors. Die Bindung von GIP an den Rezeptor erfolgt hauptsächlich durch hydrophobe Bindungen an der  $\alpha$ -Helix der C-terminalen Region. Trotzdem spielt das N-terminale Ende eine wichtige Rolle, da die Bindung von GIP 10fach erniedrigt ist in modifiziertem GIP ohne N-terminales Ende. Vermutlich ist das N-terminale Ende in eine strukturelle Reorganisation des Hormons eingebunden, die Bindungswärme freisetzt und zur Rezeptor-Ligand-Erkennung beiträgt (PARTHIER et al., 2007). Um die Involvierung der N-terminalen Hälfte von GIP und ihrer Aminosäurenreste nach Rezeptorinteraktion besser zu verstehen, wurden diese Reste auf menschlichen, embryonalen Nierenzellen exprimiert und ihre Wirkung untersucht. Die vermuteten Aminosäurenreste von Bindungsstellen wurden zuvor in einem computergestützen Modell des Komplexes von GIP und der N-terminalen extrazellulären Domäne von dem GIP Rezeptor identifiziert. Die Ergebnisse unterstützen die Theorie einer Bindungsform von GIP und dem Rezeptor, in der sich die N-terminale Hälfte von GIP in den transmembranen Helixen 2, 3, 5 und 6 befindet und der Rest Tyr1 mit Gln224 der transmembranen Helix 3, mit Arg300 der transmembranen Helix 5 und mit Phe357 der transmembranen Helix 6 interagiert, was für die gesamte Ligand-Rezeptor-Bindung unabdingbar ist (YAQUB et al., 2010). Die Domänen des Rezeptors werden durch intrazelluläre Proteinschleifen voneinander getrennt. Dabei ist die dritte intrazelluläre Schleife besonders wichtig, da diese G-Proteine binden kann, wodurch unter anderem die Adenylatcyclase aktiviert wird (VOLZ-PETERS et al., 2000).

### 2.3.2.5 Inkretineffekt bei Diabetes mellitus Typ 2, Behandlung mit Inkretinimetika und DPPIV-Hemmern

Nauck et al konnten demonstrieren, dass der Inkretineffekt bei Typ 2 Diabetikern beeinträchtigt ist (NAUCK et al., 1986). Sieben Jahre später konnte dies in einer weiteren Studie auf eine defekte Wirkung von GIP zurückgeführt werden, während die GLP-1 Wirkung erhalten war. Da in der Studie synthetisches GIP zugeführt wurde, ist vermutlich eine mangelnde Effektivität oder eine nicht ausreichende Expression des GIP-Rezeptors in den Inseln verantwortlich für die eingeschränkte Wirkung des synthetischen GIPs. Eine mögliche Erklärung für eine Desensibilisierung des GIP-Rezeptors wären dauerhaft erhöhte GIP-Werte im Blut. Es liegen allerdings verschiedene Studien vor, bei denen GIP-Werte von Typ 2 Diabetikern erhöht, normal oder erniedrigt sind. Eine andere Möglichkeit der Herunterregulierung von GIP-Rezeptoren ist die Ubiquitinierung infolge von hohen Glukosewerten, was dann eine ligandenunabhängige Verminderung von GIP-Rezeptoren bedeuten würde (KAZAKOS, 2011). Eine Vererbung der abgeschwächten GIP-Antwort ist auch nicht auszuschließen, wie sich in einer Studie mit verwandten Typ 2 Diabetikern zeigte (MEIER et al., 2001). Es lässt sich beweisen, dass die mangelnde Wirkung von GIP bei Typ 2 Diabetikern reversibel ist. Bei intensiver Behandlung mit Insulin verbessert sich der Inkretineffekt 3–4fach, was für eine wichtige Rolle der Hyperglykämie im Zusammenhang mit der defekten GIP-Wirkung spricht (HØJBERG et al., 2009). Obwohl der GLP-1 Effekt bei Typ 2 Diabetikern erhalten ist, führt die kontinuierliche subkutane Gabe von GLP-1 zu niedrigeren Nüchtern- und postprandialen Blutglukosewerten, zu niedrigeren HbA<sub>1c</sub> Werten und zu einem Gewichtsverlust (NAUCK et al., 1993). Grundsätzlich ist die Insulinantwort auf die Inkretine bei älteren Menschen abgeschwächt. Daher ist zur Kompensation die Ausschüttung von GLP-1 und GIP im Vergleich zu jüngeren Menschen erhöht. Trotzdem ist es wahrscheinlich, dass die niedrigere postprandiale Insulinsekretion zu einer schlechteren Glukosetoleranz bei älteren Menschen führt (RANGANATH et al., 1998). Für die Therapie von Diabetes mellitus Typ 2 nützliche Inkretin-basierte Medikamente sind GLP-1 Rezeptoragonisten, die weniger schnell abgebaut werden als GLP-1 selbst und DPPIV Hemmer. Der bekannteste GLP-1 Rezeptoragonist ist Exendin-4. Dies ist ein Peptid, das in der Speicheldrüse des Gilamonters vorkommt und 52 % Übereinstimmung der Aminosäuren mit GLP-1 hat. An der Position 2 besitzt es aber ein Glycin und ist damit kein Substrat für die DPPIV, was bedeutet, dass es eine höhere Lebenszeit als GLP-1 hat. Exenatide ist das erste synthetische Exendin-4,

das in den USA von der FDA (Food and Drug Administration) im April 2005 zugelassen wurde für die Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2. Mehrere Studien konnten zeigen, dass Exenatide gerade für das Anfangsstadium der Krankheit als effektive Behandlung funktioniert und eine Insulinbehandlung gleichwertig ersetzen kann. In einem späteren Stadium, in dem nicht mehr ausreichend Betazellmasse vorhanden ist, um auf GLP-1 zu reagieren, reicht eine Behandlung mit Exenatide allerdings oft nicht mehr aus (KAZAKOS, 2011). Liraglutide ist ein GLP-1 Rezeptoragonist, der besonders langanhaltende Wirkung hat, weil er nicht nur DPPIV-resistant ist, sondern auch an Serumalbumin bindet, was seine in vivo Halbwertszeit auf 11 – 13 Stunden erhöht (KNUDSEN et al., 2000). Das Medikament kam 2009 in Europa auf den Markt und kontrolliert nach einmaliger subkutaner Injektion für 24 Stunden die Blutglukose, wobei es selten zur Hypoglykämie führt. Es ist effektiver als Glimepirid, ein Sulfonylharnstoff, der ebenfalls als orales Antidiabetikum verwendet wird, effektiver als Insulin und auch als Exenatide. Verglichen mit Exenatide hat es bezüglich Verlust von Körpergewicht und Reduktion des Blutdrucks ähnliche Wirkung. Die häufigste Nebenwirkung von einer Behandlung mit GLP-1 Rezeptoragonisten ist Übelkeit, die jedoch in der Regel abklingt. Außerdem kommt es bei 50 % der Patienten, die mit Exenatide behandelt werden, zur Bildung von Antikörpern, die jedoch unproblematisch ist. Übergewichtige Typ 2 Diabetiker haben ein erhöhtes Risiko, bei einer Exenatide-Behandlung eine Pankreatitis zu bekommen (KAZAKOS, 2011). Auch die DPPIV-Hemmer wurden auf ihre Tauglichkeit für die Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 untersucht, da die DPPIV einen schnellen Abbau der Inkretine bewirkt und ihre Hemmung zu erhöhten Konzentrationen der insulinfördernden Hormone im Blut führt. Sitagliptin wurde 2006 in den USA zugelassen, sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit Sulfonylharnstoffen und anderen oralen Antidiabetika. Alle DPPIV-Inhibitoren sind selektiv für die DPPIV, aber ihre Affinität zu dem Enzym ist unterschiedlich. Sie zeigen aber alle anhaltende Effektivität in der Diabetestherapie und können zumindest in Kombination mit anderen oralen Antidiabetika den HbA<sub>1C</sub> senken (KAZAKOS, 2011).

## 2.4. GIPR<sup>dn</sup> transgene Mäuse

Nachdem man zu einer genaueren Abklärung der Wirkung der Inkretinhormone knockout Mäuse kreiert hatte, bei denen entweder der GIP Rezeptor, der GLP-1 Rezeptor oder die Rezeptoren beider Inkretinhormone (DIRKO) ausgeknockt waren, stellte man fest, dass die Kon-

sequenzen dieser Mutationen nur relativ schwach waren. Als Erklärung für den milden diabetischen Phänotyp aller drei Mausmodelle vermutete man Kompensation durch andere Mechanismen, die die Glukosehomöostase aufrechterhalten (siehe 2.3). Daher wurde eine neue Strategie versucht, um die Rolle des GIP Rezeptors zu erforschen. Man generierte ein Mausmodell, bei dem ein mutierter, dominant negativer GIP Rezeptor exprimiert wird (VOLZ-PETERS et al., 2000; HERBACH et al., 2005).

#### 2.4.1 Mutation des humanen GIP Rezeptors

Zunächst wurde die humane cDNA des intakten GIPR via Transfektion in CHL-Zellen (chinese hamster lung Zellen) exprimiert. Anschließend stimulierte man die Zellen mit GIP und konnte zeigen, dass die Kopplung der Adenylatcyclase funktionierte, was eine Erhöhung des cAMP Spiegels auslöste (VOLZ et al., 1995). Nachdem die Klonierung und Exprimierung unveränderter cDNA funktionierte, wurde eine rekombinante DNA kreiert, die einen GIP Rezeptor kodiert, bei dem an der dritten intrazellulären Schleife des Rezeptors die Aminosäurepositionen 321-328 deletiert wurde. Zusätzlich wurde an Position 342 die Aminosäure Alanin gegen Glutamin ausgetauscht. In vitro Studien an CHL-Zellen konnten belegen, dass es sich um eine dominant negative mutation handelt, weil der mutierte Rezeptor fähig ist, GIP zu binden, ohne dabei eine Signaltransduktion auszulösen ( $\text{GIPR}^{\text{dn}}$ ) (VOLZ-PETERS et al., 2000).

Abbildung 2.5 Darstellung des humanen GIP Rezeptors (A: Aminosäuresequenz des humanen dominant negativen GIP Rezeptors und dessen Anordnung in der Plasmamembran mit Mutation in der dritten intrazellulären Schleife. B: Vergrößerte Darstellung der 3. intrazellulären Schleife) (VOLZ-PETERS et al., 2000)

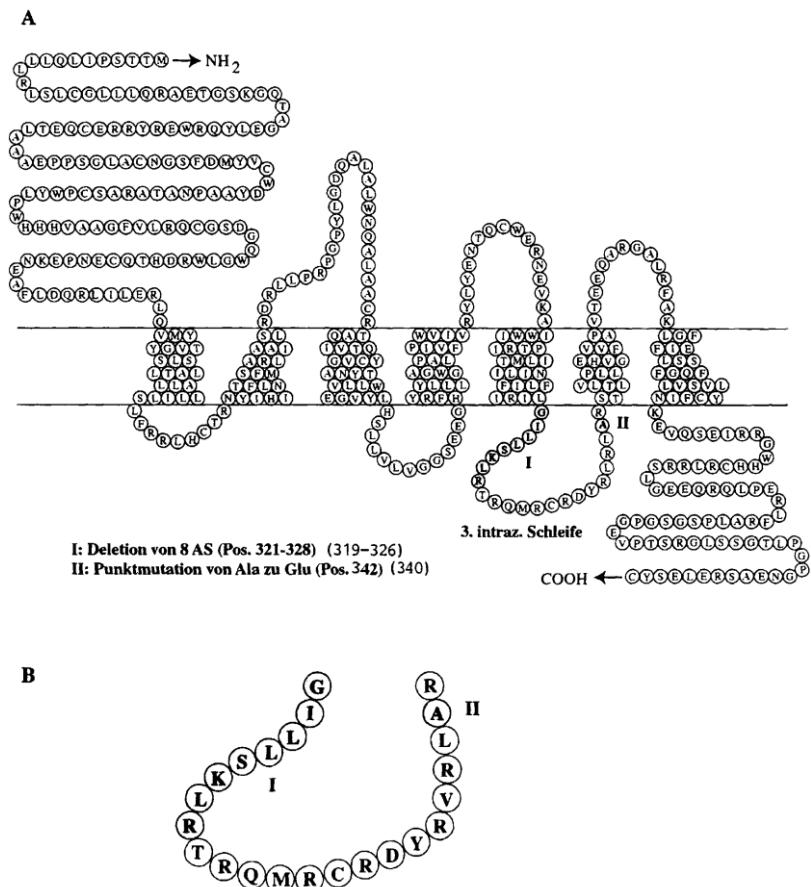


Abb. 1

## 2.4.2 Transgenes Mausmodell

In einem zweiten Schritt wurde der mutierte Rezeptor *in vivo* bei Mäusen in Betazellen überexprimiert, wodurch erreicht werden sollte, dass der endogene GIP Rezeptor inaktiviert wird, da alles vorhandene GIP bereits vom mutierten Rezeptor gebunden wurde. Die betazellspezifische Expression wurde realisiert, indem die cDNA des GIPR<sup>dn</sup> hinter den Insulinpromoter des RIP1-Vektors kloniert wurde, so wie es auch schon für die Expression von anderen Genen in Betazellen funktioniert hatte (HANAHAN, 1985). Die cDNA wurde per Mikroinjektion in befruchtete Eizellen verbracht und per Embryotransfer in scheinträchtige Mäuse eingepflanzt. In nachfolgenden klinischen Versuchen zeigte sich, dass die transgenen Tiere einen Diabetes mellitus entwickeln. Außerdem stellte man anhand histopathologischer Untersuchungen fest,

dass das Inselvolumen und die Inselanzahl im Vergleich zu den Wildtypen deutlich verringert waren. Außerdem ließen sich starke Anreicherungen von Glykogen in Leber und Nieren nachweisen (HERBACH et al., 2005)

#### 2.4.3 Charakterisierung GIPR<sup>dn</sup> transgener Mäuse

Die Untersuchung des diabetischen Phänotyps GIPR<sup>dn</sup> transgener Mäuse auf CD1 Hintergrund zeigte eine etwa 4fach erhöhte Serumglukose gegenüber Kontrolltieren bei weiblichen transgenen Mäusen mit einem Alter von 30 Tagen und eine 3,9fach erhöhte Serumglukose männlicher transgener Mäuse im selben Alter gegenüber männlichen Kontrolltieren. Mit zunehmendem Alter stiegen die Blutglukosewerte der transgenen Mäuse weiter an, während die der Kontrollen stabil blieben. So wiesen die weiblichen transgenen Tiere mit 90 Tagen eine 4,4fach höhere postprandiale Serumglukose auf als ihre weiblichen Kontrollmäuse und die männlichen transgenen Tiere sogar eine 7fach höhere Serumglukose als die gleichalten männlichen Kontrollen (HERBACH et al., 2005). Auch die Seruminsulinspiegel der transgenen Mäuse wiesen eine starke Abweichung von den Werten der Kontrolltiere auf. Postprandial war der Seruminsulinspiegel bei 90 Tage alten männlichen transgenen Mäusen 6,9fach niedriger als bei den nicht-transgenen Wurfgeschwistern. Bei den transgenen Weibchen waren die Werte 4,3fach erniedrigt gegenüber gleichalten Kontrollen. Eine subkutaner Glukosetoleranztest bestätigte den starken Diabetes sowohl bei männlichen als auch weiblichen transgenen Tieren. Im subkutanen Glukosetoleranztest fiel auf, dass die weiblichen Kontrolltiere mit einer wesentlich höheren Insulinproduktion auf Glukosezufuhr reagieren als die männlichen Kontrolltiere, außerdem war die AUC-Glukose (area under glucose curve) bei den transgenen Mäusen signifikant erhöht gegenüber den Kontrollen. Der subkutane Glukosetoleranztest wurde unter Applikation von GLP-1 und GIP wiederholt. Dabei zeigte sich, dass die AUC 46-56 % reduziert wurde durch GLP-1 Gabe, sowohl bei den Kontrollen, als auch bei den transgenen Mäusen. Dagegen bewirkte die GIP Applikation bei den GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäusen keine Veränderung der AUC, während die Kontrolltiere eine Reduktion der AUC um 42% aufwiesen. Dies demonstrierte den Effekt von GLP-1 und GIP auf die Glukosehomöostase und zeigte gleichzeitig die Effektivität der Rezeptormutation. Das Körpergewicht der männlichen transgenen Mäuse war mit 90 Tagen signifikant erniedrigt gegenüber dem der männlichen Kontrolltiere, während es bei den Weibchen nur einen geringen, nicht signifikanten Unterschied im Körpergewicht gab. Das Gesamtinselvolumen der transgenen Mäuse war gegenüber den Kontrolltieren bereits mit

10 Tagen signifikant erniedrigt und blieb auch mit 30 und 90 Tagen signifikant niedriger, wobei der Unterschied noch größer wurde. Das Gesamtbetazellvolumen der transgenen Mäuse war ebenfalls schon mit 10 Tagen signifikant erniedrigt und blieb zwischen Tag 30 und Tag 90 annähernd konstant, während das Gesamtbetazellvolumen der Kontrolltiere zwischen Tag 30 und Tag 90 noch einmal signifikant zunahm und gegenüber den transgenen Mäusen immer deutlich höher war. Auch das Gesamtvolumen der isolierten Betazellen im Pankreas war bei den transgenen männlichen und weiblichen Mäusen viel geringer als bei Kontrolltieren, unabhängig vom Zeitpunkt der Untersuchung (HERBACH et al., 2005).

Die GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäuse zeigen gegenüber Kontrolltieren auch eine deutliche Polydipsie, Polyurie und Polyphagie. Durch Fütterung einer ballaststoffreichen Diät wurde überprüft, ob die Symptome des Diabetes mellitus verringert werden können durch eine veränderte Ernährung. Dabei wurde den transgenen Mäusen und den Kontrolltieren einer Gruppe längerfristig eine konventionelle Diät gefüttert und den Tieren der zweiten Gruppe eine ballaststoffreiche Diät. Die transgenen Mäuse beider Gruppen wiesen gegenüber den Kontrolltieren eine deutlich erhöhte Blutglukose, Polyurie, Polydipsie und Polyphagie auf, jedoch waren diese bei den transgenen Tieren, die die faserreiche Diät bekommen hatten, signifikant niedriger als bei den transgenen Mäusen mit konventioneller Fütterung (HERBACH et al., 2008).

Auch die postnatale Entwicklung des Pankreas der transgenen Mäuse auf CD1 Hintergrund wurde im Hinblick auf die Insel- und Betazellzahlen und -größen untersucht. Dabei zeigte sich, dass es mit zunehmendem Alter zu einer wachsenden Diskrepanz zwischen Wildtypen und GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäusen in Gesamtinselvolumen und Gesamtbetazellvolumen kam. Während das Gesamtinsel- und Gesamtbetazellvolumen bei den Wildtypen stetig zunahm, wenn auch zwischen Tag 90 und Tag 180 nicht mehr signifikant, kam es bei den GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäusen zu einem Abfall des Gesamtinsel- und Gesamtbetazellvolumens ab Tag 45 und signifikant niedrigeren Werten als bei den Wildtypen. Auch die Inselanzahl der transgenen Tiere war signifikant niedriger als die der Kontrolltiere zu jedem der untersuchten Zeitpunkte. Bei der Replikation hingegen war nur mit 90 Tagen ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtypen und transgenen Tieren vorhanden, wobei die transgenen Tieren weniger replizierende Zellen in den Inseln aufwiesen. Als Hauptgrund für die gestörte postnatale Expansion des Pankreas bei GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäusen auf CD1 Hintergrund wurde aber die beeinträchtigte Neogenese angeführt (HERBACH et al., 2011).

Diabetische Nephropathie ist eine Spätfolge des Diabetes mellitus und eine der Hauptursachen für Nierenversagen beim Menschen. Es zeigte sich, dass die GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäuse Nierenveränderungen entwickeln, die frühen, Diabetes-Assoziierten renalen Alterationen des Menschen entsprechen. Bei der Charakterisierung der Mäuse wiesen die transgenen Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten eine signifikant höhere Blutglukose, Polyurie, Polydipsie und ein reduziertes Körpergewicht auf. Sie zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöhte Serum-Harnstoff und Kreatinin Werte und eine Albuminurie. Bei einer qualitativen und quantitativen morphometrischen Untersuchung der Nieren im Alter von 3, 8, 20 und 28 Wochen wiesen GIPR<sup>dn</sup> transgene Mäuse bereits frühzeitig glomeruläre Veränderungen auf wie eine Podozytenhypertrophie, eine reduzierte Volumendichte der Podozyten im Glomerulum und eine Verdickung der glomerulären Basalmembran. Renale und glomeruläre Hypertrophie, mesangiale Expansion und Matrixakkumulation wurden mit 20 Wochen immer deutlicher und der Glomeruloskleroseindex begann zu steigen. Mit 28 Wochen konnten größere tubulointerstitiale Läsionen und eine fortgeschrittenen Glomerulosklerose nachgewiesen werden (HERBACH et al., 2009).

In einer weiteren Studie wurde der Einfluss des genetischen Hintergrundes auf die Entwicklung diabetes-assozierter Nierenläsionen bei GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäusen untersucht. Dafür wurden transgene Böcke mit CD1 und BALB/c Weibchen verpaart. Es zeigte sich, dass bei beiden Linien transgene Tiere ein signifikant niedrigeres Körpergewicht aufwiesen und dass CD1 Mäuse gegenüber BALB/c Mäusen durchschnittlich ein signifikant höheres Körpergewicht zeigten. Im Alter von 6 Monaten zeigten transgene Tieren beider Linien eine starke und signifikante Erhöhung der Blutglukose gegenüber den Wildtypen. Während die CD1 Wildtypen signifikant höhere Werte hatten als die BALB/c Wildtypen, wiesen die transgenen Tiere beider Linien keinen signifikanten Unterschied zwischen ihren Blutglukosewerten auf. Sowohl die transgenen als auch die CD1 Wildtypen zeigten signifikant niedrigere Blutdruckwerte als BALB/c. Die transgenen Mäuse beider Linien wiesen dabei gering höhere Werte auf als die dazugehörigen Kontrolltiere, jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant. Die transgenen Mäuse beider Linien wiesen deutliche Polyphagie und Polydipsie auf, unterschieden sich von einander aber dabei nicht signifikant. Jedoch war die Polyurie bei den transgenen Mäusen auf CD1 Hintergrund gegenüber denen auf BALB/c Hintergrund signifikant stärker ausgeprägt. Die klinische und quantitativ stereologische Untersuchungen zeigten teils signifikante Abweichungen.

gen bei den transgenen Mäusen gegenüber nicht-transgenen Wurfgeschwistern, wie Albuminurie und glomerusklerotische Schädigungen, und auch teils signifikante Abweichungen zwischen den Wildtypen und zwischen den transgenen Tieren beider Linien. So wiesen CD1 Wildtypen erhöhte absolute Nephronenzahlen gegenüber BALB/c Wildtypen auf und GIPR<sup>dn</sup> transgene CD1 Mäuse zeigten signifikant höhere mittlere Glomerulumvolumen gegenüber GIPR<sup>dn</sup> transgenen BALB/c (POPPER, 2013).

Da die Studie von Popper jedoch hauptsächlich den Einfluss des genetischen Hintergrundes auf diabetes-assoziierte Nierenerkrankungen bei GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäusen untersucht, ist eine genaue Abklärung des Einflusses verschiedener genetischer Hintergründe auf den diabetischen Status und das endokrine Pankreas noch nötig. Dieser Einfluss ist bei den generell schon gut charakterisierten GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäusen noch nicht ausreichend dokumentiert.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Tierkollektiv

In der Studie wurden männliche GIPR<sup>dn</sup> transgene Mäuse auf dem genetischen Hintergrund FVB/N (F.CD1-GIPR<sup>dn</sup>) und C57Bl/6 (B6.CD1-GIPR<sup>dn</sup>) jeweils untereinander und mit Wildtypen (WT) desselben genetischen Hintergrunds verglichen. Zur Generierung der beiden kongenen transgenen Linien wurden hemizygote transgene männliche GIPR<sup>dn</sup> transgene Mäuse der Ursprungslinie (CD1) mit weiblichen C57Bl/6J und FVB/N Wildtypen verpaart. Männliche transgene Nachkommen wurden bis zur zehnten Generation mit C57Bl/6J (B6) oder FVB/N (F) Weibchen angepaart (Abbildung 3.1), danach erfolgte Bruder x Schwester Paarung. B6.CD1-GIPR<sup>dn</sup> waren zum Zeitpunkt der Versuche in der 18. Generation und F.CD1-GIPR<sup>dn</sup> in der 40. Generation. Daher war bei beiden untersuchten Linien der Anteil des CD1 Hintergrundes zu vernachlässigen.

Ein Tierkollektiv wurde im Alter von 10 Tagen zur Pankreasentnahme getötet (n=6 pro Genotyp und genetischem Hintergrund). Bei einem zweiten Kollektiv erfolgten zunächst zu verschiedenen Zeitpunkten klinische Tests (n=8 pro Genotyp und genetischem Hintergrund), bevor die Tiere im Alter von 90 Tagen zur Untersuchung des Pankreas getötet wurden (n=6 pro Genotyp und genetischem Hintergrund). Tiere des zweiten Kollektivs wurden mit 21 Tagen von weiblichen Wurfgeschwistern und der Mutter getrennt, an den Ohren markiert und es wurden Biopsien für eine spätere Genotypisierung gewonnen. Die Mäuse wurden in Standardkäfigen (Makrolon, Ehret, Deutschland) bei 12 Stunden Licht – Dunkelheit Zyklus gehalten, und erhielten Leitungswasser und Futter *ad libitum* (Altromin Spezialfutter GmbH & Co KG, Deutschland). Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit institutsinternen Standards und gemäß der Vorgaben des Tierschutzgesetzes durchgeführt (GZ 55.2-1-54-2531.3-49-10, 55.2.1.54-2532-82-13).

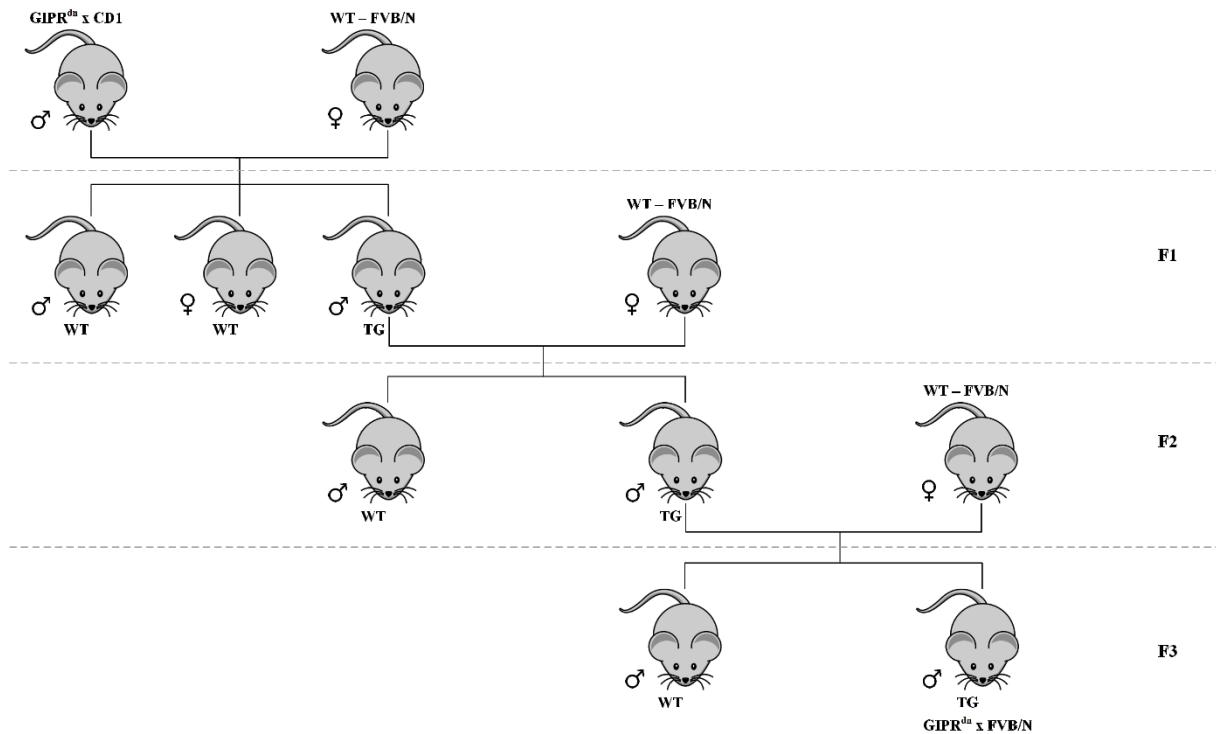


Abbildung 3.1 Verpaarungsschema für die Rückkreuzung der GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäuse auf den genetischen Hintergrund FVB/N

### 3.2. Genotypisierung

Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR (polymerase chain reaction) von Schwanzspitzenbiopsien nach etablierten Protokollen (HERBACH, 2002; POPPER, 2013).

#### 3.2.1 Primer

Primer mit folgenden Sequenzen wurden für die Genotypisierung GIPR<sup>dn</sup> transgener Mäuse benutzt:

-5'-ACA GNN TCT NAG GGG CAG ACG NCG GG-3' Oligonukleotid-Sense (Tra1)

-5'-CCA GCA GNC NTA CAT ATC GAA GG-3' Oligonukleotid-Antisense (Tra3)

(Genzentrum, München, Deutschland)

Diese Primer binden sowohl an den mutierten GIP-Rezeptor der transgenen Mäuse, als auch an den endogenen GIP-Rezeptor der Wildtypen. Die beiden Rezeptoren können anhand der Anzahl ihrer Basenpaare voneinander unterschieden werden. Das PCR-Produkt des murinen

GIP-Rezeptors beträgt circa 500 Basenpaare, während das PCR-Produkt des mutierten humanen GIP-Rezeptors nur 140 Basenpaare enthält.

### 3.2.2 DNA-Extraktion

Schwanzspitzenbiopsien wurden mit je 400 µl Mastermix über Nacht in einem Heizblock bei 55 °C verdaut (Biometra TB1 Thermoblock, Whatman, Deutschland), unverdaute Komponenten durch Zentrifugation für zwei Minuten bei 15000 Umdrehungen entfernt (Sigma 1K15, Sigma, Deutschland) und der Überstand abpipettiert. Um die DNA auszufällen, wurden 400 µl Isopropanol (Roth, Deutschland) zugefügt. Nach Abkippen des Isopropanols wurden die entstandenen Pellets zweimal mit 900 µl 70 %igem Ethanol (Roth, Deutschland) gewaschen. Nach Abkippen des Überstandes und Abpipettieren der restlichen Flüssigkeit trockneten die Pellets 20 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die DNA in TE-Puffer resuspendiert. Die Menge des TE-Puffers hing dabei von der Menge des Pellets ab. Es wurden zwischen 50 und 200 µl Puffer verwendet. Damit sich die DNA vollständig löst, kamen die Proben entweder eine Stunde in den Heizblock oder 24 Stunden in den Kühlschrank bei 4 °C.

#### **Mastermix**

Cutting Puffer	375µl
SDS 20 % (Roth, Deutschland)	20µl
Proteinkinase K (20mg/ml) (Boehringer Ingelheim, Deutschland)	5µl

#### **Cutting Puffer**

1 M Tris-HCL (pH 7,5, Roth, Deutschland)	2,5ml
0,5 M EDTA (pH 8,0, Sigma, Deutschland)	5,0ml
5 M NaCl (Roth, Deutschland)	1,0ml
1 M DTT (Roth, Deutschland)	259µl
Spermidine (500mg/ml, Sigma, Deutschland)	127µl
Aqua dest.	ad 50ml

#### **TE-Puffer**

10mM Tris-HCL (pH 8,0, Roth, Deutschland)

1mM EDTA

### 3.2.3 PCR

Für das Ansetzen der PCR wurde je Probe 1 $\mu$ l entnommen und mit 19 $\mu$ l Mastermix in PCR Cups (Kisker, Deutschland) gemischt. Alle beteiligten Komponenten wurden während des Mischvorgangs auf Eis gelagert, mit Ausnahme der Taq DNA Polymerase, die bei -20 °C tiefgefroren blieb, bis sie dem Mastermix zugefügt wurde. Bis zum Ende der Genotypisierung wurden die Reste der DNA-Proben bei 4 °C gelagert. DNA einer bereits typisierten transgenen GIPR<sup>dn</sup> Maus wurde als Positivkontrolle und DNA eines bereits genotypisierten Wildtyps als Negativkontrolle benutzt. PCR-Wasser wurde als Qualitätskontrolle eingesetzt. Die PCR wurde in einem Biometra® Uno II Theromcycler (Biometra, Deutschland) durchgeführt.

#### **Mastermix 1 x Ansatz ( $\mu$ l)**

PCR-Wasser	6,65
Q-Solution (Taq PCR Master Mix Kit, Quiagen, Niederlande)	4
10 x Puffer (Taq PCR Master Mix Kit, Quiagen, Niederlande)	2
MgCl <sub>2</sub> (50mM) (Taq PCR Master Mix Kit, Quiagen, Niederlande)	1,25
dNTPs (1mM) (Eppendorf, Deutschland)	1
Primer 1 (2 $\mu$ M)	2
Primer 2 (2 $\mu$ M)	2
Taq Polymerase (Taq PCR Master Mix Kit, Quiagen, Niederlande)	0,1
<b>Mastermix</b>	<b>19</b>
<b>Template (DNA)</b>	<b>1</b>

### 3.2.4 Gelelektrophorese

Die DNA-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Gel bestand aus TAE Agarosegel (1,5g Agarose (Gibco BRL, Deutschland) / 100ml 1xTAE Puffer), welches mit 9 $\mu$ l/l Ethidiumbromid (0,1 %, Merk, Deutschland) versetzt wurde und in eine Easy Cast® Kammer ausgegossen wurde (PeqLab, Deutschland). Nach Aushärtung des Gels wurde die Kammer mit 1x TAE Puffer aufgefüllt, der wiederum 9 $\mu$ l/l 0,1 %iges Ethidiumbromid enthielt, um die elektrische Leitung zu verbessern. Das Ethidiumbromid bindet an doppelsträngige DNA und verursacht eine Fluoreszenz bei Bestrahlung mit UV-Licht. Vor der Einbringung der DNA-Proben in die Geltaschen wurden diese mit 4 $\mu$ l von 6x loading dye blau gefärbt (MBI Fermentas, Deutschland). Am Beginn jeder Reihe im Gel wurden 12 $\mu$ l PUC Mix Marker (MBI Fermentas,

Deutschland) in die Geltasche gegeben, um bei der Auswertung der Elektrophorese Vergleichsbanden für die Bestimmung der amplifizierten DNA Fragmentgröße zu haben. Anschließend wurden je Probe 24 $\mu$ l des DNA-loading dye Gemischs in eine Geltasche pipettiert. Die Gelelektrophorese lief 45 Minuten bei 90V und 200mA (Biorad Power PAC 300, Biorad, USA). Die Auswertung der Banden erfolgte unter UV Licht (306nm) (Eagle Eye II, Stratagene, Deutschland).

### **1x TAE Puffer**

10ml 50x TAE Stammlösung auf 500 ml mit Aqua dest. aufgefüllt

### **50x TAE Stammlösung**

Tris base (Roth, Deutschland)	121g
Eisessig (Sigma, Deutschland)	28,55ml
EDTA, 0,5M, pH 8,0 (Sigma, Deutschland)	50ml
Aqua dest.	ad 500ml

### **3.3. Untersuchung von 10 Tage alten Mäusen**

Es wurden jeweils sechs F.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>* und B6.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>* und sechs männliche FVB/N und C57Bl/6J Wildtypen in den Versuch genommen. Nach grammgenauer Bestimmung des Körpergewichts (Waage KERN 440-43) wurden die Tiere mit einer intraperitonealen Injektion von einer Mischung aus Azepromazin und Ketamin in Narkose gelegt, wobei die Dosierung 2,5 mg Azepromazin und 160 mg Ketamin pro kg Körpergewicht betrug. Es wurde 1 %iges Vetranquil (Ceva, Deutschland) und Ketamin 10mg/ml (Ratiopharm, Deutschland) verwendet. Da zehn Tage alte Mäuse noch geschlossene Augenlider haben, wurden nach Erreichen eines operativen Stadiums der Narkose die Augen mittels Scherenschlag geöffnet, um eine Blutentnahme aus dem retrobulbären Plexus zu ermöglichen. Aus diesem wurden anschließend 10  $\mu$ l Blut für eine Blutglukoseuntersuchung entnommen und dann bis zum Stillstand des Blutkreislaufs das weitere Blut für die Analyse der Serumparameter Insulin, Glukagon, GLP-1 und GIP mit Hilfe von Kapillaren gewonnen. Die 10 $\mu$ l Kapillare für die Untersuchung von Blutglukose wurde in Cups gegeben und im Gerät Super GL R3.44d (Dr. Müller Gerätebau GmbH, Deutschland) gemessen. Das Blut für die Serumuntersuchung wurde 10 Minuten bei 10000 Umdrehungen zentrifugiert (Sigma 1K15, Sigma, Deutschland) und das gewonnene Serum mit 2 $\mu$ l DPPIV-Inhibitor (LINCO RESEARCH, USA) pro 100  $\mu$ l Serum versetzt. Anschließend wurde das Serum

bei -80 °C asserviert. Zur Entnahme des Pankreas wurde das Rectum durchtrennt und dann der Darm langsam und vorsichtig aus dem Abdomen gezogen, wodurch sich das Gekröse des Darms auffädelte. Milz, Duodenum und Pankreas wurden 10 Stunden in 4 %igem Paraformaldehyd (Merck KGaA, Deutschland) fixiert und anschließend voneinander getrennt. Das Pankreas wurde kurz abgetrocknet, milligrammgenau gewogen (Waage METTLER AE 200), abgemessen und dann in Agar (BD Bacto™ Agar, USA) eingebettet. Mithilfe des Lamellators (Abbildung 3.2) wurde das Pankreas in 1 Millimeter dünne Scheiben geschnitten.



Abbildung 3.2 Lamellator (entwickelt, gebaut und zur Verfügung gestellt von Dr. Andreas Blutke)

Die lamellierten Pankreascheiben wurden nach Wässerung in Gewebekapseln in Paraffin eingebettet. Die Pankreascheiben wurden anschließend parallel zueinander liegend ausgegossen, sodass nach Schneiden und Färben eine Übersicht durch das gesamte Pankreas in 1 – Millimeter – dünnen Abschnitten auf einem oder mehreren Objektträgern angefertigt wurde (siehe 3.5). Die morphometrische Auswertung der 10 Tage alten Versuchstiere erfolgte an drei Färbungen. Die Pankreasfläche wurde an HE-Schnitten bestimmt. Für die Messung der Insel- und Betazellfläche wurde eine Immunhistochemie durchgeführt, bei der in einer Doppelfärbung Insulin und die Cleaved-Caspase 3 angefärbt wurden. Letzteres ist ein Indikator für Apoptose. In einer weiteren Immunhistochemie wurden replizierende Zellen mittels PCNA Antikörper markiert. Damit konnten am Morphomaten Pankreasfläche, Inselfläche, Betazellfläche, die Fläche isolierter Betazellen und die Anzahl von Kernanschnittsprofilen replizierender und apoptotischer Zellen in Inseln bestimmt werden.

### 3.4. Klinische Verlaufsuntersuchungen

Das zweite Tierkollektiv, welches über 90 Tage untersucht wurde, bestand aus 8 GIPR<sup>dn</sup> transgenen männlichen Mäusen und 8 Wildtypen je Linie.

#### 3.4.1 Körpermengen

Das frei gefütterte Körpermengen wurde mit zehn, 21, 45, und 80 Tagen grammgenau (Waage KERN 440-43, Deutschland) bestimmt. Für die Bestimmung des Nüchternkörpermengen wurde die Mäuse im Alter von 90 Tagen 15 Stunden vor Wägung nüchtern gesetzt (Über Nacht von 19 Uhr bis 10 Uhr).

#### 3.4.2 Blutglukose frei gefüttert

Alle Proben wurden um zehn Uhr morgens entnommen, um eine hohe Vergleichbarkeit der Werte zu erreichen. Zum Zeitpunkt des Absetzens von der Mutter mit Tag 21 und am 45ten Lebenstag wurden 10 µl Blut aus der Schwanzspitze mit einer Kapillare entnommen und diese in Glukocapil Cups (Dr. Müller Gerätebau GmbH, Deutschland) gegeben. Die Blutglukose wurde mit dem Messgerät Super GL R3.44d analysiert (Dr. Müller Gerätebau GmbH, Deutschland). Vor der Blutentnahme wurde sowohl am Tag 21, als auch am Tag 45 das Körpermengen bestimmt (s.o.).

#### 3.4.3 Insulintoleranztest

Am 80. Lebenstag wurde ein Insulintoleranztest durchgeführt. Blutentnahme und -glukosebestimmung erfolgte analog zur oben beschriebenen Methode (3.4.2). Die Tiere wurden um zehn Uhr morgens nüchtern gesetzt. Es erfolgte sogleich die erste Blutprobenentnahme von 10 µl aus der Schwanzvene, um den Basalwert der Blutglukose zu bestimmen (t=0). Danach wurden 5 µl Insulin (Insuman Rapid, 40 I.E. / ml, Aventis, Deutschland) pro Gramm Körpermengen intraperitoneal gespritzt. Weitere Probenentnahmen für Glukosebestimmung erfolgten nach 10, 20, 30 und 60 Minuten nach Insulininjektion (T=10, 20, 30, 60).

