

Aus dem Institut für Pathologie  
(Direktor Prof. Dr. med. Frank Dombrowski)  
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Thema: Einfluss des Transkriptionsfaktors Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP) auf die hepatische Glykogenspeicherung und Tumorgenese bei diabetischen Mäusen nach intraportaler Pankreasinseltransplantation

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2021

Eingereicht von: Katrina Ehrlicke  
geboren am: 24.06.1995  
in: Stralsund

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Silvia Ribback

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Beate Straub

Ort: Universität Greifswald, Institut für Pathologie

Tag der Disputation: 13.10.2022

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Grundlagen und Stand der Forschung</b>	<b>3</b>
3.1	Diabetes mellitus . . . . .	3
3.2	Hepatozelluläres Karzinom (HCC) . . . . .	5
3.3	Präneoplastische Leberherde . . . . .	7
3.4	Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP) . . . . .	9
3.4.1	Vorkommen und Aufbau . . . . .	9
3.4.2	Funktion . . . . .	9
3.4.3	ChREBP in der Leber . . . . .	10
3.4.4	ChREBP in den $\beta$ -Zellen des Pankreas . . . . .	11
3.4.5	ChREBP im Fettgewebe . . . . .	11
3.4.6	Einfluss von ChREBP auf die Entstehung von Tumoren . . . . .	12
3.4.7	Regulation . . . . .	13
3.5	Modell der intraportalen Pankreasinseltransplantation . . . . .	14
<b>4</b>	<b>Material und Methode</b>	<b>15</b>
4.1	Versuchsgruppen . . . . .	15
4.2	Insulinstick . . . . .	16
4.3	Pankreasinseltransplantation . . . . .	17
4.3.1	Pankreasinselisolierung aus Spendermäusen . . . . .	17
4.3.2	Verdau und Reinigung der Spenderpankreatata . . . . .	17
4.3.3	Pankreasinseltransplantation . . . . .	19
4.4	Tötung und Perfusion am Versuchsende . . . . .	21
4.4.1	5-Bromo-2'-deoxyuridine(BrdU)-Gabe . . . . .	21
4.4.2	Perfusion und Organentnahme . . . . .	21
4.5	Auswertung . . . . .	23
4.5.1	Proliferationsaktivität der extrafokalen Hepatozyten und der Glykogenspeicherherde . . . . .	23
4.5.2	Glykogenspeicherung der Hepatozyten . . . . .	23
4.6	Statistische Auswertung . . . . .	25
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>26</b>
5.1	Proliferationsaktivität der extrafokalen Hepatozyten . . . . .	26
5.1.1	Proliferationsaktivität der Wildtyp-Mäuse . . . . .	26
5.1.2	Proliferationsaktivität der ChREBP-Knockout-Mäuse . . . . .	27

5.1.3	Vergleich der Proliferationsaktivitäten der Wildtyp- und ChREBP-Knockout-Mäuse . . . . .	28
5.2	Häufigkeit der Glykogenspeicherherde . . . . .	31
5.3	Proliferationsaktivität der Glykogenspeicherherde . . . . .	33
5.4	Nachweis der transplantierten Inseln . . . . .	34
5.5	Glykogenspeicherung der Hepatozyten . . . . .	35
5.5.1	Glykogenspeicherung der Wildtyp-Mäuse . . . . .	35
5.5.2	Glykogenspeicherung der ChREBP-Knockout-Mäuse . . . . .	35
5.5.3	Vergleich der Glykogenspeicherung der Wildtyp- und ChREBP-Knockout-Mäuse . . . . .	36
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>38</b>
6.1	Glykogenspeicherherde . . . . .	38
6.2	Tumoren . . . . .	40
6.3	Proliferationsaktivität im extrafokalen Lebergewebe . . . . .	40
6.4	Glykogenspeicherung . . . . .	42
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>45</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>46</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>47</b>
	<b>Symbol- &amp; Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>48</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>48</b>
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>57</b>
A.1	Schematische Abbildungen zum Glukose- und Glykogenstoffwechsel . . .	57
A.2	Score zur Überwachung des Allgemeinzustands von Versuchstieren . . . .	60
A.3	Materialien . . . . .	60
A.3.1	Allgemeine Versuchsmaterialien . . . . .	60
A.3.2	Tierhaltung . . . . .	64
A.3.3	OP-Besteck . . . . .	65
A.3.4	Chemikalien . . . . .	67
A.4	Konservierung der Mausorgane . . . . .	73
A.5	Materialien zur Konservierung der Mausorgane . . . . .	73
A.5.1	Spüllösung . . . . .	73
A.5.2	Fixationslösung . . . . .	74
A.5.3	Nachfixationslösung . . . . .	75
A.5.4	Natrium-Phosphatpuffer 0.1 mol . . . . .	75
A.5.5	Natrium-Phosphatpuffer 0.2 mol . . . . .	76

---

A.5.6	Aufbewahrungspuffer 0.1 mol . . . . .	76
A.5.7	Cacodylatpuffer 0.1 mol . . . . .	76
A.5.8	Cacodylatpuffer 0.2 mol . . . . .	77
A.6	Anfertigung histologischer Präparate . . . . .	77
A.6.1	Protokoll zur Durchführung der PAS-Reaktion . . . . .	77
A.6.2	Protokoll zur Durchführung der BrdU-Reaktion mit vorheriger HE-Färbung . . . . .	78

# 1 Einleitung

Das Hepatozelluläre Karzinom (hepatocellular carcinoma, HCC) gilt weltweit als fünfthäufigste Tumorerkrankung. In den westlichen Industrieländern gilt seine Inzidenz als eine der am schnellsten zunehmenden. Weltweit wird von über 600.000 Fällen pro Jahr berichtet. Diese Entwicklung, kombiniert mit der hohen Mortalität des HCC, sind Grund für die weitere Erforschung der Krankheitsursachen [79, 53].

Besonders häufig betroffen sind Patienten mit einer Leberzirrhose. Allerdings kann ein HCC auch ohne Zirrhose, vor allem bei Patienten mit einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) oder einer nicht-alkoholischen Steatohepatitis (non-alcoholic steatohepatitis, NASH) auftreten. Die Ursachen dieser Erkrankungen sind vor allem ein Diabetes mellitus und das metabolische Syndrom, welches besonders häufig auf dem Boden einer Adipositas entsteht [53, 24].

Der Einfluss des Diabetes konnte bereits in einem Hepatokarzinogenesemodell in Ratten nachgewiesen werden. Diabetischen Tieren wurden über eine portale Injektion pankreatische Inseln transplantiert. In den Azini im Abstromgebiet dieser Inseln entwickelten die Tiere klarzellige Leberherde (clear cell foci, CCF bzw. Glykogenspeicherherde), welche durch eine vermehrte Glykogen- und Lipidspeicherung in den Hepatozyten gekennzeichnet sind und bei der Ratte Vorläuferläsionen des Hepatozellulären Adenoms (HCA) und des HCC darstellen [18, 17].

In der Untersuchung der CCFs und HCCs von Menschen und Ratten fiel auf, dass der AKT/mTOR (V-akt murine thymoma viral oncogene homolog/mammalian target of Rapamycin) Signalweg stark aktiviert war. Außerdem konnten Veränderungen im Glukose- und Fett-Metabolismus festgestellt werden. Hierzu zählten eine Aktivierung der Lipogenese bei reduzierter Fettsäureoxidation und eine Induktion der Glykolyse und des Pentosephosphatwegs bei gleichzeitig supprimierter Glukoneogenese. Diese Veränderungen waren von einer Hochregulation des Transkriptionsfaktors ChREBP (carbohydrate responsive element-binding protein) begleitet [75, 25]. Somit scheint ChREBP in die Tumorgenese des HCC involviert zu sein. Ob es eher als Tumorsuppressor- oder Protoonkogen agiert, sollte mithilfe eines weiteren Tiermodells herausgefunden werden.

Das Inseltransplantationsmodell der Ratte wurde von unserer Arbeitsgruppe auf die Maus übertragen und mit einem ChREBP-Knockout-Modell kombiniert. In den Kurzzeitexperimenten zeigte sich, dass die ChREBP-Knockout-Mäuse sowohl nach einer als auch nach vier Wochen deutlich häufiger CCFs entwickelten, als die Wildtyp-Tiere. Die Proliferationsaktivität der CCFs der KO-Mäuse war im Vergleich zu den WT-Mäusen signifikant niedriger, während die Glykogenspeicherung deutlich zunahm und die Lipid-

speicherung nahezu fehlte [76].

Diese Entwicklungen sollten u.a. in meiner Arbeit nun in den Langzeitversuchen weiter beobachtet werden. Dazu wurden Versuchszeiträume von drei, sechs und 12 Monaten festgelegt. Meine Arbeit setzt sich mit den Tieren der Drei-Monats-Gruppe auseinander.

## 2 Fragestellung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der längerfristigen Entwicklung (Versuchszeitraum: drei Monate) der bereits in Kurzzeitversuchen nachgewiesenen Glykogenspeicherherde im Rahmen eines hormonellen Hepatokarzinogenesemodells nach intraportaler Pankreasinseltransplantation bei diabetischen Mäusen. Ein zentrales Ziel ist es herauszufinden, ob sich diese CCFs, wie bei der Ratte, zu Hepatozellulären Adenomen (hepatocellular adenoma, HCA) und HCCs weiterentwickeln und somit auch in der Maus als präneoplastisch angesehen werden können. Weiterhin soll untersucht werden, wie sich das Auftreten der Herde über längere Zeit verhält. Es wird angenommen, dass durch den längeren Einfluss einer durch den Diabetes verursachten Hyperglykämie und inseltransplantationsbedingter Hyperinsulinämie auf die Hepatozyten nicht nur mehr Glykogenspeicherherde entstehen, sondern sich nun auch HCAs und HCCs entwickeln.

Ergänzend dazu werden die durch einen Diabetes mellitus entstehenden Veränderungen in der Leber beobachtet. Im speziellen soll hier mithilfe eines graphischen Auswertungsverfahrens an PAS-Reaktionen der Leberschnitte die Glykogenspeicherung der Hepatozyten bestimmt werden. Erwartet wird ein geringerer Glykogengehalt in den Hepatozyten der diabetischen Tiere im Vergleich zu den nicht diabetischen. Außerdem wird angenommen, dass die transplantierten Inseln über eine Hyperinsulinämie in ihrem Abstromgebiet eine stärkere Glykogenspeicherung verursachen. Weiterhin wird die Proliferationsaktivität der Hepatozyten untersucht. Hierfür wird der 5-Bromo-2'-deoxyuridine Labeling Index sowohl in entstehenden Tumoren und Herden als auch im restlichen Lebergewebe bestimmt.

Zudem soll der Einfluss des Transkriptionsfaktors ChREBP auf die Glykogenspeicherung, Proliferationsaktivität und Tumorentstehung untersucht werden. ChREBP ist ein zentraler Regulator des Glukosestoffwechsels in der Leber, sodass mit einer stärkeren Glykogenspeicherung in den Hepatozyten der Knockout-Mäuse gerechnet wird. Außerdem scheint der Transkriptionsfaktor einen Einfluss auf die Hepatokarzinogenese zu haben welcher untersucht werden soll, indem die Zahl der entstehenden Tumoren und Glykogenspeicherherde in den Wildtyp- und Knockout-Gruppen verglichen wird.

## 3 Grundlagen und Stand der Forschung

### 3.1 Diabetes mellitus

Im Jahr 2019 waren weltweit 463 Mio. Menschen an Diabetes mellitus erkrankt. Davon 59 Mio. in Europa und 9,5 Mio. in Deutschland [27]. Etwa 95 % der Krankheitsfälle entfallen auf den Typ 2 Diabetes [67]. Dieser zeichnet sich durch eine Hyperglykämie aus, welche durch eine Insulinresistenz bedingt ist. Im Gegensatz dazu ist der Typ 1 Diabetes durch einen absoluten Insulinmangel, welcher aus einer Zerstörung der pankreatischen  $\beta$ -Zellen resultiert, gekennzeichnet [80].

Diabetes ist eine weltweit stark verbreitete Erkrankung, welche vor allem durch seine hohe Komplikationsrate eine große Bedeutung für das Gesundheitssystem darstellt. Zu diesen Komplikationen zählen Folgeerkrankungen wie Retinopathie, Nierenerkrankungen, diabetisches Fußsyndrom, Amputationen sowie kardiovaskuläre Erkrankungen [67]. Epidemiologische Studien zeigen weiterhin einen Zusammenhang zwischen Typ 2 Diabetes und einer erhöhten Inzidenz und Mortalität einiger Krebserkrankungen. Zu den davon betroffenen Organen zählen Pankreas, Brust, Endometrium, Kolon und auch die Leber. Die Inzidenz hepatobiliärer Karzinome bei Patienten mit Typ 2 Diabetes ist doppelt so hoch wie die ohne Diabetes. Die Mortalität steigt sogar auf das 2.5 fache [83, 88].

Zu den Mechanismen, die diesen Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus und Krebserkrankungen erklären könnten zählen Hyperglykämie, Insulinresistenz, Hyperinsulinämie, erhöhtes insulin-like growth factor-1 (IGF-1) und inflammatorische Zytokine [83].

Bei einer Insulinresistenz entsteht durch eine vermehrte Insulinausschüttung der pankreatischen  $\beta$ -Zellen eine Hyperinsulinämie. Insulin und IGF-1 und IGF-2, welche durch die insulinbedingte Hemmung des IGF-binding protein (IGFBP) vermehrt zur Verfügung stehen, binden an die Insulin-Rezeptor-Isoformen IR-A und IR-B, den IGF-1-Rezeptor (IGF-1R) und IR/IGF-1R Hybridrezeptoren (IR-A/IGF-1R, IR-B/IGF-1R). Die Bindung an den IR aktiviert den phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT/mTOR Signalweg, während die Bindung an den IGF-1R sowohl denselben als auch den rat sarcoma (Ras)/rapidly accelerated fibrosarcoma (Raf)/mitogen-activated protein kinase (MAPK) Signalweg aktiviert. Das in der Tumorumgebung verstärkt vorhandene Östrogen, welches durch eine insulinbedingt erhöhte Expression der Aromatase verursacht sein könnte, wirkt über den Östrogen-Rezeptor  $\alpha$  (estrogen receptor  $\alpha$ ) auf die Tumorzelle. Auch inflammatorische Zytokine wie Interleukin 6 und  $1\beta$  (IL-6, IL- $1\beta$ ) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) haben einen Einfluss. Sie aktivieren den Janus kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) Signalweg in der Tumorzelle. Die genannten Mechanismen verstärken in der Tumorzelle die Proliferation, Migration und Invasion und hemmen die

Apoptose (siehe Abbildung 1) [83].

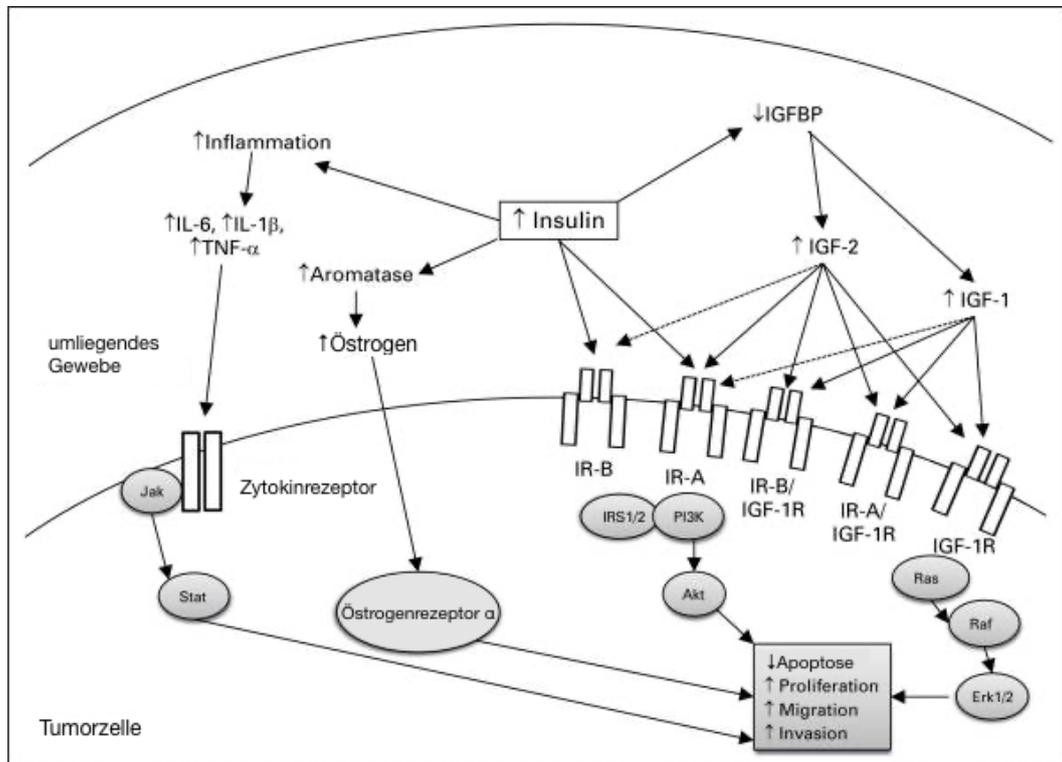


Abbildung 1: Einfluss einer Hyperinsulinämie auf Tumoren. Modifiziert nach [83]. Insulin kann direkt über seine Rezeptoren (IR-A, IR-B) oder indirekt über IGF-1 und 2 durch eine Aktivierung des PI3K/Akt- und des Ras/Raf/Erk1/2 Signalweges eine Steigerung der Proliferation, Migration und Invasion sowie eine Hemmung der Apoptose in der Tumorzelle bewirken. Gleiche Effekte entstehen insulinvermittelt durch eine verstärkte Inflammation im den Tumor umgebenden Gewebe und eine gesteigerte Aktivität der Aromatase und somit vermehrten Östrogenproduktion. IGF1BP, insulin-like growth factor binding protein; IGF-1/2, insulin-like growth factor 1/2; IR-A/B, insulin receptor A/B; IGF-1R, insulin-like growth factor 1 receptor; IRS1/2, insulin receptor substrate 1/2; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; Akt, protein kinase b; Ras, rat sarcoma; Raf, rapidly accelerated fibrosarcoma; Erk1/2, extracellular regulated kinase 1/2; IL-6/1 $\beta$ , interleukin 61 $\beta$ ; TNF- $\alpha$ , Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ; Jak, janus kinase; Stat, signal transducer and activator of transcription proteins

Eine Hyperglykämie hat eine verstärkte nicht-enzymatische Glykosylierung des Hämoglobins zufolge. Dieses setzt Eisen frei, welches freie Radikale produziert und somit oxidativen Stress verursacht. Oxidativer Stress könnte unter anderem eine Rolle in der Entstehung einer Leberzirrhose spielen, welche ein primärer Risikofaktor für die Entstehung eines Hepatozellulären Karzinoms darstellt [48].

### 3.2 Hepatozelluläres Karzinom (HCC)

2016 betrug in Deutschland laut Robert Koch-Institut die Zahl der Krebsneuerkrankungen in der Leber 8.970, während 7.036 Menschen daran starben [77]. Davon entfallen etwa 75-85% auf das Hepatozelluläre Karzinom. Es gilt als die am schnellsten zunehmende Erkrankung hinsichtlich ihrer tumorassoziierten Sterblichkeit [73].

Zu den wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung eines HCC gehören Hepatitis B und C, Leberzirrhose, nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) und metabolische Erkrankungen wie Diabetes mellitus und Adipositas [73]. Eine NAFLD ist durch die übermäßige Akkumulation von Fettsäuren in den Hepatozyten, ohne signifikanten Alkoholkonsum, gekennzeichnet. Durch Entzündungsprozesse kann die Fettleber zu einer nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) progressieren. Mögliche Folgen sind Nekrosen, Fibrose, Zirrhose und ein signifikant höheres Risiko für ein HCC infolge oder auch ohne eine Zirrhose [86, 54]. In 41.7% der Fälle entsteht ein HCC auf dem Boden einer NASH oder NAFLD ohne Zirrhose [24]. Zu den Risikofaktoren einer NAFLD zählen das metabolische Syndrom, Diabetes mellitus und Insulinresistenz [28].

Diabetes mellitus lässt sich auch als direkter Risikofaktor mit dem HCC in Verbindung bringen. In einer Studie zum Zusammenhang zwischen Diabetes und Lebererkrankungen wurden Diabetiker und nicht diabetische Kontrollpersonen über 10-15 Jahre begleitet. Nachdem alle Patienten mit einer Hepatitis-C oder Hepatitis-B-Infektion, Alkoholkonsum und/oder NAFLD ausgeschlossen wurden, war das Risiko ein HCC zu entwickeln in der diabetischen Gruppe mehr als doppelt so hoch im Vergleich zur Kontrollgruppe [23].

Eine Erklärung hierfür könnte das IGFBP1 sein. Nielsen et al. entdeckten, dass in menschlichen Leberzellen, in denen das IGFBP1 herunterreguliert ist, eine geringere apoptotische Aktivität auftritt [60]. Die Expression von IGFBP1 wurde vor allem in menschlichen Leber- und Uteruszellen lokalisiert. Der Hauptregulator des Proteins ist Insulin, indem es die Transkription inhibiert [47]. Somit könnte dieser anti-apoptotische Einfluss des Insulins die Entstehung eines HCC bei Diabetes mellitus Typ 2 begünstigen. Als weiterer Regulator der Apoptose ist Adiponectin zu nennen, welches in Insulin-resistenten Zellen vermindert vorkommt [68].

Calvisi et al. untersuchten die molekularen Veränderungen im HCC, besonders in Hinblick auf die *de novo* Lipogenese. Sie fanden eine Überexpression der Proteine des AKT/mTOR Signalweges, welcher nicht nur die *de novo* Lipogenese aktiviert, sondern auch den Glukosestoffwechsel beeinflusst [11]. Das IRS1, welches vom Insulin aktiviert und im HCC hochreguliert wird, ist unter anderem ein Aktivator des AKT/mTOR Signalwegs

[68, 75]. Der Transkriptionsfaktor ChREBP, welcher großen Einfluss auf den Lipid- und Glukosestoffwechsel in der Leber hat, wird durch den AKT/mTOR Signalweg indirekt aktiviert und ist im humanen HCC überexprimiert [11, 75].

### 3.3 Präneoplastische Leberherde

Es ist bekannt, dass in der Entwicklung des HCC Vorläuferläsionen, sogenannte präneoplastische Leberherde entstehen. Diese konnten zunächst in Tierexperimenten z.B. durch chemische Karzinogene (z.B. N-nitrosomorpholine) induziert werden [4, 5, 11].

1994 transplantierten Dombrowski et al. pankreatische Inseln in die Pfortader streptozotocin diabetischer Ratten. In der Folge entwickelten sich, im Abstromgebiet dieser Inseln in der Leber, Herde veränderter Hepatozyten in den Azini. Sie zeigten ähnliche morphologische und immunhistochemische Veränderungen, wie die bereits bekannten chemisch induzierten Leberherde. Zu diesen Veränderungen gehört eine exzessive Speicherung von Glykogen und Fett, gleichzeitig verstärkte Proliferation und Apoptose, enzymhistochemisch erhöhte Aktivität der Hexokinase, Pyruvatkinase und Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und eine verringerte Aktivität der Glykogen-Phosphorylase, Glukose-6-Phosphatase, und membrangebundenen Adenosintriphosphatase [19, 16, 18, 10]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sowohl Proteine des Ras/Raf/MAPK-, als auch des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges in den CCF vermehrt exprimiert werden (siehe Abbildung 2) [26, 25]. In Langzeitexperimenten entwickelten sich aus diesen Herden hepatozelluläre Adenome und hepatozelluläre Karzinome. Die durch eine hepatische Inseltransplantation bedingte Hyperinsulinämie in der Leber der Ratten führt bei gleichzeitiger Hyperglykämie somit auch zu glykogenspeichernden Leberherden, welche eine Vorläuferläsion für das HCA und das HCC darstellen [17, 16, 10].

Auch in der humanen Leber können CCF nachgewiesen werden. Sie zeigen ähnliche Charakteristika, wie die der Ratte. Auch hier sind der Ras/Raf/MAPK- und der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg, sowie Enzyme der Glykolyse, *de novo* Lipogenese, Beta-Oxidation und Cholesterolsynthese verstärkt exprimiert. Außerdem werden auch der Insulinrezeptor und Glukosetransporter vermehrt gebildet [75, 74]. Zusätzlich konnten sowohl in den CCFs der Ratte, als auch des Menschen erhöhte Spiegel des Transkriptionsfaktors ChREBP nachgewiesen werden (siehe Abbildung 2) [75, 25]

Leberherde mit ähnlicher Morphologie konnten in unserer Arbeitsgruppe auch vor kurzem in einem Modell der intraportalen Pankreasinseltransplantation der diabetischen Maus induziert werden. Auch hier zeigten sich eine verstärkte Expression der Ras/Raf/MAPK- und PI3K/AKT/mTOR-Signalwege, sowie des Transkriptionsfaktors ChREBP und der Pyruvatkinase in den Leberherden [76].