#### 3.4.4 Untersuchung mittels Stoffwechselkäfigen

Um die Menge der Urinproduktion, der Futteraufnahme und der Wasseraufnahme innerhalb von 24 Stunden beurteilen zu können, wurden die Versuchstiere im Alter von 85 Tagen in

Stoffwechselkäfigen (Techniplast, Deutschland) untersucht. Diese Käfige haben ein Auffangrohr für den produzierten Urin, der in einem Styroporbehältnis, das mit Eis aufgefüllt ist, platziert wird. Ein großer Trichter leitet den Urin in das Auffangröhren. Über dem Trichter sitzt ein Gitter, welches Kot und Futterkrümel abtrennen soll. Darüber befindet sich ein Rost, auf dem die Maus während der 24 Stunden sitzt. Dabei ist sie von einer Plexiglaskuppel umschlossen, an der eine Wasserflasche und ein Futterbehältnis hängen. Sowohl die Maus, als auch Futter und Wasser wurden vor Beginn des Versuchs und nach Beendigung grammgenau gewogen, um anschließend das verbrauchte Futter und Wasser und das Körpergewicht bestimmen zu können. Der produzierte Urin wurde in Milliliter gemessen.

### 3.4.5 Oraler Glukosetoleranztest

Der orale Glukosetoleranztest wurde im Alter von 90 Tagen durchgeführt. Zur Vorbereitung auf den oralen Glukosetoleranztest wurden die Versuchstiere 15 Stunden vorher nüchtern gesetzt. Dann wurden 10µl Blut wie oben beschrieben entnommen (t=0, 3.4.2) und das Körpergewicht grammgenau gewogen. Mittels einer Magensonde wurde den Mäusen 11,1 µl 1 molare Glukoselösung pro Gramm Körpergewicht (Glukose: ALPHA-D-(+)-GLUCOSE, A.C.S. REAGENT, ALDRICH, Deutschland) verabreicht. . Zehn 20, 30, 60, 90 und 120 Minuten (t=10, 20, 30, 60, 90, 120) Minuten nach Glukosegabe wurden 10 µl Blut für die Bestimmung der Blutglukose entnommen.

### 3.5. Pankreaspräparation und Weiterverarbeitung

Nach Durchführung des oralen Glukosetoleranztests wurden die Tiere mit Acepromazin und Ketamin in Narkose gelegt und über den retrobulbären Plexus entblutet. Die Dosierung der Narkose betrug 2,5 mg Acepromazin und 160 mg Ketamin pro kg Körpergewicht (Vetranquil 1 %, Ceva, Deutschland, Ketamin 10mg/ml, Ratiopharm, Deutschland). Nach Entblutung erfolgte die Entnahme des Pankreas, wobei die Abtrennung des Pankreas von den benachbarten Organen schon bei Entnahme stattfand, da das Gewebe wesentlich stabiler ist als bei zehn Tage alten Mäusen. Das Pankreas wurde vor der 24 stündigen Fixierung in 4 %iger Paraformaldehydlösung milligrammgenau gewogen. Da die histologische Auswertung hauptsächlich anhand immunhistologisch gefärbter Schnitte erfolgte, war eine auf 24 Stunden begrenzte Fixierung wichtig. Anschließend wurde das Gewebe kurz abgetrocknet und millimetergenau abge-

messen. Zur Lamellierung wurde es in Agar (BD Bakto™ Agar, USA) eingebettet. Die Einbettung in Agar erfolgte in einer Schiene, welche den Agarblock auf die richtige Größe formt, um in den Lamellator zu passen. Der Lamellator ist eine Konstruktion, in der der Agarblock in einer Schiene Millimeter für Millimeter vorgeschoben wird und dabei in einem dafür vorgesehenen Spalt mit einer Mikrotomklinge in Scheiben geschnitten wird. Dadurch erreicht man absolut gleichmäßige, plane Pankreascheiben. Diese wurden in Gewebekapseln zunächst gewässert und dann in Paraffin eingebettet. Das Einbetten in Paraffin erfolgte mit dem Histomaster 2062-DI 2L (Bavimed, Deutschland). Wie bei den 10 Tage alten Tieren wurden auch hier die Pankreascheiben parallel zueinander liegend in Blöcke ausgegossen. Aus diesen Blöcken wurden am Mikrotom (MICROM HM 315) 0,5 µm dicke Schnitte angefertigt, die in ein 40 ° warmes Wasserbad überführt wurden und anschließend auf verschiedene Objekträger (Immunhistochemie: STAR FROST adhesive Objekträger, Deutschland, HE Färbung: Objekträger der Firma Engelbrecht Medizin und Labortechnik GmbH, Deutschland) aufgezogen wurden. Die Trocknung der Schnitte erfolgte mindestens 24 Stunden im Trockenschrank (Wagner & Münz Laboratoriumsbedarf, Deutschland) bei 35°C.

### 3.6. Färbung des Pankreasgewebe

Für die histologische und quantitativ stereologische Auswertung sind verschiedene Färbungen des Pankreasgewebes notwendig: Anhand einer HE-Färbung wurde die Fläche des Pankreasgewebe gemessen. Mittels immunhistochemischer Färbung von Insulin wurde die morphometrische Flächenmessung von Inseln und Betazellen ermöglicht. Diese Färbung wurde verknüpft mit einer Markierung der apoptotischen Zellen mittels Cleaved Caspase-3 Antikörper. Zusätzlich wurden die sich replizierenden Zellen mit einer Immunhistochemie nachgewiesen, bei der PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) markiert wurde.

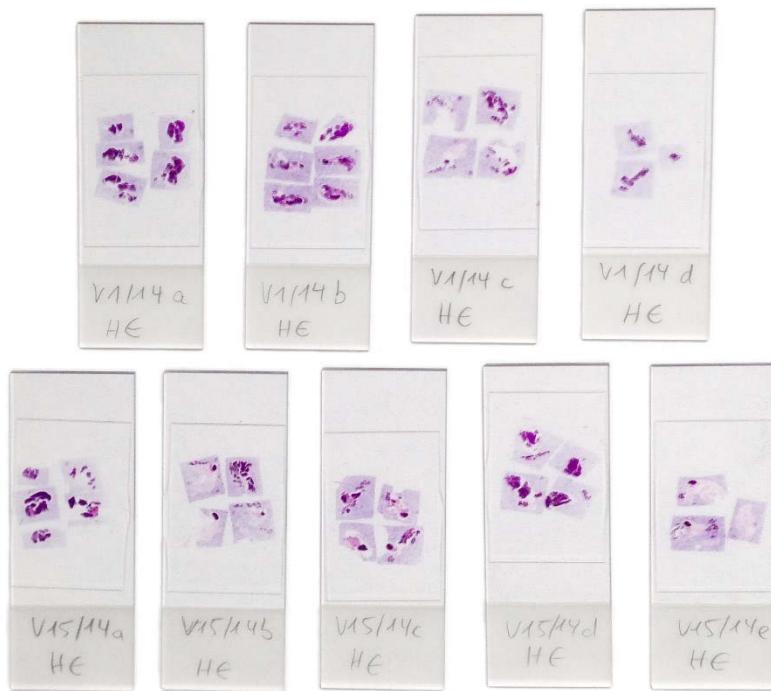


Abbildung 3.3 HE-gefärbte Schnitte des Pankreas

### 3.6.1 Hämalaun-Eosin-Färbung

**Xylo** zum Lösen des Paraffins

10 min

in Xylo tauchen

3 x 10 x 1 sek

#### **Dehyd ration mit absteigender Alkoholreihe**

100%iger Alkohol

10 x 1 sek

96%iger Alkohol

10 x 1 sek

96%iger Alkohol

10 x 1 sek

70%iger Alkohol

10 x 1 sek

70%iger Alkohol

10 x 1 sek

#### **Hämalaun**

5 min

**Wässern** in fließendem Leitungswasser

5 min

in 0,5 %igem HCL-Alkohol zum **Differenzieren** tauchen

3-5 x 1 sek

**Wässern** in fließendem warmen Leitungswasser

5 min

in **Eosin** tauchen

2 min

in **Aqua dest** spülen

#### **Rehydration mit aufsteigende Alkoholreihe**

70 %iger Alkohol	10 x 1 sek
96 %iger Alkohol	10 x 1 sek
96 %iger Alkohol	10 x 1 sek
100 %iger Alkohol	10 x 1 sek
100 %iger Alkohol	10 x 1 sek
in <b>Xylol</b> tauchen	3 x 10 x 1 sek
Eindecken mit <b>Histokitt</b> (Histokitt No. 1025/500, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Ko KG, Deutschland)	

### 3.6.2 Immunhistochemie Insulin und Cleaved Caspase-3

Mittels Antikörpern wurden Insulin und die Cleaved Caspase-3 angefärbt, um apoptotische Betazellen eindeutig identifizieren zu können. Die Vorbereitung des Gewebes für die Immunhistochemie entsprach den Vorbereitungen für die HE Färbung. Die Zeit im Xylol zum Entfernen des Paraffins betrug allerdings 20 Minuten. Nach dem Entparaffinieren wurden die Schnitte in weitere Xylolbehälter getaucht und dann mit einer absteigenden Alkoholreihe und Aqua dest. dehydriert. Anschließend erfolgte die Demaskierung der Proteine in den Gewebe schnitten mit 10mM Citratpuffer (pH 6,0) im Mikrowellendampfkochtopf (Microwave Tender Cooker®, Nordic Ware, USA) 30 Minuten bei 800 Watt. Der Citratpuffer wurde aus 27ml Stammlösung A (19,2g Citronensäure (Citronensäure Monohydrat, neo Lab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Deutschland) in 1000ml Aqua dest.), 123ml Stammlösung B (29,4g Natriumcitrat-Dihydrat (tri-Sodium citrate dihydrate, VWR Chemicals, Belgien) in 1000ml Aqua dest.) und 1,5ml Tween 20 (Merck Schuchardt OHG, Deutschland) hergestellt. Nach der Mikrowellenbehandlung wurden die Schnitte 20 Minuten im Kochtopf belassen, um abzukühlen. Anschließend wurde die endogene Peroxidase in 178,8 ml Aqua dest. mit 1,8 ml 30 %igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Perhydrol® Hydrogen peroxide 30 %, Merck KGaA, Deutschland) 15 Minuten blockiert und daraufhin wurden die Schnitte 10 Minuten in TBS gewaschen. Der TBS-Puffer mit einem pH-Wert von 7,6 wurde aus einer 1:10 Verdünnung der Stammlösung hergestellt. Die Stammlösung setzte sich zusammen aus 60,5 g TRIS (Tris Molecular biology grade, AppliChem Panrac, Deutschland), 90,0 g NaCl (neolab, Deutschland) gelöst in 1000 ml Aqua dest. Der pH Wert wurde mit 2N HCL (neolab, Deutschland) auf 7,4 eingestellt. Die Absättigung von elektrostatischen Ladungen der Proteine/unspezifischer Bindungsstellen erfolgte mit Normalserum der

Ziege (GOAT SERUM, MP Biomedicals, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:10 für 30 Minuten. Anschließend wurde das Serum abgegossen und dann sofort der Primärantikörper Guinea Pig anti Insulin (Polyclonal Guinea Pig Anti-Insulin, Dako, USA) in einer Verdünnung von 1:500 aufgetragen. Nach einer Stunde Inkubation wurden die Schnitte wieder in TBS 10 Minuten lang gewaschen und danach der Sekundärantikörper Goat anti Guinea Pig AP (Goat anti Guinea Pig IgG (H+L), Southern Biotech, USA) in einer Verdünnung von 1:100 aufgetragen und eine Stunde inkubiert. Überschüssiger, nicht gebundener Antikörper wurde durch Waschen in TBS entfernt und zur Sichtbarmachung der Antigene AP Substrat KIT I (Alkaline Phosphatase Substrate Kit I SK-5100, Vector Laboratories, USA) mit 100nM Tris-HCL aufgetragen. Die Inkubation fand unter Sichtkontrolle statt, dauerte maximal aber 5 Minuten.

#### **Ansatz der Alkalischen Phosphatase zum Färben von 10 Objektträgern**

2,5ml 100nM Tris-HCL pH 8,2-8,5

1 Tropfen Reagent 1

1 Tropfen Reagent 2

1 Tropfen Reagent 3

Nach 10 minütigem Waschen in TBS wurde endogenes Biotin zunächst mit Avidin (3 bis 4 Tropfen pro Objektträger) 15 Minuten blockiert. Anschließend wurden die Schnitte kurz durch TBS gezogen, abgeputzt und mit Biotin betropft, welches ebenfalls 15 Minuten inkubierte (Avidin/Biotin Blocking Kit SP-2001, Vector Laboratories, USA). Nach einem weiteren kurzen Abwaschen in TBS wurden unspezifische Proteinbindungsstellen mit 5 % Ziegenserum 30 Minuten blockiert. Der Primärantikörper wurde nach Abkippen des Normalserums in einer Verdünnung von 1:200 aufgebracht und inkubierte über Nacht bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer. Der Primärantikörper Rabbit anti Cleaved Caspase 3 (Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1E) Rabbit mAb, Cell Signaling Technology, USA) wurde bei -20 ° tiefgefroren und erst kurz vor Gebrauch aufgetaut und verdünnt. Nach Inkubation des Primärantikörpers wurden die Objektträger 10 Minuten lang in TBS gewaschen und dann der Sekundärantikörper Goat anti Rabbit biotinylated (Biotinylated Anti-Rabbit IgG (H+L) Affinity made in goat, Vector Laboratories, USA) in einer Verdünnung von 1:400 mit 5 % Ziegenserum aufgetragen. Die Inkubation dauerte eine Stunde. Anschließend wurden die Schnitte ein weiteres Mal 10 Minuten in TBS gewaschen. Als nächstes wurde ein ABC Komplex (VECTASTAIN ABC Kit, Vector Laboratories, USA) aufgetragen. Für 1ml Lösung wurden zu 1ml TBS 10µl Lösung A und 10µl Lösung B des

ABC Kits dazu gegeben. Die Inkubation dauerte 30 Minuten, anschließend wurde für 10 Minuten in TBS gewaschen. Die markierten Zellen wurden durch DAB (DAB BB pH 7,0 Fizzing Buffer Containing pH 7,0, Kem-En-Tech Diagnostics A/S, Dänemark) sichtbar gemacht, welches pro 1ml mit 1µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktiviert wurde. Die Inkubation erfolgte unter Sichtkontrolle bis zu 5 Minuten. Nach Wässern in fließendem Leitungswasser, Gegenfärbung mit Hämalaun und nochmaligem Wässern wurden die Schnitte über eine absteigende Alkoholreihe dehydriert und in Xylol überführt. Das Eindecken erfolgte mit Histokitt (Histokitt No. 1025/500, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Ko KG, Deutschland).

### 3.6.3 Immunhistochemie Proliferating Cell Nuclear Antigen

Mit einem Antikörper gegen das Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) wurden replizierende Zellen markiert. Die Vorbehandlung erfolgte analog zur Insulinimmunhistochemie. Nach Waschen der Objektträger für 10 Minuten in TBS (siehe 3.6.2) wurde Kaninchenserum (RABBIT SERUM, CELLect® MP Biomedicals, Deutschland) in einer Verdünnung von 5 % aufgetragen und 30 Minuten auf den Schnitten belassen, um unspezifische Proteinbindungen zu blockieren. Anschließend wurde das Serum abgegossen und ohne vorheriges Waschen sofort der Antikörper aufgetragen. Der Primärantikörper mouse anti PCNA (ms mAb to PCNA [PC 10], abcam, England) wurde in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt. Dieser Antikörper reagiert sehr empfindlich auf den Auftauvorgang und verliert einen Teil seiner Wirksamkeit. Daher muss pro Auftauvorgang die Konzentration des Antikörpers erhöht werden. Mit einem neuen Antikörper starteten wir in einer Verdünnung von 1:6400. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Objektträger 10 Minuten in TBS gewaschen und der Sekundärantikörper Rabbit anti Mouse IgPO (Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunglobulins/HRP, Dako, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:100 eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen in TBS für 10 Minuten erfolgte die Färbung mit DAB (DAB BB pH 7,0 Fizzing Buffer Containing, pH 7,0, Kem-En-Tec Diagnostics A/S, Dänemark) unter Sichtkontrolle, maximal aber für 5 Minuten. Gegenfärbung und Eindecken erfolgte wie unter 3.6.2 beschrieben.

### 3.7. Quantitativ stereologische Analyse des Pankreas

Die quantitativ stereologischen Untersuchungen wurden unter Verwendung etablierter, verzerrungsfreier modell-unabhängiger stereologischer Methoden durchgeführt (HERBACH et al., 2005; HERBACH et al., 2011).

Die Zielparameter, die mithilfe der quantitativ stereologischen Methoden bestimmt werden sollten, waren die Volumenanteile und das Gesamtvolumen der Inseln, der Betazellen und der isolierten Betazellen. Darüber hinaus erfolgte die Ermittlung der Anzahl der apoptotischen bzw. replizierenden Kernanschnittprofile in den Inseln.

Das Pankreasvolumen errechnet sich aus dem Quotienten von Pankreasgewicht und dem spezifischen Gewicht von Mauspankreas (1,08). Zur Errechnung des korrigierten Pankreasgewichts wurde zunächst an HE gefärbten Schnitten die Summe der Anschnittflächen des Pankreas- und Nichtpankreasgewebes (Lymphknoten, Darm etc.) ermittelt, der prozentuale Anteil von Nichtpankreas errechnet und vom gewogenen Organgewicht abgezogen. Die Messung erfolgte mit dem Stereologiesystem Videoplan® image analysis system (Zeiss-Kontron, Germany), das über eine Farbvideokamera (CCTV WVCD132E; Matsushita, Japan) an ein Lichtmikroskop gekoppelt war (Orthoplan; Leitz, Germany). Die Bilder wurden auf einen Farbmonitor übertragen und Pankreas- sowie Nichtpankreasgewebe konnte planimetrisch durch Umfahren der Konturen gemessen werden.

Mit folgender Formel wurde das Pankreasvolumen errechnet:

$$V_{\text{Pankreas}} = \text{korrigiertes Pankreasgewicht/spezifisches Gewicht des Mäusepankreas (1,08 mg/mm}^3)$$

Die Bestimmung der Insel-, Betazell- und isolierten-Betazellflächen erfolgte an immunhistochemisch gegen Insulin gefärbten Schnitten. Für die Messung wurde ein Bildanalysesystem verwendet, bestehend aus einem Mikroskop (BX41, Olympus, Deutschland) mit einer Farbvideokamera (DP72, Olympus, Deutschland) und der Stereologiesoftware NewCast (Visiopharm, Dänemark). Bei den Schnitten der 10 Tage alten Tiere und den 90 Tage alten transgenen Mäusen wurde dabei jede Insel umfahren und so die gesamte Inselfläche pro Pankreasfläche gemessen. Die Navigation durch das Gewebe erfolgte mäanderförmig, wobei immer rechts unten am Präparat gestartet wurde. Bei der Auswertung der Schnitte der 90 Tage alten

Wildtypen wurde aufgrund der hohen Zahl der Anschnittprofile von Inseln im Gewebe nur jede zweite Bahn ausgewertet. Dafür wurde ein virtueller Rahmen über den gezeigten Gewebeausschnitt gelegt (Abbildung 3.4). Alle Inseln, die innerhalb des Rahmens lagen oder die rechte, grüne Rahmenlinie trafen, wurden umfahren und somit ihre Fläche gemessen. Alle Inseln, die die linke rote Linie trafen wurden nicht mitgemessen. Nach Ende der Auswertung wurde die gesamte Inselfläche des Schnittes mit zwei multipliziert. Folgende Formel wurde für das Bestimmen des Inselvolumens benutzt (A steht in der Formel für Fläche):

$$V_{(\text{Inseln, Pankreas})} = \sum A_{\text{Inseln}} / \sum A_{\text{Pankreas}} \times V_{\text{Pankreas}}$$

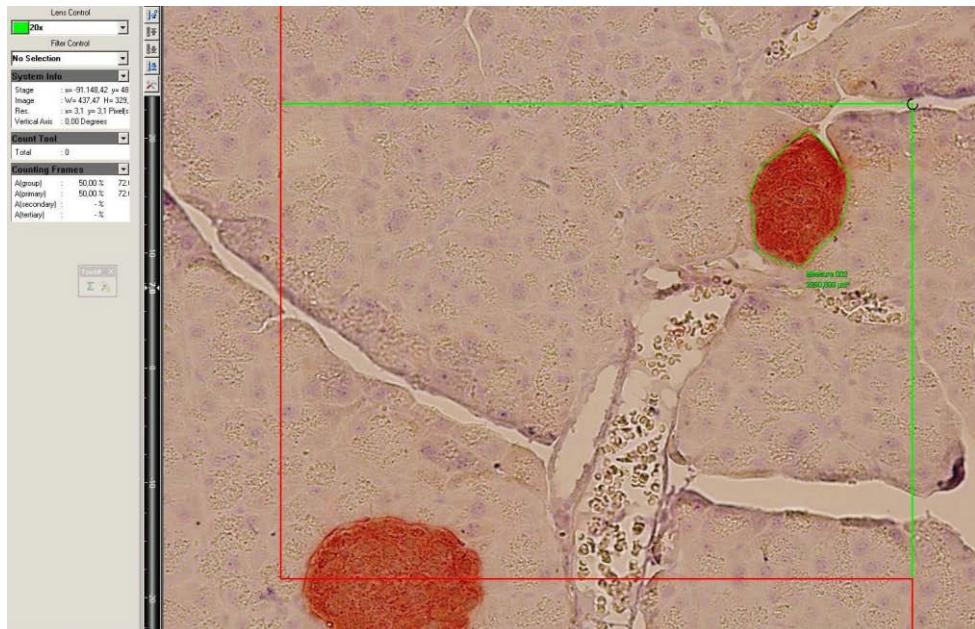


Abbildung 3.4 Messung der Inselfläche mit Hilfe eines virtuellen Rahmens

Analog wurde die Gesamtbetazellfläche gemessen und mit folgender Formel konnte das Gesamtbetazellvolumen bestimmt werden (A steht für Fläche):

$$V_{(\text{Betazellen, Inseln})} = \sum A_{\text{Betazellen}} / \sum A_{\text{Inseln}} \times V_{(\text{Inseln, Pankreas})}$$

Betazellansammlungen mit drei oder weniger Zellkernen wurden als isolierte Betazellen zugeordnet. Für die Errechnung des Gesamtvolumens der isolierten Betazellen im Pankreas wurde folgende Formel benutzt (A steht für Fläche):

$$V_{i(\text{isolierte Betazellen, Pankreas})} = \sum A_{\text{isolierten Betazellen}} / \sum A_{\text{Pankreas}} \times V_{\text{Pankreas}}$$

Für die Errechnung der Anzahl apoptotischer Kernanschnittprofile in Inseln wurde jede Insel in jedem mittels Insulin/Cleaved Caspase-3 gefärbten Schnitt sorgfältig angeschaut. Um keine Insel auszulassen, wurde in üblicher Weise durch das Gewebe navigiert. Jede apoptotische Inselzelle (Kernanschnittprofile immunhistochemisch cleaved Caspase-3 positive Inselzellen) wurde gezählt. Folgende Formel wurde für die Berechnung der Flächendichte benutzt:

$$D_{(\text{Kernanschnittsprofile apoptotischer Zellen, Inseln})} = N_{(\text{Kernanschnittsprofile apoptotischer Zellen})} / \mu\text{m}^2$$

Um die Anzahl der Kernanschnittsprofile von sich replizierender Zellen zu bestimmen, wurde die PCNA Immunhistochemie benutzt, um die entsprechenden Zellkerne zu markieren. Dann wurden in jedem Inselprofil sämtliche PCNA positiven Zellkernanschnitte gezählt und damit die Flächendichte bestimmt:

$$D_{(\text{Kernanschnittsprofile replizierender Zellen, Inseln})} = N_{(\text{Kernanschnittsprofile replizierender Zellen})} / \mu\text{m}^2$$

Außerdem wurde die Volumendichte von Inseln im Pankreas ( $V_{V(\text{Inseln, Pankreas})}$ ), die Volumendichte von Betazellen in den Inseln ( $V_{V(\text{Betazellen, Inseln})}$ ) und die Volumendichte von isolierten Betazellen im Pankreas ( $V_{V(\text{isolierte Betazellen, Pankreas})}$ ) errechnet. Dafür wurden die entsprechenden Gesamtvolumina jeweils durch  $V_{\text{Pankreas}}$  geteilt.

### 3.8. Datenpräsentation und statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS (IBM SPSS<sup>®</sup> Statistics, USA).

Die Normalverteilung aller Daten wurde mittels Shapiro-Wilks Test mit SPSS beurteilt. War diese vorhanden, wurde mit dem Levené-Test auf Varianzengleichheit geprüft. Bei gegebener Normalverteilung und Varianzengleichheit erfolgte die Analyse der Daten mit einer einfaktorieller ANOVA. Zum anschließenden Vergleich der Gruppen wurde der LSD Post HOC Test durchgeführt. Signifikant waren Werte, bei denen  $p < 0,05$  war. Bei Daten, die normalverteilt waren, aber keine Varianzengleichheit aufwiesen, wurde der Welch Test mit Dunnett's T3 Post Hoc Test durchgeführt. Waren Daten nicht normalverteilt, wurden sie anhand des Kruskal-Wallis-Tests beurteilt mit nachgeschaltetem Dunn's multiple comparisons Test. Dies galt für alle Daten, die unabhängige Stichproben waren.

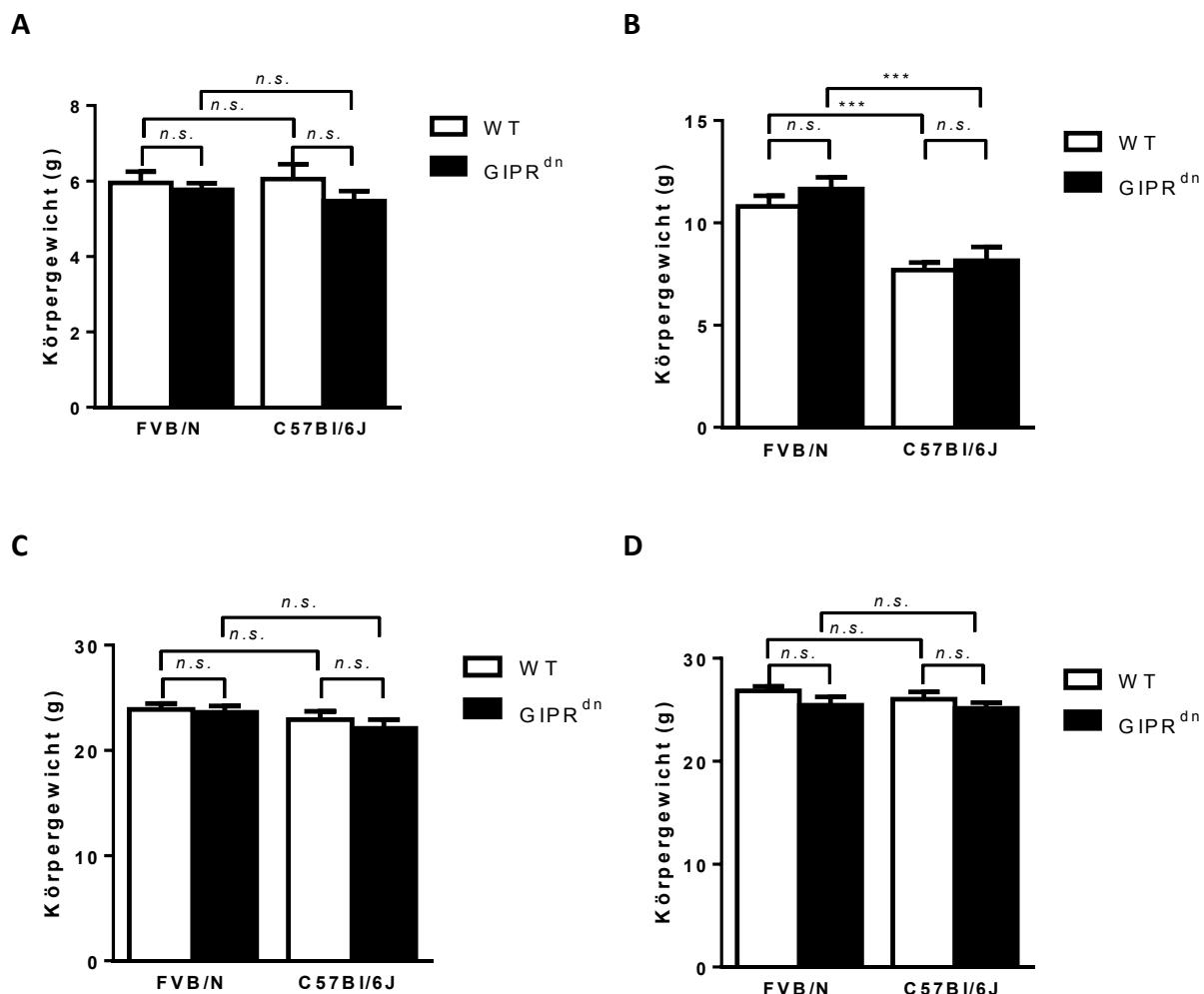
Um den Vergleich zwischen 10 Tage alten und 90 Tage alten Mäusen durchzuführen, wurde der Mann-Whitney-U-Test gewählt. Hier wurden nur gleiche Genotypen untereinander verglichen.

Die Grafiken wurden alle mit GraphRad Prism 5.0 (GraphRad Software, USA) erstellt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Körpergewichte

Wie aus Abbildung 4.1 ersichtlich, wiesen die vier untersuchten Gruppen am 10., 45. Und 80. Lebenstag keine signifikanten Unterschiede im Körpergewicht auf. Dagegen zeigten FVB/N Wildtypen und F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> mit 21 Tagen deutlich höhere Körpergewichte als B6 Wildtypen und B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup>.



**Abbildung 4.1: Körpergewichte (frei gefüttert) von F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> und B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> (*GIPR*<sup>dn</sup>) im Vergleich zu FVB/N und C57BL/6J Wildtyp-Wurfgeschwistern (WT)**

**A: 10 Tage B: 21 Tage C: 45 Tage und D: 80 Tage;** Daten zeigen Mittelwerte mit SEM; Statistik: One Way ANOVA Post-HOC LSD Test; Signifikanzen: n.s.:  $p > 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$

Abbildung 4.2 stellt den zeitlichen Verlauf des Körpergewichts zwischen Tag 10 und Tag 80 dar, bei dem sich besonders zwischen Tag 21 und Tag 45 ein steiler Anstieg des Körpergewichts aller vier Gruppen verzeichnen lässt.

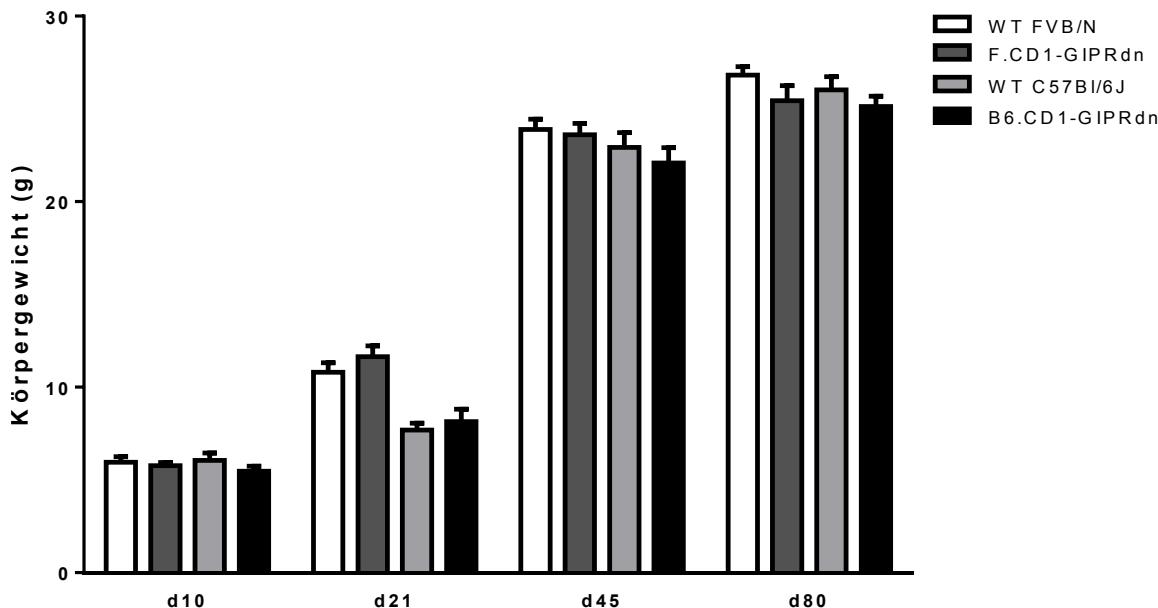


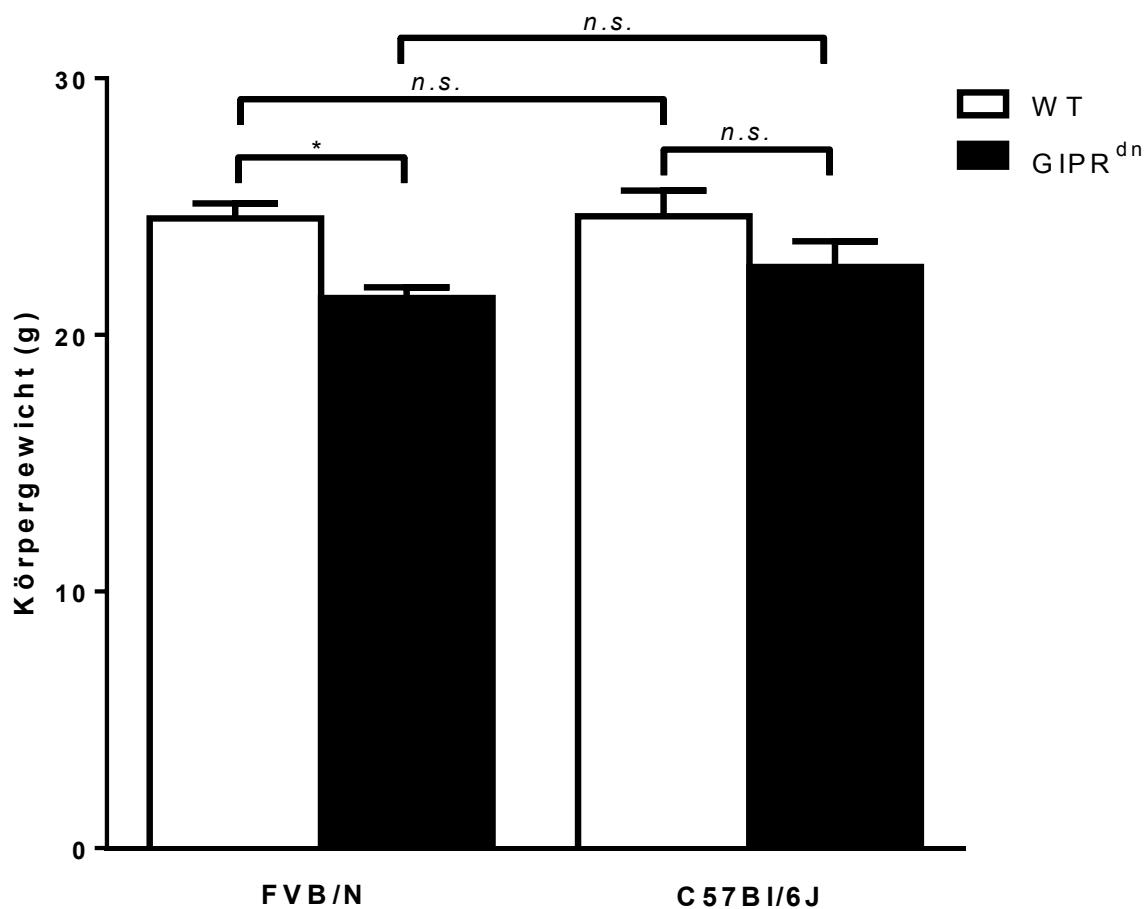
Abbildung 4.2 Körpergewichte (frei gefüttert) von F.CD1-GIPR<sup>dn</sup> und B6.CD1-GIPR<sup>dn</sup> (GIPR<sup>dn</sup>) Vergleich zu FVB/N und C57BL/6J Wildtyp-Wurfgeschwistern (WT) zwischen Tag 10 und 80

Daten zeigen Mittelwerte mit SEM, der Statistische Vergleich benachbarter Untersuchungszeitpunkt ist in Tabelle 4.1 dargestellt.

	Tag 21 zu Tag 10	Tag 45 zu Tag 21	Tag 80 zu Tag 45
WT FVB/N	**	**	**
F.CD1-GIPR <sup>dn</sup>	**	**	n.s.
WT C57BL/6J	*	**	*
B6.CD1-GIPR <sup>dn</sup>	*	**	n.s.

Tabelle 4.1 Körpergewichte: Vergleich benachbarter Untersuchungszeitpunkte: Mann-Whitney-U Test; Signifikanzen: n.s.: p > 0,05, \*p ≤ 0,05, \*\*p ≤ 0,01

Mit 90 Tagen wiesen F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> gegenüber Wildtypen der Linie signifikant niedrigere Nüchternkörpergewichte ( $p < 0,05$ ) auf. B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> zeigten keine signifikanten Unterschiede gegenüber nicht-transgenen Wurfgeschwistern (Abbildung 4.3).



**Abbildung 4.3: Körpermittelwerte (nüchtern) von F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> und B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> (*GIPR*<sup>dn</sup>) im Vergleich zu FVB/N und C57BL/6J Wildtyp-Wurfgeschwistern (WT) am 90. Lebenstag. Daten zeigen Mittelwerte mit SEM; Statistik: One Way ANOVA Post-HOC LSD Test; Signifikanzen: n.s.:  $p > 0,05$ , \*  $p \leq 0,05$**

## 4.2. Blutglukose

Abbildung 4.4 zeigt die Blutglukosewerte, die bei den vier untersuchten Tiergruppen mit 10, 21, 45 und 80 Tagen gemessen wurden. Mit 10 Tagen waren keine Unterschiede in der Blutglukose zwischen den untersuchten Gruppen feststellbar. Ab dem 21ten Lebenstag wiesen transgene FVB/N Mäuse signifikant höhere Blutglukosespiegel auf als FVB/N Wildtypen und die Glukosehomöostase verschlechterte sich massiv mit zunehmendem Alter. Ab dem 45ten Lebenstag zeigten auch B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> signifikant erhöhte Blutglukosespiegel gegenüber B6 Wildtypen, die Werte blieben jedoch im weiteren Verlauf stabil. Ab dem 21ten Lebenstag wiesen F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> signifikant höhere Blutglukosespiegel gegenüber B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> auf. Die Blutglukosespiegel der Wildtypen unterschieden sich zu keinem der untersuchten Zeitpunkte.

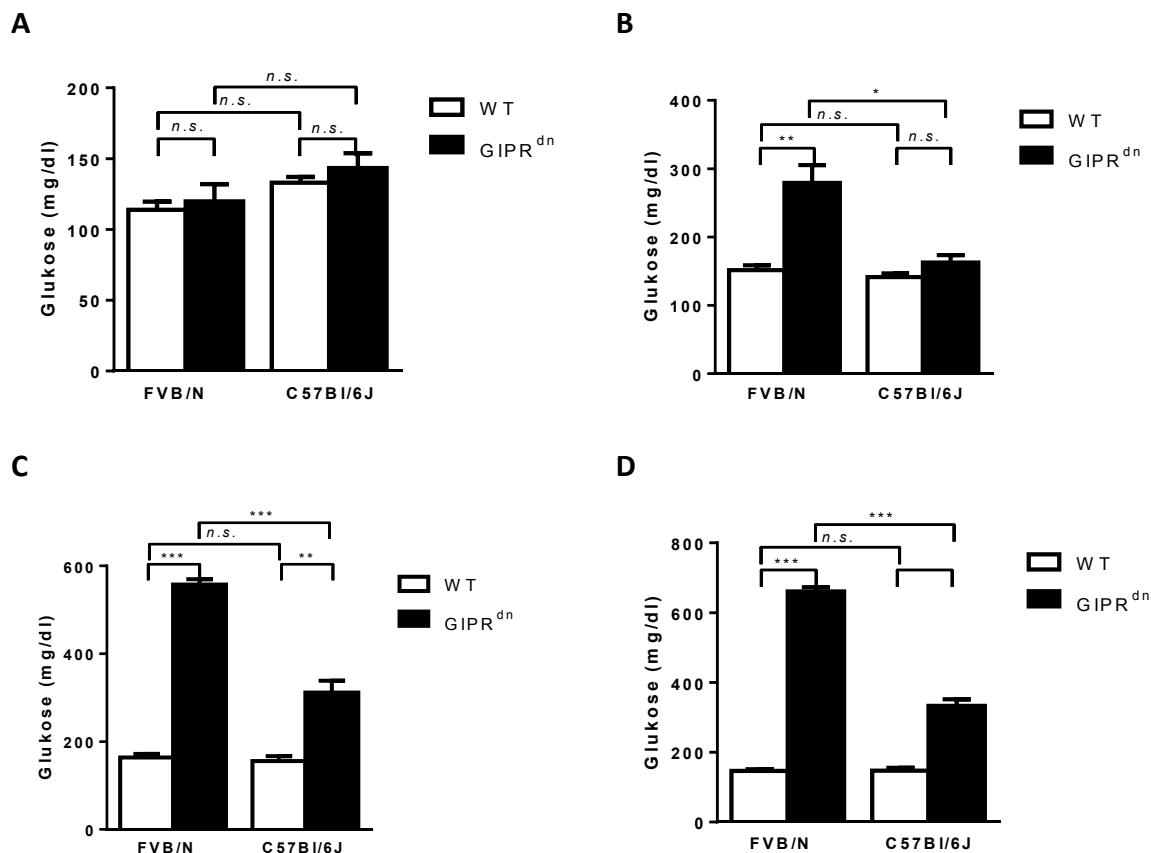


Abbildung 4.4 **Blutglukosespiegel (frei gefüttert) von F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> und B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> (*GIPR*<sup>dn</sup>) im Vergleich zu FVB/N und C57BL/6J Wildtyp-Wurfgeschwistern (WT) **A:** 10 Tage; One Way ANOVA Post-HOC LSD Test, **B:** 21 Tage; Welch, Post-HOC Dunnett T3 Test, **C:** 45 Tage; Welch, Post-HOC Dunnett T3 Test, **D:** 80 Tage; Kruskall-Wallis Test; Daten zeigen Mittelwerte mit SEM; Signifikanzen: n.s.: p > 0,05, \*p ≤ 0,05, \*\*p ≤ 0,01, \*\*\*p ≤ 0,001**

Im zeitlichen Verlauf der Messungen, dargestellt in Abbildung 4.5, zeigten die Wildtypen beider Linien nahezu konstante Blutglukosespiegel. Die transgenen C57Bl/6J Mäuse wiesen zwischen Tag 10 und Tag 21 auch nur eine leichtere Zunahme der Glukosespiegel auf, zwischen Tag 21 und Tag 45 verdoppelten sich die durchschnittlichen Blutglukosewerte bei B6.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>*. Bei den transgenen FVB/N Tieren kam es bereits zwischen Tag 10 und Tag 21 und zwischen Tag 21 und 45 zu einer annähernden Verdopplung der Blutglukosespiegel.