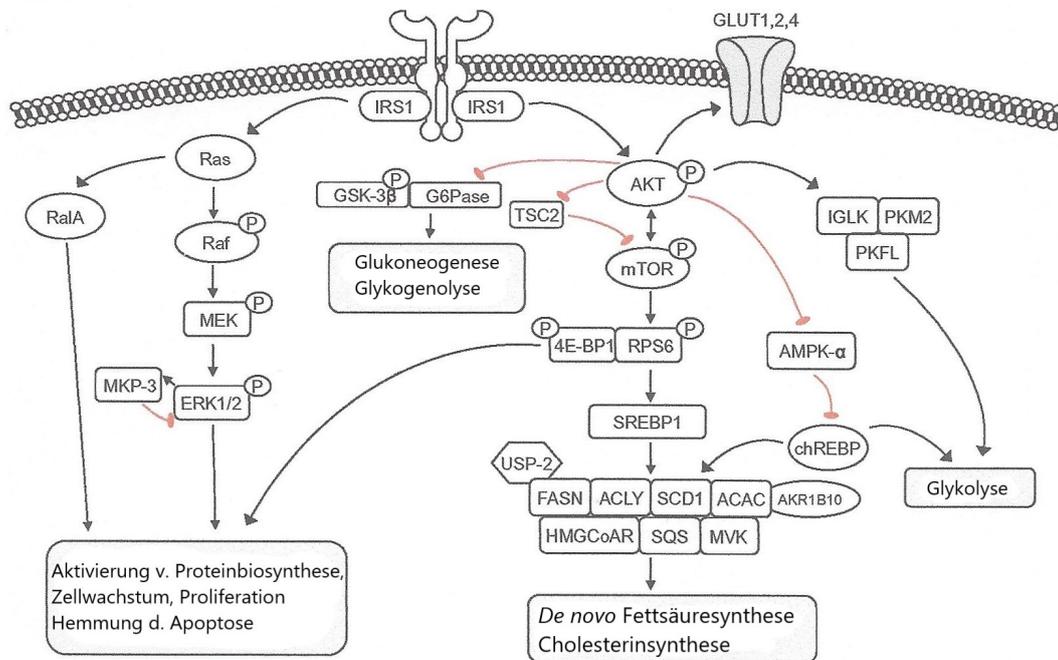


Abbildung 2: Schematische Darstellung der molekularen Mechanismen im CCF der Ratte und des Menschen. Modifiziert nach [75]

Über den Insulinrezeptor und das insulin receptor substrate 1 (IRS-1) kann Insulin im CCF Einfluss auf verschiedene Stoffwechselwege nehmen. Der Ras/Raf/MAPK Signalweg hat eine verstärkte Aktivität der Proteintranslation, des Zellwachstums und der Proliferation sowie eine verminderte apoptotische Aktivität zufolge. Durch die Phosphorylierung von AKT hemmt IRS-1 über die Glukose-6-Phosphatase (G6Pase) und die Glykogen-Synthase-Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) die Glukoneogenese und Glykogenolyse. Außerdem hemmt AKT die Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase  $\alpha$  (AMPK- $\alpha$ ) und aktiviert somit ChREBP. ChREBP hat einen verstärkenden Einfluss auf die Glykolyse und, wie auch der AKT/mTOR Signalweg, auf die *de novo* Fettsäuresynthese und die Cholesterinsynthese. Ein zusätzlicher Aktivator der Glykolyse ist AKT über IGLK, PKM2 und PKFL, außerdem fördert es die Expression der Glukosetransporter GLUT1, 2 und 4 und sorgt somit für ausreichend intrazelluläre Glukose als Ausgangsstoff der Glykolyse.

## 3.4 Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP)

### 3.4.1 Vorkommen und Aufbau

ChREBP ist ein Transkriptionsfaktor, der vorwiegend von der Leber, den pankreatischen  $\beta$ -Zellen, dem weißen und braunen Fettgewebe und der Muskulatur exprimiert wird. Ein geringeres Vorkommen ist auch in der Niere und dem Gehirn beschrieben [62, 36].

Als 864 Aminosäuren großes Protein mit einer relativen molekularen Masse von ca. 95 kDA gehört ChREBP der Helix-Loop-Helix Leuzin-Zipper Transkriptionsfaktor-Familie an. Es besitzt mehrere Schlüsseldomänen, zu denen ein nuclear localisation signal in der Nähe des N-Terminus, Polyprolin-Domänen, eine bHLH/LZ Domäne und eine leucine zipper-like Domäne gehören. Das N-terminale Ende des Proteins enthält ein Glukose sensitives Modul. Dieses ist essentiell für die Glukose-abhängige Funktion von ChREBP [39].

Es sind zwei Isoformen von ChREBP, ChREBP $\alpha$  und ChREBP $\beta$  bekannt. Eine Glukose-bedingte Aktivierung von ChREBP $\alpha$  induziert eine verstärkte Transkription von ChREBP $\beta$ , welches konstitutiv aktiv ist [30].

### 3.4.2 Funktion

Eine Studie zeigt, dass ein Knockout von ChREBP bei C57Bl/6 Mäusen eine Erhöhung von Glukose und Insulin im Blut zufolge hat. Triglyceride und freie Fettsäuren hingegen sind im Blut vermindert nachweisbar. Während der Anteil von Fettgewebe im Körper dieser Mäuse erniedrigt war, fanden sich in der Leber eine vermehrte Glykogenspeicherung in den Hepatozyten. Außerdem konnte eine geringere Glukosetoleranz und eine moderate Insulinresistenz festgestellt werden [38]. Dies zeigt, dass ChREBP einen Einfluss auf die Regulation des Fett- und Glukosestoffwechsels hat.

Zu den Zielgenen von ChREBP gehört unter anderem die Pyruvatkinase. Sie ist ein Schlüsselenzym der Glykolyse (siehe Anhang A.1, Abbildung 15). ChREBP steigert ihre Expression und sorgt somit für eine verstärkte Glykolyse. Zu den von ChREBP in ihrer Expression gesteigerten Enzymen der Lipogenese gehören die Adenosinmonophosphat-Citrat-Lyase (ACL), die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC), die Fettsäure-Synthase (FAS), die Stearoyl-CoA-Desaturase1 (SCD1) und die Fettsäure-Elongase (Elovl), wodurch ChREBP die Fettsäuresynthese induzieren kann [78]. Auch der Pentose-Phosphat-Weg (siehe Anhang A.1, Abbildung 16) kann durch ChREBP über eine vermehrte Expression der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) aktiviert werden. Weiterhin werden die Enzyme G6Pase und Fruktose-1,6-Bisphosphatase (FBPase) von ChREBP beeinflusst, wodurch es auch die Gluconeogenese aktivieren kann [37].

Weiterhin aktiviert ChREBP Gene für die Glukosetransporter Typ 2 und 4 (GLUT2,4) [37]. GLUT2 ist der Hauptglukosetransporter der Leber, während GLUT4 zwar kaum in der Leber, dafür stark im Muskel- und Fettgewebe exprimiert wird [52]. Somit könnte eine verminderte Expression von ChREBP über einen verminderten Einbau von GLUT4 zu einer peripheren Insulinresistenz und Hyperglykämie führen.

Poungvarin et al. untersuchten in einer Studie Zielgene, an die ChREBP in der Leber und im weißen Fettgewebe bindet. Sie konnten 5825 Gene in der Leber, 2418 Gene im weißen Fettgewebe und 5919 Gene in beiden Geweben ausmachen, die von ChREBP angesteuert werden. Der Großteil dieser Gene ist an bereits bekannten Stoffwechselwegen beteiligt. Insulinsignalwege, Adherenskontakte und kanzerogen Wege gehörten in beiden Geweben zu den Top 5 der durch ChREBP angesteuerten Signalwege [65].

Wenn ChREBP-Knockout-Mäuse mit Futter, welches durch hohen Fett- und Zuckeranteil charakterisiert ist, gefüttert werden, zeigt sich neben reduzierten Insulin- und Triglyceridspiegeln im Blut und erniedrigten Entzündungsmarkern auch eine Reduktion der Nahrungsaufnahme und eine daraus folgende Verringerung des Körpergewichts der Tiere [92]. Dieser Effekt legt die Vermutung nahe, dass ChREBP auch einen Einfluss auf das Gehirn haben könnte. Eine andere Studie zeigte, dass ChREBP im Zusammenhang mit kohlenhydratreicher Ernährung den fibroblast growth factor 21 (FGF21) in der Leber erhöht. FGF21 kann wahrscheinlich die Zuckeraufnahme von Mäusen über den Hypothalamus reduzieren [31].

### 3.4.3 ChREBP in der Leber

Die Leber ist eines der Organe, von denen ChREBP am stärksten exprimiert wird, was seine bedeutende Rolle für die Stoffwechselwege in der Leber verdeutlicht [62].

Einige Krankheitsbilder sind verbunden mit erhöhter ChREBP Expression in der Leber. Dazu gehören Diabetes mellitus Typ 2 bzw. Patienten mit einer beeinträchtigten Glukosetoleranz und Adipositas. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen hatten diese Patienten eine erhöhte Expression von ChREBP in der Leber bzw. gesteigerte mRNA Level [44, 22, 66]. Außerdem lässt sich ChREBP mit der Entstehung einer hepatischen Steatose bzw. NASH in Verbindung bringen. In einer Studie wurde ChREBP in der Leber von ob/ob Mäusen (Mäuse mit ausgeschaltetem Leptin-Gen, charakterisiert durch Adipositas und Insulinresistenz) inhibiert, was eine Reduktion der hepatischen Steatosen aufgrund der verminderten Lipogenese nach sich zog [14]. Eine Überexpression von ChREBP in der Leber hingegen hatte ein Vermehrtes Auftreten hepatischer Steatosen in C57Bl/6J Mäusen zur Folge [7].

Die Funktion von ChREBP scheint von der Stoffwechsellage im Körper abzuhängen. Während normal gefütterte ChREBP Knockout Mäuse im Vergleich zum Wildtyp eine moderate Glukoseintoleranz zeigten, bewirkte eine Inhibierung von ChREBP in der Leber von ob/ob Mäusen eine verbesserte Glukosetoleranz und Insulinsensitivität [38, 14]. Grund für die moderate Glukoseintoleranz der ChREBP Knockout Mäuse ist womöglich, dass Insulin die Glukoseproduktion der Leber ohne ChREBP nicht mehr suffizient hemmen kann [39]. Im Gegensatz dazu zeigt eine Studie, dass in Mäusen, die mit Fruktose gefüttert wurden, ChREBP die hepatische Glukoseproduktion sogar über die Aktivierung von G6Pase verstärkt. Dies erfolgte jedoch insulinunabhängig [43]. Je nach Stoffwechsellage kann ChREBP die hepatische Glukoseproduktion also insulinabhängig hemmen oder insulinunabhängig über die G6Pase verstärken.

#### 3.4.4 ChREBP in den $\beta$ -Zellen des Pankreas

Es ist bekannt, dass Glukose die  $\beta$ -Zell Proliferation stimuliert, doch der intrazelluläre Mechanismus wird noch erforscht. Metukuri et al. fanden heraus, dass eine Depletion von ChREBP in  $\beta$ -Zellen von Ratten und Menschen die Glukose-stimulierte  $\beta$ -Zell Proliferation hemmt. Entgegengesetzt stimuliert eine Überexpression von ChREBP in diesen Zellen die Proliferation. Weiterhin untersuchten sie die Expression von Zell-Zyklus-Regulatoren. Bei einer ChREBP-Depletion wurden sie vermindert, bei einer Überexpression vermehrt exprimiert [55].

ChREBP reguliert direkt Gene des Zucker- und Fettstoffwechsels [81], so z.B. die Pyruvat-Carboxylase, welche wichtig für die Glukose-induzierte Insulinausschüttung ist und bei Typ2 Diabetes sowohl in Ratten als auch in menschlichen Inselzellen herunterreguliert gefunden wurde [93]. Im Gegensatz dazu kommt ChREBP vermehrt in den Zellkernen der  $\beta$ -Zellen von Diabetikern im Vergleich zu Nicht-Diabetikern vor. Konstitutiv aktives ChREBP hat in den insulinproduzierenden Inselzellen von Mäusen eine Glukotoxizität, bei der es durch eine länger bestehende Hyperglykämie zur Zellschädigung kommt, zur Folge [64].