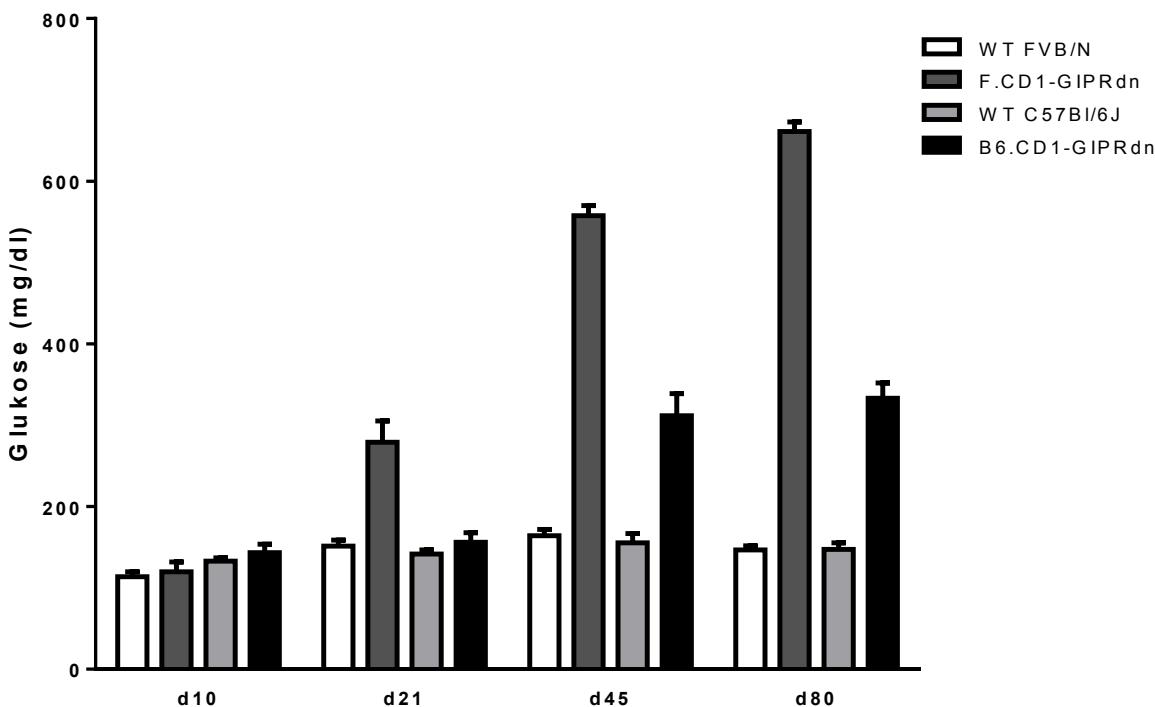


Abbildung 4.5 Blutglukosespiegel (frei gefüttert) von F.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>* und B6.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>* (*GIPR<sup>dn</sup>*) im Vergleich zu FVB/N und C57Bl/6J Wildtyp-Wurfgeschwistern (WT) zwischen Tag 10 und Tag 80; Daten zeigen Mittelwerte mit SEM;

Der Statistische Vergleich benachbarter Untersuchungszeitpunkte ist in Tabelle 4.2 dargestellt.

	Tag 21 zu Tag 10	Tag 45 zu Tag 21	Tag 80 zu Tag 45
WT FVB/N	*	n.s.	n.s.
F.CD1- <i>GIPR<sup>dn</sup></i>	**	***	**
WT C57Bl/6J	n.s.	n.s.	n.s.
B6.CD1- <i>GIPR<sup>dn</sup></i>	n.s.	**	n.s.

Tabelle 4.2 Blutglukosespiegel: Vergleich benachbarter Untersuchungszeitpunkte. Mann-Whitney-U Test; Signifikanzen: n.s.: p > 0,05, \*p ≤ 0,05, \*\*p ≤ 0,01, \*\*\*p ≤ 0,001

#### 4.3. Insulintoleranztest

Im Alter von 80 Tagen wurden Insulintoleranztests durchgeführt. Zehn Minuten nach der Insulingabe sanken die Glukosewerte aller vier untersuchten Gruppen bereits ab, wie man in Abbildung 4.6 erkennen kann. *GIPR<sup>dn</sup>* transgene FVB/N Mäuse zeigten zu allen untersuchten Zeitpunkten signifikant höhere Blutglukosewerte als die nicht-transgenen Wurfgeschwister ( $p<0,001$ ). B6.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>* wiesen ebenfalls signifikant höhere Blutglukosewerte als die Kontrolltiere auf, der Unterschied wurde mit zunehmender Zeitdauer des Versuchs aber geringer. *GIPR<sup>dn</sup>* transgene FVB/N Mäuse zeigten zu jedem Zeitpunkt signifikant höhere Blutglukosewerte als B6.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>*. Die Blutglukosespiegel der Wildtypen beider Linien unterschieden sich nur 10 Minuten nach der Insulininjektion signifikant voneinander, danach nicht mehr.

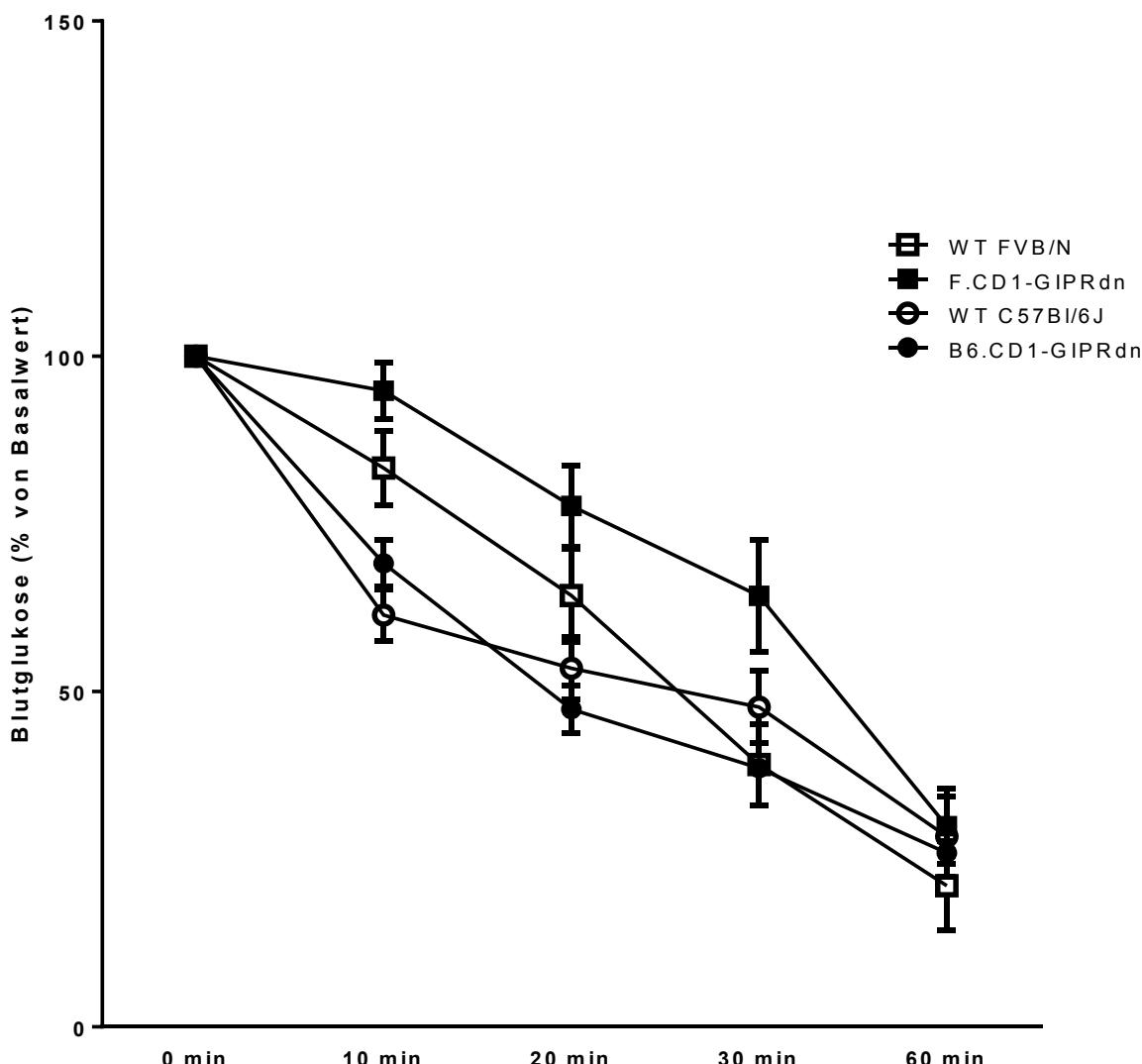


Abbildung 4.6 Insulintoleranztest von F.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>* und B6.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>* im Vergleich zu

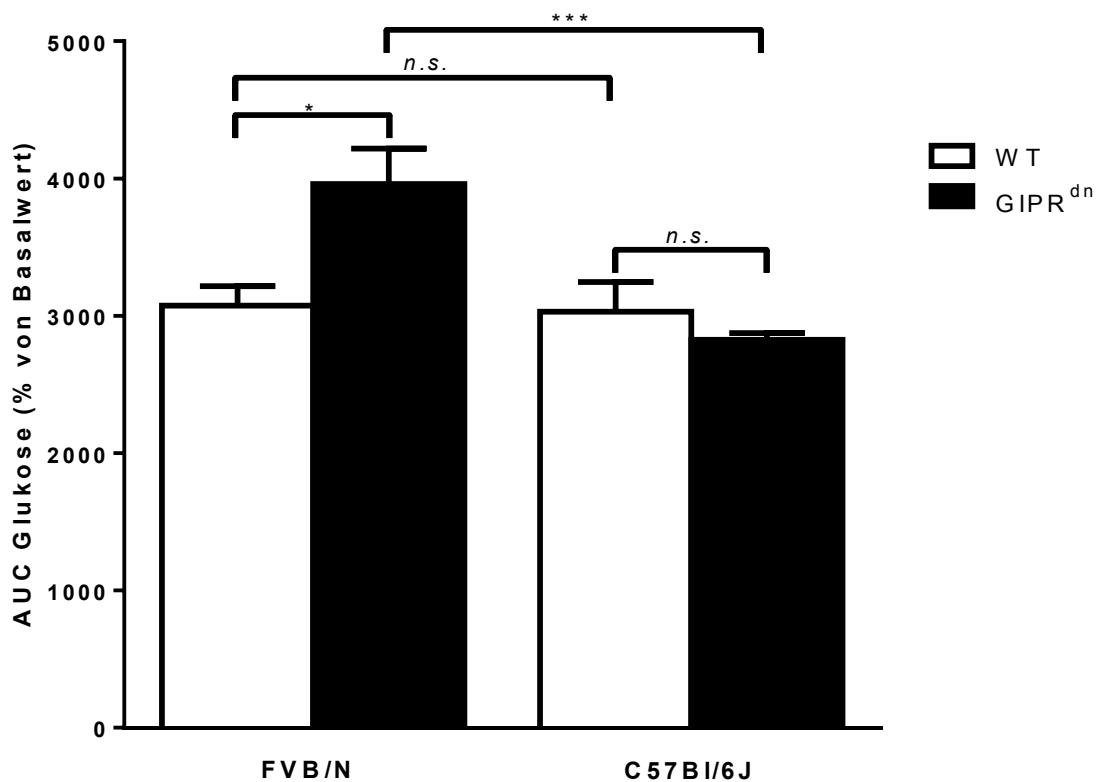
**FVB/N und C57Bl/6J Wildtyp-Wurfgeschwistern (WT):** Daten zeigen Mittelwerte mit SEM;  
Signifikanzen sind in Tabelle 4.3 gezeigt

	0 min	10 min	20 min	30 min	60 min
F.CD1- <i>GIPR</i> <sup>dn</sup> zu WT FVB/N	<i>n.s.</i>	**	**	**	<i>n.s.</i>
B6.CD1- <i>GIPR</i> <sup>dn</sup> zu WT C57Bl/6J	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	*	<i>n.s.</i>
F.CD1- <i>GIPR</i> <sup>dn</sup> zu B6.CD1- <i>GIPR</i> <sup>dn</sup>	<i>n.s.</i>	***	***	***	<i>n.s.</i>
WT FVB/N zu WT C57Bl/6J	<i>n.s.</i>	**	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>

Tabelle 4.3 Insulintolerantest: Kruskal-Wallis Test für 0 min, Post-HOC Dunn's multiple comparison test, 10 min, 20 min, 30 min; Welch Test, Post-HOC Dunnett T3 Test für 60 min; Signifikanzen: *n.s.*:  $p > 0,05$ , \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$

#### 4.4. Area under curve Glukose Insulintoleranztest

Im Insulintoleranztest wiesen die F.CD1- *GIPR<sup>dn</sup>* signifikant höhere Fläche unter der Glukosekurve (AUC Glukose) auf als nicht-transgene Wurfgeschwister und als B6.CD1- *GIPR<sup>dn</sup>* Mäuse (Abbildung 4.7). Die AUC Glukose der B6.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>* unterschied sich nicht signifikant von B6 Wildtypen und auch die Wildtypen beider Linien zeigten keine signifikanten Unterschiede.



**Abbildung 4.7 Area under glucose curve Insulintoleranztest von F.CD1- *GIPR<sup>dn</sup>* und B6.CD1- *GIPR<sup>dn</sup>* (*GIPR<sup>dn</sup>*) im Vergleich zu FVB/N und C57BL/6J Wildtyp-Wurfgeschwistern (WT):** Daten zeigen Mittelwerte mit SEM; n.s.: p > 0,05, \*p ≤ 0,05, \*\*\*p ≤ 0,001

#### 4.5. Oraler Glukosetoleranztest

Im oralen Glukosetoleranztest, der im Alter von 90 Tagen durchgeführt wurde, zeigten die transgenen Tiere beider Linien signifikant erhöhte Nüchternenglukosespiegel. *F.CD1-GIPR<sup>dn</sup>* wiesen zudem signifikant höhere Nüchternenglukosespiegel auf als transgene Mäuse auf B6 Hintergrund. Die Nüchternblutglukose der beiden Wildtyp-Linien unterschied sich nicht. Beide transgenen Linien wiesen einen steilen Anstieg der Blutglukose nach Glukosegabe auf, während die Wildtypen einen geringeren Anstieg zeigten. Nach 20-30 Minuten nach der Glukosezufuhr fiel der Blutzuckerspiegel aller Mäuse wieder ab. Beide transgenen Linien zeigten zu den meisten Zeitpunkten signifikant höhere Werte verglichen mit den entsprechenden Wildtyp-Wurfgeschwistern. Transgene Mäuse der beiden Linien unterschieden sich kaum untereinander im Kurvenverlauf, genauso wenig wie Wildtypen (Abbildung 4.8).

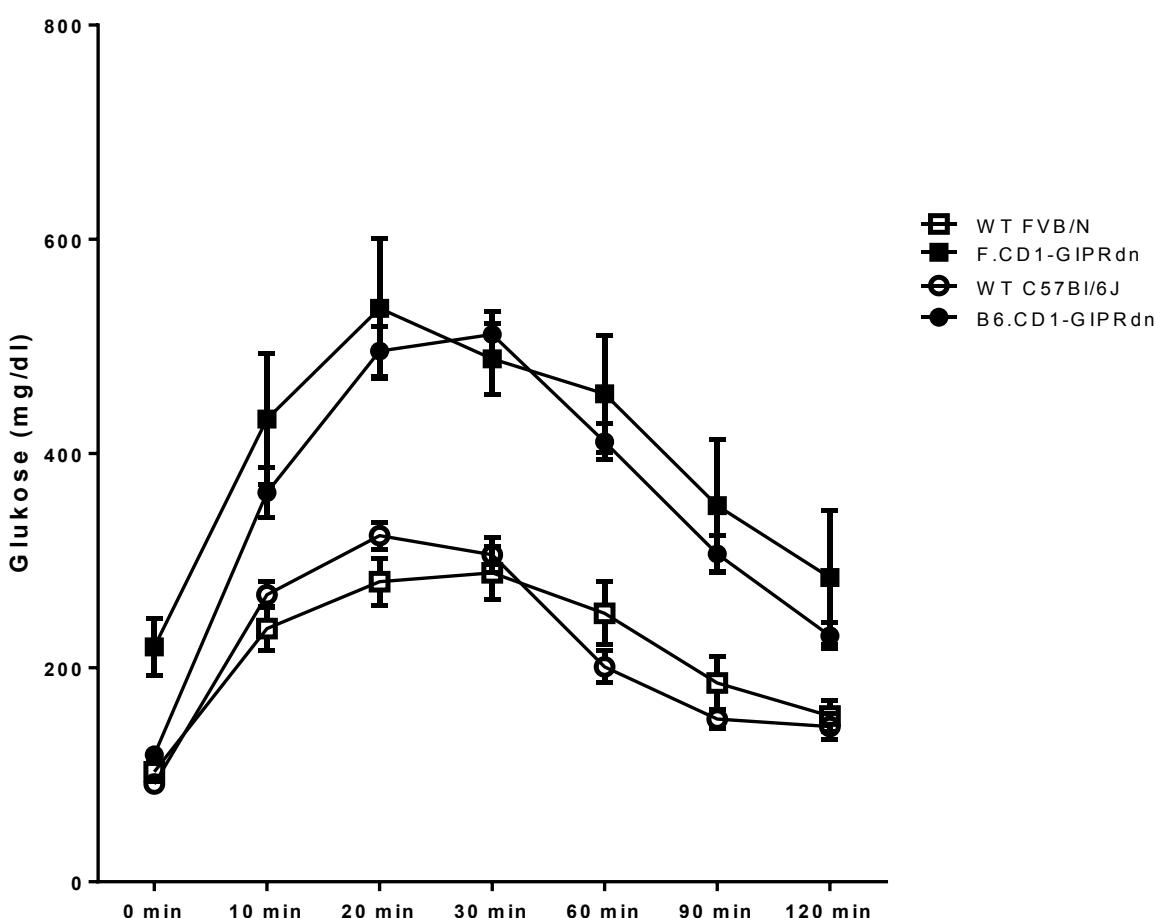


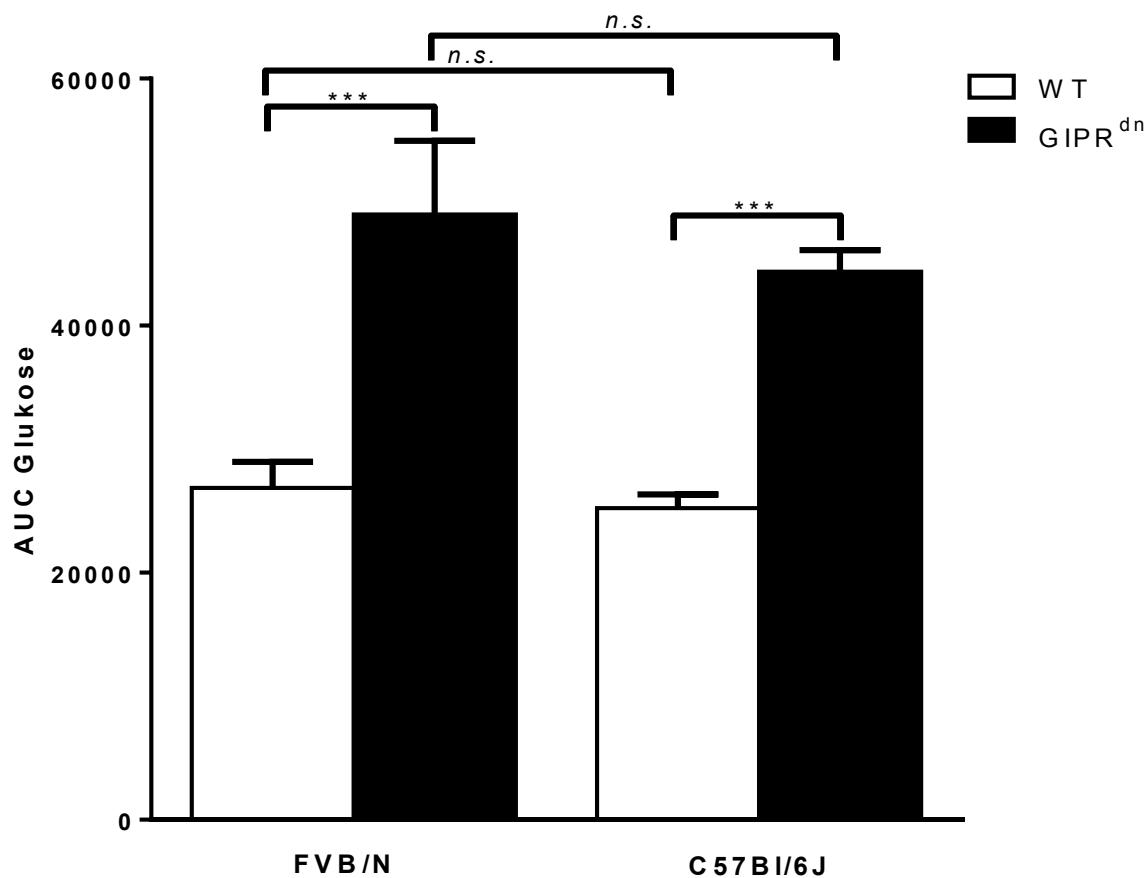
Abbildung 4.8 oraler Glukosetoleranztest von *F.CD1-GIPR<sup>dn</sup>* und *B6.CD1-GIPR<sup>dn</sup>* im Vergleich zu FVB/N und C57BL/6J Wildtyp-Wurfgeschwistern (WT): Daten zeigen Mittelwerte mit SEM; Signifikanzen sind in Tabelle 4.4 gezeigt

	0 min	10 min	20 min	30 min	60 min	90 min	120 min
F.CD1- <i>GIPR<sup>dn</sup></i> zu WT FVB/N	*	n.s.	*	***	*	n.s.	n.s.
B6.CD1- <i>GIPR<sup>dn</sup></i> zu WT C57Bl/6J	**	*	***	***	***	***	**
F.CD1- <i>GIPR<sup>dn</sup></i> zu B6.CD1- <i>GIPR<sup>dn</sup></i>	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
FVB/N WT zu C57Bl/6J WT	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 4.4 oraler Glukosetoleranztest: Kruskall-Wallis Test für 0 min, Post-Hoc Dunn's multiple comparison test; 120 min; Welch Test für 10 min, 20 min, 60 min, 90 min, Post-HOC Dunnnett T3 Test; One Way ANOVA für 30 min, Post-HOC LSD Test; Signifikanzen: n.s.: p > 0,05, \*p ≤ 0,05, \*\*p ≤ 0,01, \*\*\*p ≤ 0,001

#### 4.6. Area under curve Glukose oraler Glukosetoleranztest

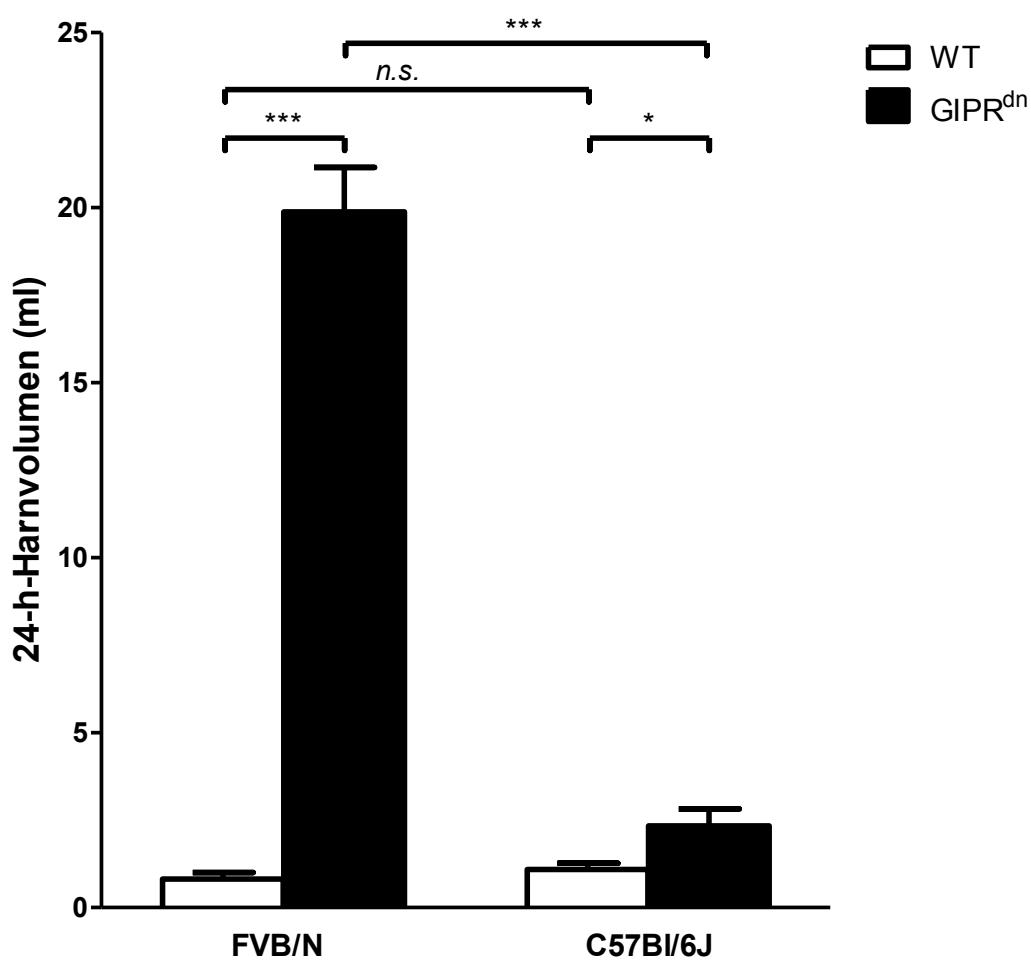
Die Fläche unter der Glukosekurve (AUC Glukose) des Glukosetoleranztests der GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäuse war signifikant höher als bei den entsprechenden nicht-transgenen Wurfgeschwistern (Abbildung 4.9). Zwischen den Linien gab es keine signifikanten Unterschiede.



**Abbildung 4.9 Area under glucose curve (AUC Glukose) im oralen Glukosetoleranztest von F.CD1-GIPR<sup>dn</sup> und B6.CD1-GIPR<sup>dn</sup> im Vergleich zu FVB/N und C57Bl/6J Wildtyp-Wurfgeschwistern (WT):** Daten zeigen Mittelwerte mit SEM; n.s.: p > 0,05, \*\*\*p ≤ 0,001

#### 4.7. Harnvolumen in 24 Stunden

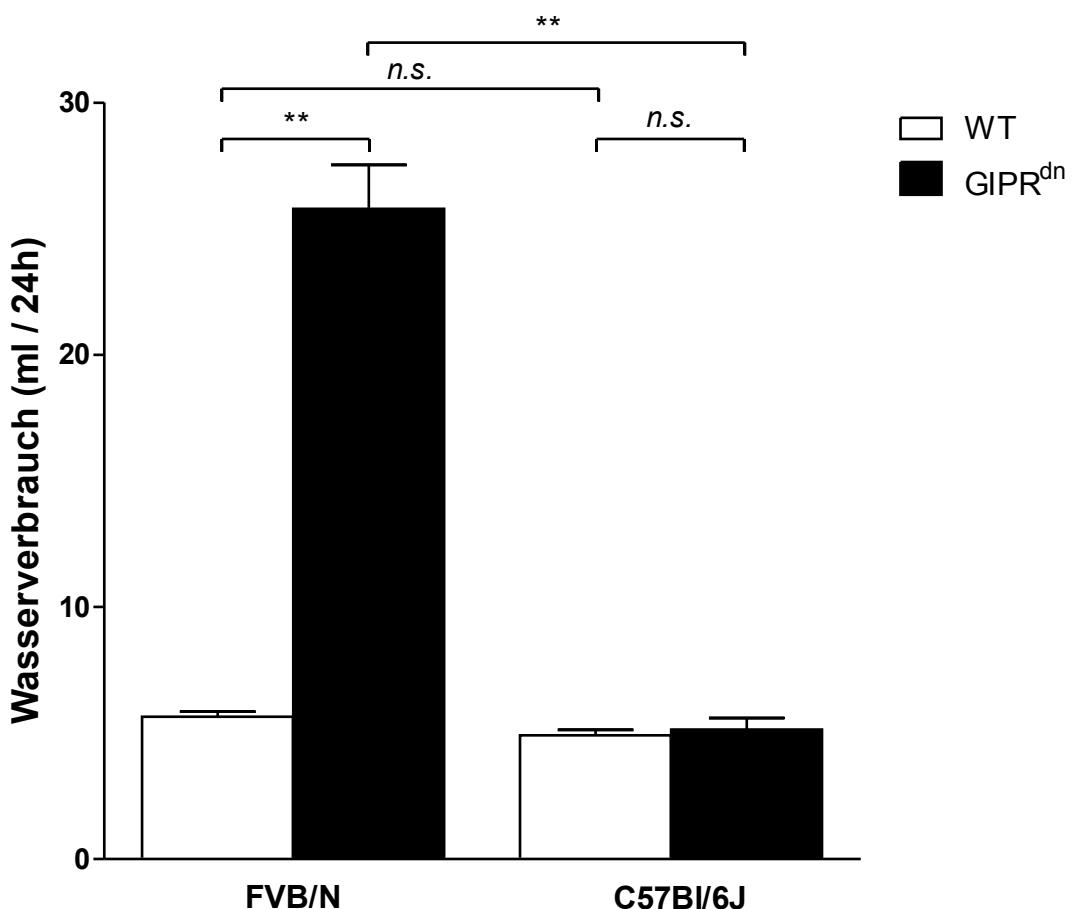
Die Messung des 24 Stunden Harnvolumens erfolgte im Alter von circa 85 Tagen. Wie in Abbildung 4.10 gezeigt, wiesen die F.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>* gegenüber den FVB/N Wildtypen, aber auch gegenüber B6.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>* sehr stark erhöhte 24h-Harnvolumina auf ( $p < 0,001$ ). Im Vergleich zu den nicht-transgenen Wurfgeschwistern betrug das Volumen des Urins der transgenen FVB/N circa das 20fache. Das Harnvolumen der transgenen C57Bl/6J Mäuse war gegenüber den B6 Wildtypen auch signifikant erhöht, es betrug etwa das Doppelte. Die Harnvolumina der Wildtypen beider Linien unterschieden sich nicht signifikant (Abbildung 4.10).



**Abbildung 4.10: 24h-Harnvolumen von GIPR<sup>dn</sup> transgenen und Wildtypmäusen (WT) am 85. Lebenstag**, Daten zeigen Mittelwerte mit SEM; Kruskall-Wallis Test, Post-HOC Dunn's multiple comparison Test; Signifikanzen: n.s.:  $p > 0,05$ , \* $p \leq 0,05$ , \*\*\* $p \leq 0,001$

#### 4.8. Wasserverbrauch in 24 Stunden

Der tägliche Wasserverbrauch von F.CD1-GIPRdn war gegenüber den nicht-transgenen Wurfgeschwistern und B6.CD1-GIPRdn signifikant erhöht. Währenddessen unterschied sich der Wasserverbrauch zwischen B6.CD1-GIPRdn und B6 Wildtypen und auch zwischen den Wildtypen beider Linien nicht (Abbildung 4.11).

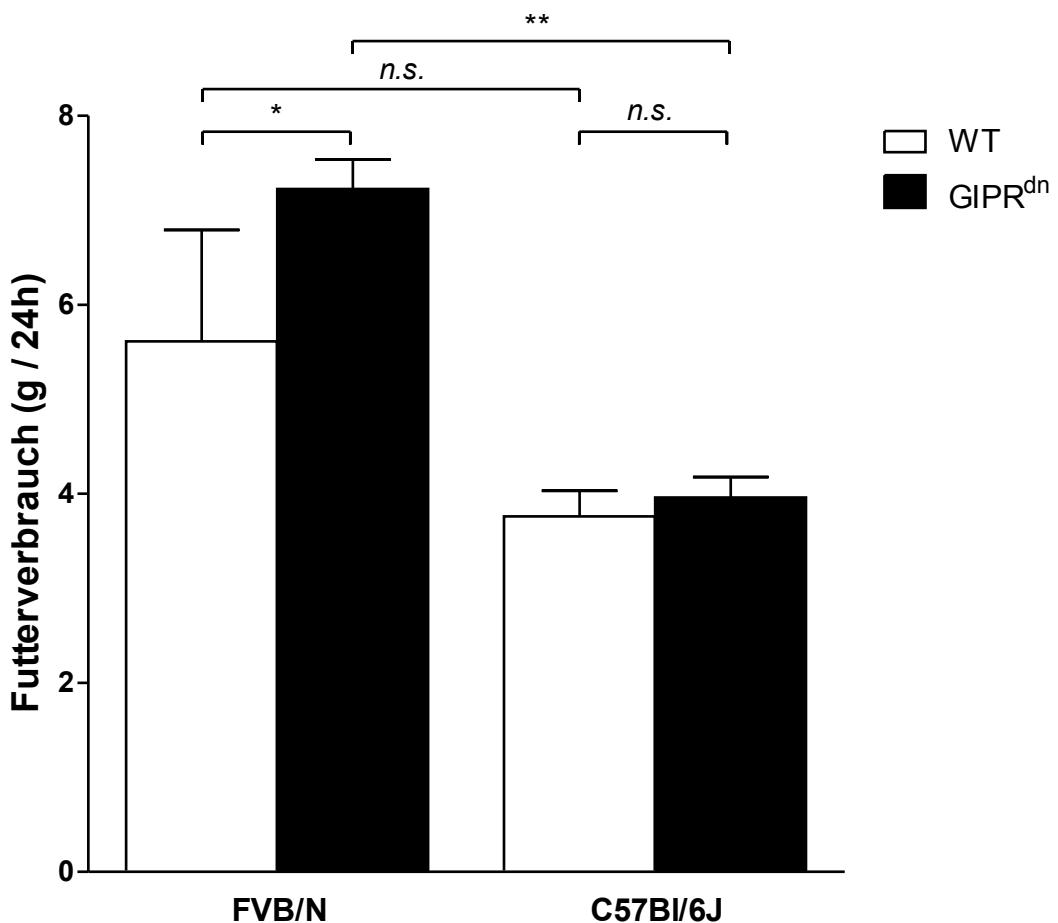


**Abbildung 4.11: 24h-Wasserverbrauch von GIPR<sup>dn</sup> transgenen und Wildtypmäusen (WT) am 85. Lebenstag:** Daten zeigen Mittelwerte mit SEM; Kruskall-Wallis Test, Post-HOC Dunn's multiple comparison Test; Signifikanzen: n.s.:  $p > 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$

Die Werte der Blutglukose (siehe Kapitel 4.2) wurden mit denen des Wasserverbrauchs (Kapitel 4.8) und des Harnvolumens (Kapitel 4.7) in Bezug gesetzt, um jeweils den empirischen Korrelationskoeffizienten zu bestimmen. Für die Korrelation zwischen Blutglukose und Wasserverbrauch ergab sich ein Wert von 0.93, für die Korrelation zwischen Blutglukose und Harnvolumen ein Wert von 0,95.

#### 4.9. Futterverbrauch in 24 Stunden

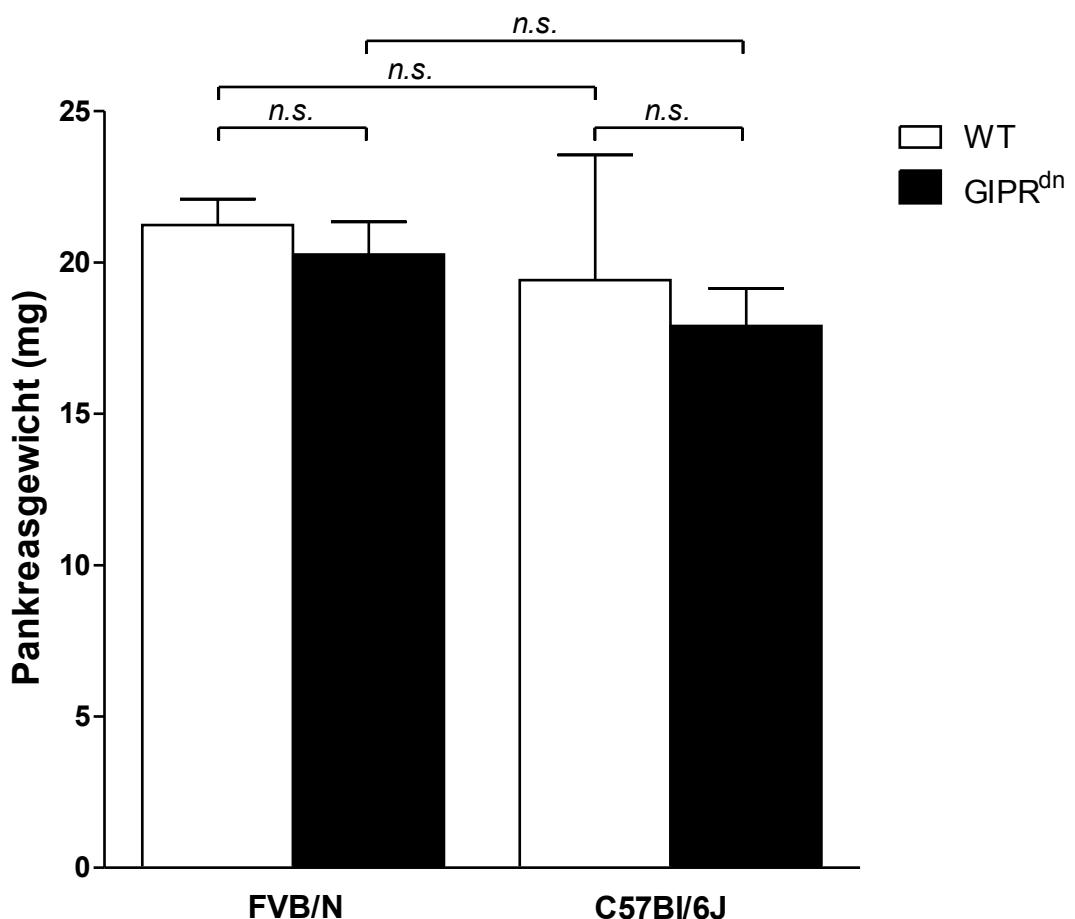
Wie in Abbildung 4.12 ersichtlich, war der tägliche Futterverbrauch der F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> Mäuse gegenüber Wildtypen und dem von B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> signifikant erhöht. Zwischen den B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> und den nicht-transgenen Wurfgeschwistern und zwischen den Wildtypen beider Linien gab es keinen signifikanten Unterschied im Futterverbrauch (Abbildung 4.12).



**Abbildung 4.12 24h Futterverbrauch von GIPR<sup>dn</sup> transgenen und Wildtypmäusen (WT) am 85. Lebenstag:** Daten zeigen Mittelwerte mit SEM; Kruskall-Wallis Test, Post-HOC Dunn's multiple comparison Test; Signifikanzen: n.s.:  $p > 0,05$ , \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$

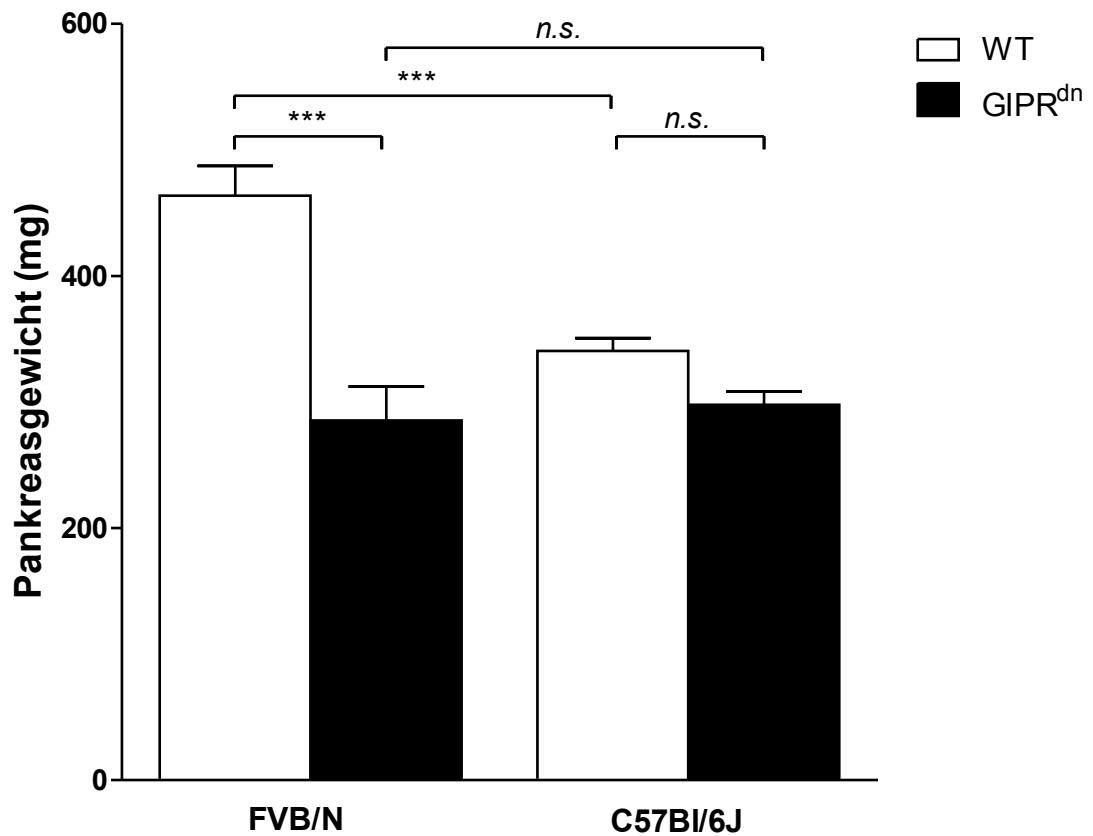
#### 4.10. Pankreasgewichte

Im Alter von 10 Tagen unterschieden sich die Pankreasgewichte der vier Gruppen nicht signifikant voneinander (Abbildung 4.13).



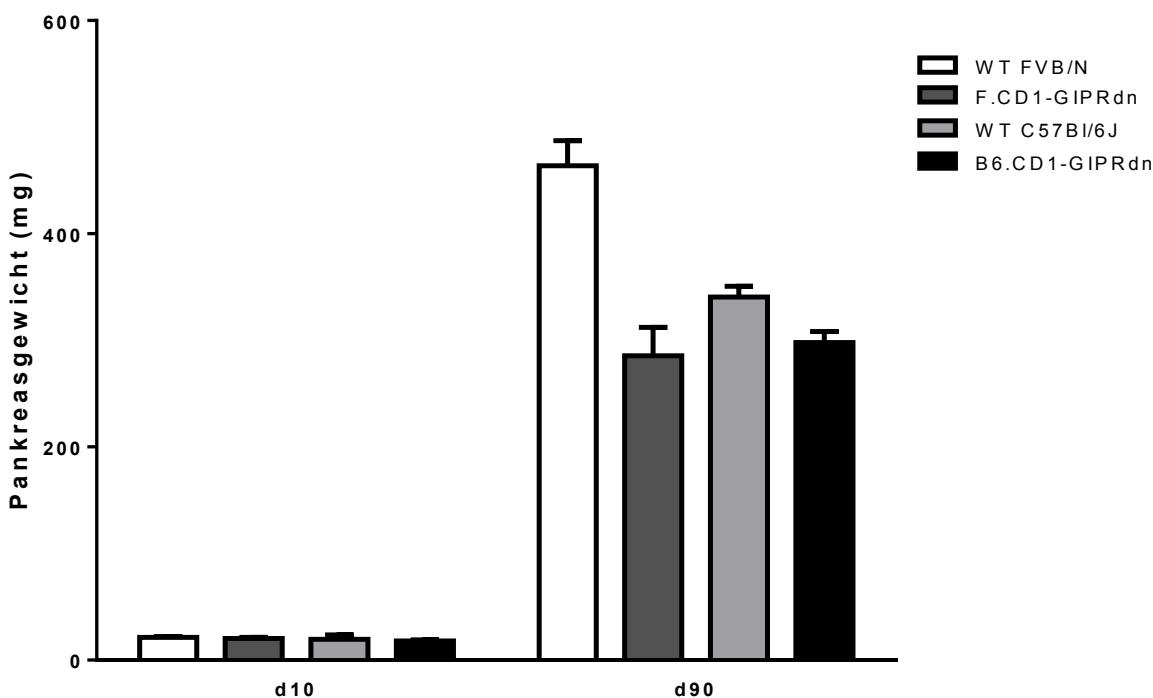
**Abbildung 4.13 Pankreasgewicht von GIPR<sup>dn</sup> transgenen und Wildtypmäusen (WT) am 10. Lebenstag:** Daten zeigen Mittelwerte mit SEM; Welch Test, Post-HOC Dunnett's T3 Test; Signifikanzen: n.s.: p > 0,05

Im Alter von 90 Tagen war das Pankreasgewicht der FVB/N Wildtypmäusen deutlich höher als das der anderen drei Gruppen. Das Pankreasgewicht der GIPR<sup>dn</sup> transgenen C57Bl/6 Mäuse unterschied sich nicht signifikant von dem der nicht-transgenen Wurfgeschwister (Abbildung 4.14).



**Abbildung 4.14 Pankreasgewicht von GIPR<sup>dn</sup> transgenen und Wildtypmäusen (WT) am 90. Lebenstag:** Daten zeigen Mittelwerte mit SEM; One Way ANOVA, Post-HOC LSD Test; Signifikanz: n.s.:  $p > 0,05$ , \*\*\* $p \leq 0,001$

Bei allen untersuchten Gruppen war das Pankreasgewicht mit 90 Tagen deutlich höher als mit 10 Tagen (Abbildung 4.15).

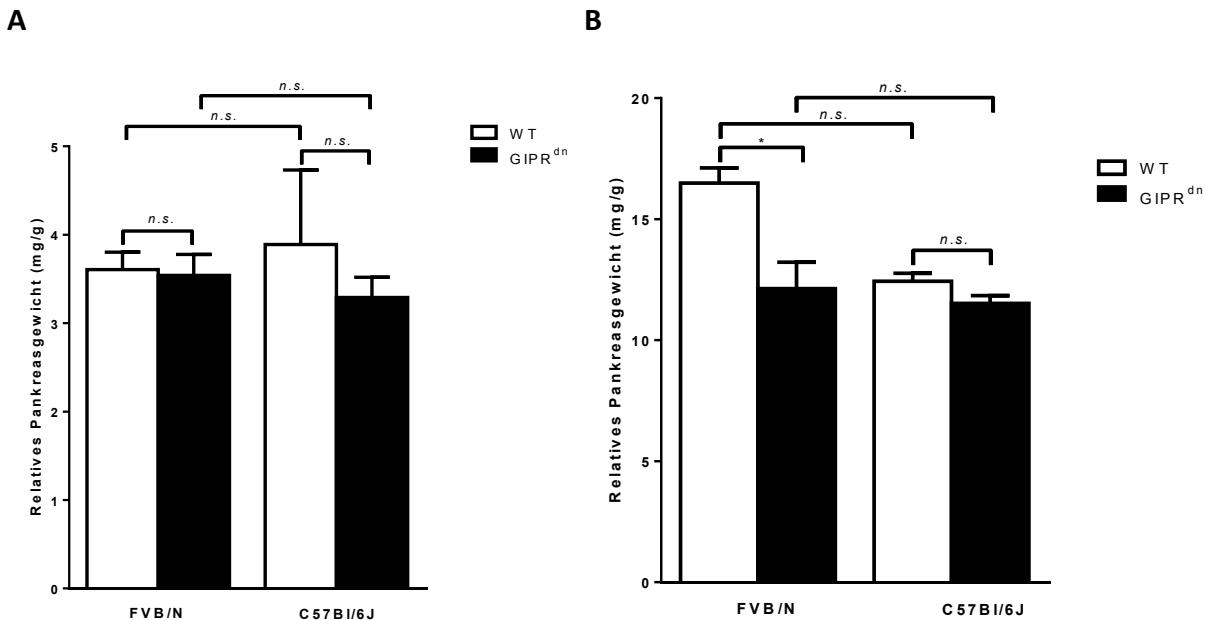


**Abbildung 4.15 Vergleich der Pankreasgewichte von GIPR<sup>dn</sup> transgenen und Wildtypmäusen (WT) 10. und 90. Lebenstag:** Daten zeigen Mittelwerte mit SEM; Signifikanzen sind in Tabelle 4.5 dargestellt

F.CD1-GIPR <sup>dn</sup> d10 zu F.CD1-GIPR <sup>dn</sup> d90	**
B6.CD1-GIPR <sup>dn</sup> d10 zu B6.CD1-GIPR <sup>dn</sup> d90	**
FVB/N WT d10 zu FVB/N WT d90	**
C57BL/6J WT d10 zu C57BL/6J WT d90	**

Tabelle 4.5 Pankreasgewichte: Vergleich zwischen 10 und 90 Tage alten Tieren. Mann-Whitney-U Test; Signifikanzen: \*\*p ≤ 0,01

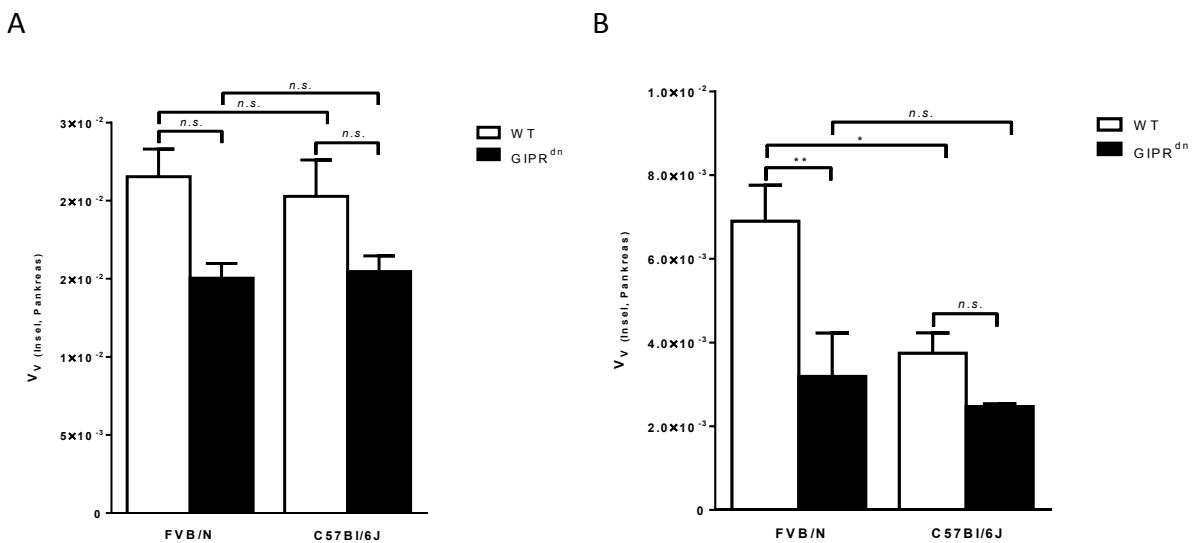
Die Pankreasgewichte bezogen auf das Körpergewicht unterschieden sich am zehnten Lebens- tag nicht signifikant voneinander. Am 90. Lebenstag wiesen die Wildtypen der Linie FVB/N signifikant höhere relative Pankreasgewichte auf als die F. CD1-*GIPR*<sup>dn</sup>. Die Wildtypen der Linie C57Bl/6J zeigten niedrigere relative Pankreasgewichte als die der Linie FVB/N, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant (Abbildung 4.16).



**Abbildung 4.16: A: Relatives Pankreasgewicht von F. CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> und B6. CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> (*GIPR*<sup>dn</sup>) im Vergleich zu FVB/N und C57Bl/6J Wildtyp-Wurfgeschwistern (WT) A: 10 Tage; B: 90 Tage:** Daten zeigen Mittelwerte mit SEM; Kruskal-Wallis-Test, Post-HOC Dunn's multiple comparison Test; Signifikanzen: n.s.: p > 0,05, \*p ≤ 0,05

#### 4.11. Volumendichte der Inseln im Pankreas

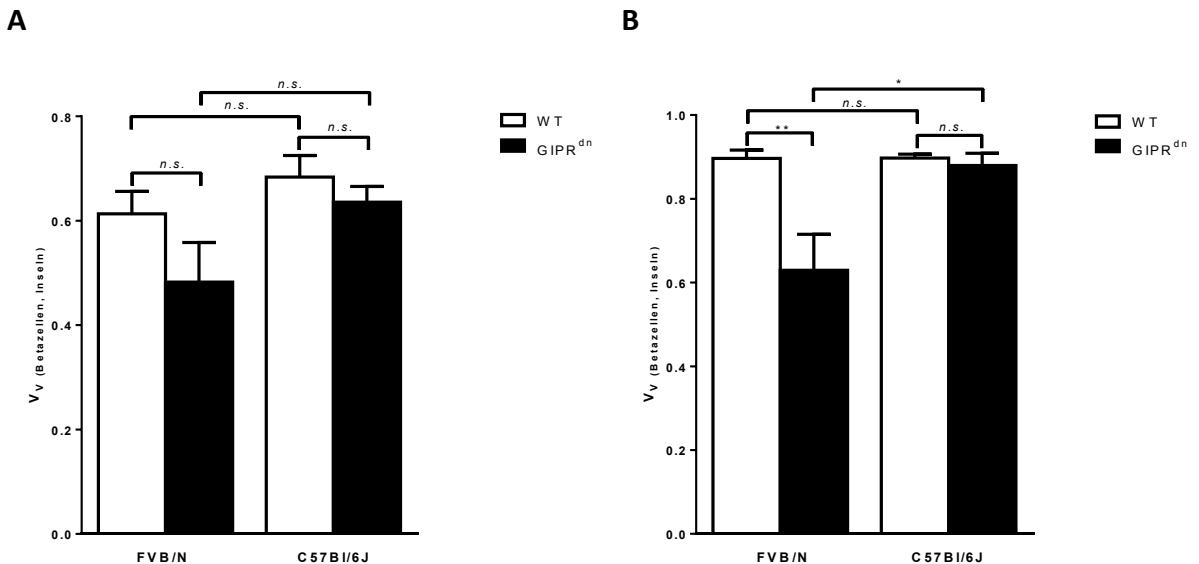
Mit zehn Tagen gab es keine signifikanten Unterschiede in der Volumendichte der Inseln im Pankreas, jedoch wiesen die transgene Mäuse tendenziell niedrigere Werte als Wildtypwurfgeschwister auf. Mit 90 Tagen zeigten die F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> eine signifikant niedrigere Volumendichte der Inseln im Pankreas verglichen mit FVB/N Wildtypen, während die B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> zwar etwas niedriger Werte aufwiesen als B6 Wildtypen, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant. FVB/N Wildtypen zeigten signifikant höhere Volumendichten der Inseln im Pankreas als B6 Wildtypen (Abbildung 4.17).



**Abbildung 4.17 Volumendichte der Inseln im Pankreas bei *GIPR*<sup>dn</sup> transgenen Mäusen und Wildtypen (WT), A: 10 Tage, B: 90 Tage,:** Daten zeigen Mittelwerte mit SEM; Kruskal-Wallis-Test, Post-HOC Dunn's multiple comparison Test; Signifikanzen: n.s.:  $p > 0,05$ , \* $p \leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,005$

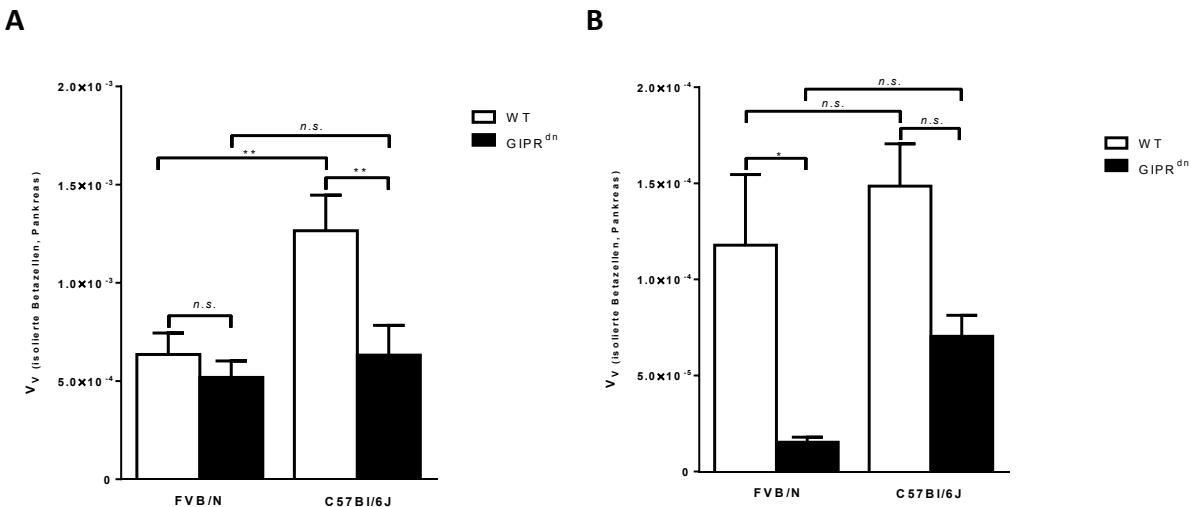
#### 4.12. Volumendichte der Betazellen in den Inseln

Am zehnten Lebenstag gab es keine signifikanten Unterschiede der Volumendichte der Betazellen in den Inseln. Mit 90 Tagen wiesen die F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> eine signifikant niedrigere Volumendichte der Betazellen in den Inseln auf, verglichen mit den FVB/N Wildtypen und den B6.DC1-*GIPR*<sup>dn</sup> (Abbildung 4.18).



#### 4.13. Volumendichte der isolierten Betazellen im Pankreas

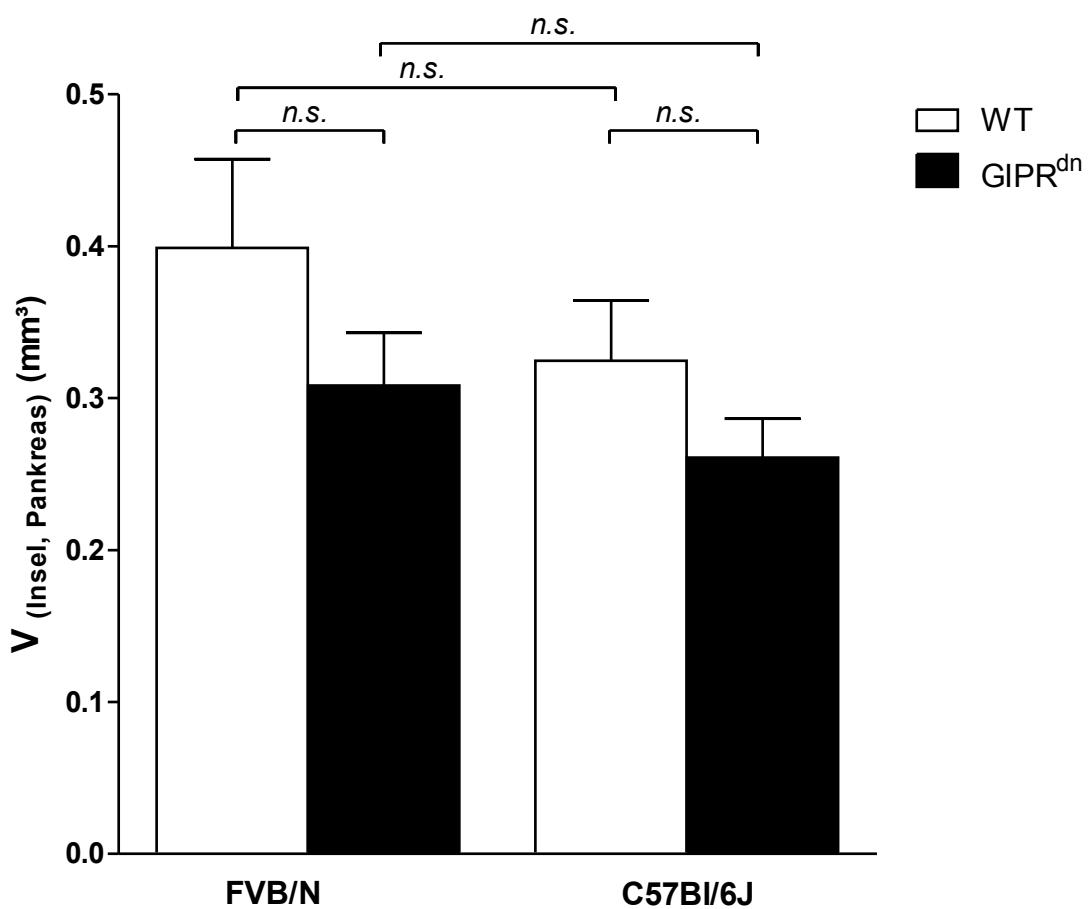
Bereits mit 10 Tagen wiesen B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> signifikant niedrigere Volumendichte der isolierten Betazellen im Pankreas auf als B6 und FVB/N Wildtypen. Am 90. Lebenstag zeigten transgene Mäuse beider Linien deutlich niedrigere Volumendichten der isolierten Betazellen im Pankreas als Wildtypen der entsprechenden Linie (Abbildung 4.19).



**Abbildung 4.19 Volumendichte der isolierten Betazellen im Pankreas bei GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäusen und Wildtypen (WT), A: 10 Tage, B: 90 Tage:** Daten zeigen Mittelwerte mit SEM; Kruskal-Wallis-Test, Post-HOC Dunn's multiple comparison Test; Signifikanzen: n.s.:  $p > 0,05$ , \* $p \leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,005$

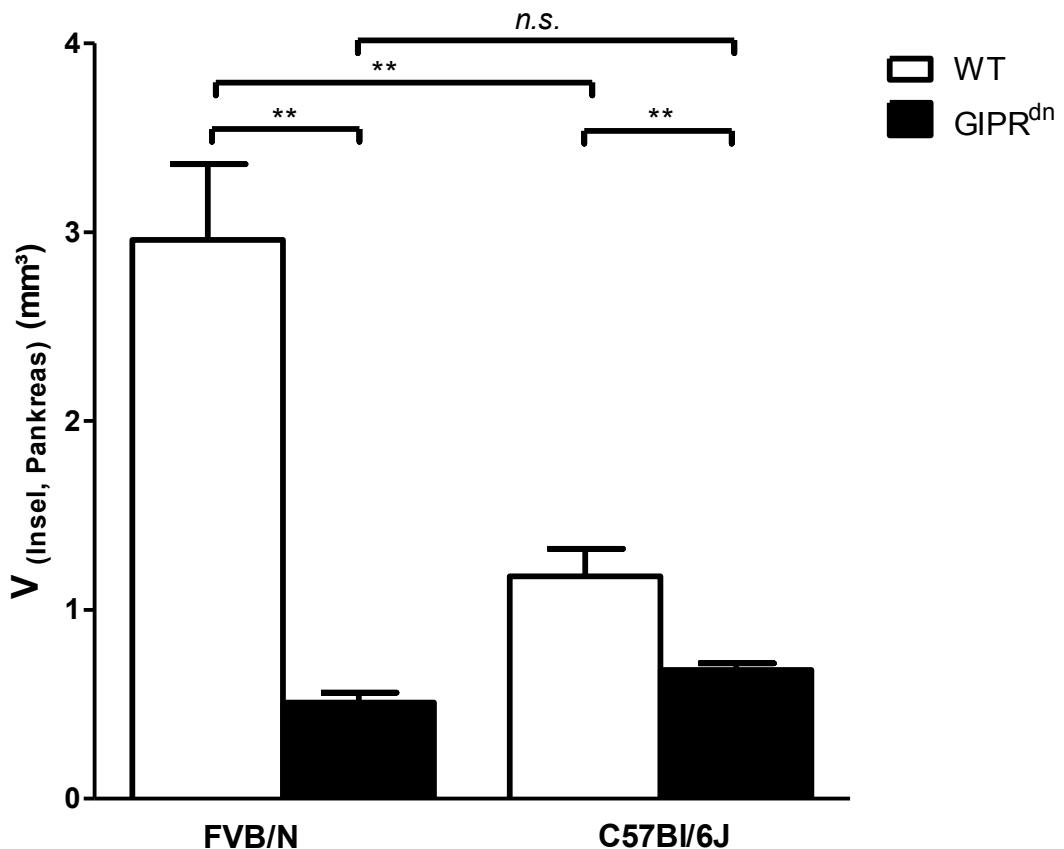
#### 4.14. Gesamtinselvolumen

Am 10. Lebenstag ließen sich noch keine signifikanten Unterschiede im Gesamtinselvolumen der vier untersuchten Gruppen feststellen. Transgene Mäuse beider Linien zeigten gegenüber den Wildtypen ein leicht, wenn auch nicht signifikant niedrigeres Gesamtinselvolumen. Tiere auf dem genetischen Hintergrund FVB/N zeigten tendenziell höhere Gesamtinselvolumina als der gleiche Genotyp auf C57Bl/6J Hintergrund (Abbildung 4.20).



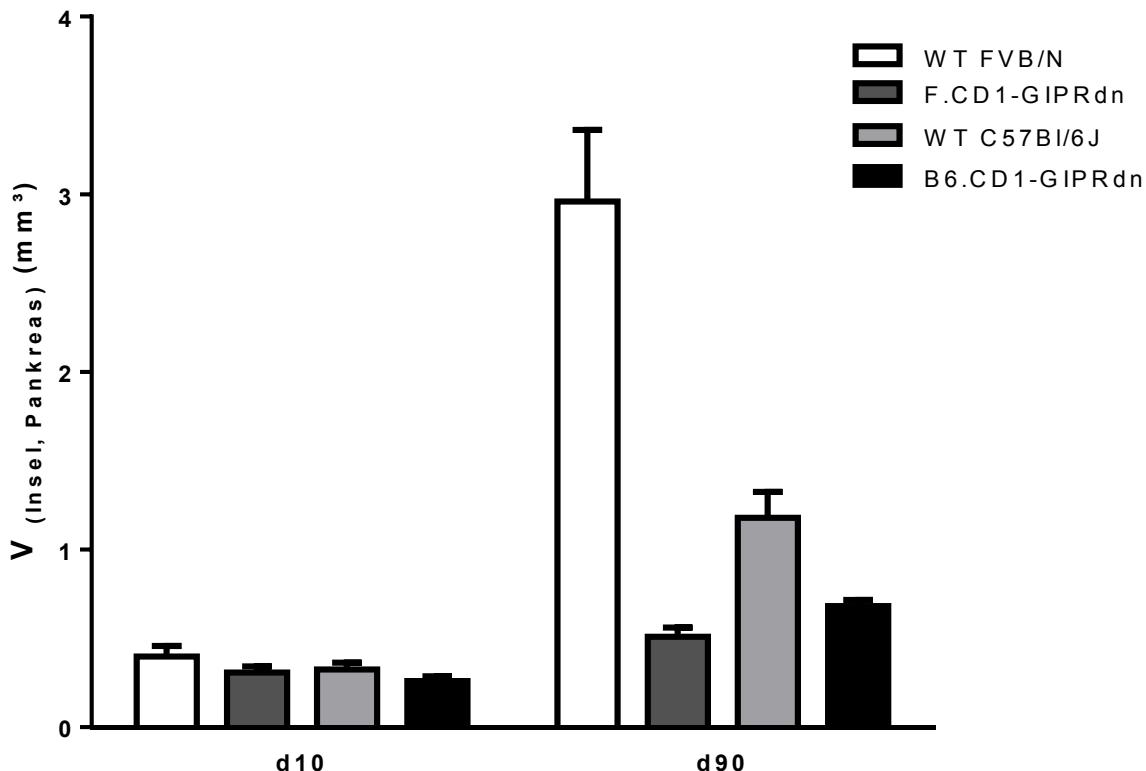
**Abbildung 4.20 Gesamtinselvolumen von GIPR<sup>dn</sup> transgenen und Wildtypmäusen (WT) am 10. Lebenstag:** Daten zeigen Mittelwerte mit SEM; Kruskal-Wallis Test, Post-HOC Dunn's multiple comparison Test; Signifikanzen: n.s.: p > 0,05

Das Gesamtinselvolumen von 90 Tage alten GIPR<sup>dn</sup> transgenen FVB/N Mäuse war gegenüber den nicht-transgenen Wurfgeschwistern signifikant erniedrigt ( $p<0,01$ ). Das Gesamtinselvolumen der transgenen C57Bl/6J Mäuse war ebenfalls signifikant niedriger als das der Wildtyp-Wurfgeschwister, jedoch war der Unterschied nicht so stark ausgeprägt wie zwischen transgenen FVB/N und Wildtyp Mäusen. Das Gesamtinselvolumen der FVB/N Wildtypen war signifikant höher als das der C57Bl/6J Wildtypen. (Abbildung 4.21).



**Abbildung 4.21 Gesamtinselvolumen von GIPR<sup>dn</sup> transgenen und Wildtypmäusen (WT) am 90. Lebenstag:** Daten zeigen Mittelwerte mit SEM; Kruskall-Wallis Test, Post-HOC Dunn's multiple comparison Test; Signifikanzen: n.s.:  $p > 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$

Während das Gesamtinselvolumen der FVB/N Wildtypen mit 90 Tagen 6fach höher war, war es bei transgenen Mäusen nur um circa ein Drittel höher als bei den entsprechenden 10 Tage alten Tieren. Sowohl bei transgenen B6 als auch bei B6 Kontrollmäusen verdoppelte sich das Gesamtinselvolumen zwischen dem 90ten und 10ten Lebenstag (Abbildung 4.22).



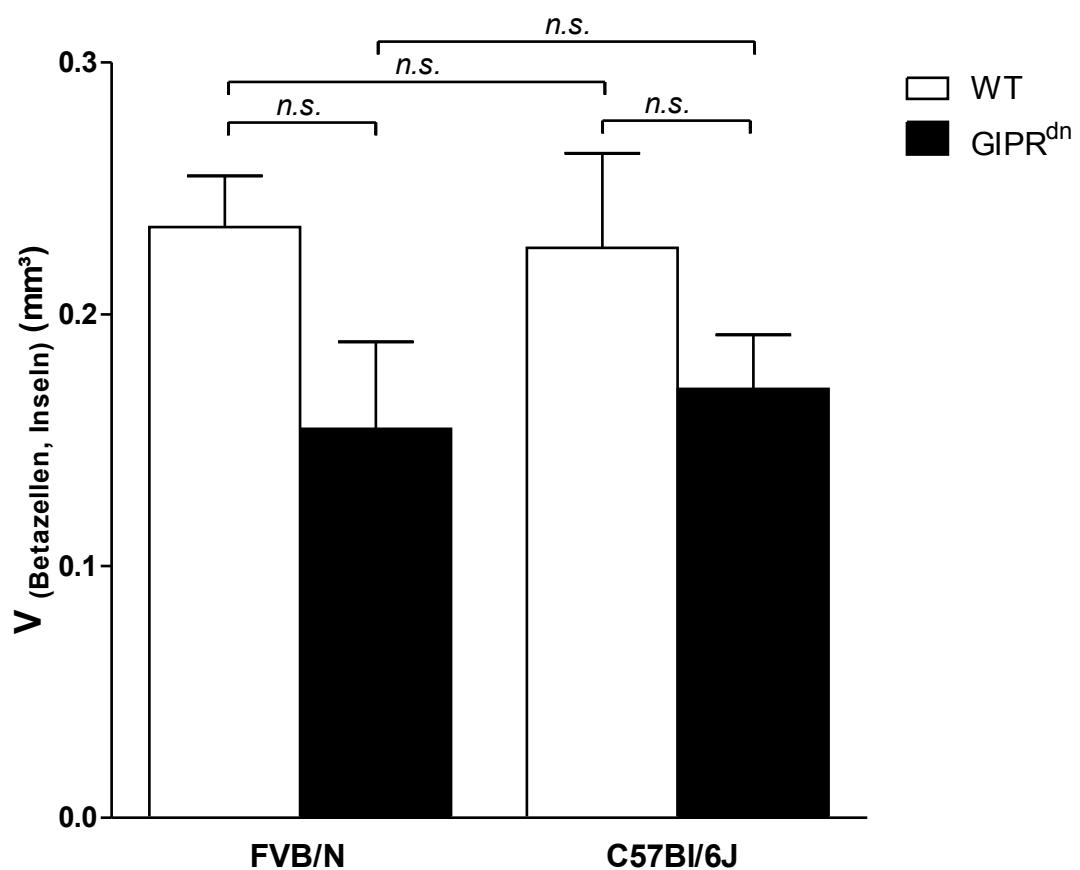
**Abbildung 4.22 Gesamtinselvolumen von GIPR<sup>dn</sup> transgenen und Wildtypmäusen (WT) am 10. und 90. Lebenstag:** Daten zeigen Mittelwerte mit SEM; Signifikanzen sind in Tabelle 4.6 dargestellt.

F.CD1-GIPR <sup>dn</sup> d10 zu F.CD1-GIPR <sup>dn</sup> d90	**
B6.CD1-GIPR <sup>dn</sup> d10 zu B6.CD1-GIPR <sup>dn</sup> d90	**
FVB/N WT d10 zu FVB/N WT d90	**
C57Bl/6J WT d10 zu C57Bl/6J WT d90	**

**Tabelle 4.6 Gesamtinselvolumen:** Vergleich 10 und 90 Tage. Mann-Whitney-U-Test; Signifikanz: \*\*p ≤ 0,01

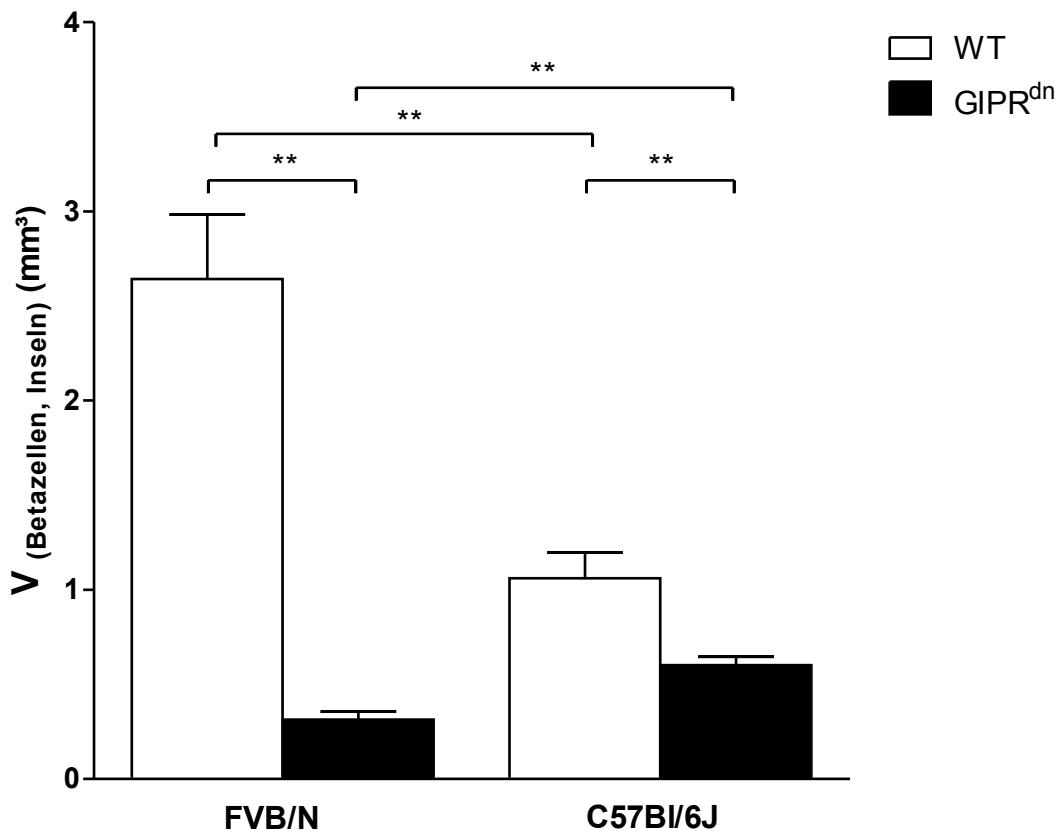
#### 4.15. Gesamtbetazellvolumen

Mit 10 Tagen ließen sich noch keinerlei signifikante Unterschiede im Gesamtbetazellvolumen der vier untersuchten Gruppen feststellen. Es fällt jedoch auf, dass die transgenen Tiere beider Linien gegenüber Wildtypen tendenziell niedrigere Gesamtbetazellvolumina aufweisen. Die Gesamtbetazellvolumina der Wildtypen beider Linien unterscheiden sich untereinander kaum, ebenso wenig wie die der transgenen Tiere beider Linien (Abbildung 4.23).



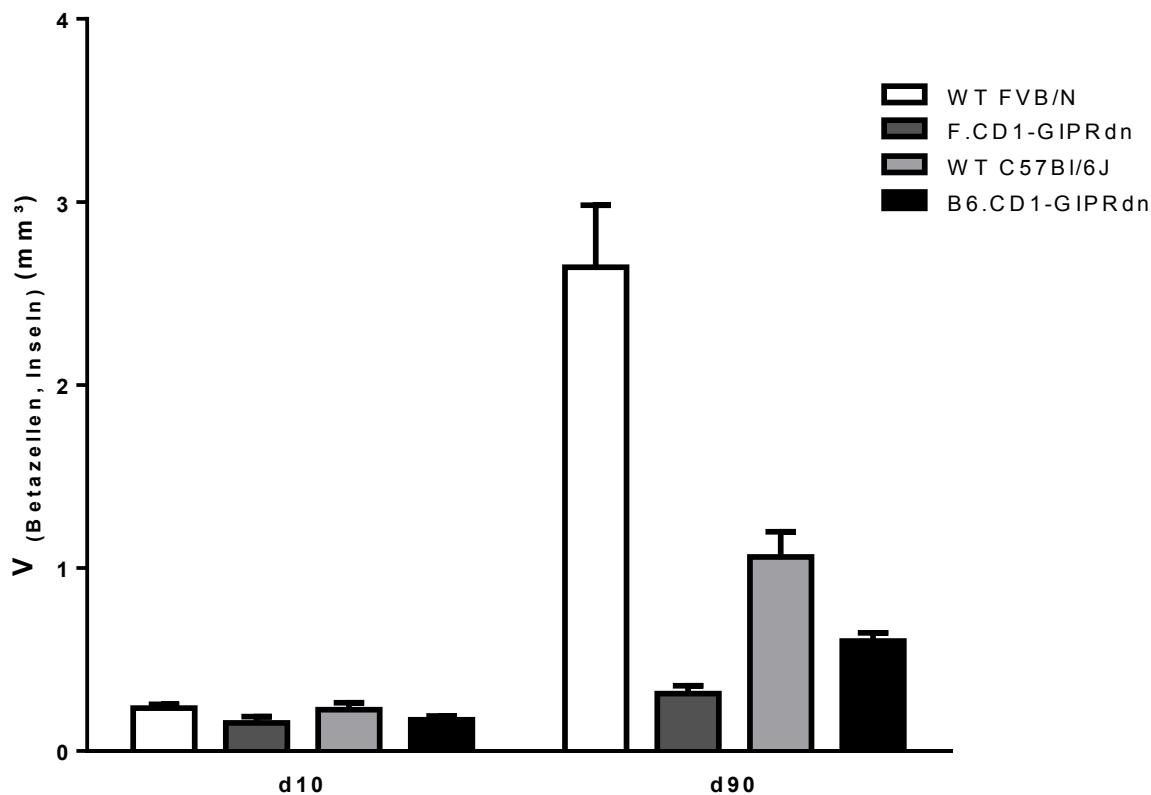
**Abbildung 4.23 Gesamtbetazellvolumen von GIPR<sup>dn</sup> transgenen und Wildtypmäusen (WT) am 10. Lebenstag:** Daten zeigen Mittelwerte mit SEM; One Way ANOVA Post-HOC LSD Test; Signifikanzen: n.s.:  $p > 0,05$

Mit 90 Tagen war das Gesamtbetazellvolumen der transgenen FVB/N gegenüber den Wildtyp-Tieren auf ein Sechstel reduziert. Bei den transgenen C57Bl/6J Mäusen war das Gesamtbetazellvolumen gegenüber den Wildtypen nicht ganz halbiert ( $p < 0,01$ ). Die transgene FVB/N zeigten ein signifikant niedrigeres Gesamtbetazellvolumen als die transgenen C57Bl/6J Mäuse. Bei den Wildtypen waren die Verhältnisse genau umgekehrt: FVB/N Wildtypen zeigten ein mehr als doppelt so hohes Gesamtbetazellvolumen als B6 Wildtypen. (Abbildung 4.24)



**Abbildung 4.24 Gesamtbetazellvolumen von GIPR<sup>dn</sup> transgenen und Wildtypmäusen (WT) am 90. Lebenstag:** Daten zeigen Mittelwerte mit SEM; Kruskal-Wallis Test, Post-HOC Dunn's multiple comparison Test; Signifikanzen: \*\* $p \leq 0,01$

Bei 90 Tage alten transgenen Tieren war das Gesamtbetazellvolumen signifikant höher als bei 10 Tage alten Tieren. F.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>* zeigten aber eine deutlichere Zunahme des Gesamtbetazellvolumens (3,5fach) als B6.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>* (2fach). Vergleicht man 10 und 90 Tage alte Tiere, verdreifachte sich das Gesamtbetazellvolumen bei den B6 Wildtypen, bei den FVB/N Wildtypen stieg es in etwa um das sechsfache an (Abbildung 4.25).