#### 3.4.5 ChREBP im Fettgewebe

Auch im weißen Fettgewebe beeinflusst ChREBP die *de novo* Lipogenese. Hierfür ist vor allem die ChREBP $\beta$  Isoform verantwortlich [85]. In einer Studie wurde die Expression von ChREBP in der Leber und im Fettgewebe fettleibiger und normalgewichtiger Patienten untersucht. Es zeigte sich, dass ChREBP in der Leber der adipösen Patienten verstärkt und im Fettgewebe vermindert exprimiert wurde. Außerdem war die hepatische Lipogenese erhöht, während sie im Fettgewebe eine verringerte Aktivität im Vergleich zu den normalgewichtigen Patienten zeigte [66]. Weiterhin war im weißen Fettgewebe fettreich ernährter Mäuse eine Abnahme der Expression von ChREBP $\beta$  und der Insulinsensiti-

vität zu beobachten, was eine Erklärung für die ernährungsbedingte Entwicklung einer Insulinresistenz darstellen könnte [85].

### 3.4.6 Einfluss von ChREBP auf die Entstehung von Tumoren

ChREBP konnte bereits in mehreren Studien mit Tumoren in Verbindung gebracht werden. So zeigten Tong et al., dass eine Suppression des Transkriptionsfaktors in den Tumorzellen von hepatozellulären Karzinomen und kolorektalen Karzinomen die Proliferationsaktivität dieser Zellen und das Tumorstadium verringert [87]. Eine andere Studie konnte in den Lebern von Patienten mit HCC, sowohl im Tumor, als auch im umgebenden Gewebe vermehrt ChREBP mRNA nachweisen [11]. Außerdem konnte eine verstärkte Expression von ChREBP in menschlichen Brustkrebszellen beobachtet werden, welche mit fortschreitender Entartung weiter anstieg [2]. Auch im metastasierten Prostatakarzinom wurde eine Überexpression des Transkriptionsfaktors entdeckt [41].

Die Mechanismen, über die ChREBP Einfluss auf die Tumorentstehung nimmt, sind Teil intensiver Forschung. Es ist bekannt, dass in Tumorzellen ein anderer Metabolismus, nämlich die aerobe Glykolyse, auch Warburg-Effekt genannt, vorherrscht. Dieser zeichnet sich durch eine verstärkte Glukoseaufnahme, Glykolyse und Laktatproduktion aus. Auch Lipide, Aminosäuren und Nukleotide werden, unter anderem über den Pentose-Phosphat-Weg, vermehrt synthetisiert [49, 37]. Diese Veränderungen sind nicht nur in Tumorzellen, sondern auch in anderen stark proliferierenden Zellen zu beobachten. Der Warburg Effekt wird von dem PI3K/AKT Signalweg, den Genen Myc und Mondo A und dem Hypoxie-induzierten Faktor (HIF) verstärkt und von dem Tumorsuppressorgen p53 abgeschwächt [37, 51, 12].

Durch seine Zielgene kann ChREBP unterschiedliche Einflussfaktoren der aeroben Glykolyse regulieren. Es kann den Einbau der Glukosetransporter und somit die Glukoseaufnahme und die Aktivität der Pyruvatkinase und der G6PDH und somit die Glykolyse und den Pentose-Phosphat-Weg verstärken [37, 78]. Außerdem könnte ein Zusammenhang zwischen ChREBP und Myc bestehen. Untersuchungen zeigten, dass der Komplex aus ChREBP und Max-like protein x (Mlx) E-Box Elemente erkennt, die auch von dem Komplex Myc/Max erkannt werden. Somit könnten diese beiden Transkriptionsfaktoren entweder konkurrieren oder auch kooperieren [84]. Zellen, in denen ChREBP blockiert wurde, reagierten mit einer Aktivierung von p53 und einem Zell-Zyklus-Arrest [87]. Somit scheint ChREBP einen hemmenden Einfluss auf das Tumorsuppressorgen p53 zu haben. Auch Gene des Zell-Zyklus werden von ChREBP abgelesen und somit die Proliferation beeinflusst [65].

### 3.4.7 Regulation

Es sind unterschiedlichste Mechanismen zur Regulation der Expression und Aktivierung von ChREBP bekannt. Posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Acetylierung und O-Glc-N-Acetylierung beeinflussen die Kerntranslokation, die Proteinstabilität und die DNA-Bindungsaktivität von ChREBP [37, 36, 1, 35]. Die Expression seiner mRNA wird über verschiedene Transkriptionsfaktoren, die an den ChREBP-Promotor binden, reguliert. Einige von ihnen erhöhen so die Transkriptionsrate. Dazu zählen liver x receptor (LXR), thyroid hormone receptor- $\beta$ 1 (TR- $\beta$ 1), sterol regulatory element-binding protein 1a (SREBP-1a), specificity protein 1 (Sp1), hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ), forkhead box protein A1 und A2 (Foxa1, Foxa2). Octamer-binding protein-1 (Oct-1) hingegen verringert die Transkriptionsrate [39, 1, 37].

Außerdem verstärkt Glukose die transkriptionale Aktivität von ChREBP. Auch die Glukose Metabolite Xylulose-5-Phosphat, Glukose-6-Phosphat und Fruktose-2,6-Bisphosphat aktivieren das Protein [46, 15]. Ketonkörper hingegen inhibieren die ChREBP-Aktivität [59]. Dies erklärt, warum ChREBP durch verschiedene Diäten beeinflusst werden kann. Auch die Zielgene von ChREBP können dieses durch negative Rückkopplung in seiner Aktivität hemmen [39].

### 3.5 Modell der intraportalen Pankreasinseltransplantation

Das Modell der intraportalen Pankreasinseltransplantation wurde 1994 von Dombrowski et al. zunächst an diabetischen Ratten durchgeführt. Sie beschrieben die histologischen und biochemischen Veränderungen der Hepatozyten im Abflussgebiet der transplantierten Inseln, mit dem Ergebnis, dass die Mitose-, Apoptose- und Proliferationsrate dieser Hepatozyten deutlich erhöht waren. Außerdem speicherten sie vermehrt Glykogen und Fett [19]. Im weiteren Verlauf fiel auf, dass die veränderten Leberazini bereits bekannten, chemisch induzierten, präneoplastischen Leberherden ähneln und auch ihre immunhistochemischen Eigenschaften Parallelen aufwiesen [19, 18].

In Langzeitversuchen konnte gezeigt werden, dass sich aus diesen Leberherden im Verlauf HCAs und HCCs entwickeln. In diesen konnten eine erhöhte Proliferationsaktivität und eine verminderte Apoptoserate nachgewiesen werden [17].

Die Leberherde stellen somit präneoplastische Läsionen dar und das Modell der intraportalen Pankreasinseltransplantation kann als Hepatokarzinogenesmodell genutzt werden, um unser Verständnis der Entstehung von Lebertumoren weiter zu vertiefen [17]. Die molekularen und metabolischen Veränderungen wurden weiter erforscht und es wurde gezeigt, dass unter anderem der AKT/mTOR Signalweg, welcher auch den Transkriptionsfaktor ChREBP aktiviert, in diesen, Glykogen und Fett speichernden Herden stärker aktiv ist [75].

2017 wurde die Methode erfolgreich auf die Maus übertragen und, um den Einfluss von ChREBP zu untersuchen, mit einem ChREBP-Knockout Modell kombiniert [76]. Es wurde gezeigt, dass die Fettspeicherung, die Aktivität des AKT/mTOR Signalweges und die Proliferationsaktivität in den Leberherden der Knockout-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp reduziert waren, die Glykogenspeicherung hingegen deutlich erhöht war [76]. Diese Arbeit beschäftigt sich nun mit den Langzeitversuchen des kombinierten Pankreasinseltransplantations- und ChREBP-Knockout-Modells der Mäuse.

## 4 Material und Methode

### 4.1 Versuchsgruppen

Es wurden 6 Wochen alte, männliche ChREBP-Knockout Mäuse vom Stamm B6.129S6-Mlxipl<sup>tm1Kuy</sup>/J verwendet. Dem gegenüber standen zum Vergleich 6 Wochen alte, männliche Wildtyp-Mäuse vom Stamm C57Bl/6J. Für beide Genotypen wurden je vier Versuchsgruppen benötigt (siehe Tabelle 1). In den vorangegangenen Kurzzeitversuchen entwickelten weniger Tiere der Wildtyp- Hauptgruppe Glykogenspeicherherde, sodass die Zahl der Tiere in dieser Gruppe verdoppelt wurde.

	Wildtyp	Knockout
diabetisch/ transplantiert (HG)	n=40	n=20
diabetisch/ nicht transplantiert	n=20	n=20
nicht diabetisch/ transplantiert	n=20	n=20
nicht diabetisch/ nicht transplantiert	n=20	n=20

Tabelle 1: Versuchsgruppen und Anzahl der Tiere; HG, Hauptgruppe

Nach intraperitonealer Gabe von Streptozotocin (180 mg/kg KG, SIGMA Life Science ALDRICH, St. Louis, USA) entwickelten die Tiere entsprechend ihrer Gruppe einen Insulinmangeldiabetes. Dieser stellte sich ca. eine Woche nach Streptozotocin-Injektion ein. Als diabetisch galt eine Maus, wenn ihr Blutzuckerwert 16,7 mmol/l oder höher betrug. Zusätzlich wurden die Mäuse der Hauptgruppe einer Inseltransplantation unterzogen. Als Kontrollgruppen dienten nur diabetische nicht transplantierte, nur transplantierte nicht diabetische und nicht behandelte Kontrolltiere. Nach 3 Monaten wurden die Tiere getötet. Wenn eine Maus einen Score-Wert (Kriterien siehe Anhang A.2, Tabelle 10) von mindestens 9 oder in einer Kategorie 3 Punkte erhielt, wurde sie vorzeitig getötet.

Die Mäuse wurden in Makrolonkäfigen (Typ 2/ Typ 3, FA Zoonlab, Castrop-Rauxel, Deutschland) offen gehalten. Die Lüftung des Tierraums sorgte für eine Temperatur von 22–24°C und eine Luftfeuchtigkeit von ca. 55%. Der Tag-Nacht-Rythmus der Tiere war durch 12 Stunden Tag und 12 Stunden Nacht gekennzeichnet. Futter (Maus-Haltungsfutter, 10 mm, ssniff Spezialdiäten GmbH) und Wasser stand ihnen ad libitum zur Verfügung. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde täglich kontrolliert. Körpergewicht, Blutzucker- und Score-Wert der Tiere wurden in regelmäßigen Abständen erhoben (siehe Tabelle 2).

Hauptgruppe	1. Woche	Alle 2 Tage
	2.-5. Woche	1-mal pro Woche
	Ab der 6. Woche	1-mal pro Monat
Diabetische Kontrolltiere/ Transplantierte Kontrolltiere	1. Monat	1-mal pro Woche
	Ab dem 2. Monat	1-mal pro Monat
Kontrolltiere	Ab dem 1. Monat	1-mal pro Monat

Tabelle 2: Intervall der Blutzucker- und Körpergewichtsmessungen

## 4.2 Insulinstick

Bei schlechtem Allgemeinzustand diabetischer Mäuse wurde zum Teil die Implantation eines Insulinsticks (Lin  $\beta$ IT<sup>®</sup>-Insulinimplan- tate, Linshin Canada, INC., Toronto, Kanada) notwendig. Dieser sezernierte durchgehend Insulin in das subkutane Fettgewebe der Mäuse. Kriterien für eine Insulinstickgabe waren ein Gewichtsverlust von mindestens 15% des Körpergewichts bei einem Blutzuckerspiegel von mindestens 25 mmol/l. Die aus den Vorexperimenten ermittelte Dosis lag bei einem ganzen Insulinstick für die Knockout-Mäuse und einem halben Insulinstick für die Wildtyp-Mäuse. Zur Implantation erfolgte eine kurze Ethernarkose. Die Nackenregion wurde mit Sensiva (Schülke Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland) desinfiziert und der Insulinstick mithilfe eines Trokars ins subkutane Fettgewebe implantiert. Im ersten Monat nach der Stick-Gabe wurden einmal wöchentlich der Blutzuckerwert, das Körpergewicht und der Score-Wert der Maus gemessen.

## 4.3 Pankreasinseltransplantation

### 4.3.1 Pankreasinselisolation aus Spendermäusen

Als Spender wurden männliche, mindestens 6 Wochen alte Mäuse des gleichen Stammes des zu transplantierenden Tieres verwendet. Die Maus wurde gewogen und erhielt eine intraperitoneale Injektion von Ketamin (40 mg/kg KG, Dr. Otto Fischer GmbH, Weyan-Holzolling, Deutschland) und Xylacin (80 mg/kg KG, Dr. Otto Fischer GmbH, Weyan-Holzolling, Deutschland).