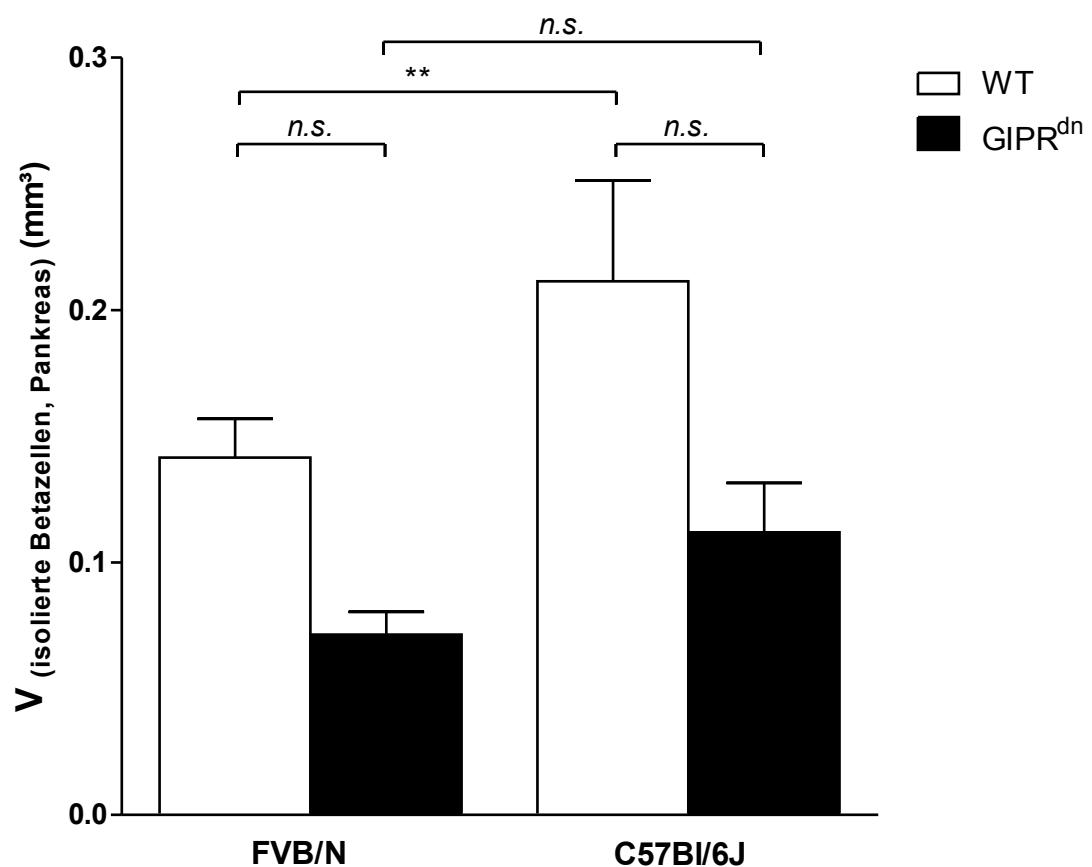
**Abbildung 4.25 Gesamtbetazellvolumen von *GIPR<sup>dn</sup>* transgenen und Wildtypmäusen (WT)**  
**10. und 90. Lebenstag:** Daten zeigen Mittelwerte mit SEM; Signifikanzen sind in Tabelle 4.7 dargestellt

F.CD1- <i>GIPR<sup>dn</sup></i> d10 zu F.CD1- <i>GIPR<sup>dn</sup></i> d90	*
B6.CD1- <i>GIPR<sup>dn</sup></i> d10 zu B6.CD1- <i>GIPR<sup>dn</sup></i> d90	**
FVB/N WT d10 zu FVB/N WT d90	**
C57BL/6J WT d10 zu C57BL/6J WT d90	**

Tabelle 4.7 Gesamtbetazellvolumen: Vergleich 10 und 90 Tage. Mann-Whitney-U-Test; Signifikanzen: \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$

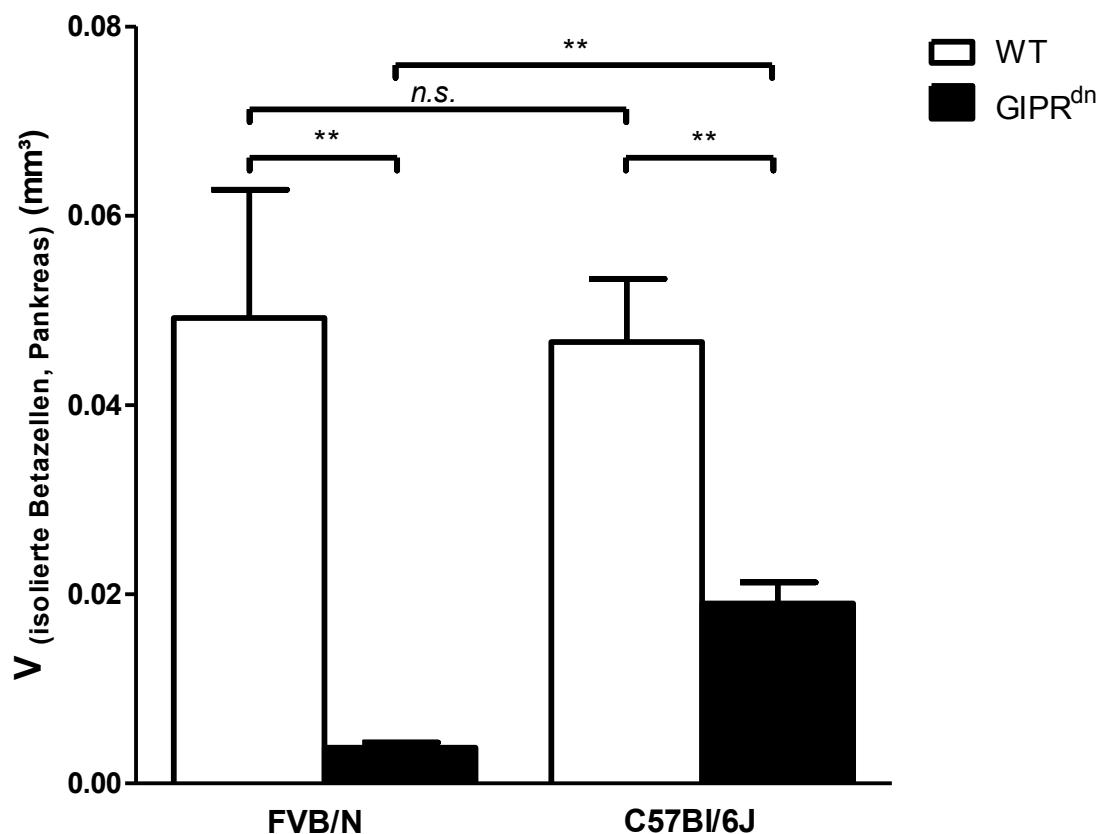
#### 4.16. Gesamtvolumen der isolierten Betazellen

Das Gesamtvolumen der isolierten Betazellen war bei beiden transgenen Gruppen tendenziell niedriger als bei den entsprechenden Wildtyp-Wurfgeschwistern. Das Gesamtvolumen der isolierten Betazellen bei C57Bl/6J Wildtypen war signifikant höher als bei FVB/N Wildtypen, B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> zeigten ein etwas höheres Gesamtvolumen isolierter Betazellen als F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> (n.s.) (Abbildung 4.26).



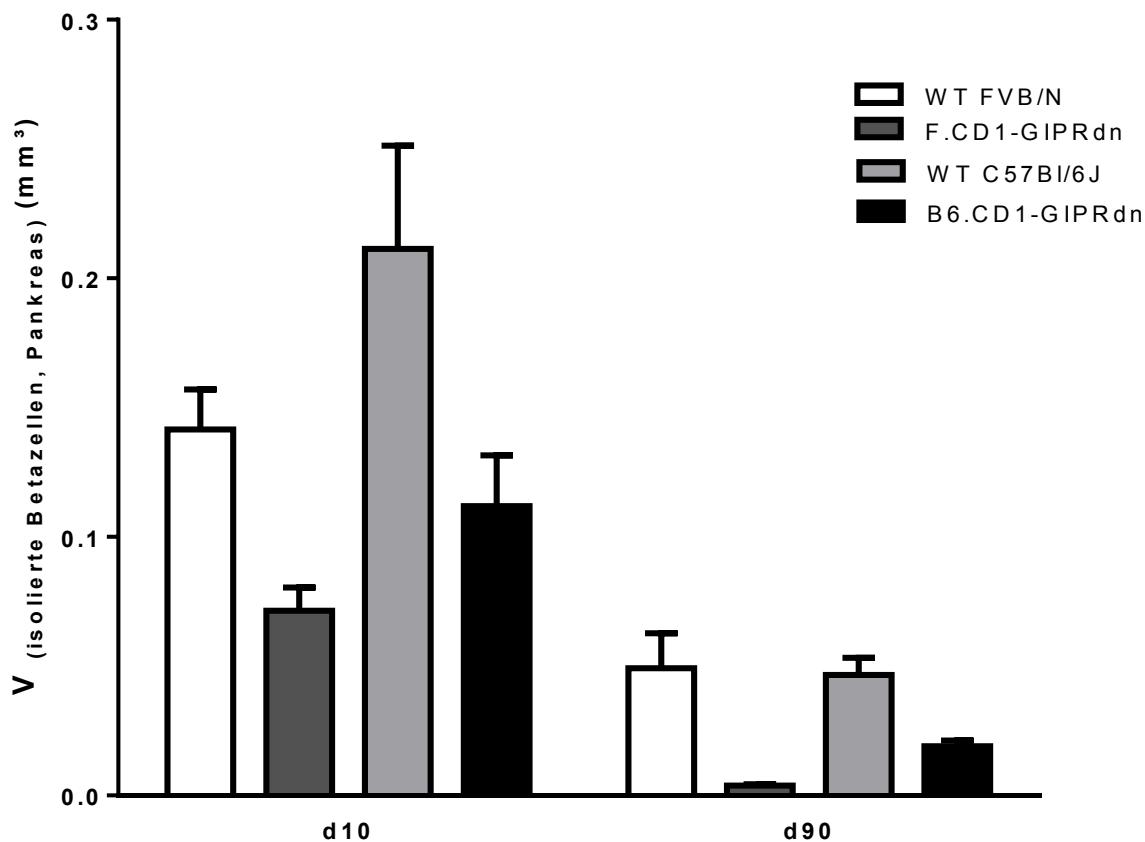
**Abbildung 4.26 Gesamtvolumen isolierter Betazellen von GIPR<sup>dn</sup> transgenen und Wildtypmäusen (WT) am 10. Lebenstag:** Daten zeigen Mittelwerte mit SEM; Welch Test, Post-HOC Dunnett T3 Test; Signifikanzen: n.s.:  $p > 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$

Bei den 90 Tage alten Mäusen zeigten GIPR<sup>dn</sup> transgene Tiere gegenüber Wildtypen ein signifikant niedrigeres Gesamtvolume von isolierten Betazellen im Pankreas ( $p < 0,01$ ). Während sich die Werte unter den Wildtypen nicht signifikant unterschieden, war bei den transgenen Tieren das Gesamtvolume der isolierten Betazellen im Pankreas der C57Bl/6J Mäuse circa dreimal so hoch wie bei den transgenen FVB/N Mäusen (Abbildung 4.27).



**Abbildung 4.27 Gesamtvolume der isolierten Betazellen von GIPR<sup>dn</sup> transgenen und Wildtypmäusen (WT) am 90. Lebenstag:** Daten zeigen Mittelwerte mit SEM; Kruskal-Wallis Test, Post-HOC Dunn's multiple comparison Test; Signifikanzen: n.s.:  $p > 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$

Das Gesamtvolumen der isolierten Betazellen war bei allen vier Gruppen im Alter von 90 Tagen signifikant niedriger als mit 10 Tagen (Abbildung 4.28).



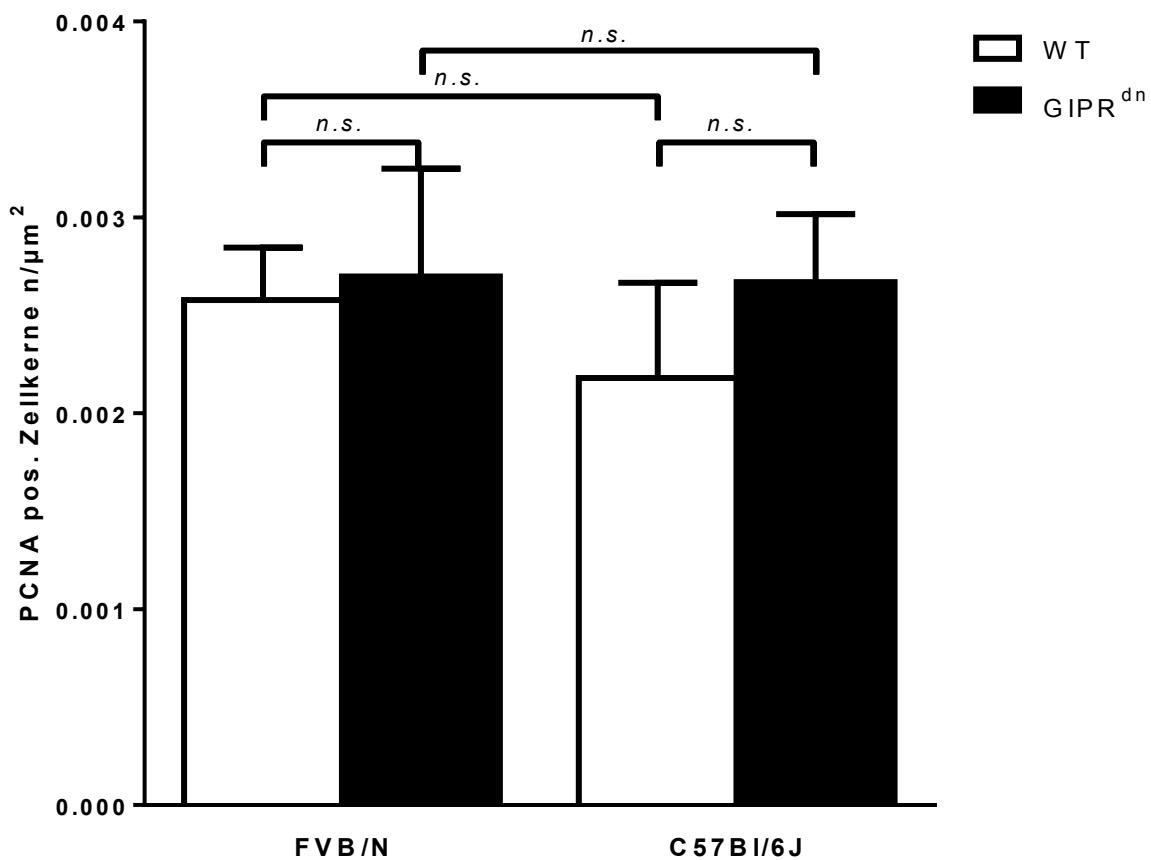
**Abbildung 4.28 Gesamtvolumen der isolierten Betazellen von GIPR<sup>dn</sup> transgenen und Wildtypmäusen (WT) am 10. und 90. Lebenstag:** Daten zeigen Mittelwerte mit SEM; Mann-Whitney-U-Test; Signifikanzen sind in Tabelle 4.8 dargestellt

F.CD1-GIPR <sup>dn</sup> d10 zu F.CD1-GIPR <sup>dn</sup> d90	*
B6.CD1-GIPR <sup>dn</sup> d10 zu B6.CD1-GIPR <sup>dn</sup> d90	*
FVB/N WT d10 zu FVB/N WT d90	**
C57Bl/6J WT d10 zu C57Bl/6J WT d90	**

Tabelle 4.8 Gesamtvolumen der isolierten Betazellen: Vergleich 10 und 90 Tage. Mann-Whitney-U-Test, Signifikanzen: \*  $\leq 0,05$ , \*\*  $\leq 0,01$

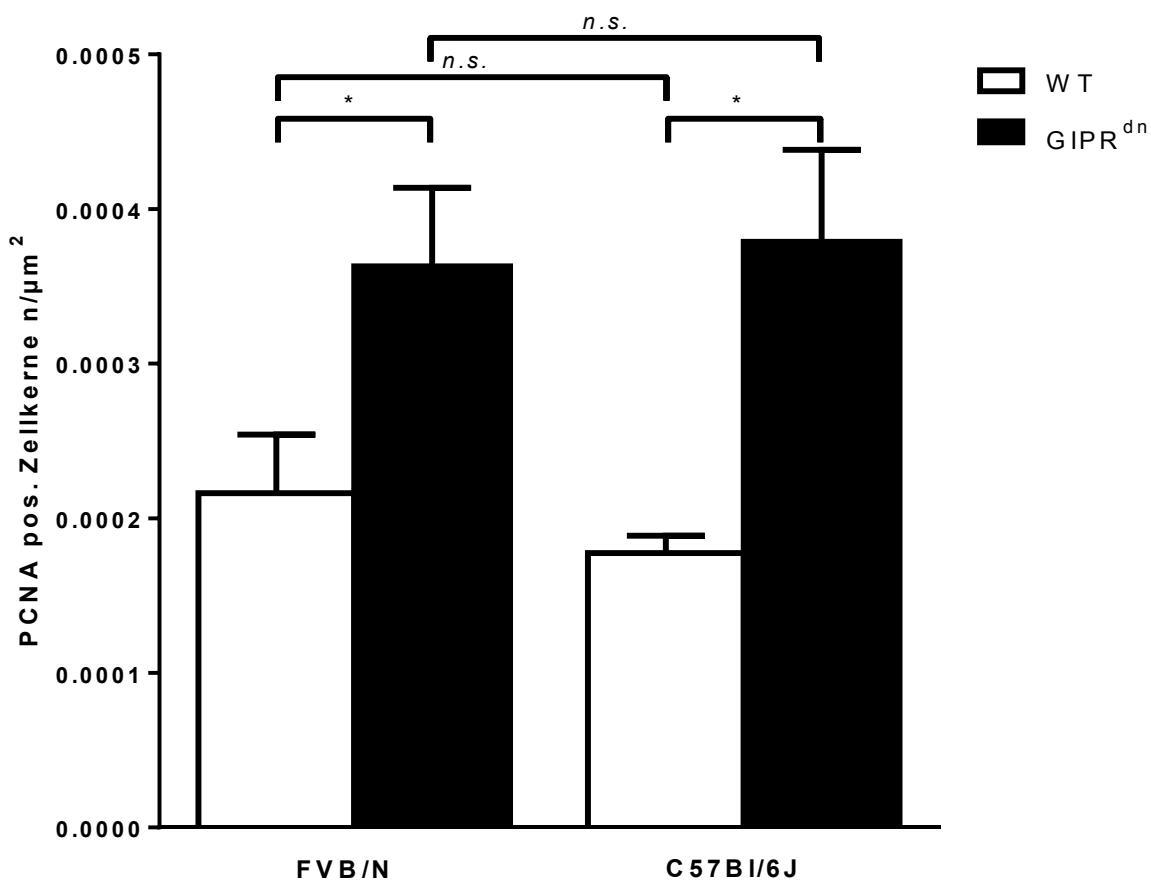
#### 4.17. PCNA-positive Kernanschnittprofile in den Inseln

Bei den 10 Tage alten Versuchstieren zeigten sich quantitativ keine signifikanten Unterschiede bei der Replikationsrate in den Inseln (Abbildung 4.29).



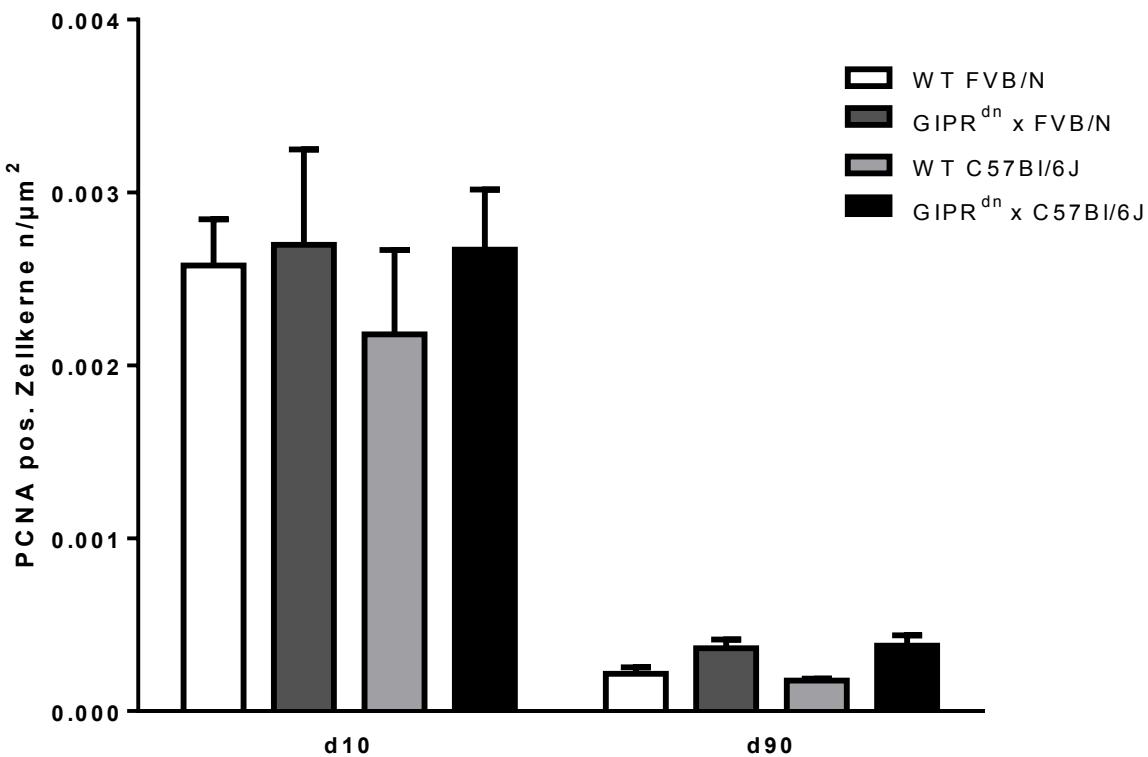
**Abbildung 4.29 Anzahl der PCNA positiven Kernanschnittprofile in den Inseln von GIPR<sup>dn</sup> transgenen und Wildtypmäusen (WT) am 10. Lebenstag:** Daten zeigen Mittelwerte mit SEM; Kruskal-Wallis Test, Post-HOC Dunn's multiple comparison Test; Signifikanzen: n.s.: p > 0,05

Im Alter von 90 Tagen zeigten die GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäuse beider Linien eine signifikant höhere Anzahl von PCNA positiven Zellkernanschnittprofilen in den Inseln (Abbildung 4.30).



**Abbildung 4.30 Anzahl der PCNA positiven Kernanschnittprofile in den Inseln von GIPR<sup>dn</sup> transgenen und Wildtypmäusen (WT) am 90. Lebenstag:** Daten zeigen Mittelwerte mit SEM; Kruskal-Wallis Test, Post-HOC Dunn's multiple comparison Test; Signifikanzen: n.s.:  $p > 0,05$ , \* $p \leq 0,05$

Am Tag 90 betrug die Replikationsrate bei den GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäusen beider genetischer Hintergründe, wie in Abbildung 4.31 ersichtlich, nur circa ein Siebtel der Replikationsrate am Tag 10. Bei den Wildtypen beider Linien betrug die Replikationsrate mit 90 Tagen in etwa ein Dreizehntel der Replikationsrate an Tag 10.



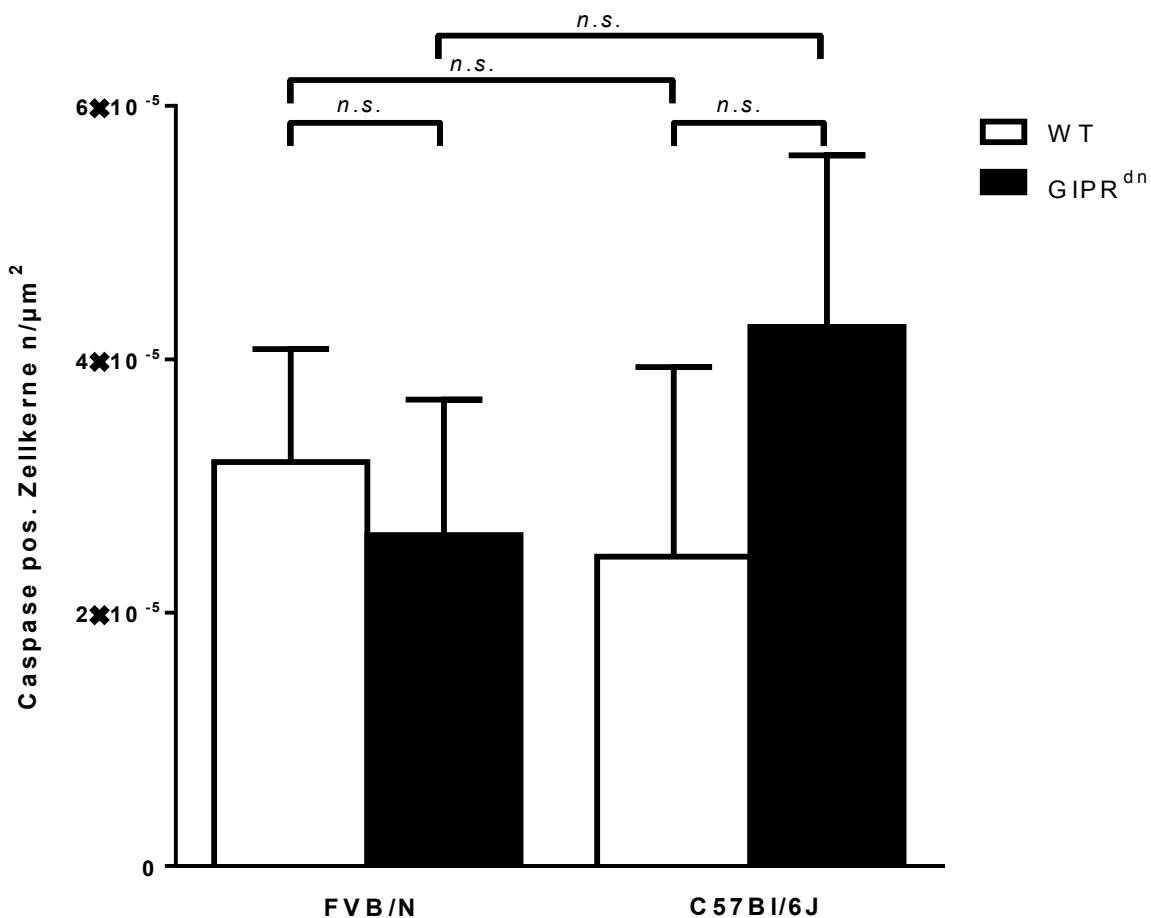
**Abbildung 4.31 Anzahl der PCNA positiven Kernanschnittprofile in den Inseln von GIPR<sup>dn</sup> transgenen und Wildtypmäusen (WT) am 10. und 90. Lebenstag:** Daten zeigen Mittelwerte mit SEM; Signifikanzen sind in Tabelle 4.9 dargestellt

F.CD1-GIPR <sup>dn</sup> d10 zu F.CD1-GIPR <sup>dn</sup> d90	**
B6.CD1-GIPR <sup>dn</sup> d10 zu B6.CD1-GIPR <sup>dn</sup> d90	**
FVB/N WT d10 zu FVB/N WT d90	**
C57BL/6J WT d10 zu C57BL/6J WT d90	**

Tabelle 4.9 Replizierende Kernanschnittprofile: Tag 10 und Tag 90. Mann-Whitney-U-Test; Signifikanzen: \*\* ≤ 0,01

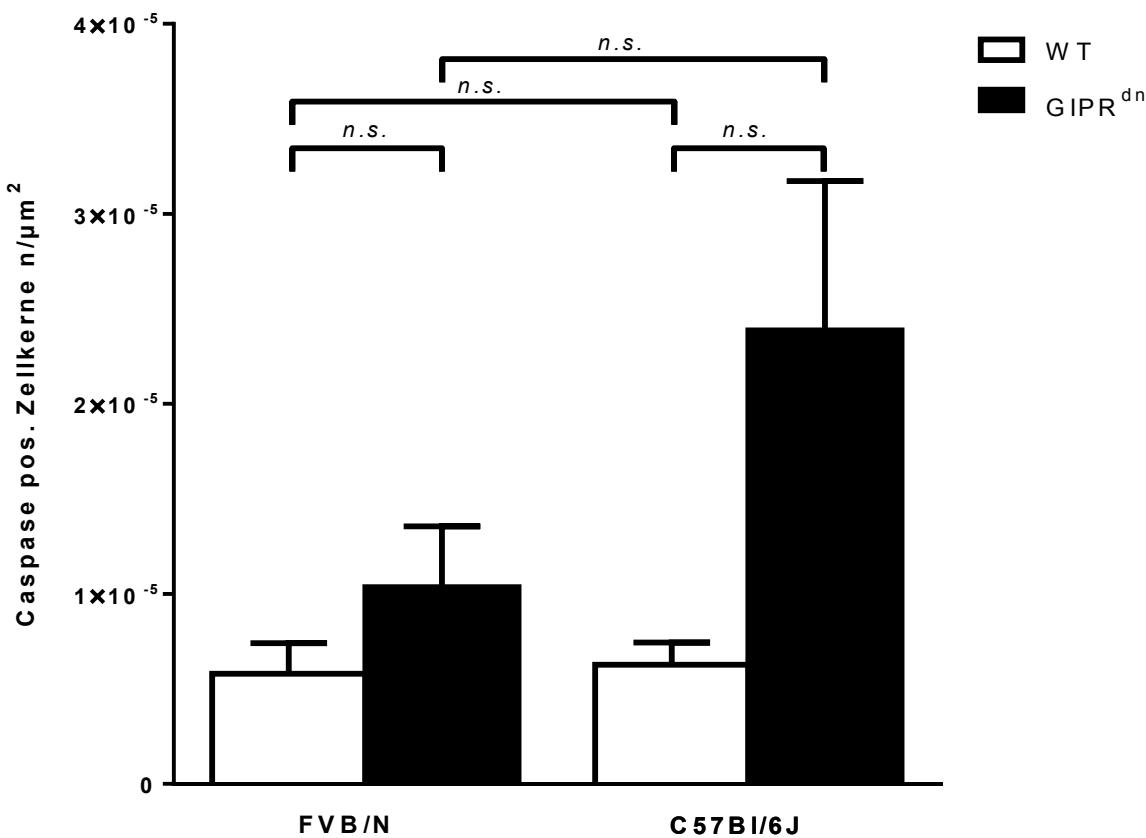
#### 4.18. Cleaved-Caspase 3-positive Kernanschnittprofile in den Inseln

Mit 10 Tagen ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier untersuchten Gruppen feststellen. B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> zeigten deutlich mehr apoptotische Kernanschnittsprofile in den Inseln als F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup>, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant (Abbildung 4.32).



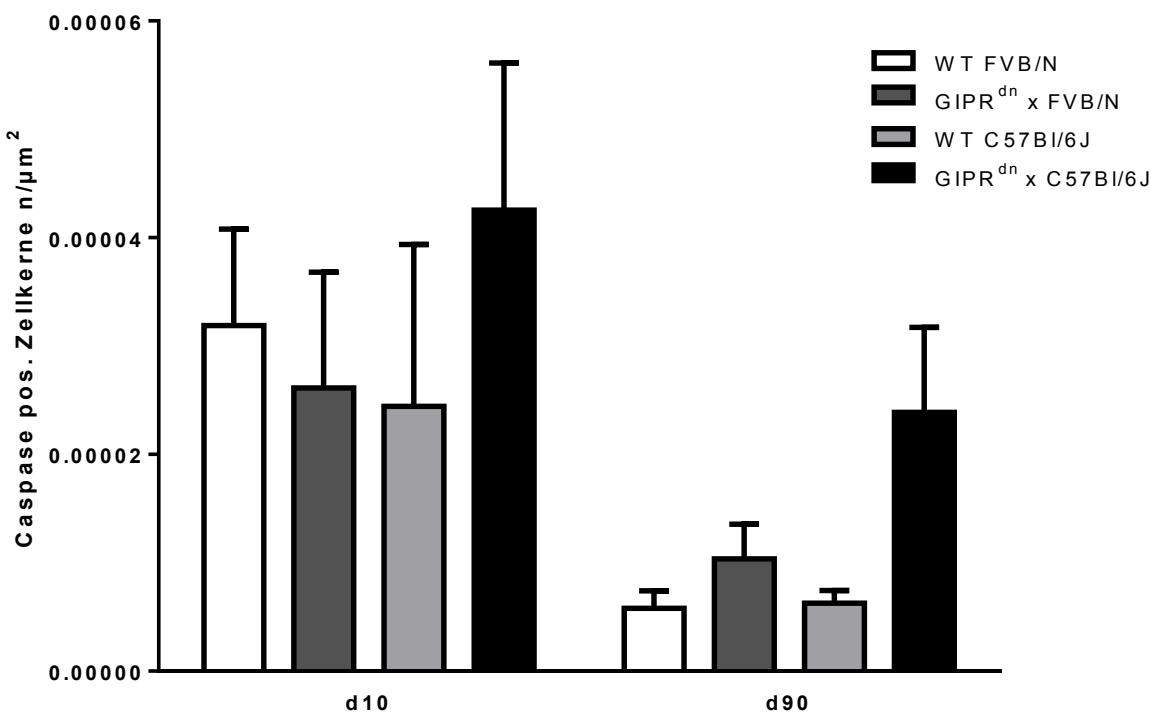
**Abbildung 4.32 Anzahl apoptotischer Kernanschnittprofile in den Inseln von *GIPR*<sup>dn</sup> transgenen und Wildtypmäusen (WT) am 10. Lebenstag:** Daten zeigen Mittelwerte mit SEM; One Way ANOVA, Post-HOC LSD Test; Signifikanzen: n.s.: p > 0,05

Auch mit 90 Tagen gab es innerhalb der vier Gruppen keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 4.33). Die transgenen Tiere beider Linien wiesen höhere Apoptoseraten auf, vor allem B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup>, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant.



**Abbildung 4.33 Anzahl apoptotischer Kernanschnittprofilen in den Inseln von *GIPR*<sup>dn</sup> transgenen und Wildtypmäusen (WT) am 90. Lebenstag:** Daten zeigen Mittelwerte mit SEM; Kruskal-Wallis Test, Post-HOC Dunn's multiple comparison Test; Signifikanzen: n.s.:  $p > 0,05$

Im Vergleich zwischen Tag 10 und Tag 90 (Abbildung 4.34) wiesen die GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäuse und Wildtypen beider genetischer Hintergründe mit 10 Tagen eine größere Anzahl an apoptotischen Kernanschnittprofilen in den Inseln auf als 90 Tage alte Tiere, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.



**Abbildung 4.34 Anzahl apoptotischer Kernanschnittprofile in den Inseln von GIPR<sup>dn</sup> transgenen und Wildtypmäusen (WT) am 10. und 90. Lebenstag:** Daten zeigen Mittelwerte mit SEM; Signifikanzen sind in Tabelle 4.10 eingetragen

F.CD1-GIPR <sup>dn</sup> d10 zu F.CD1-GIPR <sup>dn</sup> d90	<i>n.s.</i>
B6.CD1-GIPR <sup>dn</sup> d10 zu B6.CD1-GIPR <sup>dn</sup> d90	<i>n.s.</i>
FVB/N WT d10 zu FVB/N WT d90	<i>n.s.</i>
C57BL/6J WT d10 zu C57BL/6J WT d90	<i>n.s.</i>

Tabelle 4.10 Apoptotische Kernanschnittprofile: Tag 10 und Tag 90. Mann-Whitney-U-Test; Signifikanzen: *n.s.*: > 0,05

## 4.19. Qualitativ histologische Befunde am endokrinen Pankreas

### 4.19.1 Inselmorphologie

Am 10. Lebenstag ließen sich mikroskopisch nur wenig auffällige Unterschiede am Pankreas feststellen (Abbildung 4.35). So konnte man erkennen, dass die Inselprofile von GIPR<sup>dn</sup> transgenen Tieren weniger stark gefärbte Betazellen aufweisen als Wildtypen. Allerdings war dieser Unterschied nur andeutungsweise zu erkennen.

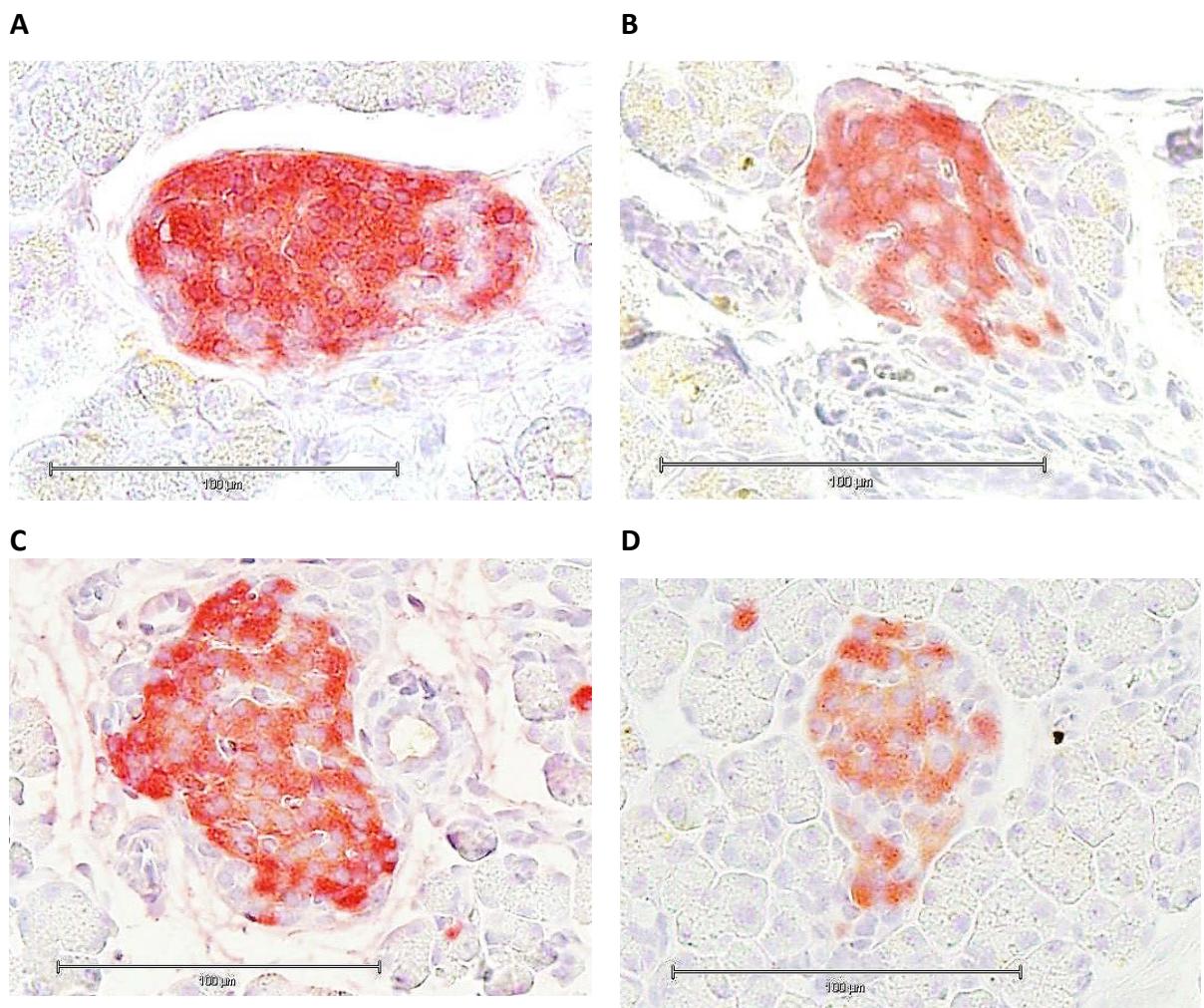
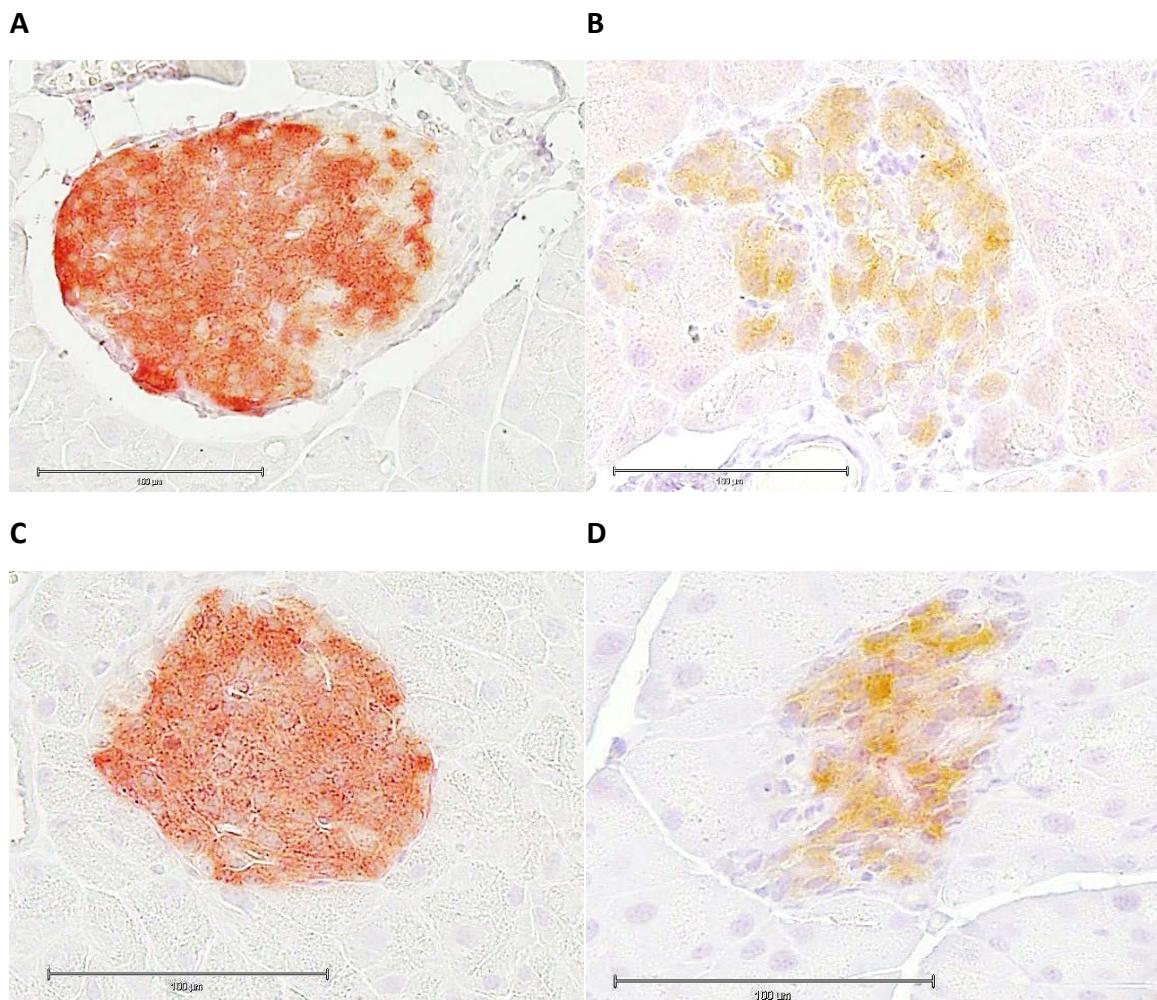


Abbildung 4.35 Inselprofile von GIPR<sup>dn</sup> transgenen (B, D) und Wildtypmäusen (WT, A, C) der Linie FVB/N (A, C) und C57BL/6 (B, D) am 10. Lebenstag, Insulin-Immunhistochemie

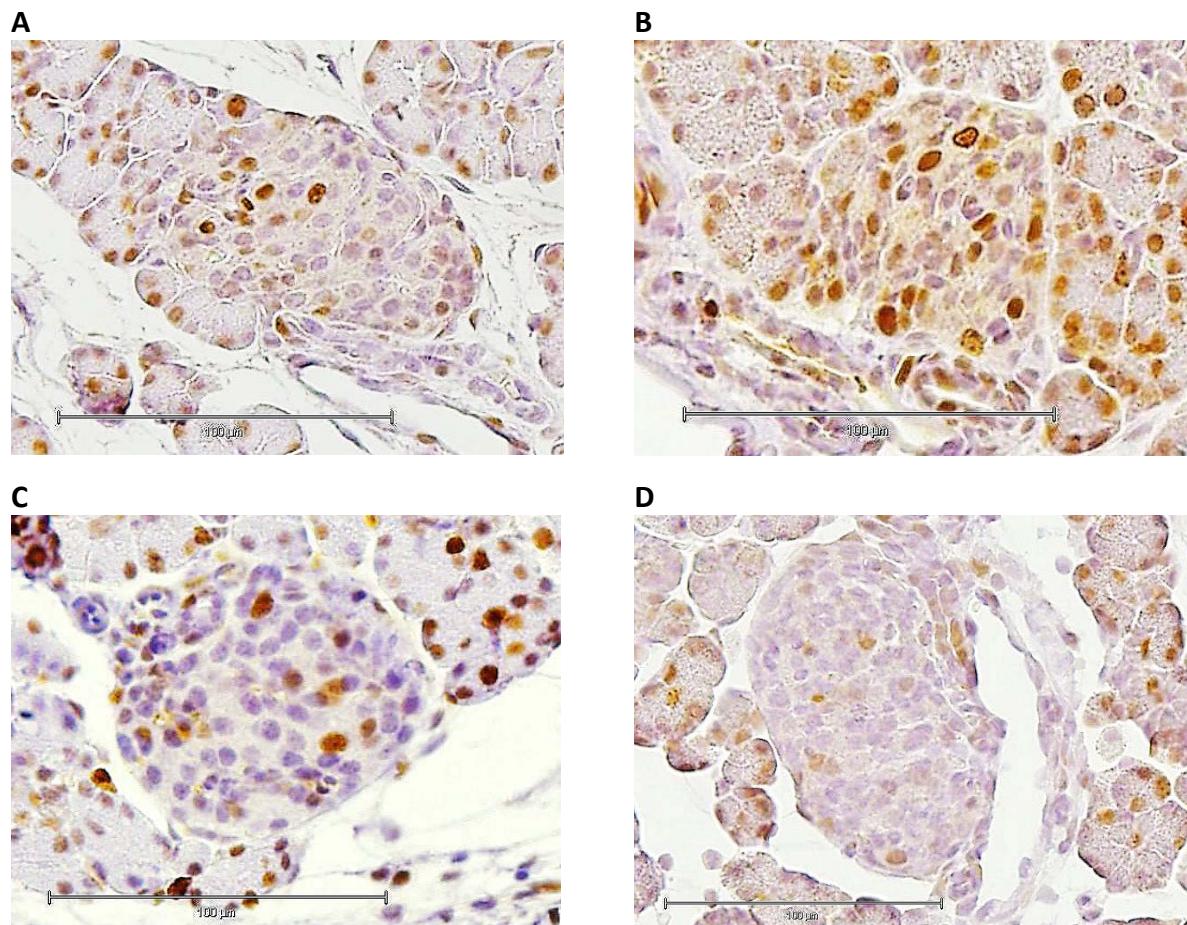
Mit 90 Tagen ließ sich sofort erkennen, welche Insel von einem GIPR<sup>dn</sup> transgenen Tier stammt und welche von einem Wildtypen. Die Insulinfärbung bei transgenen Tieren war wesentlich schwächer und es waren weniger Zellen, die Insulin positiv markieren, erkennbar. Insulinnegative Zellen waren bei transgenen Tieren beider Linien über das gesamte Inselprofil verteilt zu finden, bei Wildtypen lagen diese Nicht-Betazellen maustypisch in der Peripherie der Insel (Abbildung 4.36).



**Abbildung 4.36 Inselprofil von GIPR<sup>dn</sup> transgenen (B, D) und Wildtypmäusen (WT, A, C) der Linie FVB/N (A, C) und C57BL/6 (B, D) am 90. Lebenstag, Insulin-Immunhistochemie**

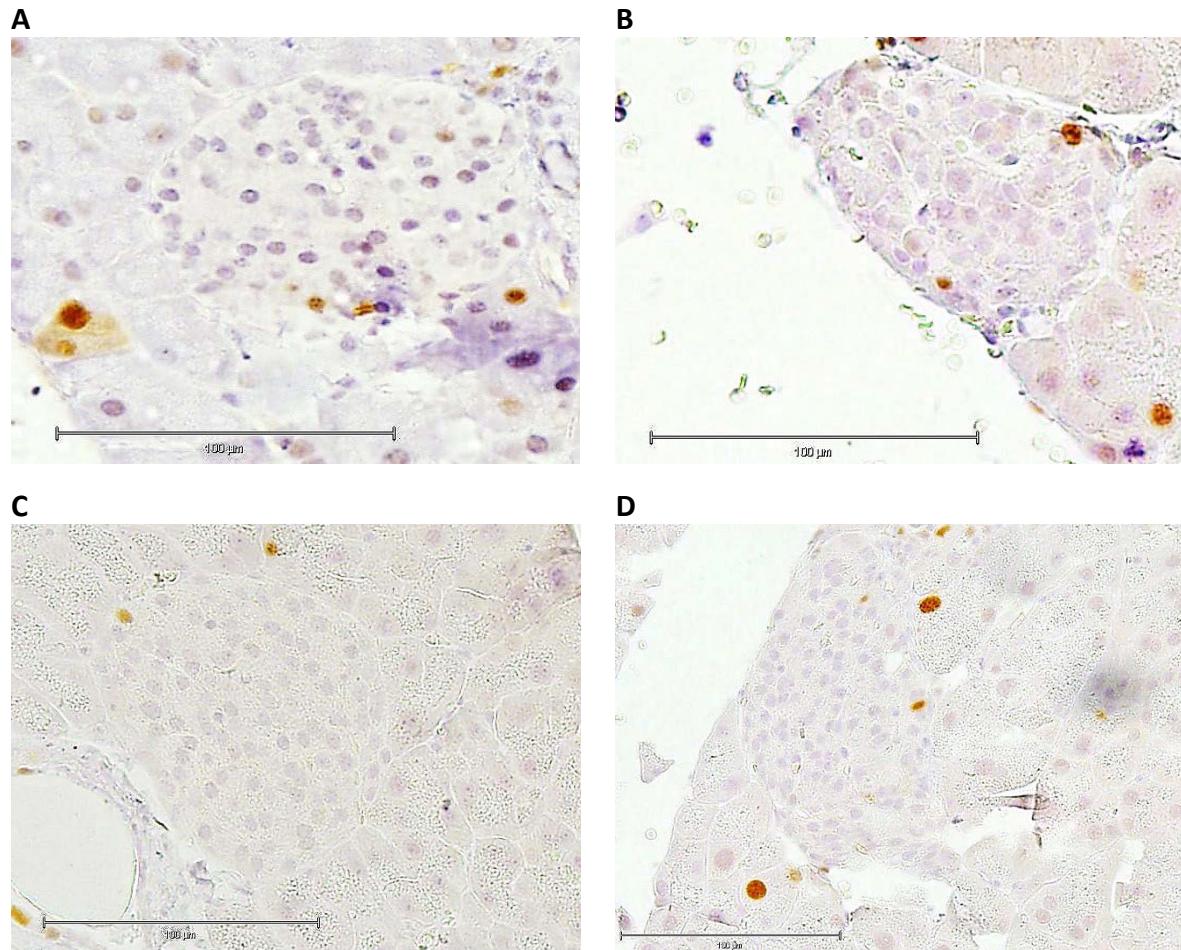
#### 4.19.2 PCNA Immunhistochemie

Bei den 10 Tage alten Mäusen ließen sich zahlreiche replizierende Zellen finden. Die Anzahl der gezählten immunhistochemisch gefärbten Zellkernanschnittsprofile variierte in den unterschiedlichen Inseln stark, jedoch unabhängig davon, von welcher untersuchten Tiergruppe die Insel stammte (Abbildung 4.37, Abbildung 4.38).



**Abbildung 4.37 Inselprofil von GIPR<sup>dn</sup> transgenen (B, D) und Wildtypmäusen (WT, A, C) der Linie FVB/N (A, C) und C57BL/6 (B, D) am 10. Lebenstag, PCNA Immunhistochemie**

Auch bei den 90 Tage alten Mäusen war die Replikationsrate nicht verschieden. Es fiel jedoch sofort auf, dass nur noch vereinzelt Zellkerne immunhistochemisch markiert waren, was einen sehr großen Unterschied zu den Inseln der 10 Tage alten Mäuse darstellte.



**Abbildung 4.38** Inselprofil von GIPR<sup>dn</sup> transgenen (B, D) und Wildtypmäusen (WT, A, C) der Linie FVB/N (A, C) und C57BL/6 (B, D) am 90. Lebenstag, PCNA Immunhistochemie

## 5. Diskussion

### 5.1. Diskussion genereller Aspekte der Studie

Weltweit waren im Jahr 2013 382 Millionen Menschen an DM erkrankt. Das sind 8,3 % der Gesamtbevölkerung. Schätzungen zufolge solle sich die Zahl der Diabetiker bis zum Jahr 2035 nahezu verdoppeln. Der Hauptteil der Erkrankten sind dabei Typ 2 Diabetiker. (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013). In Deutschland werden im Moment durchschnittlich 20 % der Jahresausgaben der gesetzlichen Krankenkassen auf die Behandlung von DM und seinen Folgeerkrankungen verwendet (DEUTSCHE DIABETES UNION, 2007). Diese Zahlen unterstreichen die momentane Bedeutung von DM. Die Lebensqualität eines Typ 2 Diabetikers kann durch die Krankheit massiv eingeschränkt sein und oftmals kommt es durch kardiovaskuläre Komplikationen oder Nierenversagen als Spätfolge des Diabetes zu einem verfrühten Tod. Wenngleich viele Risikofaktoren identifiziert wurden, sind die genauen Ursachen für Typ 2 Diabetes noch immer nicht bekannt.

Sowohl für die Erforschung von Pathomechanismen des Typ 2 DM und seinen Spätkomplikationen als auch für die Entwicklung von Therapieansätzen stellen Mausmodelle eine gute Basis dar. Die GIPR<sup>dn</sup> transgene Maus, die zunächst auf CD1 Hintergrund gezüchtet und charakterisiert wurde, hat sich als sehr gut geeignetes Diabetes-Modell herauskristallisiert. Da diese Mäuse einen schweren Diabetes mit Hyperglykämie, Hypoinsulinämie, Polydipsie, Polyurie, Glukosurie und Gewichtsabnahme (HERBACH et al., 2005) entwickeln, weisen sie vom klinischen Status her Symptome eines Menschen mit Diabetes mellitus Typ 2 auf. Außerdem zeigen GIPR<sup>dn</sup> transgene Mäuse fortgeschrittene diabetesassoziierte Alterationen an der Niere, weswegen sie sich als Forschungsmodell für die Diabetische Nephropathie eignen (HERBACH et al., 2009). Es konnte auch nachgewiesen werden, dass sich der diabetische Phänotyp der GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäuse durch eine ballaststoffreiche Diät deutlich abmildert (HERBACH et al., 2008). Ernährung ist für die Behandlung von Diabetes Typ 2 beim Menschen höchst relevant, daher ist das Mausmodell auch in dieser Hinsicht sehr wertvoll. Außerdem weist das in der Vergangenheit häufig benutzte Streptozotocin (STZ) diabetische Mausmodell Schwächen auf. Es konnte gezeigt werden, dass der High-Responder-Stamm C57Bl/6J nach STZ Applikation nur einen milden Diabetes entwickelt im Vergleich zu C57Bl/6J Mäusen, welche einen

genetisch bedingten (Akita-Mutation) Diabetes zeigen (GURLEY et al., 2006). Damit ist ein genetisch bedingter Diabetes dem chemisch induzierten Diabetes im Mausmodell vorzuziehen, besonders, da STZ auch Tumore auslösen kann, die die Versuchsergebnisse unter anderem durch Einschränkung des allgemeinen Gesundheitsstatus beeinträchtigen könnten. Dass außerdem der genetische Hintergrund, auf den eine Mutation verbracht wird, den diabetischen Phänotyp beeinflusst, wurde in der Vergangenheit mehrfach gezeigt (COLEMAN, 1992; BROSIUS et al., 2009; GURLEY et al., 2010). Die Rückkreuzung der GIPR<sup>dn</sup> transgenen Maus auf verschiedene genetische Hintergründe ist daher sinnvoll, da verschiedene Mäusstämme eine unterschiedliche Suszeptibilität hinsichtlich der Ausprägung des diabetischen Phänotyps, der Schwere der morphologischen Veränderungen am Pankreas und des Ausmaßes der Spätkomplikationen aufweisen. Dass dies zumindest bei der Diabetischen Nephropathie der Fall ist, zeigte die Studie von Popper 2013, in der GIPR<sup>dn</sup> transgene Mäuse auf BALB/c Hintergrund rückgekreuzt wurden (C.CD1-GIPR<sup>dn</sup>). Die diabetischen Tiere auf CD1 Hintergrund entwickelten signifikant höhere Albuminurie, signifikante podozytäre Hypertrophie und stärkere glomerulosklerotische Veränderungen als C.CD1-GIPR<sup>dn</sup>. Letzteres ist vermutlich durch das größere Glomerulumvolumen bei transgenen CD1 Mäusen im Vergleich zu C.CD1-GIPR<sup>dn</sup> verursacht, weshalb ein hohes Podozytenvolumen als angeborene Prädisposition für Glomerulosklerose vermutet wird (POPPER, 2013). Daher zeigte die Studie, dass der genetische Hintergrund CD1 besser geeignet ist, um mit GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäusen die späteren Stadien der diabetischen Nephropathie zu untersuchen als der genetische Hintergrund BALB/c. Ein Einfluss des genetischen Hintergrunds auf die Ausprägung einer diabetischen Nephropathie wurde auch bei Streptozotocin-induziertem Diabetes gezeigt. In einer Studie zeigt sich der häufig für die Forschung genutzte Stamm C57Bl/6J weitgehend resistent gegenüber diabetischer Nephropathie, während die Stämme DBA/2J und KK/Hij signifikant höhere Albuminurie und stärkere glomeruläre Alterationen aufweisen. Der ebenfalls untersuchte Stamm FVB/N zeigt in der Studie Polyurie, erhöhte Harnkreatininwerte und ordnet sich mit der Empfänglichkeit intermediär ein (QI et al., 2005). In einer weiteren Studie mit dem Stamm C57Bl/6J kann dessen Unempfänglichkeit für diabetische Nephropathie infolge STZ-Injektionen bestätigt werden, während Mäuse des Stamms CD1 infolge der einmaligen STZ-Injektion nach circa drei Monaten fortgeschrittene renale Alterationen entwickeln und sechs bis sieben Monate nach Diabetesbeginn versterben (SUGIMOTO et al., 2007).

Es ist durchaus möglich, dass andere genetische Hintergründe als CD1 noch besser geeignet sind, den Diabetes mellitus und dessen Spätfolgen am GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mausmodell zu untersuchen. In der Diabetesforschung wird sehr häufig der Stamm C57Bl/6J verwendet, obwohl es sich um einen relativ diabetesresistenten oder intermediär empfänglichen Stamm handelt (QI et al., 2005; CLEE & ATTIE., 2007, BERGLUND et al., 2008). Daher ist die Charakterisierung des diabetischen Phänotyps und der morphologischen Veränderungen des Pankreas im GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mausmodell auf diesem Hintergrund von großer Relevanz. In der vorliegenden Studie wurden der diabetische Status und die Pankreasveränderungen GIPR<sup>dn</sup> transgener Mäuse auf C57Bl/6J Hintergrund mit transgenen Mäusen auf dem genetischen Hintergrund FVB/N verglichen. Die Befunde, die bei den zwei neuen Linien erhoben wurden, werden im Folgenden mit den Untersuchungsergebnissen einer ähnlichen Studie, in der GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäuse auf CD1 Hintergrund untersucht wurden, diskutiert, um beurteilen zu können, welcher genetische Hintergrund sich am besten für welche Fragestellung eignet.

In der vorliegenden Studie wurden kongene Inzuchtstämme generiert, indem GIPR<sup>dn</sup> transgene Mäuse auf CD1 Hintergrund über mindestens 10 Generationen hinweg auf C57Bl/6J und auf FVB/N Hintergrund zurück gekreuzt wurden (B6.CD1-GIPR<sup>dn</sup>, F.CD1-GIPR<sup>dn</sup>). Anschließend wurde anhand von mehreren Blutglukosemessungen, eines Insulintoleranztests, dem Messen von Stoffwechselfunktionen innerhalb von 24 Stunden und einem oralen Glukosetoleranztest eine genaue klinische Charakterisierung des diabetischen Status der beiden GIPR<sup>dn</sup> transgenen Linien im Vergleich zu nicht-transgenen Wurfgeschwistern durchgeführt. Dafür wurden jeweils acht transgene Mäuse und acht Wildtypen jeder Linie untersucht. Für die morphometrische Analyse des Pankreasgewebes und insbesondere auch der postnatalen Entwicklung des Pankreas wurden verschiedene Parameter wie Pankreasvolumen, Gesamtinsel- und -betazellvolumen bei jeweils sechs transgenen Mäusen und sechs Wildtypen im Alter von 10 und 90 Tagen bei beiden Linien bestimmt. Dies ermöglicht einen umfassenden Vergleich der unterschiedlichen klinischen Ausprägung des Diabetes mellitus und eventueller Unterschiede in der postnatalen Entwicklung des Pankreas zwischen den beiden untersuchten Mäuselinien.

## 5.2. Klinische Untersuchungen

Wenn man die frei gefütterten Körpermassen der Wildtypen beider Linien und der transgenen Wurfgeschwister zu mehreren Zeitpunkten vergleicht, fällt auf, dass die transgenen Mäuse zwar immer ein tendenziell niedrigeres Gewicht haben, als die Wildtypen, aber dieser

Unterschied ist nicht signifikant. Bei GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäusen auf CD1 Hintergrund ist das Körpergewicht an Tag 30 und Tag 90 signifikant niedriger als bei gleichalten Wildtypen, wobei zu bedenken ist, dass es sich bei diesen Werten um korrigierte Werte handelt, bei denen der Inhalt von Magen und Darm abgezogen wurde, da transgene Tiere einen signifikant stärker gefüllten Darm in Folge der Hyperphagie aufweisen (HERBACH et al., 2005). Möglicherweise ist die starke Füllung des Darmtrakts aufgrund der Hyperphagie (s.u.) dafür verantwortlich, dass eine eventuelle Abnahme von tatsächlicher Körpermasse verschleiert wird und deswegen bei frei gefütterten Mäusen keine Unterschiede im Körpergewicht bestehen. Mit 90 Tagen weisen die F.CD1-GIPR<sup>dn</sup> das niedrigste Körpergewicht auf, welches zu diesem Zeitpunkt nach 15 Stunden Fasten gewogen wurde. Auch die B6.CD1-GIPR<sup>dn</sup> weisen nüchtern ein niedrigeres Körpergewicht auf als die Wildtypen der Linie, was die These einer Verschleierung der Abnahme des Körpergewichts durch Hyperphagie, und damit mehr Darminhalt, stärkt. Jedoch ist dieser Unterschied bei B6.CD1-GIPR<sup>dn</sup> nicht signifikant. Weitere Untersuchungen belegen, dass bei GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäusen auf CD1 und BALB/c (C) Hintergrund das Körpergewicht mit 6 Monaten signifikant niedriger ist als bei gleichalten Wildtypen, wobei in dieser Studie das Körpergewicht nicht um den gastrointestinalen Inhalt korrigiert ist (POPPER, 2013). Die Reduktion von Muskel- und Fettgewebe als Folge der Hypoinsulinämie/Hyperglykämie wurde in früheren Untersuchungen für die Reduktion des Körpergewichts verantwortlich gemacht (HERBACH et al., 2008). Bei B6.CD1-GIPR<sup>dn</sup> könnte demnach die weniger ausgeprägte Störung der Glukosehomöostase (s.u.) zum Erhalt des Körpergewichts beitragen. Bei F.CD1-GIPR<sup>dn</sup> sind die Blutglukosespiegel jedoch ähnlich hoch wie bei GIPR<sup>dn</sup> x CD1 (s.u.), womit eine ähnliche Körpergewichtsreduktion bei beiden Stämmen zu erwarten wäre.

Bei F.CD1-GIPR<sup>dn</sup> lässt sich bereits mit 21 Tagen mit Hilfe eines Teststreifens eine schwere Glukosurie feststellen, bei B6.CD1-GIPR<sup>dn</sup> entwickelt sich erst zwischen 35 und 40 Tagen eine Glukosurie, die meist nicht so ausgeprägt ist wie bei F.CD1-GIPR<sup>dn</sup>, was auf ein späteres Einsetzen des Diabetes hinweist. Der Diabetes bei GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäusen auf CD1 Hintergrund setzt circa zwischen 14 und 21 Tagen ein, was wahrscheinlich durch eine Umstellung von Milch auf feste Nahrung bedingt ist, wodurch die GIP/GIPR-Achse zunehmend an Bedeutung gewinnt (HERBACH et al., 2005). Bei der Untersuchung der Blutglukose zeigen die GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäuse beider Linien schon am 10. Lebenstag leicht erhöhte Werte gegenüber ihren nicht-transgenen Wurfgeschwistern. Dieser Unterschied wird bei F.CD1-GIPR<sup>dn</sup> am 21. Lebenstag signifikant und bei B6.CD1-GIPR<sup>dn</sup> erst am 45. Lebenstag. Dementsprechend ist die

Blutglukose der B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> auch schon am 21. Lebenstag signifikant niedriger als die der F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup>. Dieser Unterschied vergrößert sich mit fortschreitendem Alter weiter, sodass die F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> mit 80 Tagen doppelt so hohe Glukosewerte zeigen als die B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup>. Die Blutglukosespiegel der Wildtypen beider Linien unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Verantwortlich für die Hyperglykämie ist auf zellulärer Ebene wahrscheinlich eine verminderte Exozytose von Insulin, die durch einen Defekt von  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom ausgelöst ist, der durch ein stark eingeschränktes Wirken von GIP bedingt ist. Zusätzlich wurden bei *GIPR*<sup>dn</sup> transgenen Mäusen auf CD1 Hintergrund postprandial erhöhte Glukagonwerte festgestellt (HERBACH et al., 2005). Glukagon führt über Miniglukagon zu einer Schließung von spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$  Kanälen und somit wird zusätzlich die insulinotrope Wirkung von Glukose und GLP-1 verhindert (DALLE et al., 2004). Dass die Blutglukosewerte der B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> signifikant niedriger sind als die Werte der F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> ist vermutlich durch die größere funktionelle Betazellmasse von B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> erklärt, womit mehr Betazellen zur Verfügung stehen, die Insulin sezernieren (siehe 5.3). Es wäre auch denkbar, dass die Betazellfunktion bei F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> durch die Expression des mutierten Rezeptors stärker gestört ist als bei B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup>.

Auch die Nüchternblutglukosewerte der B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> sind gegenüber den F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> signifikant niedriger, während sich die Wildtypen beider Linien nicht signifikant unterscheiden. B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> zeigen nach 15 Stunden Fasten zwar noch signifikant höhere Werte als die nicht-transgenen Wurfgeschwister, viele der transgenen Mäuse weisen jedoch Blutglukosewerte unter 150 mg/dl auf. Bei der Maus sind Nüchternglukosespiegel von 220 mg/dl häufig noch kein Indiz für einen Diabetes mellitus (CLEE & ATTIE, 2007). F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> weisen dagegen stark erhöhte Nüchternglukosespiegel gegenüber ihren nicht transgenen Wurfgeschwistern auf. Vergleicht man die Nüchternblutglukosewerte *GIPR*<sup>dn</sup> transgener Mäuse auf CD1 Hintergrund am Tag 90 mit B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> weisen B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> transgene Mäuse nur halb so hohe Werte auf wie die *GIPR*<sup>dn</sup> x CD1, während F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> fast identisch hohe Blutglukosewerte erreichen (HERBACH et al., 2011). Ausgehend von den Blutglukosewerten können F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> Mäuse als diabetesempfänglich im *GIPR*<sup>dn</sup> Mausmodell eingeordnet werden, während B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> Mäuse eher diabetesresistent sind. Eine Seruminsulinmessung könnte zeigen, ob die beiden Linien unterschiedliche Insulinspiegel aufweisen. Bei der Ursprungslinie *GIPR*<sup>dn</sup> zeigen die *GIPR*<sup>dn</sup> transgenen Mäuse ab dem 30. Lebenstag signifikant niedrigere Seruminsulinwerte als nicht-transgene Wurfgeschwister. Frei gefüttert weisen männliche *GIPR*<sup>dn</sup> trans-

gene Mäuse mit 30 Tagen 18,8fach reduzierte Seruminsulinwerte auf ( $p<0,05$ ) und postprandial zeigen sie mit 90 Tagen 6,9 fach reduzierte Seruminsulinwerte ( $p<0,05$ , HERBACH et al., 2005). Der pankreatische Insulingehalt ist bei GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäusen signifikant niedriger (~ 70 %) als bei nicht-transgenen Wurfgeschwistern (HERBACH et al., 2011). Bei einem Vergleich der Insulinaktion der beiden Stämme FVB/N und C57Bl/6 zeigten die Tiere des Stammes FVB/N auf Hyperglykämie keine erhöhte Insulinausschüttung, während die Mäuse des Stammes C57Bl/6 in vivo intermediär auf Glukosezufuhr reagieren. An isolierten Inseln wies der Stamm C57Bl/6 eine schwächere glukosestimulierte Insulinsekretion auf als *in vivo* (BERGLUND et al., 2008). Der Mäusestamm C57Bl/6J hat sich in der Vergangenheit oft relativ resistent gegenüber Diabetesentwicklung gezeigt. So weisen db/db Mutanten auf C57Bl/6J Hintergrund nur milden Diabetes auf (COLEMAN, 1992) und auch ob/ob Mutanten auf B6 Hintergrund zeigen nur eine schwache Hyperglykämie und keine verlangsamte Triglycerid-Clearance (YAMAUCHI et al., 2001). Der genetische Hintergrund hat einen starken Einfluss auf die Schnelligkeit der Triglycerid-Clearance, welche wiederum wichtig für die Ausprägung des diabetischen Phänotyps ist (HALUZIK et al., 2004). Auch ohne genetische Mutation zeigen verschiedene Mäusestämme unterschiedliche Glukosemetabolismusregulierungen. So weisen Mäuse des Stamms FVB/N nur eine schwache Reaktion auf Hyperglykämie mit keiner signifikant erhöhten Insulinausschüttung und einer relativen Insulinresistenz in der Leber auf, aber sie zeigen die höchste Gegenregulierung der in einer Studie untersuchten Mäusestämme bei Hypoglykämie. Der Stamm C57Bl/6J ordnet sich mit seinen Reaktionen auf Hyper- und Hypoglykämie eher intermediär zwischen den in der Studie untersuchten Mäusestämmen ein, weist aber ohne Stimulation die höchsten Glukose- und Glukagonwerte auf, während die Mäuse des Stamms FVB/N die niedrigsten Basisglukagonwerte zeigen (BERGLUND et al., 2008).

Im Insulintoleranztest sprechen die GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäuse beider Linien auf Insulin an, wobei B6.CD1-GIPR<sup>dn</sup> normoglykämische Bereiche erreichen, während die F.CD1-GIPR<sup>dn</sup> noch circa 100 mg/dl über den Ausgangswerten liegt. Die Fläche unter der Glukosekurve während des Insulintoleranztests von F.CD1-GIPR<sup>dn</sup> ist signifikant höher als bei Wildtypen und bei B6.CD1-GIPR<sup>dn</sup>. Bei B6.CD1-GIPR<sup>dn</sup> ist kein Unterschied zu B6 Wildtypen zu finden und auch die Wildtypen untereinander unterscheiden sich nicht. Die Ergebnisse unterstreichen die Resultate von früheren Studien (HERBACH, 2002; HERBACH et al., 2011), dass GIPR<sup>dn</sup> transgene Mäuse mit einem ausgeprägten Diabetes mellitus eine milde Insulinresistenz entwickeln, die

von der chronischen Hyperglykämie herrührt (DEL PRATO, 2009). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass gesunde FVB/N Mäuse eine hepatische Insulinresistenz gegenüber anderen Inzuchtstämmen wie z.B. B6 entwickeln (BERGLUND et al., 2008). In der vorliegenden Untersuchung zeigten FVB/N Wildtypen jedoch lediglich 10 Minuten nach Insulingabe höhere Glukosespiegel als C57Bl/6J Wildtypen.

Beim oralen Glukosetoleranztest erreichen die B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> Mäuse 10 Minuten nach Glukoseverabreichung ähnlich hohe Werte wie F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> und beide Linien zeigen die gesamte Testdauer einen ähnlichen Kurvenverlauf. Die Wildtypen zeigen im gesamten Verlauf des oralen Glukosetoleranztest ebenfalls einen ähnlichen Verlauf der Glukosekurve und unterscheiden sich nie signifikant voneinander. Generell lässt sich bei den transgenen Mäusen beider Linien eine stark beeinträchtigte Glukosetoleranz feststellen. Anders als bei den Inkretinrezeptor-Knockout Mausmodellen (GLP-1<sup>-/-</sup>, GIPR<sup>-/-</sup>, DIRKO) ist bei der GIPR<sup>dn</sup> transgenen Maus keine Kompensation des Ausfalls von GIP zu erwarten, da der GIP Rezeptor nicht ausgeschaltet ist, sondern nur ein mutierter GIP Rezeptor exprimiert wird, bei dem keine Signaltransduktion in Anschluss an die Kopplung von GIP eingeleitet wird. Es werden auch endogene GIP Rezeptoren exprimiert und diese konkurrieren mit den dominant negativen GIP Rezeptoren um den Liganden. Es kommt nicht zu einer kompensatorischen Erhöhung von GLP-1, wie es in GIPR<sup>-/-</sup> Mäusen der Fall ist (PAMIR et al., 2003). Jedoch weisen GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäuse eine signifikant erniedrigte Sekretion von Insulin gegenüber Wildtypen infolge GLP-1 Stimulation auf und die Glukagonsekretion wird durch Glukosegabe nicht gehemmt (HERBACH et al., 2011). Interessanterweise zeigen die B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> eine ähnlich starke Glukoseintoleranz wie die F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup>, obwohl das Gesamtbetazellvolumen bei B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> etwa doppelt so hoch ist als bei F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> und zudem B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> keine Insulinresistenz aufweisen. Dies legt den Schluss nahe, dass die Betazellfunktion bei B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> durch die Expression des mutierten Rezeptors stärker beeinflusst ist als bei F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup>. Da die starke Störung der Glukosetoleranz den gering veränderten frei gefütterten Glukosespiegeln widerspricht, könnte es auch sein, dass bei B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> Mäusen Glukose alleine keine so gute Betazellantwort im Sinne einer Insulinsekretion hervorruft als handelsübliches Futter.

Beim Vergleich der Stoffwechselfunktionen zeigen die GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäuse auf FVB/N Hintergrund sowohl im Vergleich zu den FVB/N Wildtypen, als auch im Vergleich zu den B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> einen vielfach höheren Wasserverbrauch in 24 Stunden und entsprechend

auch eine viel höhere Harnproduktion. B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> weisen ebenfalls eine deutliche Polyurie auf, die jedoch signifikant niedriger ist als bei den F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup>. In einer anderen Studie, bei der streptozotozindiabetische Mäuse verglichen wurden, zeigen FVB/N Mäuse ebenfalls eine ausgeprägtere Polyurie als C57Bl/6J Mäuse (QI et al., 2005). Mit 6 Monaten zeigen die GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäuse auf CD1 Hintergrund einen vierfach erhöhten Wasserkonsum und ein fünffach erhöhtes 24 Stunden Urinvolumen, während die C.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> nur einen dreifach erhöhten Wasserkonsum aufweisen und ein zwar signifikant erhöhtes Urinvolumen im Vergleich zu den Wildtypen, jedoch gegenüber den GIPR<sup>dn</sup> x CD1 ein signifikant niedrigeres Harnvolumen (POPPER, 2013). Die Linie B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> zeigt von den fünf untersuchten Stämmen die geringste Polyurie, GIPR<sup>dn</sup> transgene Mäuse auf CD1 Hintergrund und F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> zeigen die höchsten Urinvolumina. Die Ausprägung von Polyurie und Polydipsie sind am ehesten durch das Ausmaß der gestörten Glukosehomöostase bedingt und es gibt eine starke Korrelation zwischen der Hyperglykämie am 80sten Lebenstag und der Polyurie und Polydipsie. Die transgene Mäuse auf F, C und CD1 Hintergrund weisen neben stark erhöhtem Wasserverbrauch und Urinproduktion einen erhöhten Futterverbrauch gegenüber den zugehörigen Wildtypen auf, während B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> nur geringe Abweichungen von den Kontrolltieren zeigen. Erhöhte Nahrungszufuhr kann bei GIPR<sup>dn</sup> x CD1 und C.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> eine Gewichtsabnahme durch einen Insulinmangel jedoch nicht kompensieren (POPPER, 2013).

### 5.3. Quantitativ-stereologische Untersuchungen

Das Pankreasgewicht von F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> und B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> unterscheidet sich am zehnten Lebenstag nicht signifikant von nicht-transgenen Wurfgeschwistern. Auch GIPR<sup>dn</sup> x CD1 Mäuse weisen mit 10 Tagen keinen signifikanten Unterschied im Pankreasgewicht gegenüber Wildtypen auf, genauso wenig wie im Alter von 30 und 90 Tagen (HERBACH et al., 2005). Mit 90 Tagen jedoch zeigen F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> signifikant niedrigere Pankreasgewichte als FVB/N Wildtypen. Da das endokrine Pankreas nur 1 - 2 % des Gewichts der gesamten Bauchspeicheldrüse ausmacht, ist durch eine Inselatrophie kein Unterschied im Gewicht oder Volumen des Pankreas zu erwarten. Das deutlich niedrigere Pankreasgewicht und -volumen der F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> im Alter von 90 Tagen könnte von einem verminderten Wachstum durch Insulinmangel herröhren, jedoch wird von keinem stärkeren Einfluss von Insulin als Wachstumsfaktor auf das exokrine Pankreas berichtet (ZHANG & LIU, 2014). Auch GIP, dessen Signaltransduktion in den

GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäusen unterbunden ist, ist ein Wachstumsfaktor für das endokrine Pankreas, aber es ist keine Wirkung auf das exokrine Pankreas bekannt (BUTEAU et al., 1999). Interessant ist, dass das Pankreasgewicht der Wildtypen beider Linien mit 90 Tagen so stark voneinander abweicht. Obwohl sich das Körpergewicht der untersuchten Mäuse zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant voneinander unterscheidet, weisen FVB/N Wildtypen doch ein um circa 20 % höheres Pankreasgewicht auf als B6 Wildtypen. Als Ursache dafür muss auch ein physiologisch niedrigeres Pankreasgewicht des Stamms C57Bl/6J in Betracht gezogen werden. Genauso, wie die Inselmasse durch den genetischen Hintergrund beeinflusst wird, kann das Pankreasgewicht dadurch beeinflusst sein. So weist der Stamm C57Bl/6J auch ein signifikant niedrigeres relatives Pankreasgewicht auf als die Stämme BALB/c und DBA/2 (BOCK et al., 2005). Das relative Pankreas der FVB/N Wildtypen der vorliegenden Studie ist mit 1,7% deutlich höher als bei anderen Wildtypstämmen und auch als bei FVB/N Mäuse aus anderen Untersuchungen (BÖTTINGER et al., 1997; SHAMSI et al., 2014). Der Grund hierfür ist unklar. Das Pankreasgewicht der beiden transgenen Linien unterscheidet sich zu keinem der untersuchten Zeitpunkte und war auch in früheren Studien nie verschieden (HERBACH et al., 2005; HERBACH et al., 2011).

Das Gesamtinselvolumen GIPR<sup>dn</sup> transgener Mäuse beider Linien ist am Tag 10 nur tendenziell niedriger als bei den entsprechenden Wildtypen. Neunzig Tage alte F.CD1-GIPR<sup>dn</sup> dagegen zeigen ein mehr als vierfach niedrigeres Gesamtinselvolumen als FVB/N Wildtypen ( $p<0,01$ ) und ein etwas niedrigeres Gesamtinselvolumen als gleichalte B6.CD1-GIPR<sup>dn</sup> (n.s.). Das Gesamtinselvolumen bei B6.CD1-GIPR<sup>dn</sup> ist im Vergleich zu Kontrollen nahezu auf 50% reduziert ( $p<0,01$ ). Dagegen weisen FVB/N Wildtypen ein mehr als doppelt so hohes Gesamtinselvolumen wie C57Bl/6J Wildtypen auf ( $p<0,01$ ). Die FVB/N Wildtypen weisen auch eine doppelt so hohe Volumendichte der Inseln im Pankreas auf wie die C57Bl/6J Wildtypen, was dagegen spricht, dass das hohe Gesamtinselvolumen alleinig durch das hohe Pankreasgewicht bedingt ist. Die Volumendichte der Inseln im Pankreas bei F.CD1-GIPR<sup>dn</sup> ist nur halb so groß wie bei nicht-transgenen Wurfgeschwistern am 90. Lebenstag. Bei B6.CD1-GIPR<sup>dn</sup> dagegen ist die Volumendichte der Inseln im Pankreas am 90. Lebenstag nur um circa 30% reduziert gegenüber den Wildtypen. Bei F.CD1-GIPR<sup>dn</sup> ist die Volumendichte der Betazellen in den Inseln signifikant reduziert gegenüber den nicht-transgenen Wurfgeschwistern und gegenüber B6.CD1-GIPR<sup>dn</sup>. Letztere dagegen weisen keine geringere Volumendichte der Betazellen in den Inseln auf als ihre nicht-transgenen Wurfgeschwister. Die Reduktion des Gesamtbetazellvolumens von

B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> lässt sich damit alleinig auf das reduzierte Gesamtinselvolumen zurückführen, während es bei den F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> auf eine Reduktion des Gesamtinselvolumens zurückzuführen ist und die Inseln überdies mit weniger Betazellen ausgestattet sind. Die Komposition der Inseln hat sich als essentiell für die Betazellfunktion erwiesen (HERBACH et al., 2007) (HERBACH et al., 2005). Demnach kann die stärker gestörte Glukosehomöostase von F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> durch additive Effekte einer gestörten GIPR-Funktion, einer reduzierten Betazellmasse und einer gestörten Betazellfunktion durch veränderte Komposition der Inseln ausgelöst sein. Die Veränderungen im endokrinen Pankreas bedeuten, dass transgene Mäuse beider Linien infolge der Expression des mutierten GIPR im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypen weniger Inselmasse gebildet haben und/oder mehr Betazellen zugrunde gehen. Im zeitlichen Verlauf weisen sowohl die Wildtypen als auch die GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäuse beider Linien eine signifikante Zunahme des Gesamtinselvolumens auf. Diese ist allerdings bei den Wildtypen wesentlich stärker ausgeprägt. Die Zunahme des Gesamtinselvolumens ist hauptsächlich verursacht durch Inselzellreplikation bei einer geringen Apoptoserate, aber auch durch Inselneogenese und Inselteilung (HERBACH et al., 2005; HERBACH et al., 2011). Die unterschiedliche Volumenzunahme des endokrinen Pankreas bei Wildtypen und GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäusen erklärt sich unter anderem durch die vielfältigen Funktionen von GIP. GIP erhöht nach Bindung an den G-Protein gekoppelten GIPR den intrazellulären cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) Gehalt und initiiert die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) mit nachfolgendem Schluss ATP-sensitiver K-Kanäle. Die daraus resultierende Membrandepolarisation führt zur Öffnung von spannungsabhängigen Calciumkanälen und zum Calciumeinstrom in die Betazelle und damit zur Insulinexozytose (HOLST, 1994). GIP steigert die Signaltransduktion von Proteinkinasen wie MAPK (mitogen-activated protein Kinase) oder CREB (cAMP regulatory element binder) (TRÜMPER et al., 2001). Über eine Modulation der p38 MAPK Aktivität kann GIP das Zellüberleben verbessern, da über eine Hemmung der Phosphorylierung von p38 MAPK deren antiapoptotische Wirkung durch Hemmung der Caspase-3 aufrechterhalten wird (EHSES et al., 2003). Außerdem hat GIP einen mitogenen Einfluss auf Betazellen über MAPK und ist synergistisch mit Glukose ein Wachstumsfaktor für differenzierte Betazellen über PKA/CREB, MAPK und PI3K/PKB (Phosphoinositid-3-Kinasen/Proteinkinase B) (TRÜMPER et al., 2001; TRÜMPER et al., 2002). Ein defekter Einstrom von  $Ca^{2+}$  und eine gestörte cAMP Produktion, infolge einer gestörten GIP-Signaltransduktion, führen zu einer mangelnden Aktivierung von p38 MAPK und CREB (ARNETTE et al., 2003) und damit zu einer beeinträchtigten Entwicklung des endokrinen

Pankreas. Ein dritter denkbarer Mechanismus, der zu einer Malformation des endokrinen Pankreas führen könnte, wäre eine gestörte Expression von Transkriptionsfaktoren wie Pdx-1 (homeobox Protein). Dieser Transkriptionsfaktor wird in der embryonalen Entwicklung vom Entoderm exprimiert und alle pankreatischen Zelltypen leiten sich von Pdx1 exprimierenden Progenitorzellen ab (MURTAUGH & MELTON, 2003). Wenn man GIP oder den GIPR inhibiert, führt das zu einer verminderten Anzahl von Pdx-1 positiven Zellen im embryonalen Pankreas (PRASADAN et al., 2011). Alle drei Mechanismen sind abhängig von einer Signaltransduktion G-Protein gekoppelter Rezeptoren und zeigen deren Wichtigkeit für die Inselentwicklung und –neogenese. Bei GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäusen auf CD1 Hintergrund sind bereits mit 10 Tagen das Gesamtinsel- und –betazellvolumen signifikant reduziert, also bereits vor Einsetzen des Diabetes. Daher können die Veränderungen noch nicht Folge des diabetischen Status, der Hyperglykämie und der Hypoinsulinämie, sein (HERBACH et al., 2005). Es gibt die Hypothese, dass der Wettbewerb um die Bindung von GIP zwischen endogenen GIP Rezeptoren und dominant negativen GIP Rezeptoren eine frühe Störung der GIP Rezeptor Signalübertragung auslöst, die eine beeinträchtigte Expansion des endokrinen Pankreas zur Folge hat (HERBACH et al., 2011), weil die mitotische und zellschützende Wirkung von GIP in Kombination mit Glukose stark beeinträchtigt wird (BAGGIO & DRUCKER, 2007).