Die Spendermaus wurde auf dem, mit einem OP-Tuch bezogenen OP-Tisch, unter einem Stereomikroskop (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) in Rückenlage fixiert. Nach Desinfektion der Bauchdecke mit 70%igem Ethanol (Universitätsapotheke Greifswald, Greifswald, Deutschland) wurde diese, inklusive des Peritoneums, mithilfe einer Schere großzügig eröffnet.

Nach Verlagerung des Darmkonvoluts wurde die Bifurcatio aortae stumpf freipräpariert. Die Bifurcatio aortae wurde mit einem Venenpunktionssystem (Punktionskanüle Venofix®A, orange, G25, 0,50 x 15 mm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) punktiert. Über das zugehörige Schlauchsystem wurden etwa 60 ml Neutralrotlösung (0,1 mg/ml NaCl, Carl-Roth-GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) infundiert. Der Blutkreislauf wurde durch Einschneiden der Vena cava inferior infrahepatisch eröffnet.

Das rot angefärbte Pankreas wurde stumpf mithilfe zweier Pinzetten aus dem Retroperitoneum entfernt und in isotoner Hanks-Lösung (Hank's balanced salt solution, 10X CMF-HBSS concentrate, 0,1ml/ml Aqua dest., SIGMA Life Science ALDRICH, St. Louis, USA) mit einem pH-Wert von 7,2 bei 0°C zwischengelagert (siehe Abbildung 3a). Für eine Empfängermaus wurden im Schnitt zwei Spenderpankreatata benötigt.

### 4.3.2 Verdau und Reinigung der Spenderpankreatata

Die isolierten Pankreatata wurden anschließend mit einer Rasierklinge manuell zerkleinert (siehe Abbildung 3b,c) und in Hanks-Lösung in zwei 5 ml Spritzen aufgezogen. Nach Sedimentation des Pankreasgewebes wurde die überstehende Hanks-Lösung entfernt. In einem auf 37°C erwärmten Erlenmeyerkolben mit einem Volumen von 25 ml wurde das Pankreasgewebe in 14 mg Kollagenase (Collagenase NB8 Broad Range, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) und 7 mg Albumin (Albumin bovine cryst. lyophil., SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) für ca. neun Minuten auf einem Magnetrührer im Brutschrank bei 37°C verdaut. Um die enzymatische Aktivität zu beenden, wurde das Gemisch in 0°C kalte Hanks-Lösung enthaltende



(a) Entnommene Pankreata in Hanks-Lösung



(b) Ein Maus-Pankreas vor dem Zerschnitt



(c) Mäuse-Pankreata nach dem Zerschnitt

Abbildung 3: Pankreasgewebe vor und nach dem Zerschnitt

Reagenzgläser gefüllt (siehe Abbildung 4a). Die Reagenzgläser wurden sanft geschwenkt, danach zur Sedimentation des Pankreas abgestellt (siehe Abbildung 4b). Mit einer Pipette wurde die Hanks-Lösung nach acht Minuten abgezogen und verworfen. Nach Einfüllen frischer, kalter Hanks-Lösung wurde dieser Vorgang vier Mal wiederholt.

Das Pankreasgewebe, verdünnt mit Hanks-Lösung, wurde in einer Petrischale unter einem Stereomikroskop (Olympus Biosystems GmbH, Planegg, Deutschland) begutachtet (siehe Abbildung 5a). Mit einer Glaspipette (Disposable Glass Pasteur Pipettes, Diameter: 7mm, vwr® International, Radnong, USA) wurden die rot angefärbten, intakten und reinen Inseln einzeln angesaugt, gezählt und in einem eisgekühlten Eppendorf-Reaktionsgefäß zwischengelagert, bis ca. 200 Inseln gesammelt wurden.



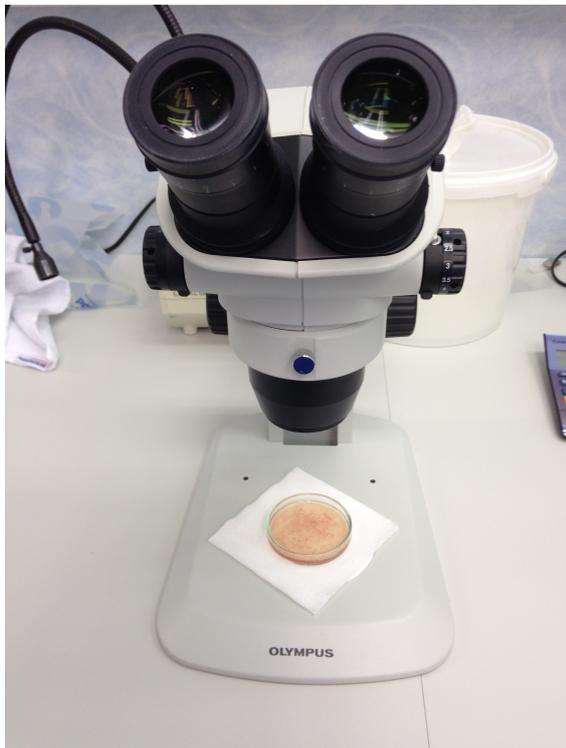
(a) Spülung der Pankreata



(b) rot gefärbtes, sedimentiertes Pankreasgewebe

Abbildung 4: Spülung der Pankreasfragmente

Zur Vorbereitung des Transplantationssystems wurde bei einer Verlängerungsleitung für Infusionen (Heidelberger-Extension-Type Verlängerungsleitung, Größe: 30 cm, 1.2 x 2.2 mm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) ein Ende abgetrennt. Am anderen Ende wurde eine luftleer mit Hanks-Lösung gefüllte 1 ml Spritze angeschlossen. Das Schlauchsystem wurde mit der Hanks-Lösung gefüllt, bis nur noch 0,05 ml Flüssigkeit in der Spritze enthalten waren. Über das offene Ende des Systems wurden die Inseln aus dem Eppendorf-Reaktionsgefäß in den Schlauch aufgesogen. Nun befanden sich in der Spritze ca. 0,1 ml Flüssigkeit, was dem später transplantierten Volumen entspricht. Bei einer Kanüle (sterile Einweg-Subkutannadeln AGANI™ NEEDLE, Shanghai International Holding Corp. GmbH (Europe), Hamburg, Deutschland) wurde die Spitze abgesägt und an der offenen Seite des Systems mithilfe von Sekundenkleber (Sekundenkleber „UHU Minis“ , flüssig, Einkomponenten-Reaktionsklebstoff, UHU GmbH und Co.KG, Bühl, Deutschland) fixiert (siehe Abbildung 5b).



(a) Detektion der Pankreasinseln unter dem Stereomikroskop



(b) System zur Transplantation der Pankreasinseln

Abbildung 5: Vorbereitung der Transplantation

### 4.3.3 Pankreasinseltransplantation

Die Empfängermaus (Alter: 8-10 Wochen, Gewicht: 20-25g) erhielt eine intraperitoneale Injektion von Ketamin (40 mg/kg KG, Dr. Otto Fischer GmbH, Weyan-Holzolling, Deutschland) und Xylacin (80 mg/kg KG, Dr. Otto Fischer GmbH, Weyan-Holzolling, Deutschland). Das Operationsgebiet wurde rasiert und die Maus in Rückenlage auf dem

OP-Tisch auf einer Wärmeplatte (Terrarium Heizmatte „Terra Mat 5“, 5W, 14x15 cm, GarPet GmbH und Co. KG, Cadolzburg, Deutschland) fixiert, um den intraoperativen Verlust von Körperwärme zu minimieren. Nachdem der abdominale Bereich mit 70%igem Ethanol desinfiziert wurde, wurde die Haut der Bauchdecke mit einem Skalpell und das darunterliegende Peritoneum mit einer Gefäßschere eröffnet. Die Darmschlingen wurden vorsichtig mit einer stumpfen anatomischen Pinzette nach extraabdominell verlagert. Der Darm wurde während des Eingriffs wiederholt mit 37°C warmer isotoner NaCl-Lösung befeuchtet.

Die Vena portae hepatis war gut unter dem Leberrand sichtbar und wurde mit zwei, in NaCl-Lösung getränkten, Wattestäbchen vorsichtig straff gezogen. Unter dem Stereomikroskop wurde die Pfortader nun mit dem Transplantationssystem punktiert und die etwa 200 Pankreasinseln aus dem Schlauchsystem injiziert. Nach Entfernen der Kanüle aus der Pfortader erfolgte die Blutstillung an der Punktionsstelle für etwa sieben Minuten mit einem schmalen Stempel. Danach wurde der Darm mit einem in NaCl-Lösung getränkten Wattestäbchen zurück nach intraabdominell verlagert. Daraufhin wurde die Peritonealhöhle mit steriler, 37°C warmer NaCl-Lösung gespült.

Das Peritoneum wurde mit einer fortlaufenden Naht (Faden MARILON® aus Polyvinylidenfluorid, monofil, nicht resorbierbar, blau, 5/0 USP, 45cm, Catgut GmbH, Markneukirchen, Deutschland) verschlossen und mit Sensiva (Schülke Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland) desinfiziert. Die Haut wurde mit Wundklammern (Wundklammern Michel 7,5 x 1,75 mm, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) verschlossen und mit Sensiva desinfiziert.

Postoperativ wurde die Maus abgetrocknet und in warme Tücher gehüllt. Um weiteren Wärmeverlust zu verringern wurde der Käfig mit einem Handtuch abgedeckt und auf einer Wärmeplatte (Terrarium Heizmatte „Terra Mat 20“, 20W, 42x28 cm, GarPet GmbH und Co. KG, Cadolzburg, Deutschland) warm gehalten. Die Maus wurde bis zum vollständigen Erwachen beobachtet.

## 4.4 Tötung und Perfusion am Versuchsende

### 4.4.1 5-Bromo-2'-deoxyuridine(BrdU)-Gabe

Der Hälfte der Mäuse jeder Versuchsgruppe wurde eine Woche vor der Tötung eine BrdU-Pumpe implantiert. Jede osmotische Minipumpe (alzet® mini osmotic pump 2001, 1,0 µl/h, 200 µl, Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, USA) wurde mit ca. 0,2 ml BrdU-Lösung (20mg/ml NaCl, SIGMA Life Science ALDRICH, St. Louis, USA) gefüllt. Um die Pumpe zu implantieren wurde die Maus mit Diethylether narkotisiert. Nach Desinfektion der Nackenregion mit Sensiva wurde die Haut mit einem kleinen Scherenschnitt eröffnet. Die Pumpe wurde durch diesen Schnitt ins subkutane Fettgewebe eingeschoben und die Öffnung mit Klammernähten verschlossen und wiederum desinfiziert.

Der anderen Hälfte jeder Versuchsgruppe wurde BrdU (10mg/ml NaCl, SIGMA Life Science ALDRICH, St. Louis, USA) mithilfe einer Spritze drei Mal injiziert (24h vor Perfusion i.p., 12h vor Perfusion i.p., 1h vor Perfusion jeweils i.p. und s.c.). Insgesamt erhielten diese Mäuse 0,8 ml BrdU.

### 4.4.2 Perfusion und Organentnahme

Zu Beginn der Perfusion wurde die Maus mit Ketamin (40 mg/kg KG) und Xylacin (80 mg/kg KG) narkotisiert. Nach Desinfektion der Bauchhaut und großzügiger Eröffnung des Abdomens mithilfe einer Schere wurde die Bifurkation der Bauchaorta freipräpariert. Zur Punktion wurde eine Venenverweilkanüle (Venenverweilkatheter mit Flügeln BD-Insyste-N, gelb, 24 G, 0.7x14 mm, Becton Dickinson Infusion Therapy Systems, Utah, USA) verwendet. Zunächst wurde das aus der Aorta austretende Blut in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß (gefüllt mit drei Serumkügelchen (Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht, Deutschland)) aufgefangen, nach etwa 20 Minuten zentrifugiert (Centrifuge 5415D  $\geq$  10,0 x 1000 rpm, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland), das Serum mit einer Pipette (Eppendorfpipette Reference, 100 µl, Kinesis GmbH Langenfeld, Deutschland) entnommen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Eine Spül- und eine Fixationslösung (Zusammensetzung siehe Anhang A.5.1, A.5.2) wurden auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und in einem Infusionssystem (Intrafix® Primeline, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) bereitgestellt. Pro Maus wurden ca. 50 ml beider Lösungen benötigt. An die Venenverweilkanüle wurde die Spülösung angeschlossen. Der Gefäßkreislauf wurde durch einen Einschnitt der Vena cava inferior infrahepatisch unterbrochen. Der Thorax wurde eröffnet.