GIPR<sup>dn</sup> transgene Mäuse beider in dieser Studie untersuchten Linien zeigen mit 90 Lebenstagen ein signifikant niedrigeres Gesamtbetazellvolumen als ihre nicht-transgenen Wurfgeschwister. Der Unterschied zwischen Wildtyp und B6.CD1-GIPR<sup>dn</sup> ist jedoch wesentlich geringer als bei F.CD1-GIPR<sup>dn</sup>. Das Gesamtbetazellvolumen von F.CD1-GIPR<sup>dn</sup> ist halb so hoch als bei B6.CD1-GIPR<sup>dn</sup>. FVB/N Wildtypen zeigen dagegen ein mehr als doppelt so hohes Gesamtbetazellvolumen als B6 Wildtypen. F.CD1-GIPR<sup>dn</sup> zeigen somit eine stärkere Störung des postnatalen Insel- und Betazellwachstums als B6.CD1-GIPR<sup>dn</sup>. Eine mögliche Erklärung könnte die Zunahme des Gesamtinsel- und Betazellvolumens der Wildtypen zwischen Tag 10 und Tag 90 sein, welche überwiegend durch die Vermehrung von Inseln und Betazellproliferation zu stande kommt (FINEGOOD et al., 1995; GEORGIA & BHUSHAN, 2004; HERBACH et al., 2011). Außerdem unterscheidet sich der Aufbau des endokrinen Pankreas zwischen den beiden Stämmen. Die F.CD1-GIPR<sup>dn</sup> zeigen subjektiv betrachtet eine deutlich erniedrigte Zahl an Inselprofilen im histologischen Schnitt und bei den verbliebenen Inseln färbt sich nur ein kleiner Teil der Zellen positiv für Insulin. Die FVB/N Wildtypen weisen dagegen sehr große Inselprofile

auf, bei denen der überwiegende Teil, circa 80 – 90 %, insulinpositiv gefärbt ist. Eine Unterscheidung zwischen Gewebe von transgenen Mäusen und Wildtypen ist auf den ersten Blick möglich. Bei den B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> und den C57Bl/6J Wildtypen dagegen fällt diese subjektive Unterscheidung deutlich schwerer. Auch bei der Ursprungslinie GIPR<sup>dn</sup> x CD1 ist die Architektur des endokrinen Pankreas verändert, die Insel- und Betazellzahlen sind bereits ab dem 10ten Lebenstag signifikant niedriger und die Größe der Inseln ist ab dem 90sten Lebenstag reduziert (HERBACH et al., 2011).

Die Empfänglichkeit für Diabetes kann bei den db/db BKS Mäusen (db/db auf C57BlKS/J Hintergrund) auf eine reduzierte Proliferation und hohe Apoptoseraten zurückgeführt werden. Die Hypothese, dass genetisch bedingte Unterschiede bei verschiedenen genetischen Hintergründen in der Proliferationskapazität und der Apoptosefrequenz zu einer Phänotyp-Varianz beitragen, wurde in einer Studie von Puff et al. (2011) bestätigt (PUFF et al., 2011). Schon vor Einsetzen des Diabetes weisen db/db Mäuse auf BKS Hintergrund höhere Apoptoseraten auf als db/db Mäuse auf C57Bl/6J (B6) Hintergrund. Die Replikation nimmt bei db/db BKS Mäusen mit zunehmendem Alter schnell ab, während die Replikationsrate bei db/db B6 Mäusen nur langsam abfällt und mit 12 Wochen noch doppelt so viele replizierende Zellen aufweisen wie die db/db BKS Mäuse. Die verminderte Replikation der db/db BKS Mäuse ist vermutlich nicht auf den Diabetes zurückzuführen, da Hyperglykämie replikationsfördernd ist (BONNER-WEIR et al., 1989; SWENNE, 1992; GUILLEMAIN et al., 2007; JETTON et al., 2008). Auch die fünffach höhere Apoptoserate bei den db/db BKS ist unabhängig vom Diabetes, da die Abweichungen zwischen den Linien schon vor Einsetzen des Diabetes bestanden. Dementsprechend zeigen die db/db BKS einem Abfall der Betazellmasse ab der zehnten Lebenswoche auf circa 3 mg, während die db/db B6 einen konstanten Anstieg der Betazellmasse bis auf 8 mg verzeichnen, was einen sehr unterschiedlichen diabetischen Phänotyp der beiden Linien auslöst (PUFF et al., 2011). Die Replikationsraten der C57Bl/6J Maus sind zum Beispiel doppelt so hoch wie die der eng verwandten C57Bl/6K Maus, die wesentlich empfänglicher für Diabetes ist (SWENNE & ANDERSSON, 1984). Dies legt den Schluss für die vorliegende Studie nahe, dass durch eine stärkere Proliferation der Betazellen bei B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> mehr Insel-/Betazellmasse erhalten bleibt. Wenn man die Replikationsraten der vier untersuchten Gruppen dieser Studie vergleicht, lassen sich am Tag 10 keinerlei signifikante Unterschiede feststellen. Am Tag 90 jedoch weisen die GIPR<sup>dn</sup> transgenen Tiere beider Linien eine signifikant höhere Replikation auf als die nicht-transgenen Wurfgeschwister, was als ein Regenerationsversuch gedeutet

werden kann. Allerdings zeigen die B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> keine höhere Replikation als F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup>. Da jedoch Replikationsraten im histologischen Schnitt nicht sehr genau zu bestimmen sind und es sich um eine Momentaufnahme handelt, zu einem Zeitpunkt (10 Tage) vor und nachdem die Reduktion der Inseln und Betazellen bereits vorlag, schließt die unveränderte Proliferationrate nicht aus, dass zu einem anderen Zeitpunkt unterschiedliche Replikationsraten vorlagen. Bei gesunden Mäusen und Ratten ist die Betazellreplikation hauptverantwortlich für die postnatale Expansion des endokrinen Pankreas (FINEGOOD et al., 1995; GEORGIA & BHUSHAN, 2004). Bis zu vier Monaten kommt es zu einer massiven Zunahme von Betazell- und Inselmasse; es kommt zur Verdopplung der Masse zwischen ein und zwei Monaten und zwischen drei und vier Monaten. Mit vier Monaten entspricht die Replikationsrate bei der Ratte etwa der Apoptoserate, wodurch die Betazellmasse ab diesem Zeitpunkt ungefähr gleich bleibt (FINEGOOD et al., 1995). Es konnte auch gezeigt werden, dass die Massenzunahme des endokrinen Pankreas durch einen Anstieg von Insel- und Betazellzahl verursacht ist, also mit einer Hyperplasie und nicht mit einer Hypertrophie einhergeht. Das heißt, dass die durchschnittliche Inselgröße gleich bleibt und die durchschnittliche Betazellgröße sogar zwischen Tag 10 und Tag 45 sinkt (HERBACH et al., 2011). Bei *GIPR*<sup>dn</sup> x CD1 transgenen Mäusen ist die Replikation, wie auch die Inselzellneogenese, signifikant reduziert gegenüber Wildtypen (HERBACH et al., 2005; HERBACH et al., 2011). Allerdings wurden replizierende Zellen in den Studien mit *GIPR*<sup>dn</sup> x CD1 Mäusen durch BrdU markiert, während in dieser Studie eine Färbung durch PCNA gewählt wurde, wodurch die Ergebnisse nicht vergleichbar sind. Die durchschnittliche Inselgröße nimmt initial in den *GIPR*<sup>dn</sup> transgenen Mäusen auf CD1 Hintergrund zu, was durch eine akute Hyperglykämie verursacht ist, die die Betazellreplikation fördert. Diese proliferativen Effekte von Glukose konnte schon durch Versuche mit Glukoseinfusionen in der Ratte gezeigt werden (BERNARD et al., 1998). Durch chronische Hyperglykämie und Glukotoxizität kommt es dann jedoch zu vermehrter Apoptose, dem Fehlen von Replikation und einem signifikantem Abfall des Gesamtbetazellvolumens und der durchschnittlichen Inselgröße. Die Glukotoxizität führt zu oxidativem Stress, der sich mittels einem Marker – Serummalondialdehyd – nachweisen lässt. Dieser Marker war bei 90 Tage alten *GIPR*<sup>dn</sup> transgenen Mäusen auf CD1 Hintergrund signifikant erhöht (HERBACH et al., 2011). Außer der Glukotoxizität hat auch noch die mangelnde Wirkung von GIP Einfluss auf erhöhte Apoptoseraten und erniedrigte Replikation. GIP hat eine antiapoptotische Wirkung, diese ist abhängig von einer pleiotropen Aktivierung von PKA/CREB, MAPK und P13K und wird synergistisch durch Glukose unterstützt

(TRUMPER et al., 2002). GIP ist des Weiteren ein mitogener Faktor für Betazellen und führt zur vermehrten Zelldifferenzierung und Gentranskription über Aktivierung der PKA/CREB, MAPK und P13K/PKB (EHSES et al., 2003). In der vorliegenden Studie unterscheiden sich die Apoptoseraten weder an Tag 10 noch an Tag 90 signifikant voneinander, weder zwischen Wildtyp und *GIPR<sup>dn</sup>* transgenem Tier noch im zeitlichen Verlauf. Allerdings sind morphologische Anzeichen für Apoptosen kurzlebig und apoptotische Zellen werden schnell von Makrophagen entfernt, daher ist es schwierig, eine exakte Bestimmung der Apoptoserate durchzuführen (SCAGLIA et al., 1995; BONNER-WEIR et al., 2000). Beim Menschen wird von einer perinatalen Betazellapoptosewelle berichtet (KASSEM et al., 2000) und auch bei der Ratte gibt es eine neonatale Apoptosewelle, die der Remodellierung des Pankreas dient (SCAGLIA et al., 1997).

Das Gesamtvolumen isolierter Betazellen, als Indikator für Inselneogenese, ist bei 10 Tage alten transgenen Tieren tendenziell und bei 90 Tage alten transgenen Tieren signifikant gegenüber den entsprechenden Wildtypwurfgeschwistern reduziert. Diese Befunde decken sich mit den Ergebnissen früherer Studien mit *GIPR<sup>dn</sup>* x CD1 transgenen Mäusen (HERBACH et al., 2005; HERBACH et al., 2011). Mit 10 Tagen weisen B6.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>* nur tendenziell höhere Neogenese auf als F.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>*. Dagegen zeigen B6 Wildtypen mit 10 Tagen ein signifikant höheres Gesamtvolumen an isolierten Betazellen als FVB/N Wildtypen. Mit 90 Tagen weisen B6.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>* eine circa dreifach höhere Neogenese auf als F.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>*. Diese Neogenese könnte das signifikant höhere Gesamtbetazellvolumen bei transgenen Mäusen auf B6 vs. FVB/N Hintergrund verursachen. Zwischen den beiden Wildtypstämmen sind mit 90 Tagen keine Unterschiede mehr feststellbar. Zwischen Tag 10 und Tag 90 kommt es sowohl bei *GIPR<sup>dn</sup>* transgenen Mäusen als auch bei den Wildtypen beider Linien zu einem signifikantem Abfall der Neogenese. Dies konnte auch bei früheren Studien mit Tieren auf CD1 Hintergrund belegt werden (HERBACH et al., 2005; HERBACH et al., 2011).

Das Gesamtbetazellvolumen reicht erst bei einer Reduktion um 60-70% nicht mehr aus, um den Glukosemetabolismus zu regulieren (RAHIER et al., 1989). Das Gesamtbetazellvolumen der F.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>* ist um 85 % verringert und weist damit nur noch 15 % des Gesamtbetazellvolumens der nicht-transgenen Wurfgeschwister auf. Folglich entwickelt sich ein schwerer diabetischer Phänotyp. Die B6.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>* dagegen weisen nur ein 45,5 % niedrigeres Gesamtbetazellvolumen auf als ihre nicht-transgenen Wurfgeschwister. Mit den damit verbleibenden

54,5 % des Gesamtbetazellvolumens ist die Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase besser möglich, wenn sie auch durch die gestörte GIP-Funktion eingeschränkt ist. Mit durchschnittlichen Nüchternblutglukosewerten von unter 120mg/dl am 90sten Lebenstag weisen die B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> zwar signifikant erhöhte Werte gegenüber B6 Wildtypen auf, jedoch sind ihre Blutglukosewerte nur circa halb so hoch wie die der F-CD1-*GIPR*<sup>dn</sup>. Allerdings zeigen die B6.DC1-*GIPR*<sup>dn</sup> im oralen Glukosetoleranztest eine ebenso starke Störung der Glukosetoleranz wie die F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup>, was anhand ihres gut erhaltenen Gesamtbetazellvolumens überraschend ist. Zu erwarten wäre aufgrund der größeren Masse an Betazellen, die Insulin sezernieren können, eine deutlich bessere Glukosetoleranz als bei den F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup>. Allerdings ist bei einem oralen Glukosetoleranztest auch die Signalübermittlung durch GIP wichtig, das durch orale Aufnahme von Glukose ausgeschüttet wird. Die Signaltransduktion von GIP ist sowohl in F-CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> als auch in B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> blockiert und somit kann nur deutlich weniger als die Hälfte an Insulin nach Glukosegabe freigesetzt werden (HERBACH et al., 2011).

#### 5.4. Einfluss des genetischen Hintergrundes auf den Diabetes und das endokrine Pankreas

B6.CD1-*GIPRdn* weisen ein *gering* vermindertes Gesamtinsel- und Gesamtbetazellvolumen im Vergleich zu den B6 Wildtypen auf, während F.CD1-*GIPRdn* ein *stark* erniedrigtes Gesamtinsel- und Gesamtbetazellvolumen im Vergleich zu nicht-transgenen Wurfgeschwistern zeigen. B6.CD1-*GIPRdn* weisen zudem ein signifikant höheres Gesamtbetazellvolumen als F.CD1-*GIPRdn* auf, wohingegen B6 Wildtypen niedrigere Gesamtinsel- und –betazellvolumina zeigen als FVB/N Wildtypen ( $p<0,01$ ). Diese Unterschiede in der Betazellmasse können zumindest zum Teil den mildernden diabetischen Phänotyp der B6.CD1- *GIPR*<sup>dn</sup> erklären.

Es wäre ebenso denkbar, dass bei B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> der mutierte Rezeptor in den Inseln nicht so stark exprimiert wird wie bei F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup>. Das „dominant“ in *GIPR*<sup>dn</sup> steht dafür, dass das der mutierte Rezeptor in diesem Mausmodell einen dominanten Effekt über den endogenen GIP-Rezeptor ausübt, so dass dieser keine ausreichende Funktion mehr ausüben kann (VOLZ-PETERS et al., 2000). Es wäre möglich, dass die Expression bei B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> niedriger ist als bei F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> Mäusen und so noch eine größere Menge an Substrat an die endogenen GIP-Rezeptoren bindet und damit der endogene Rezeptor die Funktion der GIP/GIPR Achse aufrechterhalten kann. Die Expressionsstärke eines ins Genom integrierten DNA-Abschnitts ist abhängig vom Integrationsort und der Anzahl der integrierten DNA-Kopien (VOLZ-PETERS et

al., 2000). Da beide transgenen Linien auf das gleiche Foundertier zurückgehen ist es unwahrscheinlich, dass der Integrationsort oder die Anzahl der integrierten Kopien bei beiden Linien unterschiedlich ist. Zudem sind eindeutig große Unterschiede zwischen den Wildtypen beider Linien zu erkennen. Die Grundausstattung der Wildtypen bezüglich Pankreasgewicht, Pankreasvolumen, Gesamtinselvolumen und Gesamtbetazellvolumen variiert mit 90 Tagen stark. Am 90sten Lebenstag weisen die Wildtypen der Linie FVB/N circa eine doppelt so hohe Volumendichte an Inseln im Pankreas auf und das Gesamtvolume an Inseln und Betazellen ist ebenfalls signifikant erhöht im Vergleich zu Wildtypen der Linie C57Bl/6J. In einer Studie über den Einfluss des genetischen Hintergrundes auf die Größe und Struktur des endokrinen Pankreas weist der Stamm C57Bl/6J die geringste Insel- und Betazellmasse auf (BOCK et al., 2005), reagiert als High Responder auf Streptozotocin-Injektionen und entwickelt deutlichen Diabetes, was mit dem ohnehin schon geringen Gesamtinselvolumen erklärt wird. Der Stamm DBA mit der größten Insel- und Betazellmasse entwickelt jedoch einen noch stärkeren diabetischen Phänotyp (KAKU et al., 1988; CARDINAL et al., 1998). Nachdem FVB/N Wildtypen ebenfalls die höchsten Gesamtbetazellvolumina aufweisen decken sich die Ergebnisse mit den Befunden bei DBA-Mäusen. Der Stamm FVB/N zeigt in mehreren Studien eine hohe Empfänglichkeit für Diabetes. Auf db/db Hintergrund zeigen die FVB/N Mäuse eine größere Insulinresistenz, Hyperglykämie und Hyperinsulinämie als die Mäuse des Stamms C57Bl/6J. (CLEE & ATTIE, 2007). Bei einer genauen Untersuchung des Glukosemetabolismus der Stämme FVB/N und C57Bl/6J zeigt sich, dass die Tiere des Stamms C57Bl/6J auf Hyperglykämie sehr stark mit einem Insulinanstieg auf über 500 pmol/l reagieren, während die Tiere des Stamms FVB/N nur einen Insulinanstieg von unter 150 pmol/l aufweisen. Bei Hypoglykämie dagegen können die Mäuse des Stamms C57Bl/6J die Glukagonsekretion nur vervierfachen, während das Hormon bei den Mäusen des Stamms FVB/N 9,9fach ansteigt (BERGLUND et al., 2008). Dadurch erklärt sich, warum die Tiere des Stamms FVB/N generell höhere Blutglukosespiegel aufweisen.

Um abzuklären, ob die Ursache für den geringeren diabetischen Phänotyp der GIPR<sup>dn</sup> transgenen Maus auf dem genetischen Hintergrund C57Bl/6J an einer weniger starken Expression des mutierten Rezeptors liegt, müsste nun die Expression an isolierten Inseln von GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäusen auf C57Bl/6J und FVB/N Hintergrund untersucht werden. Da die Inseln von GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäusen sehr fragil sind, ist eine Inselisolierung bei Ihnen sehr schwierig (HERBACH et al., 2011). Falls aber die Transgenexpression gleich stark ist, wäre ein denkbarer Ansatz, durch eine Kreuzung der beiden Stämme ein Susceptibility Gen ausfindig zu machen, das den

Stamm FVB/N anfälliger für Diabetes macht oder ein Resistenzgen zu finden, das den Stamm C57Bl/6J weniger anfällig für Diabetes macht. Auf diese Weise wurde auch die db/db Mutation untersucht. Beim Verbringen dieser Mutation auf FVB/N und C57Bl/6J Hintergründe fallen ebenfalls deutliche Unterschiede auf. Die db/db Mäuse auf FVB/N Hintergrund entwickeln die stärkere Hyperglykämie, Hyperinsulinämie, Inselhypertrophie und die stärkere Insulinresistenz im Vergleich zu der db/db Maus auf C57Bl/6J Hintergrund (CHUA et al., 2002; LUO et al., 2006). Es wurden db/db Mäuse mit C57Bl/6J Hintergrund auf FVB/N Hintergrund rückgekreuzt und es konnte ein Allel auf Chromosom 5 gefunden werden, bei dessen Vorkommen der Stamm FVB/N vermehrt Insulin produziert und der Stamm C57Bl/6J keine Insulinproduktion aufweist (LUO et al., 2006). Auch bei dieser Studie entwickeln die db/db Mäuse auf dem genetischen Hintergrund FVB/N den stärkeren Diabetes, obwohl das Mausmodell ein ganz anders funktionierendes System ist als die transgene GIPR<sup>dn</sup> Maus. Diese und ähnliche Forschungsergebnisse kann man als Hinweis auf eine prinzipiell höhere Empfänglichkeit des Stamms FVB/N für Diabetes sehen, was die These bestätigen könnte, dass der genetische Hintergrund die Ausprägung des diabetischen Phänotyps und die postnatale Entwicklung des Pankreas maßgeblich beeinflusst. Im Falle des GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mausmodells gibt es an dieser These nach der ausführlichen Charakterisierung des diabetischen Phänotyps und der postnatalen Entwicklung des Pankreas nun kaum noch Zweifel. Es zeigte sich im Rahmen der vorliegenden Studie, dass GIPR<sup>dn</sup> transgene Mäuse auf dem genetischen Hintergrund FVB/N besser für die Diabetesforschung geeignet sind als GIPR<sup>dn</sup> transgene Mäuse auf C57Bl/6J Hintergrund, da sie einen wesentlich stärker ausgeprägten diabetischen Status und eine stärkere Malformation des Pankreas entwickeln. Im Idealfall können diese Forschungsergebnisse genutzt werden, um ein Susceptibility Gen oder ein Resistenzgen für Diabetes zu entdecken, was helfen könnte, die Pathogenese des Diabetes mellitus besser zu verstehen.

## 6. Ausblick

Die Daten dieser Studie zeigen deutlich, wie unterschiedlich die Ausprägung des diabetischen Phänotyps bei zwei verschiedenen Mauslinien sein kann, welche das selbe Transgen exprimieren, in diesem Falle F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> und B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup>. Auch die postnatale Entwicklung des endokrinen Pankreas und die quantitativ stereologischen Daten wie das Gesamtinsel- und das Gesamtbetazzellvolumen variieren stark in Abhängigkeit von der untersuchten Linie. Daher ist es für die weitere Suche nach gut geeigneten Modellen für die Diabetesforschung unerlässlich, den Einfluss weiterer stammspezifischer Faktoren auf den Diabetes und das endokrine Pankreas *GIPR*<sup>dn</sup> transgener Mäuse zu charakterisieren, wie zum Beispiel die Stämme BALB/c, DBA/2 oder NMRI.

Des Weiteren müsste zu einer lückenlosen Abklärung der Ursache der unterschiedlichen Untersuchungsergebnisse bei den Linien F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> und B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> die Expression des dominant negativen GIP Rezeptors überprüft werden, was an isolierten Inseln von *GIPR*<sup>dn</sup> transgenen Mäusen beider genetischer Hintergründe durchgeführt werden müsste. Nur so kann sicher ausgeschlossen werden, dass statt des Einflusses des genetischen Hintergrundes eine unterschiedliche Expressionsstärke des Transgens für die verschieden starke Ausprägung des Diabetes verantwortlich ist. Wie bereits erwähnt könnte bei einer gleichstarken Expression des dominant negativen GIP Rezeptors durch eine Kreuzung der beiden Stämme nach einem Diabetes Susceptibility Gen oder einem Resistenzgen gesucht werden.

Wenn die *GIPR*<sup>dn</sup> transgenen Mäuse auf CD1 Hintergrund auf verschiedene genetische Hintergründe zurück gekreuzt und die so entstandenen Linien charakterisiert würden, werden sich vermutlich mehrere exzellent geeignete Mausmodelle etablieren, mit denen die Diabetesforschung weiter voran gebracht werden kann. Auch die Spätfolgen des DM können anhand dieser Tiermodelle bestens charakterisiert werden.

## 7. Zusammenfassung

Diabetes mellitus Typ 2 (DM) ist eine der wichtigsten Krankheiten unserer Zeit. Mit steigender Prävalenz rückt die Erforschung der Ursachen und Therapiemöglichkeiten der Erkrankung immer mehr in den Vordergrund, denn die genaue Pathogenese des DM ist noch nicht geklärt. Bekannt ist, dass es im Verlauf der Erkrankung zu einem Verlust von funktioneller Betazellmasse kommt. Das endokrine Pankreas kann zwar Insulin produzieren, allerdings ist die Menge nicht ausreichend, um die Glukosehomöostase aufrecht zu halten.

*GIPR<sup>dn</sup>* transgene Mäuse exprimieren einen mutierten GIPR unter der transkriptionellen Kontrolle des Ratteninsulingenpromotors in den Betazellen des Pankreas. Der mutierte Rezeptor kann das Inkretinhormon GIP zwar noch binden, aber keine Signaltransduktion einleiten. Es kommt zu einer verminderten Freisetzung von Insulin, Hyperglykämie und zu einem verminderten Gesamtinsel- und Gesamtbetazellvolumen. Dieser Verlust von funktioneller Betazellmasse in Kombination mit einem ausgeprägten diabetischen Phänotyp macht dieses murine DM Modell sehr attraktiv für die Diabetesforschung, da es große Parallelen zum humanen DM aufweist.

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss der genetischen Hintergründe FVB/N und C57Bl/6J auf den diabetischen Phänotyp und die postnatale Entwicklung des endokrinen Pankreas von *GIPR<sup>dn</sup>* transgenen Mäusen untersucht. Hierzu wurden *GIPR<sup>dn</sup>* transgene Mäuse auf CD1 Hintergrund über zehn Generationen auf die genetischen Hintergründe FVB/N und C57Bl/6J zurück gekreuzt (F.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>*, B6.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>*). Es folgten zahlreiche klinische Untersuchungen der männlichen *GIPR<sup>dn</sup>* transgenen Mäuse und ihrer nicht-transgenen Wurfgeschwister zur Charakterisierung des diabetischen Status. Außerdem erfolgten quantitativ stereologische Untersuchungen des Pankreas mit 10 und 90 Tagen.

Dabei zeigte sich, dass die *GIPR<sup>dn</sup>* transgenen Mäuse auf FVB/N Hintergrund deutliche klinische Symptome wie Hyperglykämie, Glukosurie, Polyurie, Polydipsie und Polyphagie entwickelten, im Gegensatz zu den *GIPR<sup>dn</sup>* transgenen Mäuse auf C57Bl/6J Hintergrund. B6.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>* Mäuse wiesen keine signifikanten klinischen Abnormitäten im Vergleich zu nicht-transgenen Wurfgeschwistern auf in der Insulinresistenz, Wasser- oder Futteraufnahme und deutlich geringere Veränderungen der Blutglukose. Daher kann man festhalten, dass der diabeti-

sche Phänotyp der GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäuse auf dem genetischen Hintergrund FVB/N deutlicher ausgeprägt ist als bei den GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäusen auf dem genetischen Hintergrund C57Bl/6J. Im direkten Vergleich der GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäuse beider Stämme wiesen die GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäuse auf dem genetischen Hintergrund FVB/N signifikant höhere Blutglukosewerte ab Tag 21 auf, signifikant schlechtere Insulinsensitivität, deutlich höhere Nüchternblutglukosewerte ( $p<0,05$ ) und eine ungleich stärkere Polyurie, Polydipsie und Polyphagie ( $p<0,01$ ). Bei einem Vergleich der Wildtypen gab es keine signifikanten Unterschiede bei den untersuchten klinischen Parametern zwischen den beiden untersuchten Linien.

Bei der quantitativ stereologischen Beurteilung des Pankreas zeigten die GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäuse auf dem genetischen Hintergrund FVB/N gegenüber den nicht-transgenen Wurfgeschwistern ein signifikant niedrigeres Gesamtinsel-, Gesamtbetazellvolumen und Gesamtvolumen der isolierten Betazellen im Alter von 90 Tagen. Die Replikationsrate war dagegen mit 90 Tagen bei den F.CD1-GIPR<sup>dn</sup> Mäusen signifikant höher als bei den Wildtypen. Das Gesamtinsel-, Gesamtbetazellvolumen und Gesamtvolumen an isolierten Betazellen bei B6.CD1-GIPR<sup>dn</sup> war gegenüber nicht-transgenen Wurfgeschwistern mit 90 Tagen ebenfalls signifikant niedriger. Die Replikation bei B6.CD1-GIPR<sup>dn</sup> betrug mit 90 Tagen in etwa das Doppelte der Replikation der Wildtypen. Im direkten Vergleich der GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäuse miteinander zeigten F.CD1-GIPR<sup>dn</sup> am Tag 90 ein halb so hohes Gesamtbetazellvolumen und ein Drittel des Gesamtvolumens der isolierten Betazellen im Pankreas im Vergleich zu B6.CD1-GIPR<sup>dn</sup>. Die FVB/N Wildtypen hingegen zeigten am Tag 90 ein mehr als doppelt so hohes Gesamtinsel- und Gesamtbetazellvolumen gegenüber den C57Bl/6 Wildtypen.

Ein niedrigeres Gesamtvolumen der isolierten Betazellen könnte verantwortlich sein für das niedrigere Gesamtbetazellvolumen bei F.CD1-GIPR<sup>dn</sup> gegenüber B6.CD1-GIPR<sup>dn</sup>. Das niedrigere Gesamtbetazellvolumen der GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäuse auf dem genetischen Hintergrund FVB/N wiederum ist wohl verantwortlich für den wesentlich stärker ausgeprägten diabetischen Phänotyp gegenüber den GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mäusen auf C57Bl/6J Hintergrund. Aufgrund dieses stärker ausgeprägten diabetischen Status eignen sich F.CD1-GIPR<sup>dn</sup> Mäuse excellent als Forschungsmodell für schweren DM. B6.CD1-GIPR<sup>dn</sup> eignen sich besser zur Untersuchung eines milderdiabetischen Phänotyps. Verglichen mit GIPR<sup>dn</sup> x CD1 weisen die GIPR<sup>dn</sup>

transgenen Mäuse auf FVB/N Hintergrund bezüglich des diabetischen Phänotyps und des endokrinen Pankreas keine großen Unterschiede auf. Der bisher viel in der Diabetesforschung genutzte Stamm C57Bl/6J wurde in dieser Arbeit als wenig diabetes-empfänglich eingestuft.

In der vorliegenden Arbeit wurde deutlich, wie unterschiedlich sich die Expression des GIPR<sup>dn</sup> bei Mäusen verschiedener genetischer Hintergründe auswirkt, sowohl in der postnatalen Entwicklung des endokrinen Pankreas als auch in der Ausprägung des diabetischen Phänotyps. Außerdem konnte mit den Ergebnissen dieser Studie ein wertvoller Beitrag zum optimalen Einsatz des GIPR<sup>dn</sup> transgenen Mausmodells für verschiedene Fragestellungen der Diabetesforschung geleistet werden.

## 8. Summary

Diabetes mellitus is one of the most important diseases of our time. With growing prevalence, the investigation of the cause and therapy of this disease grows more and more important, as the pathogenesis of type 2 diabetes has not been completely elucidated. It is known that there appears a decrease of functional beta cell mass during the course of the disease. Though the endocrine pancreas is able to produce insulin, the amount is not sufficient to maintain glucose homeostasis.

GIPR<sup>dn</sup> transgenic mice express a mutated GIP receptor under the control of the rat insulin gene promotor in the beta cells of the pancreas. The mutated receptor is able to bind the incretin hormone GIP, but signal transduction is inhibited. This leads to a diminished secretion of insulin, to hyperglycemia and to a decreased total volume of islets and beta cells. The loss of functional beta cell mass in combination with a strong diabetic phenotype makes this mouse model attractive for diabetes research because of the similarity to human diabetes mellitus.

In this study, the influence of the genetic background FVB/N and C57Bl/6J on the diabetic phenotype and the postnatal development of the endocrine pancreas was investigated. For this, GIPR<sup>dn</sup> transgenic mice on CD1 background were back crossed to the genetic backgrounds FVB/N and C57Bl/6J (F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup>, B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup>). Thereupon, several clinical investigations of male GIPR<sup>dn</sup> transgenic mice and their non-transgenic littermates were performed to characterize the diabetic status. Furthermore, quantitative stereological investigations of the pancreas at the age of 10 and 90 days have been carried out.

It could be shown that GIPR<sup>dn</sup> transgenic mice on the background FVB/N develop severe clinical symptoms of diabetes like hyperglycemia, glycosuria, polydipsia, polyuria and polyphagia, in contrast to GIPR<sup>dn</sup> transgenic mice on C57Bl/6J background. B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup>-mice did not show significant abnormalities compared to non-transgenic littermates like insulin resistance, water or food intake and they only showed minor differences in the blood glucose levels. Therefore, the diabetic phenotype of F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> is much more distinct than the diabetic phenotype of B6.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup>. In the direct comparison of the GIPR<sup>dn</sup> transgenic mice, the F.CD1-*GIPR*<sup>dn</sup> showed significant higher blood glucose levels ( $p<0,05$ ) from day 21 on and a

much stronger polyuria, polydipsia and polyphagia ( $p<0,01$ ). The comparison of the wildtypes did not show any significant differences in the investigated clinical parameters.

The quantitative stereological investigation of the endocrine pancreas showed that F.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>* mice have significant lower total islet volumes, total beta cell volumes and total isolated beta cell volumes compared to non-transgenic littermates at the age of 90 days. However, the F.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>* mice showed significantly higher replication rates than the wild types 90-day-old wildtype mice. The total islet volume, the total beta cell volume and the total volume of isolated beta cells of the B6.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>* mice were significantly lower than in non-transgenic littermates as well. Replication in the B6.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>* mice was twice that of 90-day-old wildtype mice. At 90 days of age, F.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>* showed half of the total beta cell volume and one third of the total volume of isolated beta cells compared to B6.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>* mice. In contrast, FVN/N wildtype mice showed more than twice of the total beta cell volume and the total islet volume than the C57Bl/6 wildtype mice at 90 days of age.

An increased total volume of isolated beta cells could be responsible for the higher total beta cell volume in B6.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>* compared to F.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>*. The decreased total beta cell volume in F.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>* is probably responsible for the greater diabetic phenotype of the F.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>*. Due to the stronger diabetic phenotype, the F.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>* is a more appropriate mouse model for severe diabetes, whereas *GIPR<sup>dn</sup>* transgenic mice on the background C57Bl/6 are more appropriate mouse models for investigating consequences of mild diabetes. Compared to *GIPR<sup>dn</sup>* x CD1, F.CD1-*GIPR<sup>dn</sup>* show no greater divergences. The commonly used mouse strain C57Bl/6J was classified as less susceptible for diabetes in this study.

This study showed how the expression of the *GIPR<sup>dn</sup>* influences the postnatal development of the endocrine pancreas and the diabetic phenotype in mice of different genetic backgrounds. We could contribute to the optimal use of the *GIPR<sup>dn</sup>* transgenic mouse model for different questions in diabetes research.

## 9. Quellen

- Ahlgren U, Pfaff SL, Jessell TM, Edlund T, Edlund H. Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature* 1997; 385: 257-60.
- Ahren B, Pacini G. Insufficient islet compensation to insulin resistance vs. reduced glucose effectiveness in glucose-intolerant mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2002; 283: E738-E44.
- American Diabetes Association (2010) Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. In: *Diabetes Care*. S62-S9
- Anini Y, Hansotia T, Brubaker PL. Muscarinic receptors control postprandial release of glucagon-like peptide-1: in vivo and in vitro studies in rats. *Endocrinology* 2002; 143: 2420-6.
- Arnette D, Gibson TB, Lawrence MC, January B, Khoo S, McGlynn K, Vanderbilt CA, Cobb MH. Regulation of ERK1 and ERK2 by glucose and peptide hormones in pancreatic  $\beta$  cells. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278: 32517-25.
- Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 2007; 132: 2131-57.
- Balwierz A, Polus A, Razny U, Wator L, Dyduch G, Tomaszewska R, Scherneck S, Joost H, Dembinska-Kiec A. Angiogenesis in the New Zealand obese mouse model fed with high fat diet. *Lipids Health Dis* 2009; 8: 13.
- Berglund ED, Li CY, Poffenberger G, Ayala JE, Fueger PT, Willis SE, Jewell MM, Powers AC, Wasserman DH. Glucose metabolism in vivo in four commonly used inbred mouse strains. *Diabetes* 2008; 57: 1790-9.
- Bernard C, Thibault C, Berthault M-F, Magnan C, Saulnier C, Portha B, Pralong WF, Pénicaud L, Ktorza A. Pancreatic beta-cell regeneration after 48-h glucose infusion in mildly diabetic rats is not correlated with functional improvement. *Diabetes* 1998; 47: 1058-65.
- Bhushan A, Itoh N, Kato S, Thiery JP, Czernichow P, Bellusci S, Scharfmann R. Fgf10 is essential for maintaining the proliferative capacity of epithelial progenitor cells during early pancreatic organogenesis. *Development* 2001; 128: 5109-17.
- Blume N, Skouv J, Larsson L-I, Holst JJ, Madsen OD. Potent inhibitory effects of transplantable rat glucagonomas and insulinomas on the respective endogenous islet cells are

- associated with pancreatic apoptosis. *Journal of Clinical Investigation* 1995; 96: 2227.
- Bock T, Pakkenberg B, Buschard K. Genetic background determines the size and structure of the endocrine pancreas. *Diabetes* 2005; 54: 133-7.
- Bonner-Weir S, Trent D, Honey R, Weir G. Responses of neonatal rat islets to streptozotocin: limited B-cell regeneration and hyperglycemia. *Diabetes* 1981; 30: 64-9.
- Bonner-Weir S, Deery D, Leahy JL, Weir GC. Compensatory growth of pancreatic  $\beta$ -cells in adult rats after short-term glucose infusion. *Diabetes* 1989; 38: 49-53.
- Bonner-Weir S, Baxter LA, Schuppin GT, Smith FE. A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas: a possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes* 1993; 42: 1715-20.
- Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil JJ. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 7999-8004.
- Bonner-Weir S. Perspective: Postnatal Pancreatic  $\beta$  Cell Growth. *Endocrinology* 2000; 141: 1926-9.
- Bonner-Weir S, Sharma A. Are there pancreatic progenitor cells from which new islets form after birth? *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism* 2006; 2: 240-1.
- Bonner-Weir S, Inada A, Yatoh S, Li W, Aye T, Toschi E, Sharma A. Transdifferentiation of pancreatic ductal cells to endocrine beta-cells. *Biochemical Society Transactions* 2008; 36: 353.
- Bonner-Weir S, Toschi E, Inada A, Reitz P, Fonseca SY, Aye T, Sharma A. The pancreatic ductal epithelium serves as a potential pool of progenitor cells. *Pediatric diabetes* 2004; 5: 16-22.
- Böttlinger EP, Jakubczak JL, Roberts IS, Mumy M, Hemmati P, Bagnall K, Merlino G, Wakefield LM. Expression of a dominant-negative mutant TGF- $\beta$  type II receptor in transgenic mice reveals essential roles for TGF- $\beta$  in regulation of growth and differentiation in the exocrine pancreas. *The EMBO journal* 1997; 16: 2621-33.
- Bouwens L, Wang R-N, De Blay E, Pipeleers DG, Klöppel G. Cytokeratins as markers of ductal cell differentiation and islet neogenesis in the neonatal rat pancreas. *Diabetes* 1994; 43: 1279-83.

- Bouwens L, De Blay E. Islet morphogenesis and stem cell markers in rat pancreas. *J Histochem Cytochem* 1996; 44: 947-51.
- Bouwens L, Rooman I. Regulation of pancreatic beta-cell mass. *Physiological reviews* 2005; 85: 1255-70.
- Bouwens L. Beta cell regeneration. *Current diabetes reviews* 2006; 2: 3-9.
- Brosius FC, Alpers CE, Bottinger EP, Breyer MD, Coffman TM, Gurley SB, Harris RC, Kakoki M, Kretzler M, Leiter EH. Mouse models of diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 2009; 20: 2503-12.
- Brun T, He KHH, Lupi R, Boehm B, Wojtusciszyn A, Sauter N, Donath M, Marchetti P, Maedler K, Gauthier BR. The diabetes-linked transcription factor Pax4 is expressed in human pancreatic islets and is activated by mitogens and GLP-1. *Human molecular genetics* 2008; 17: 478-89.
- Brüning J, Winnay J, Cheatham B, Kahn CR. Differential signaling by insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in IRS-1-deficient cells. *Molecular and Cellular Biology* 1997; 17: 1513-21.
- Buteau J, Roduit R, Susini S, Prentki M. Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells. *Diabetologia* 1999; 42: 856-64.
- Buteau J, Foisy S, Joly E, Prentki M. Glucagon-like peptide 1 induces pancreatic  $\beta$ -cell proliferation via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Diabetes* 2003; 52: 124-32.
- Butler A, Galasso R, Matveyenko A, Rizza R, Dry S, Butler P. Pancreatic duct replication is increased with obesity and type 2 diabetes in humans. *Diabetologia* 2010; 53: 21-6.
- Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC.  $\beta$ -cell deficit and increased  $\beta$ -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; 52: 102-10.
- Cardinal JW, Allan DJ, Cameron DP. Differential Metabolite Accumulation May Be the Cause of Strain Differences in Sensitivity to Streptozotocin-Induced  $\beta$  Cell Death in Inbred Mice 1. *Endocrinology* 1998; 139: 2885-91.

- Chen S, Shimoda M, Chen J, Matsumoto S, Grayburn PA. Transient overexpression of cyclin D2/CDK4/GLP1 genes induces proliferation and differentiation of adult pancreatic progenitors and mediates islet regeneration. *Cell Cycle* 2012; 11: 695-705.
- Cho JM, Jang HW, Cheon H, Jeong YT, Kim D-H, Lim Y-M, Choi S-h, Yang E-k, Shin C-Y, Son MH. A novel dipeptidyl peptidase IV inhibitor DA-1229 ameliorates streptozotocin-induced diabetes by increasing  $\beta$ -cell replication and neogenesis. *Diabetes research and clinical practice* 2011; 91: 72-9.
- Chua S, Liu SM, Li Q, Yang L, Thassanapaff V, Fisher P. Differential beta cell responses to hyperglycaemia and insulin resistance in two novel congenic strains of diabetes (FVB-Lepr db) and obese (DBA-Lep ob) mice. *Diabetologia* 2002; 45: 976-90.
- Clee SM, Attie AD. The genetic landscape of type 2 diabetes in mice. *Endocr Rev* 2007; 28: 48-83.
- Coleman DL. The influence of genetic background on the expression of mutations at the diabetes (db) locus in the mouse VI: hepatic malic enzyme activity is associated with diabetes severity. *Metabolism* 1992; 41: 1134-6.
- Cozar-Castellano I, Haught M, Stewart AF. The cell cycle inhibitory protein p21cip is not essential for maintaining  $\beta$ -cell cycle arrest or  $\beta$ -cell function in vivo. *Diabetes* 2006; 55: 3271-8.
- Creutzfeldt W. The incretin concept today. *Diabetologia* 1979; 16: 75-85.
- Criscimanna A, Speicher JA, Houshmand G, Shiota C, Prasadan K, Ji B, Logsdon CD, Gittes GK, Esni F. Duct cells contribute to regeneration of endocrine and acinar cells following pancreatic damage in adult mice. *Gastroenterology* 2011; 141: 1451-62. e6.
- Dalle S, Longuet C, Costes S, Broca C, Faruque O, Fontés G, Bataille D. Glucagon promotes cAMP-response element-binding protein phosphorylation via activation of ERK1/2 in MIN6 cell line and isolated islets of Langerhans. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 20345-55.
- De Angelis K, Irigoyen MC, Morris M. Diabetes and cardiovascular autonomic dysfunction: application of animal models. *Auton Neurosci* 2009; 145: 3-10.
- De León DD, Deng S, Madani R, Ahima RS, Drucker DJ, Stoffers DA. Role of endogenous glucagon-like peptide-1 in islet regeneration after partial pancreatectomy. *Diabetes* 2003; 52: 365-71.

- Del Prato S. Role of glucotoxicity and lipotoxicity in the pathophysiology of Type 2 diabetes mellitus and emerging treatment strategies. *Diabetic medicine* 2009; 26: 1185-92.
- Deltour L, Leduque P, Paldi A, Ripoche MA, Dubois P, Jami J. Polyclonal origin of pancreatic islets in aggregation mouse chimaeras. *Development* 1991; 112: 1115-21.
- Desai BM, Oliver-Krasinski J, De Leon DD, Farzad C, Hong N, Leach SD, Stoffers DA. Preexisting pancreatic acinar cells contribute to acinar cell, but not islet  $\beta$  cell, regeneration. *Journal of Clinical Investigation* 2007; 117: 971.
- Deutsche Diabetes Union (2007) *Gesundheitsbericht Diabetes* 2007
- Diabetes D (2010) *Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes* 2010. In: Kirchheim, Mainz
- Docherty K. Pancreatic stellate cells can form new  $\beta$ -like cells. *The Biochemical journal* 2009; 421: e1-4.
- Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA. Adult pancreatic  $\beta$ -cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 2004; 429: 41-6.
- Drucker DJ. The biology of incretin hormones. *Cell metabolism* 2006; 3: 153-65.
- Edvell A, Lindstrom P. Development of insulin secretory function in young obese hyperglycemic mice (Umea ob/ob). *Metabolism* 1995; 44: 906-13.
- Ehses JA, Casilla VR, Doty T, Pospisilik JA, Winter KD, Demuth H-U, Pederson RA, McIntosh CH. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide promotes  $\beta$ -(INS-1) cell survival via cyclic adenosine monophosphate-mediated caspase-3 inhibition and regulation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 2003; 144: 4433-45.
- Elghazi L, Cras-Meneur C, Czernichow P, Scharfmann R. Role for FGFR2IIIb-mediated signals in controlling pancreatic endocrine progenitor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 3884-9.
- Esni F, Johansson BR, Radice GL, Semb H. Dorsal pancreas agenesis in N-cadherin- deficient mice. *Dev Biol* 2001; 238: 202-12.
- Farilla L, Bulotta A, Hirshberg B, Li Calzi S, Khoury N, Noushmehr H, Bertolotto C, Di Mario U, Harlan DM, Perfetti R. Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets. *Endocrinology* 2003; 144: 5149-58.
- Finegood DT, Scaglia L, Bonner-Weir S. Dynamics of  $\beta$ -cell mass in the growing rat pancreas: estimation with a simple mathematical model. *Diabetes* 1995; 44: 249-56.

- Flamez D, Van Breusegem A, Scrocchi LA, Quartier E, Pipeleers D, Drucker DJ, Schuit F. Mouse pancreatic beta-cells exhibit preserved glucose competence after disruption of the glucagon-like peptide-1 receptor gene. *Diabetes* 1998; 47: 646-52.
- Friedrichsen BN, Richter HE, Hansen JA, Rhodes CJ, Nielsen JH, Billestrup N, Møldrup A. Signal transducer and activator of transcription 5 activation is sufficient to drive transcriptional induction of cyclin D2 gene and proliferation of rat pancreatic  $\beta$ -cells. *Molecular Endocrinology* 2003; 17: 945-58.
- Friedrichsen BN, Neubauer N, Lee YC, Gram VK, Blume N, Petersen JS, Nielsen JH, Møldrup A. Stimulation of pancreatic  $\beta$ -cell replication by incretins involves transcriptional induction of cyclin D1 via multiple signalling pathways. *Journal of Endocrinology* 2006; 188: 481-92.
- Gapp DA, Leiter EH, Coleman DL, Schwizer RW. Temporal changes in pancreatic islet composition in C57BL/6J-db/db (diabetes) mice. *Diabetologia* 1983; 25: 439-43.
- Georgia S, Bhushan A.  $\beta$  cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal  $\beta$  cell mass. *Journal of Clinical Investigation* 2004; 114: 963.
- Georgia S, Bhushan A. p27 regulates the transition of  $\beta$ -cells from quiescence to proliferation. *Diabetes* 2006; 55: 2950-6.
- Goren HJ, Kulkarni RN, Kahn CR. Glucose homeostasis and tissue transcript content of insulin signaling intermediates in four inbred strains of mice: C57BL/6, C57BLKS/6, DBA/2, and 129X1. *Endocrinology* 2004; 145: 3307-23.
- Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F. neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000; 97: 1607-11.
- Granger A, Kushner JA. Cellular origins of  $\beta$ -cell regeneration: a legacy view of historical controversies. *Journal of internal medicine* 2009; 266: 325-38.
- Grant CW, Moran-Paul CM, Duclos SK, Guberski DL, Arreaza-Rubin G, Spain LM. Testing agents for prevention or reversal of type 1 diabetes in rodents. *PLoS ONE* 2013; 8: e72989.
- Guillemain G, Filhoulaud G, Da Silva-Xavier G, Rutter GA, Scharfmann R. Glucose is necessary for embryonic pancreatic endocrine cell differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 2007; 282: 15228-37.
- Guiot Y, Sempoux C, Moulin P, Rahier J. No decrease of the (beta)-cell mass in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2001; 50: S188.

Gunasekaran U, Gannon M. Type 2 diabetes and the aging pancreatic beta cell. *Aging (Albany NY)* 2011; 3: 565-75.

Gurley SB, Clare SE, Snow KP, Hu A, Meyer TW, Coffman TM. Impact of genetic background on nephropathy in diabetic mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290: F214-22.

Gurley SB, Mach CL, Stegbauer J, Yang J, Snow KP, Hu A, Meyer TW, Coffman TM. Influence of genetic background on albuminuria and kidney injury in *Ins2+/C96Y* (Akita) mice. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2010; 298: F788-F95.

Haluzik M, Parizkova J, Haluzik M. Adiponectin and its role in the obesity-induced insulin resistance and related complications. *Physiological Research* 2004; 53: 123-30.

Hanahan D. Heritable formation of pancreatic  $\beta$ -cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature* 1985; 315: 115-22.

Hansotia T, Baggio LL, Delmeire D, Hinke SA, Yamada Y, Tsukiyama K, Seino Y, Holst JJ, Schuit F, Drucker DJ. Double incretin receptor knockout (DIRKO) mice reveal an essential role for the enteroinsular axis in transducing the glucoregulatory actions of DPP-IV inhibitors. *Diabetes* 2004; 53: 1326-35.

Hansotia T, Drucker DJ. GIP and GLP-1 as incretin hormones: lessons from single and double incretin receptor knockout mice. *Regulatory peptides* 2005; 128: 125-34.

Harrison KA, Thaler J, Pfaff SL, Gu H, Kehrl JH. Pancreas dorsal lobe agenesis and abnormal islets of Langerhans in *Hlx9*-deficient mice. *Nat Genet* 1999; 23: 71-5.

Hellerström C, Swenne I, Andersson A. Islet cell replication and diabetes. In: *The pathology of the endocrine pancreas in diabetes*: Springer 1988: 141-70.

Herbach N (2002) Clinical and pathological characterization of a novel transgenic animal model of diabetes mellitus expressing a dominant negative glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor (GIPR dn). *Imu*

Herbach N, Goeke B, Schneider M, Hermanns W, Wolf E, Wanke R. Overexpression of a dominant negative GIP receptor in transgenic mice results in disturbed postnatal pancreatic islet and beta-cell development. *Regulatory peptides* 2005; 125: 103-17.

Herbach N, Rathkolb B, Kemter E, Pichl L, Klaften M, de Angelis MH, Halban PA, Wolf E, Aigner B, Wanke R. Dominant-negative effects of a novel mutated *Ins2* allele causes early-onset diabetes and severe  $\beta$ -cell loss in Munich *Ins2C95S* mutant mice. *Diabetes* 2007; 56: 1268-76.

- Herbach N, Göke B, Wolf E, Wanke R. Diets influence the diabetic phenotype of transgenic mice expressing a dominant negative glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor (GIPR dn). *Regulatory peptides* 2008; 146: 260-70.
- Herbach N, Schairer I, Blutke A, Kautz S, Siebert A, Göke B, Wolf E, Wanke R. Diabetic kidney lesions of GIPRdn transgenic mice: podocyte hypertrophy and thickening of the GBM precede glomerular hypertrophy and glomerulosclerosis. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2009; 296: F819-F29.
- Herbach N, Bergmayr M, Göke B, Wolf E, Wanke R. Postnatal development of numbers and mean sizes of pancreatic islets and beta-cells in healthy mice and GIPR dn transgenic diabetic mice. *PLoS ONE* 2011; 6: 1-11.
- Herrera P. Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages. *Development*. 127(11) 2000: 2317-22.
- Herrera PL, Huarte J, Sanvito F, Meda P, Orci L, Vassalli JD. Embryogenesis of the murine endocrine pancreas; early expression of pancreatic polypeptide gene. *Development* 1991; 113: 1257-65.
- Højberg P, Vilsbøll T, Rabøl R, Knop F, Bache M, Krarup T, Holst JJ, Madsbad S. Four weeks of near-normalisation of blood glucose improves the insulin response to glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* 2009; 52: 199-207.
- Holst JJ. Glucagonlike peptide 1: a newly discovered gastrointestinal hormone. *Gastroenterology* 1994; 107: 1848-55.
- Hui H, Wright C, Perfetti R. Glucagon-like peptide 1 induces differentiation of islet duodenal homeobox-1-positive pancreatic ductal cells into insulin-secreting cells. *Diabetes* 2001; 50: 785-96.
- Ianus A, Holz GG, Theise ND, Hussain MA. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *Journal of Clinical Investigation* 2003; 111: 843.
- International Diabetes Federation (2013) Idf diabetes atlas 6th edition. In: Brussels: International Diabetes Federation
- Ishola DA, van der Giezen DM, Hahnel B, Goldschmeding R, Kriz W, Koomans HA, Joles JA. In mice, proteinuria and renal inflammatory responses to albumin overload are strain-dependent. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2006; 21: 591-7.

- Jensen J, Heller RS, Funder-Nielsen T, Pedersen EE, Lindsell C, Weinmaster G, Madsen OD, Serup P. Independent development of pancreatic alpha- and beta-cells from neurogenin3-expressing precursors: a role for the notch pathway in repression of premature differentiation. *Diabetes* 2000; 49: 163-76.
- Jetton TL, Everill B, Lausier J, Roskens V, Habibovic A, LaRock K, Gokin A, Peshavaria M, Leahy JL. Enhanced  $\beta$ -cell mass without increased proliferation following chronic mild glucose infusion. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2008; 294: E679-E87.
- Jhala US, Canettieri G, Scretton RA, Kulkarni RN, Krajewski S, Reed J, Walker J, Lin X, White M, Montminy M. cAMP promotes pancreatic  $\beta$ -cell survival via CREB-mediated induction of IRS2. *Genes & development* 2003; 17: 1575-80.
- Jonas J-C, Sharma A, Hasenkamp W, Ilkova H, Patanè G, Laybutt R, Bonner-Weir S, Weir GC. Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic  $\beta$  cell differentiation in an animal model of diabetes. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 14112-21.
- Kaku K, Fiedorek FT, Province M, Permutt MA. Genetic analysis of glucose tolerance in inbred mouse strains: evidence for polygenic control. *Diabetes* 1988; 37: 707-13.
- Kaneko T, Wang P-Y, Tawata M, Sato A. Low carbohydrate intake before oral glucose-tolerance tests. *The Lancet* 1998; 352: 289.
- Kano Y, Kanatsuna T, Nakamura N, Kitagawa Y, Mori H, Kajiyama S, Nakano K, Kondo M. Defect of the first-phase insulin secretion to glucose stimulation in the perfused pancreas of the nonobese diabetic (NOD) mouse. *Diabetes* 1986; 35: 486-90.
- Kassem SA, Ariel I, Thornton P, Scheimberg I, Glaser B.  $\beta$ -cell proliferation and apoptosis in the developing normal human pancreas and in hyperinsulinism of infancy. *Diabetes* 2000; 49: 1325-33.
- Kaung HL. Growth dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat. *Dev Dyn* 1994; 200: 163-75.
- Kazakos K. Incretin effect: GLP-1, GIP, DPP4. *Diabetes research and clinical practice* 2011; 93: S32-S6.
- Kieffer TJ, McIntosh C, Pederson RA. Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology* 1995; 136: 3585-96.

Kim S-J, Winter K, Nian C, Tsuneoka M, Koda Y, McIntosh CH. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) stimulation of pancreatic  $\beta$ -cell survival is dependent upon phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (PKB) signaling, inactivation of the forkhead transcription factor Foxo1, and down-regulation of bax expression. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280: 22297-307.

Kim SK, Selleri L, Lee JS, Zhang AY, Gu X, Jacobs Y, Cleary ML. Pbx1 inactivation disrupts pancreas development and in Lpf1-deficient mice promotes diabetes mellitus. *Nat Genet* 2002; 30: 430-5.

Kitamura T, Nakae J, Kitamura Y, Kido Y, Biggs WH, Wright CV, White MF, Arden KC, Accili D. The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic  $\beta$  cell growth. *The Journal of clinical investigation* 2002; 110: 1839-47.

Kluge R, Scherneck S, Schürmann A, Joost H. Pathophysiology and genetics of obesity and diabetes in the New Zealand obese mouse: a model of the human metabolic syndrome. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) 2012; 933: 59.

Knudsen LB, Nielsen PF, Huusfeldt PO, Johansen NL, Madsen K, Pedersen FZ, Thøgersen H, Wilken M, Agersø H. Potent derivatives of glucagon-like peptide-1 with pharmacokinetic properties suitable for once daily administration. *Journal of medicinal chemistry* 2000; 43: 1664-9.

Kooptiwut S, Zraika S, Thorburn AW, Dunlop ME, Darwiche R, Kay TW, Proietto J, Andrikopoulos S. Comparison of insulin secretory function in two mouse models with different susceptibility to  $\beta$ -cell failure. *Endocrinology* 2002; 143: 2085-92.

Kopp JL, Dubois CL, Hao E, Thorel F, Herrera PL, Sander M. Progenitor cell domains in the developing and adult pancreas. *Cell Cycle* 2011; 10: 1921-7.

Krapp A, Knöfler M, Ledermann B, Bürki K, Berney C, Zoerkler N, Hagenbüchle O, Wellauer PK. The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes & development* 1998; 12: 3752-63.

Kulkarni RN, Almind K, Goren HJ, Winnay JN, Ueki K, Okada T, Kahn CR. Impact of genetic background on development of hyperinsulinemia and diabetes in insulin

receptor/insulin receptor substrate-1 double heterozygous mice. *Diabetes* 2003; 52: 1528-34.

Kwon DY, Kim YS, Ahn IS, Kim DS, Kang S, Hong SM, Park S. Exendin-4 Potentiates Insulinotropic Action Partly via Increasing BETA.-Cell Proliferation and Neogenesis and Decreasing Apoptosis in Association With the Attenuation of Endoplasmic Reticulum Stress in Islets of Diabetic Rats. *Journal of pharmacological sciences* 2009; 111: 361-71.

Leahy J, Bonner-Weir S, Weir G. Minimal chronic hyperglycemia is a critical determinant of impaired insulin secretion after an incomplete pancreatectomy. *Journal of Clinical Investigation* 1988; 81: 1407.

Lee YC, Nielsen JH. Regulation of beta cell replication. *Molecular and cellular endocrinology* 2009; 297: 18-27.

Leiter EH, Prochazka M, Coleman DL. The non-obese diabetic (NOD) mouse. *The American journal of pathology* 1987; 128: 380.

Li H, Arber S, Jessell TM, Edlund H. Selective agenesis of the dorsal pancreas in mice lacking homeobox gene Hlx9. *Nat Genet* 1999; 23: 67-70.

Li L, Seno M, Yamada H, Kojima I. Promotion of  $\beta$ -cell regeneration by betacellulin in ninety percent-pancreatectomized rats. *Endocrinology* 2001; 142: 5379-85.

Li Y, Hansotia T, Yusta B, Ris F, Halban PA, Drucker DJ. Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates  $\beta$  cell apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278: 471-8.

Lindstrom P. The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]. *ScientificWorldJournal* 2007; 7: 666-85.

Ling Z, Wu D, Zambre Y, Flamez D, Drucker D, Pipeleers DG, Schuit FC. Glucagon-like peptide 1 receptor signaling influences topography of islet cells in mice. *Virchows Archiv* 2001; 438: 382-7.

Lipsett M, Finegood DT.  $\beta$ -cell neogenesis during prolonged hyperglycemia in rats. *Diabetes* 2002; 51: 1834-41.

Luo N, Liu SM, Liu H, Li Q, Xu Q, Sun X, Davis B, Li J, Chua Jr S. Allelic variation on chromosome 5 controls  $\beta$ -cell mass expansion during hyperglycemia in leptin receptor-deficient Diabetes mice. *Endocrinology* 2006; 147: 2287-95.

- Lysy PA, Weir GC, Bonner-Weir S. Concise review: pancreas regeneration: recent advances and perspectives. *Stem cells translational medicine* 2012; 1: 150-9.
- Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu* 1980; 29: 1-13.
- Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Katagiri K. Effect of castration on the appearance of diabetes in NOD mouse. *Jikken Dobutsu* 1981; 30: 137-40.
- Mansford KR, Opie L. Comparison of metabolic abnormalities in diabetes mellitus induced by streptozotocin or by alloxan. *Lancet* 1968; 1: 670-1.
- Martín J, Hunt SL, Dubus P, Sotillo R, Nehme-Pelluard F, Magnuson MA, Parlow AF, Malumbres M, Ortega S, Barbacid M. Genetic rescue of Cdk4 null mice restores pancreatic  $\beta$ -cell proliferation but not homeostatic cell number. *Oncogene* 2003; 22: 5261-9.
- Mashima H, Ohnishi H, Wakabayashi K, Mine T, Miyagawa J-i, Hanafusa T, Seno M, Yamada H, Kojima I. Betacellulin and activin A coordinately convert amylase-secreting pancreatic AR42J cells into insulin-secreting cells. *Journal of Clinical Investigation* 1996; 97: 1647.
- Matsushima Y, Makino H, Kanatsuka A, Osegawa M, Kumagai A, Nishimura M, Tochino Y, Makino S. Pancreatic somatostatin contents in spontaneously diabetic KK and non-obese diabetic (NOD) mice. *Horm Metab Res* 1982; 14: 292-8.
- Meier JJ, Hücking K, Holst JJ, Deacon CF, Schmiegel WH, Nauck MA. Reduced insulinotropic effect of gastric inhibitory polypeptide in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2001; 50: 2497-504.
- Meier JJ, Butler AE, Saisho Y, Monchamp T, Galasso R, Bhushan A, Rizza RA, Butler PC.  $\beta$ -cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of  $\beta$ -cell mass in humans. *Diabetes* 2008; 57: 1584-94.
- Meslier N, Gagnadoux F, Giraud P, Person C, Ouksel H, Urban T, Racineux JL. Impaired glucose-insulin metabolism in males with obstructive sleep apnoea syndrome. *Eur Respir J* 2003; 22: 156-60.
- Miyawaki K, Yamada Y, Yano H, Niwa H, Ban N, Ihara Y, Kubota A, Fujimoto S, Kajikawa M, Kuroe A, Tsuda K, Hashimoto H, Yamashita T, Jomori T, Tashiro F, Miyazaki J, Seino Y. Glucose intolerance caused by a defect in the entero-insular axis: a study in gastric inhibitory polypeptide receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 14843-7.

- Montanya E, Nacher V, Biarnés M, Soler J. Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy. *Diabetes* 2000; 49: 1341-6.
- Murtaugh LC, Melton DA. Genes, signals, and lineages in pancreas development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003; 19: 71-89.
- Nauck M, Stöckmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1986; 29: 46-52.
- Nauck M, Schmidt W, Ebert R, Strietzel J, Cantor P, Hoffmann G, Creutzfeldt W. Insulinotropic properties of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in man: interactions with glucose, phenylalanine, and cholecystokinin-8. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1989; 69: 654-62.
- Nauck M, Kleine N, Ørskov C, Holst JJ, Willms B, Creutzfeldt W. Normalization of fasting hyperglycaemia by exogenous glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 1993; 36: 741-4.
- Nyberg J, Anderson MF, Meister B, Alborn A-M, Ström A-K, Brederlau A, Illerskog A-C, Nilsson O, Kieffer TJ, Hietala MA. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is expressed in adult hippocampus and induces progenitor cell proliferation. *The Journal of Neuroscience* 2005; 25: 1816-25.
- Oh YS, Shin S, Lee Y-J, Kim EH, Jun H-S. Betacellulin-induced beta cell proliferation and regeneration is mediated by activation of ErbB-1 and ErbB-2 receptors. *PLoS ONE* 2011; 6: e23894.
- Ohneda A, Kobayashi T, Nihei J, Tochino Y, Kanaya H, Makino S. Insulin and glucagon in spontaneously diabetic non-obese mice. *Diabetologia* 1984; 27: 460-3.
- Otani K, Kulkarni RN, Baldwin AC, Krutzfeldt J, Ueki K, Stoffel M, Kahn CR, Polonsky KS. Reduced  $\beta$ -cell mass and altered glucose sensing impair insulin-secretory function in  $\beta$ IRKO mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2004; 286: E41-E9.
- Pamir N, Lynn FC, Buchan AM, Ehses J, Hinke SA, Pospisilik JA, Miyawaki K, Yamada Y, Seino Y, McIntosh CH, Pederson RA. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor null mice exhibit compensatory changes in the enteroinsular axis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 284: E931-9.

- Papadopoulou S, Edlund H. Attenuated Wnt signaling perturbs pancreatic growth but not pancreatic function. *Diabetes* 2005; 54: 2844-51.
- Parthier C, Kleinschmidt M, Neumann P, Rudolph R, Manhart S, Schlenzig D, Fanghanel J, Rahfeld J-U, Demuth H-U, Stubbs MT. Crystal structure of the incretin-bound extracellular domain of a G protein-coupled receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007; 104: 13942-7.
- Pearson K, Scott D, Torrance B. Effects of partial surgical pancreatectomy in rats. I. Pancreatic regeneration. *Gastroenterology* 1977; 72: 469-73.
- Pederson RA, Satkunarajah M, McIntosh C, Scrocchi LA, Flamez D, Schuit F, Drucker DJ, Wheeler MB. Enhanced glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion and insulinotropic action in glucagon-like peptide 1 receptor-/-mice. *Diabetes* 1998; 47: 1046-52.
- Perfetti R, Zhou J, Doyle ME, Egan JM. Glucagon-like peptide-1 induces cell proliferation and pancreatic-duodenum homeobox-1 expression and increases endocrine cell mass in the pancreas of old, glucose-intolerant rats. *Endocrinology* 2000; 141: 4600-5.
- Perley MJ, Kipnis DM. Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects. *Journal of Clinical Investigation* 1967; 46: 1954.
- Plachot C, Movassat J, Portha B. Impaired  $\beta$ -cell regeneration after partial pancreatectomy in the adult Goto-Kakizaki rat, a spontaneous model of type II diabetes. *Histochemistry and cell biology* 2001; 116: 131-9.
- Popper BA (2013) Impact of the genetic background on the development of diabetes-associated renal lesions in GIPRdn transgenic diabetic mice. Verlag Dr. Hut
- Prasadan K, Koizumi M, Tulachan S, Shiota C, Lath N, Paredes J, Guo P, El-Gohary Y, Malek M, Shah S. The expression and function of glucose-dependent insulinotropic polypeptide in the embryonic mouse pancreas. *Diabetes* 2011; 60: 548-54.
- Preitner F, Ibberson M, Franklin I, Binnert C, Pende M, Gjinovci A, Hansotia T, Drucker DJ, Wollheim C, Burcelin R. Gluco-incretins control insulin secretion at multiple levels as revealed in mice lacking GLP-1 and GIP receptors. *Journal of Clinical Investigation* 2004; 113: 635.
- Proietto J, Rohner-Jeanrenaud F, Ionescu E, Jeanrenaud B. Role of the oropharynx in regulation of glycemia. *Diabetes* 1987; 36: 791-5.

Puff R, Dames P, Weise M, Göke B, Seissler J, Parhofer K, Lechner A. Reduced proliferation and a high apoptotic frequency of pancreatic beta cells contribute to genetically-determined diabetes susceptibility of db/db BKS mice. Hormone and metabolic research= Hormon-und Stoffwechselforschung= Hormones et metabolisme 2011; 43: 306-11.

Qi Z, Fujita H, Jin J, Davis LS, Wang Y, Fogo AB, Breyer MD. Characterization of susceptibility of inbred mouse strains to diabetic nephropathy. Diabetes 2005; 54: 2628-37.

Rahier J, Ibrahim M, Channaoui K. Islet Cell-populations in Obese Subjects and Type-2 (non-insulin-dependent) Diabetic-patients. Diabetologia: clinical and experimental diabetes and metabolism 1989; 32: A532-A.

Ranganath L, Sedgwick I, Morgan L, Wright J, Marks V. The ageing entero-insular axis. Diabetologia 1998; 41: 1309-13.

Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. Diabet Med 2005; 22: 359-70.

Rocca A, Brubaker P. Role of the vagus nerve in mediating proximal nutrient-induced glucagon-like peptide-1 secretion 1. Endocrinology 1999; 140: 1687-94.

Rooman I, Lardon J, Bouwens L. Gastrin stimulates  $\beta$ -cell neogenesis and increases islet mass from transdifferentiated but not from normal exocrine pancreas tissue. Diabetes 2002; 51: 686-90.

Rooman I, Bouwens L. Combined gastrin and epidermal growth factor treatment induces islet regeneration and restores normoglycaemia in C57Bl6/J mice treated with alloxan. Diabetologia 2004; 47: 259-65.

Rulifson IC, Karnik SK, Heiser PW, Ten Berge D, Chen H, Gu X, Taketo MM, Nusse R, Hebrok M, Kim SK. Wnt signaling regulates pancreatic  $\beta$  cell proliferation. Proceedings of the National Academy of Sciences 2007; 104: 6247-52.

Salas E, Rabhi N, Froguel P, Annicotte J-S. Role of Ink4a/Arf locus in beta cell mass expansion under physiological and pathological conditions. Journal of diabetes research 2014; 2014

Salpeter SJ, Khalaileh A, Weinberg-Corem N, Ziv O, Glaser B, Dor Y. Systemic regulation of the age-related decline of pancreatic  $\beta$ -cell replication. Diabetes 2013; 62: 2843-8.

Scaglia L, Smith FE, Bonner-Weir S. Apoptosis contributes to the involution of beta cell mass in the post partum rat pancreas. Endocrinology 1995; 136: 5461-8.

- Scaglia L, Cahill CJ, Finegood DT, Bonner-Weir S. Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. *Endocrinology* 1997; 138: 1736-41.
- Schwitzgebel VM, Scheel DW, Conners JR, Kalamaras J, Lee JE, Anderson DJ, Sussel L, Johnson JD, German MS. Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* 2000; 127: 3533-42.
- Scrocchi LA, Brown TJ, MaClusky N, Brubaker PL, Auerbach AB, Joyner AL, Drucker DJ. Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagon-like peptide 1 receptor gene. *Nat Med* 1996; 2: 1254-8.
- Seno M, Tada H, Kosaka M, Sasada R, Igarashi K, Shing Y, Folkman J, Ueda M, Yamada H. Human betacellulin, a member of the EGF family dominantly expressed in pancreas and small intestine, is fully active in a monomeric form. *Growth Factors* 1996; 13: 181-91.
- Seymour PA, Bennett WR, Slack JM. Fission of pancreatic islets during postnatal growth of the mouse. *J Anat* 2004; 204: 103-16.
- Shamsi NA, Salkeld MD, Rattanatray L, Voultzios A, Varcoe TJ, Boden MJ, Kennaway DJ. Metabolic consequences of timed feeding in mice. *Physiology & behavior* 2014; 128: 188-201.
- Sharma K, McCue P, Dunn SR. Diabetic kidney disease in the db/db mouse. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284: F1138-44.
- Srinivasan S, Ohsugi M, Liu Z, Fatrai S, Bernal-Mizrachi E, Permutt MA. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis is partly mediated by reduced insulin signaling through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and increased glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in mouse insulinoma cells. *Diabetes* 2005; 54: 968-75.
- Steffes MW, Mauer SM. Diabetic glomerulopathy in man and experimental animal models. *Int Rev Exp Pathol* 1984; 26: 147-75.
- Stoffers DA, Kieffer TJ, Hussain MA, Drucker DJ, Bonner-Weir S, Habener JF, Egan JM. Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes* 2000; 49: 741-8.
- Suarez-Pinzon WL, Power RF, Yan Y, Wasserfall C, Atkinson M, Rabinovitch A. Combination therapy with glucagon-like peptide-1 and gastrin restores normoglycemia in diabetic NOD mice. *Diabetes* 2008; 57: 3281-8.

Sugimoto H, Grahovac G, Zeisberg M, Kalluri R. Renal fibrosis and glomerulosclerosis in a new mouse model of diabetic nephropathy and its regression by bone morphogenic protein-7 and advanced glycation end product inhibitors. *Diabetes* 2007; 56: 1825-33.

Swenne I, Eriksson U. Diabetes in pregnancy: islet cell proliferation in the fetal rat pancreas. *Diabetologia* 1982; 23: 525-8.

Swenne I, Andersson A. Effect of genetic background on the capacity for islet cell replication in mice. *Diabetologia* 1984; 27: 464-7.

Swenne I. Pancreatic beta-cell growth and diabetes mellitus. *Diabetologia* 1992; 35: 193-201.

Talchai C, Xuan S, Kitamura T, DePinho RA, Accili D. Generation of functional insulin-producing cells in the gut by Foxo1 ablation. *Nat Genet* 2012; 44: 406-12.

Teitelman G, Alpert S, Polak JM, Martinez A, Hanahan D. Precursor cells of mouse endocrine pancreas coexpress insulin, glucagon and the neuronal proteins tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y, but not pancreatic polypeptide. *Development* 1993; 118: 1031-9.

Téllez N, Joanny G, Escoriza J, Vilaseca M, Montanya E. Gastrin treatment stimulates  $\beta$ -cell regeneration and improves glucose tolerance in 95% pancreatectomized rats. *Endocrinology* 2011; 152: 2580-8.

Teta M, Long SY, Wartschow LM, Rankin MM, Kushner JA. Very slow turnover of  $\beta$ -cells in aged adult mice. *Diabetes* 2005; 54: 2557-67.

Teta M, Rankin MM, Long SY, Stein GM, Kushner JA. Growth and regeneration of adult  $\beta$  cells does not involve specialized progenitors. *Developmental cell* 2007; 12: 817-26.

The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20: 1-11. July 1997: <http://care.diabetesjournals.org/content/20/7/1183.short>. 31. August 2014.

Tourrel C, Balbe D, Lacorne M, Meile M, Kergoat M, Portha B. GLP-1 and exendin-4 stimulate beta-cell mass neogenesis in STZ-treated newborn rats resulting in persistently improved glucose homeostasis at adult age. *Diabetes* 2001; 50: 1562-70.

Toye A, Lippiat J, Proks P, Shimomura K, Bentley L, Hugill A, Mijat V, Goldsworthy M, Moir L, Haynes A. A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice. *Diabetologia* 2005; 48: 675-86.

- Trudeau JD, Dutz JP, Arany E, Hill DJ, Fieldus WE, Finegood DT. Neonatal beta-cell apoptosis: a trigger for autoimmune diabetes? *Diabetes* 2000; 49: 1-7.
- Trumper A, Trumper K, Hörsch D. Mechanisms of mitogenic and anti-apoptotic signaling by glucose-dependent insulinotropic polypeptide in beta (INS-1)-cells. *Journal of Endocrinology* 2002; 174: 233-46.
- Trümper A, Trümper K, Trusheim H, Arnold R, Göke B, Hörsch D. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is a growth factor for  $\beta$  (INS-1) cells by pleiotropic signaling. *Molecular Endocrinology* 2001; 15: 1559-70.
- Van de Casteele M, Leuckx G, Baeyens L, Cai Y, Yuchi Y, Coppens V, De Groef S, Eriksson M, Svensson C, Ahlgren U. Neurogenin 3&plus; cells contribute to  $\beta$ -cell neogenesis and proliferation in injured adult mouse pancreas. *Cell death & disease* 2013; 4: e523.
- Vavra J, Deboer C, Dietz A, Hanka L, Sokolski W. Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic. *Antibiotics annual* 1958; 7: 230-5.
- Volz-Peters A, Peters H, Berghofer P, Jiang J, Goke R, Balling R, Wanke R, Wolf E, Goke B. Expression of a dominant-negative GIP receptor induces diabetes mellitus in transgenic mice. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* 2000; 108: S40-S.
- Volz A, Göke R, Lankat-Buttgereit B, Fehmann H-C, Bode HP, Göke B. Molecular cloning, functional expression, and signal transduction of the GIP-receptor cloned from a human insulinoma. *FEBS letters* 1995; 373: 23-9.
- Wang R, Klöppel G, Bouwens L. Duct-to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats. *Diabetologia* 1995; 38: 1405-11.
- Weir GC, Laybutt DR, Kaneto H, Bonner-Weir S, Sharma A. Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes* 2001; 50: S154.
- Weir GC, Bonner-Weir S. Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes* 2004; 53: S16-S21.
- Weir GC, Aguayo-Mazzucato C, Bonner-Weir S.  $\beta$ -cell dedifferentiation in diabetes is important, but what is it? *Islets* 2013; 5: 233-7.
- Weir GC, Bonner-Weir S. Islet  $\beta$  cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2013; 1281: 92-105.

Westman S. Development of the obese-hyperglycaemic syndrome in mice. *Diabetologia* 1968; 4: 141-9.

World Health Organization. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia: report of a WH. 2006: 28. April 2014.

World Health Organization. Fact sheet: what is diabetes. Fact sheet N 312. Reviewed on October 2013 2008:

Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S. Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes* 1999; 48: 2270-6.

Xu X, D'Hoker J, Stange G, Bonne S, De Leu N, Xiao X, Van De Casteele M, Mellitzer G, Ling Z, Pipeleers D.  $\beta$  cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell* 2008; 132: 197-207.

Yamamoto K, Miyagawa J-i, Waguri M, Sasada R, Igarashi K, Li M, Nammo T, Moriwaki M, Imagawa A, Yamagata K. Recombinant human betacellulin promotes the neogenesis of beta-cells and ameliorates glucose intolerance in mice with diabetes induced by selective alloxan perfusion. *Diabetes* 2000; 49: 2021-7.

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nature medicine* 2001; 7: 941-6.

Yaqub T, Tikhonova IG, Lättig J, Magnan R, Laval M, Escrieut C, Boulègue C, Hewage C, Fourmy D. Identification of determinants of glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor that interact with N-terminal biologically active region of the natural ligand. *Molecular pharmacology* 2010; 77: 547-58.

Yin D, Tao J, Lee DD, Shen J, Hara M, Lopez J, Kuznetsov A, Philipson LH, Chong AS. Recovery of Islet  $\beta$ -Cell Function in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice An Indirect Role for the Spleen. *Diabetes* 2006; 55: 3256-63.

Zajicek G, Arber N, Schwartz-Arad D, Ariel I. Streaming pancreas: islet cell kinetics. *Diabetes research (Edinburgh, Scotland)* 1990; 13: 121-5.

Zhang J, Liu F. Tissue-specific insulin signaling in the regulation of metabolism and aging. *IUBMB life* 2014; 66: 485-95.

- Zhang X, Gaspard JP, Mizukami Y, Li J, Graeme-Cook F, Chung DC. Overexpression of cyclin D1 in pancreatic  $\beta$ -cells in vivo results in islet hyperplasia without hypoglycemia. *Diabetes* 2005; 54: 712-9.
- Zhou L, Pelengaris S, Abouna S, Young J, Epstein D, Herold J, Nattkemper TW, Nakhai H, Khan M. Re-expression of IGF-II is important for beta cell regeneration in adult mice. 2012;
- Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to  $\beta$ -cells. *Nature* 2008; 455: 627-32.
- Zraika S, Aston-Mourney K, Laybutt D, Kebede M, Dunlop M, Proietto J, Andrikopoulos S. The influence of genetic background on the induction of oxidative stress and impaired insulin secretion in mouse islets. *Diabetologia* 2006; 49: 1254-63.
- Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Müller B, Vallejo M, Thomas MK, Habener JF. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* 2001; 50: 521-33.

## 10. Danksagung

Ich möchte PD Dr. Nadja Herbach für die Überlassung des Themas, die große Unterstützung, die Einarbeitung in das Thema meiner Doktorarbeit, die Hilfe bei sämtlichen Belangen dieser Dissertation und das kritische Lesen der Arbeit danken.

Weiterer Dank geht an Univ.-Prof. Dr. R. Wanke für die Möglichkeit, diese Dissertation in seinen Laboren durchzuführen. Ich bin sehr dankbar für seine Unterstützung und die konstruktiven Besprechungen mit ihm.

Dr. Andreas Blutke bin ich dankbar für die konstruktiven Besprechungen, das Einarbeiten in die Statistik und die Überlassung des Lamellators.

Außerdem möchte ich dem gesamten Team des Instituts für Tierpathologie der LMU für die Hilfe danken, besonders Lisa Pichl, Michaela Nützel, Doris Merl für die technische Unterstützung und Sabine Zwirz und Adran Ciolovan für die Versorgung der Mäuse.

Besonderer Dank geht an Carola Seibold für die Einarbeitung in der Laborarbeit, an Alexandra Rieger für die Unterstützung und an Stefanie Schauer für das kritische Lesen.

Zuletzt möchte ich meiner Familie, meinem Patenonkel und besonders meinem Verlobten für die großartige Unterstützung danken.