Waren die Organe vollständig gespült, wurden nach Gefäßabklemmung der Mittellappen der Leber, ein Teil des Pankreas, die linke Niere und die Harnblase entnommen. Von der Leber, dem Pankreas und der Niere wurden je zwei ca. 2 mm<sup>3</sup> große Stücke mit einer Rasierklinge zugeschnitten und in OsO<sub>4</sub> (>99,95%, Carl-Rot GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) fixiert. Nach zwei Stunden wurde diese mit Cacodylatpuffer (0,1 mol, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) abgepuffert. Der Rest des Mittellappens wurde in ca. 2 mm breite Lamellen geschnitten und zusammen mit der Hälfte der Niere, dem Rest des Pankreas und der Harnblase bei -80°C eingefroren.

Anschließend wurde die Fixationslösung angeschlossen. Nachdem alle Organe fixiert waren, wurden sie entnommen und in 4,5%iger Formaldehyd-Lösung (Universitätsapotheke Greifswald, Greifswald, Deutschland) bzw. einer Nachfixationslösung (Zusammensetzung siehe Anhang A.5.3) zwischengelagert (siehe Anhang A.4, Tabelle 15).

Bei einem Teil der Mäuse erfolgte keine Abtrennung des Mittellappens der Leber. Diese intakten Lebern wurden fotodokumentiert (1-2 Mäuse pro Gruppe). Danach wurde die Niere halbiert und die Leber in ca. 2 mm breite Lamellen geschnitten. Zusammen mit den Organen, die in Formalin konserviert wurden, wurden sie in Paraffin (Paraplast PLUS, Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland) eingebettet. Es wurden Serienschnitte von zwei Blöcken der Leber angefertigt und eine HE-Färbung und PAS-Reaktion (Protokoll siehe Anhang A.6.1) durchgeführt. Außerdem erfolgt eine immunhistochemische Darstellung von BrdU (Protokoll siehe Anhang A.6.2). Die in OsO<sub>4</sub> fixierten Stückchen von Leber, Pankreas und Niere wurden in Epoxidharz (EPON-Härter MNA, EPON-Härter DDSA, Glycidether 100, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) eingebettet und Semi- (750nm, 500nm) und Ultradünnschnitte (90nm) angefertigt.

## 4.5 Auswertung

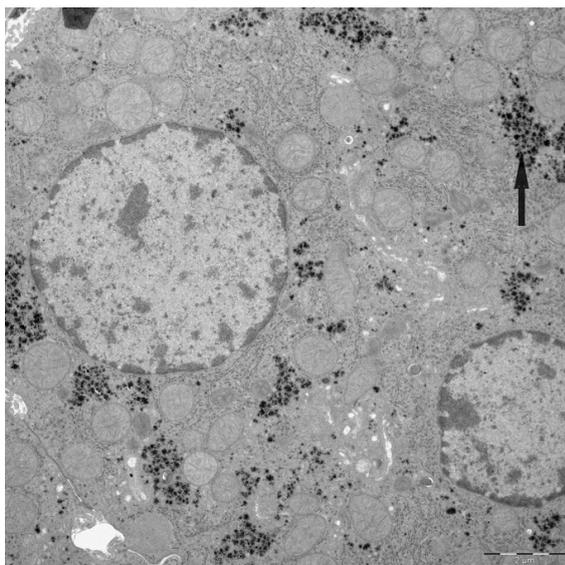
### 4.5.1 Proliferationsaktivität der extrafokalen Hepatozyten und der Glykogenspeicherherde

Von den Gewebsschnitten der in Paraffin eingebetteten Mausleber wurde eine 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)-Reaktion angefertigt. BrdU wird in der Phase der DNA-Synthese des Zellzyklus als Thymidin-Analogon in die DNA eingebaut. Mithilfe von Antikörpern kann es in der BrdU-Reaktion sichtbar gemacht werden [58, 9].

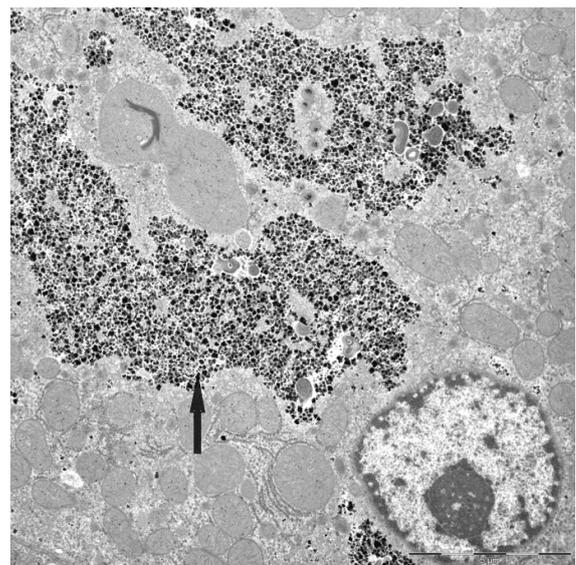
An einem Lichtmikroskop (Leica DMRB 301, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland), welches über eine Kamera (Nikon DS-Fi1, Nikon Corporation, Tokio, Japan) mit einem Computer verbunden ist, wurden die Gewebsschnitte mithilfe der Software NIS Elements BR 3.2 (Version 2011) bei 400 facher Vergrößerung ausgewertet. Es wurden 2000 extrafokale Hepatozytenzellkerne pro Tier gezählt und der Anteil der BrdU positiv gefärbten Zellkerne bestimmt (BrdU Labeling Index, BrdU LI in %). Außerdem wurden alle Zellkerne der CCF betrachtet und auch hier der BrdU-LI berechnet.

### 4.5.2 Glykogenspeicherung der Hepatozyten

Um die Glykogenspeicherung der Hepatozyten vergleichen zu können, wurde zunächst eine PAS-Reaktion der Gewebsschnitte angefertigt, wobei sich eingelagertes Glykogen violett darstellt. Zur Überprüfung, dass es sich bei den angefärbten Bereichen um Glykogen handelt, wurden exemplarisch elektronenmikroskopische Bilder der Gewebe aufgenommen (siehe Abbildung 6).



(a) WT diab/nicht TX



(b) KO diab/nicht TX

Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Wildtyp-(a) und Knockout-Mäusen(b) der Gruppe diab/nicht TX zur Darstellung der Glykogenspeicherung (Pfeil)

Die Untersuchung der PAS-Reaktionen erfolgte am selben Mikroskop und Computer wie die Bestimmung des BrdU-LI. Glykogen zeigt sich in der PAS-Reaktion violett. Es wurden pro Maus vier unterschiedliche Ausschnitte mit einer Größe von  $22,4 \text{ mm}^2$  bei 400 facher Vergrößerung ausgewertet und ihr Mittelwert bestimmt.

Zunächst wurden mithilfe des Programms „NISElementsBR 3.2“ die Histogramme  $h_r(i)$ ,  $h_g(i)$  und  $h_b(i)$  für die 3 Farbkanäle Rot, Grün und Blau über alle Intensitäten  $i \in [0 .. 255]$  berechnet. Ein Histogramm beschreibt für jeden Intensitätswert, wieviele Pixel im Bild mit diesem Intensitätswert vorkommen. Es handelt sich dabei also um reine Zählwerte ohne Einheit [91]. Es folgte die Berechnung der gewichteten Histogramme und ihre Aufsummation:

$$RF = \sum_{i=1}^{255} hr(i) * i \quad (1)$$

$$GF = \sum_{i=1}^{255} hg(i) * i \quad (2)$$

$$BF = \sum_{i=1}^{255} hb(i) * i \quad (3)$$

RF (Rotfraktion), GF (Grünfraktion) und BF (Blaufraktion) sind helligkeitsabhängig und daher von Parametern der Bildaufnahme, wie z.B. Helligkeitseinstellung des Mikroskops und Dicke des pathohistologischen Schnitts abhängig. Daher erfolgte eine Normierung mit der Gesamtsumme über die 3 Farbkanäle:

$$RFN = \frac{RF}{RF + GF + BF} \quad (4)$$

$$GFN = \frac{GF}{RF + GF + BF} \quad (5)$$

Ein höherer Glykogenanteil stellte sich im mikroskopischen Bild durch eine höhere normierte Rotfraktion (RFN) und eine verminderte normierte Grünfraktion (GFN) dar, während der Blauanteil wenig berührt wird. Daher eignet sich das Verhältnis von RFN zu GFN als Maßzahl für die Messung der Glykogenkonzentration:

$$GC = \frac{RFN}{GFN} \quad (6)$$

Eine empirische Fehlerabschätzung erfolgte durch folgendes Beispiel: Abbildung 7 zeigt einen histopathologischen Schnitt durch die Leber einer Maus, vor (links) und nach (rechts)

Erhöhung der Helligkeit um 10 %. Der Unterschied ist klar erkennbar. Die Tabelle 3 zeigt die zugehörige Auswertung. Es fällt auf, dass die Werte RF und GF (vor Normierung) zwischen den beiden Bildern erwartungsgemäß stark differieren, während die Werte RFN, GFN und GC (nach Normierung) nahezu identisch sind. Die Normierung erlaubt es also, die bei der Bildaufnahme entstehenden Einflüsse auf die Messung weitestgehend zu eliminieren, so dass Aufnahmen, auch wenn sie unter unterschiedlichen Bedingungen gemacht wurden, vergleichbar werden.

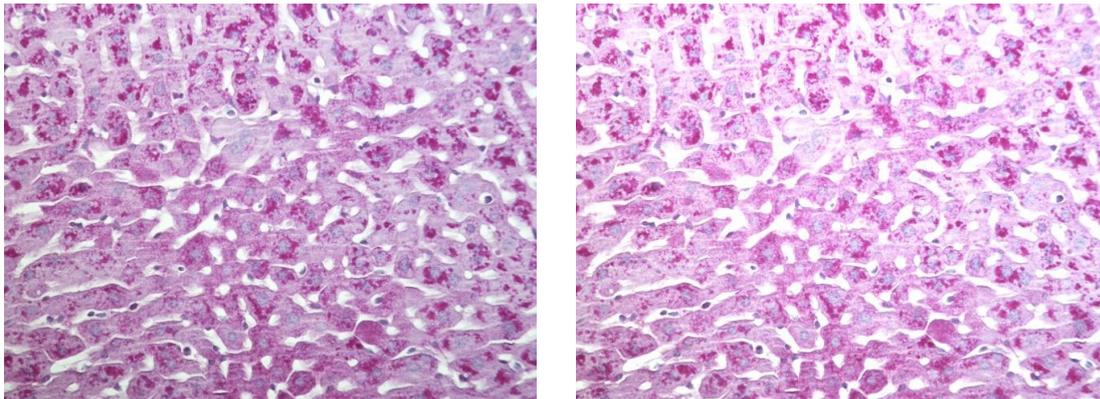


Abbildung 7: Glykogenspeicherung der Leber einer Maus: (links) Original, (rechts) nach Erhöhung der Helligkeit um 10 %. PAS-Reaktion. Länge untere Bildkante 0,5mm

	Original	nach Helligkeitserhöhung
RF	$9,71 \cdot 10^8$	$11,32 \cdot 10^8$
GF	$7,81 \cdot 10^8$	$9,18 \cdot 10^8$
RFN	0,355	0,355
GFN	0,286	0,288
GC	1,243	1,233

Tabelle 3: Auswertung der Bilder aus Abbildung 7; RF, Rotfraktion; GF, Grünfraktion; RFN, normierte Rotfraktion; GFN, normierte Grünfraktion; GC, Glykogenkonzentration

#### 4.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mithilfe der Statistiksoftware „R“. Um die Werte auf Normalverteilung zu testen wurde der Shapiro-Wilk-Test genutzt. Bei normalverteilten Daten wurde der t-Test und bei nicht normalverteilten Daten der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test zur Signifikanztestung verwendet. Um die Häufigkeit der Glykogenspeicherherde und angewachsenen Inseln zu vergleichen wurde der Exakte Test nach Fisher verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Proliferationsaktivität der extrafokalen Hepatozyten

#### 5.1.1 Proliferationsaktivität der Wildtyp-Mäuse

##### BrdU-Applikation mittels osmotischer Minipumpe

Die diabetischen, transplantierten (diab/TX) Mäuse der Hauptgruppe zeigen mit einem mittleren BrdU-Labeling-Index (BrdU-LI) von  $6,05\% \pm 0,79$  (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts, S.E.M.) die höchste Proliferationsaktivität der extrafokalen Hepatozyten (siehe Tabelle 4). Der niedrigste BrdU-LI hingegen kann in der Gruppe der nicht diabetischen, nicht transplantierten (nicht diab/nicht TX) Kontrolltiere nachgewiesen werden ( $0,62\% \pm 0,12$ ). Zwischen diesen Gruppen stehen die diabetischen, nicht transplantierten (diab/nicht TX) Tiere mit einem Mittelwert von  $2,85\% \pm 0,62$  und die nicht diabetischen, transplantierten (nicht diab/TX) Tiere ( $0,99\% \pm 0,23$ ). In der Gruppe der diab/nicht TX Tiere, ist eine signifikant ( $p=0,003$ ) geringere Proliferationsaktivität als in der Hauptgruppe zu beobachten. Im Vergleich zur nicht diab/TX Kontrollgruppe jedoch ist diese signifikant ( $p=0,016$ ) erhöht. Der Unterschied der Proliferationsaktivitäten der Hauptgruppe und der diab/nicht TX Gruppe im Vergleich zur nicht diab/nicht TX Kontrollgruppe ist signifikant ( $p=8,48e-4$  bzw.  $p=0,005$ ).

Gruppe	BrdU-LI (%) Mittelwert $\pm$ S.E.M.	N	Signifikanz- testung
WT diab/TX	$6,05 \pm 0,79$	22	#, \$, &
WT diab/nicht TX	$2,85 \pm 0,62$	10	* &, §
WT nicht diab/TX	$0,99 \pm 0,23$	10	*, §
WT nicht diab/nicht TX	$0,62 \pm 0,12$	10	*, #
KO diab/TX	$6,14 \pm 1,36$	8	#, &
KO diab/nicht TX	$2,90 \pm 1,88$	10	*, §
KO nicht diab/TX	$7,63 \pm 1,52$	8	&, §
KO nicht diab/nicht TX	$1,19 \pm 0,33$	11	*, §

Tabelle 4: Proliferationsaktivität extrafokaler Hepatozyten bei Wildtyp- und Knockout-Mäusen nach BrdU-Applikation über eine Woche; WT, Wildtyp; KO, Knockout; diab/TX, diabetisch/transplantiert; diab/nicht TX, diabetisch/nicht transplantiert; nicht diab/TX, nicht diabetisch/transplantiert; nicht diab/nicht TX, nicht diabetisch/nicht transplantiert; S.E.M., Standardfehler des Mittelwerts; N, Anzahl der Tiere; signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber \*, diab/TX; #, diab/ nicht TX; \$, nicht diab/ TX; &, nicht diab/ nicht TX; §, WT gegenüber KO

##### BrdU-Applikation mittels Injektion

Im Gewebe der Mäuse, denen BrdU mittels Injektion verabreicht wurde, zeigen sich deutlich weniger signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen als bei den Tieren

mit osmotischer Minipumpe (siehe Tabelle 5).

Die BrdU-LIs der Gruppen diab/TX und diab/nicht TX bewegen sich im ähnlichen Bereich, jedoch sind die Werte der diab/nicht TX Gruppe weiter gestreut (S.E.M. diab/TX: 0,27, S.E.M. diab/nicht TX: 0,93). Die Tiere der Gruppen nicht diab/TX und nicht diab/nicht TX unterscheiden sich in ihrer extrafokalen Proliferationsaktivität nicht signifikant voneinander. Jedoch kann in beiden Gruppen ein signifikant höherer BrdU-LI im Vergleich zu den diab/TX Mäusen beobachtet werden ( $p=0,04$  bzw.  $p=0,001$ ).

Gruppe	BrdU-LI (%) Mittelwert $\pm$ S.E.M.	N	Signifikanz- testung
WT diab/TX	1,76 $\pm$ 0,27	14	§,&
WT diab/nicht TX	2,07 $\pm$ 0,93	10	
WT nicht diab/TX	0,89 $\pm$ 0,27	9	*
WT nicht diab/nicht TX	0,51 $\pm$ 0,12	10	*
KO diab/TX	1,67 $\pm$ 0,95	10	
KO diab/nicht TX	3,21 $\pm$ 1,32	10	
KO nicht diab/TX	0,68 $\pm$ 0,16	9	
KO nicht diab/nicht TX	0,73 $\pm$ 0,30	8	

Tabelle 5: Proliferationsaktivität extrafokaler Hepatozyten bei Wildtyp- und Knockout-Mäusen nach BrdU-Applikation über 24 Stunden; WT, Wildtyp; KO, Knockout; diab/TX, diabetisch/transplantiert; diab/nicht TX, diabetisch/nicht transplantiert; nicht diab/TX, nicht diabetisch/transplantiert; nicht diab/nicht TX, nicht diabetisch/nicht transplantiert; S.E.M., Standardfehler des Mittelwerts; N, Anzahl der Tiere; signifikant ( $p<0,05$ ) gegenüber \*, diab/TX; #, diab/ nicht TX; \$, nicht diab/ TX; &, nicht diab/ nicht TX; §, WT gegenüber KO

### 5.1.2 Proliferationsaktivität der ChREBP-Knockout-Mäuse

#### BrdU-Applikation mittels osmotischer Minipumpe

In der Gruppe der ChREBP-Knockout-Tiere mit osmotischer Minipumpe stellen sich je zwei Versuchsgruppen mit ähnlichem Ergebnis dar (siehe Tabelle 4). Zum einen kann zwischen den diab/TX und den nicht diab/TX Tieren kein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Gleiches gilt für die Gruppen diab/ nicht TX und nicht diab/nicht TX. Auffällig ist hier jedoch die große Streuung der Werte der diab/nicht TX Tiere (S.E.M.: 1,88%).

Mit einem p-Wert von 0,004 zeigen die nicht diab/TX Mäuse eine signifikant größere Proliferationsaktivität als die Gruppe diab/nicht TX. Auch von den nicht diab/nicht TX Tieren unterscheidet sie sich signifikant ( $p=0,001$ ). Gleiches gilt für die Mäuse der Hauptgruppe ( $p=0,012$ ,  $p=0,003$ ).

### **BrdU-Applikation mittels Injektion**

Im Bereich der ChREBP-Knockout-Mäuse zeigen die diab/ TX Tiere eine Proliferationsaktivität von  $1,67\% \pm 0,95$ . Es folgen, mit einem BrdU-LI von  $3,21\% \pm 1,32$  die Tiere der Gruppe diab/nicht TX. Die Streuung dieser beiden Versuchsgruppen ist deutlich höher, als die der anderen beiden Gruppen (siehe Tabelle 5). Die Proliferationsaktivität der Gruppe nicht diab/ TX beträgt  $0,68\% \pm 0,16$  und der nicht diab/ nicht TX Tiere  $0,73\% \pm 0,30$ . Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen ermittelt werden.

### **5.1.3 Vergleich der Proliferationsaktivitäten der Wildtyp- und ChREBP-Knockout-Mäuse**

#### **BrdU-Applikation mittels osmotischer Minipumpe**

Vergleicht man die Hauptgruppe der Wildtyp-Mäuse mit der Hauptgruppe der ChREBP-Knockout-Mäuse so lässt sich kein signifikanter Unterschied in der Proliferationsaktivität der extrafokalen Hepatozyten beobachten.

In den diab/nicht TX und den nicht diab/TX Gruppen jedoch können signifikante Unterschiede (p-Werte von 0,035 (diab/nicht TX) und 0,003 (nicht diab/TX)) festgestellt werden, wobei die Gruppe diab/nicht TX einen höheren BrdU-LI bei den Wildtyp-Tieren aufweist, und die Gruppe nicht diab/TX bei den ChREBP-Knockout-Tieren. Die beiden Kontrollgruppen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

#### **BrdU-Applikation mittels Injektion**

Vergleicht man die Mittelwerte der Versuchsgruppen zwischen Wildtyp- und ChREBP-Knockout-Mäusen, denen BrdU mittels Injektion verabreicht wurde, zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.

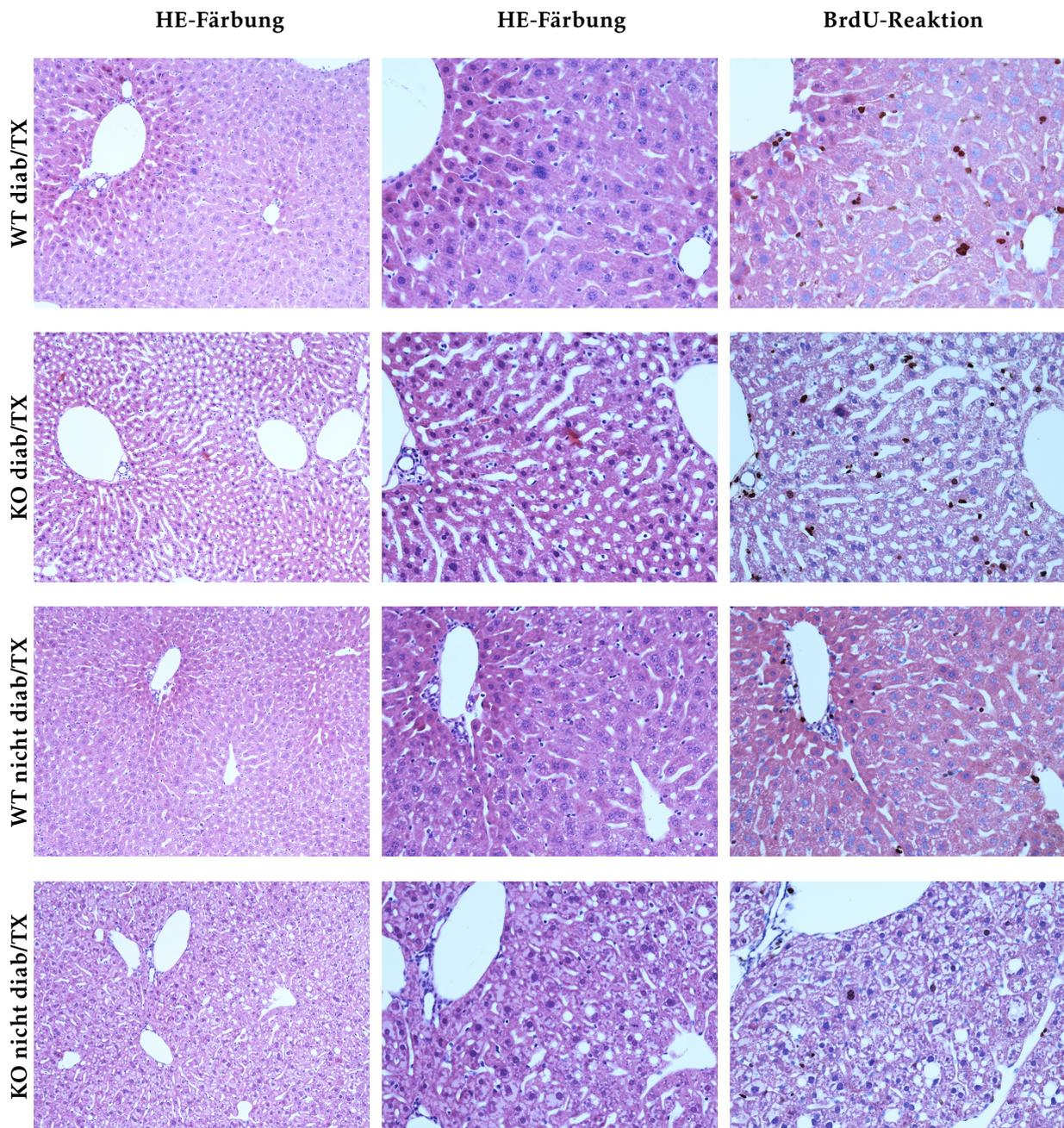


Abbildung 8: Histologische Abbildungen des Lebergewebes von Wildtyp- und Knockout-Mäusen der Gruppen diab/TX und nicht diab/TX, die BrdU-positive Zellkerne stellen sich in der BrdU-Reaktion braun gefärbt dar; WT, Wildtyp; KO, Knockout; diab/TX, diabetisch/transplantiert; diab/nicht TX, diabetisch/nicht transplantiert; nicht diab/TX, nicht diabetisch/transplantiert; nicht diab/nicht TX, nicht diabetisch/nicht transplantiert; Länge untere Bildkante in Spalte eins 1mm, in den Spalten zwei und drei 0,5mm

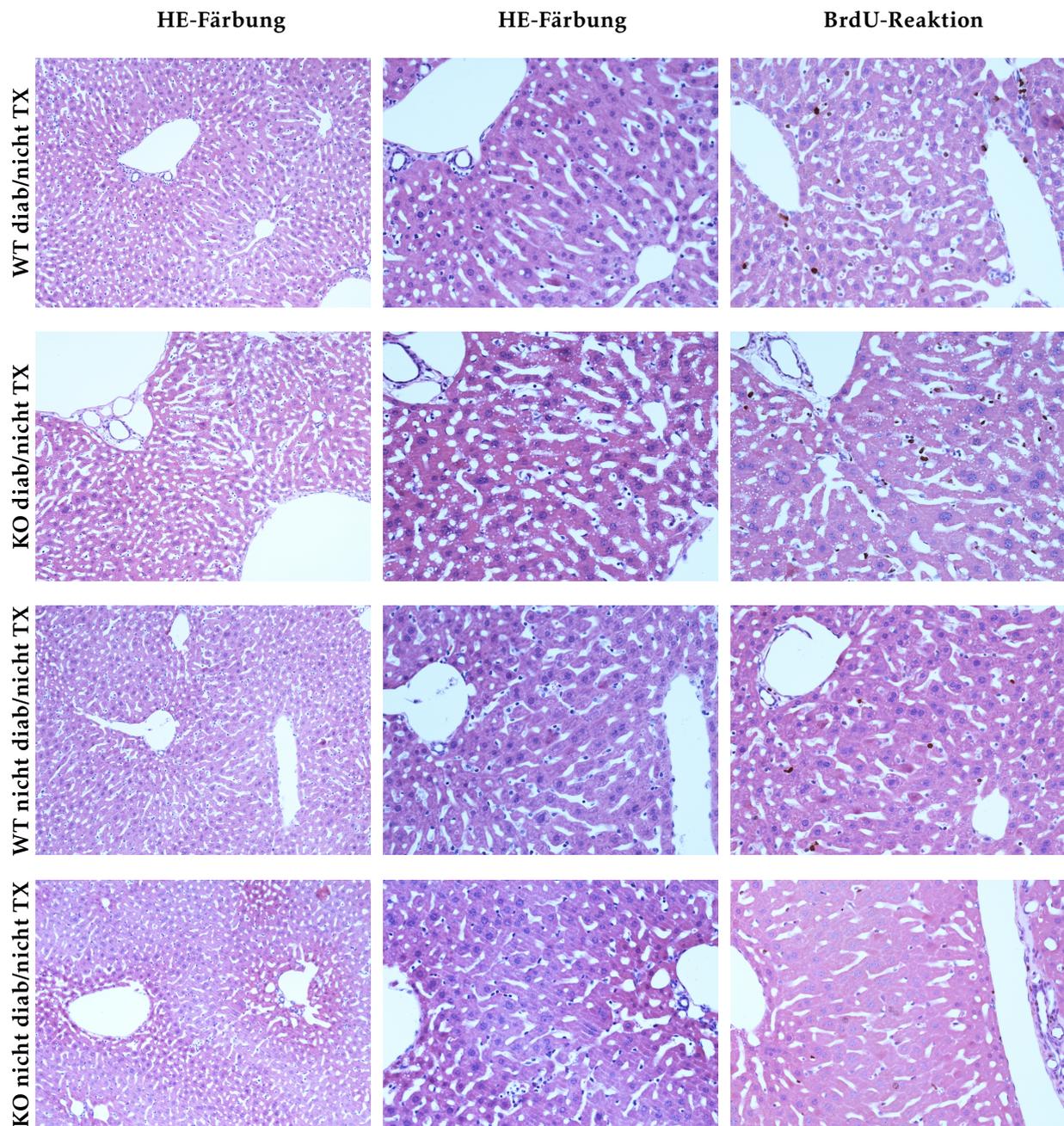


Abbildung 9: Histologische Abbildungen des Lebergewebes von Wildtyp- und Knockout-Mäusen der Gruppen diab/nicht TX und nicht diab/nicht TX, die BrdU-positiven Zellkerne stellen sich in der BrdU-Reaktion braun gefärbt dar; WT, Wildtyp; KO, Knockout; diab/TX, diabetisch/transplantiert; diab/nicht TX, diabetisch/nicht transplantiert; nicht diab/TX, nicht diabetisch/transplantiert; nicht diab/nicht TX, nicht diabetisch/nicht transplantiert; Länge untere Bildkante in Spalte eins: 1mm, in den Spalten zwei und drei: 0,5mm

## 5.2 Häufigkeit der Glykogenspeicherherde

Zur Bestimmung der Häufigkeit der CCF wurden alle Tiere des Projekts herangezogen, deren Versuch nach 3 Monaten beendet wurde.

Die CCFs stellen sich in der HE-Färbung als Ansammlungen klarzelliger Hepatozyten dar, welche größer sind als im umgebenden Gewebe (siehe Abbildung 10, Zeilen eins und zwei). Sie speichern vermehrt Lipide und Glykogen, welches in der PAS-Reaktion sichtbar wird (siehe Abbildung 10, Zeile drei). Die Größe der Herde variiert stark [76].

In der Gruppe der Wildtyp-Tiere treten Glykogenspeicherherde vor allem in der Hauptgruppe auf (siehe Tabelle 6). Ihre Häufigkeit beträgt hier 17,5%. Während ein einzelner sporadischer Herd auch in der Gruppe der diab/nicht TX Tiere (4%) zu finden ist, treten in den anderen beiden Gruppen keine spontanen CCFs auf.

Gruppe	CCF (absolut)	relativer Anteil der Tiere mit CCF (%)	Signifikanztestung (Exakter Test nach Fisher)
WT diab/TX	7/40	17,5	n.s.
WT diab/nicht TX	1/25	4	n.s.
WT nicht diab/TX	0/20	0	n.s.
WT nicht diab/nicht TX	0/20	0	n.s.
KO diab/TX	4/24	16,7	n.s.
KO diab/nicht TX	2/37	5,4	n.s.
KO nicht diab/TX	1/17	5,9	n.s.
KO nicht diab/nicht TX	0/19	0	n.s.

Tabelle 6: Häufigkeit von Glykogenspeicherherden bei Wildtyp- und Knockout-Mäusen; WT, Wildtyp; KO, Knockout; diab/TX, diabetisch/transplantiert; diab/nicht TX, diabetisch/nicht transplantiert; nicht diab/TX, nicht diabetisch/transplantiert; nicht diab/nicht TX, nicht diabetisch/nicht transplantiert; CCF, Glykogenspeicherherd; n.s., nicht signifikant

Die CCFs der ChREBP-Knockout-Tiere hingegen sind etwas weiter auf die Gruppen verteilt (siehe Tabelle 6). Auch hier sind in der diab/TX Gruppe die meisten Herde zu finden (16,7%). In der Gruppe diab/nicht TX entwickelten sich bei 5,4% der Tiere, in der Gruppe nicht diab/TX bei 5,9% Herde.

Im Vergleich der Versuchsgruppen zwischen Wildtyp- und ChREBP-Knockout-Mäusen konnte kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der Herde festgestellt werden. Tumoren waren in keiner Gruppe zu beobachten.

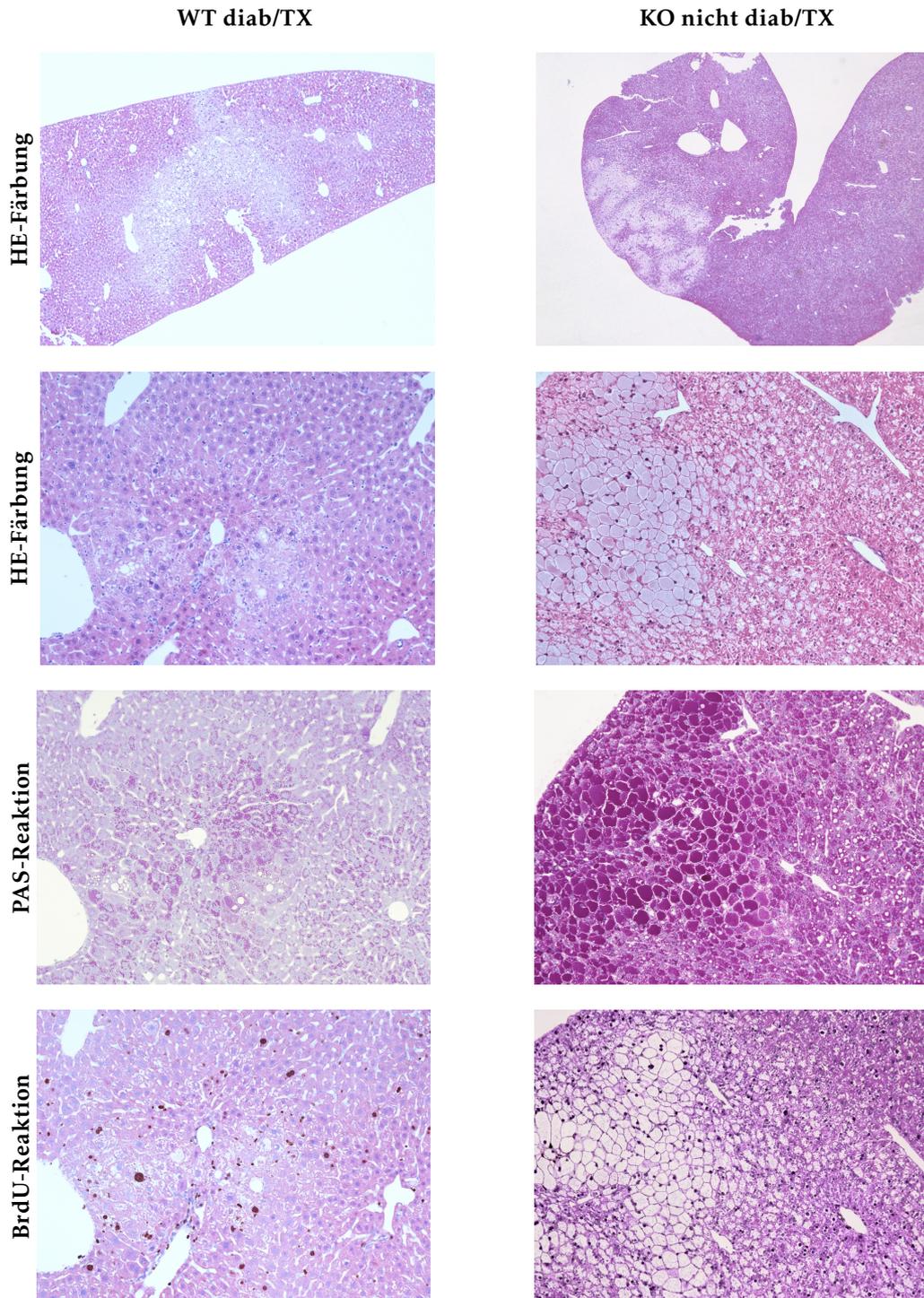


Abbildung 10: Histologische Abbildungen von Glykogenspeicherherden der Wildtyp- (Spalte eins) und Knockout-Mäuse (Spalte zwei). In der HE-Färbung stellen sich die Herde als helle, klarzellige Areale dar und grenzen sich deutlich vom umgebenden Gewebe ab (Zeile eins). Bei stärkerer Vergrößerung ist zu erkennen, dass die Hepatozyten der Glykogenspeicherherde und teilweise auch ihre Zellkerne größer als im umgebenden Gewebe imponieren (Zeile zwei). Es ist weiterhin klar erkennbar, dass die Hepatozyten in den Herden mehr Glykogen speichern als im umgebenden Gewebe (Zeile drei). Und in den Herden deutlich mehr BrdU-positive (braun gefärbte) Zellkerne als im umgebenden Gewebe zu finden sind (Zeile vier). WT, Wildtyp; KO, Knockout; diab/TX, diabetisch/transplantiert; nicht diab/TX, nicht diabetisch/transplantiert; Länge untere Bildkante Zeile eins, Bild eins: 2,5mm, Bild zwei: 5mm, Zeilen zwei, drei und vier: 1mm

### 5.3 Proliferationsaktivität der Glykogenspeicherherde

Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts der Proliferationsaktivität verhalten sich wie in Tabelle 7 dargestellt. Es ist zu sehen, dass sich die Proliferationsaktivitäten im Mittel ähneln.

Vergleicht man die Proliferationsaktivität der Herde in der Gruppe diab/ TX der Wildtyp-Tiere ( $15,17\% \pm 2,86$ ), mit der des Kontrollgewebes der entsprechenden Gruppe ( $6,05\% \pm 0,79$ ), so ist zu erkennen, dass die Herde einen höheren BrdU-LI zeigen ( $p=0,031$ ). Die anderen Versuchsgruppen konnten aufgrund der zu geringen Herdzahl nicht auf Signifikanz geprüft werden.

Gruppe	BrdU LI (%) Mittelwert $\pm$ S.E.M.	N	Signifikanz- testung
1W WT diab/ TX	$15,17 \pm 2,86$	5	#
1W KO diab/TX	$17,53 \pm 2,15$	2	-
24h WT diab/TX	2,12	1	-
24h KO diab/ nicht TX	18,28	1	-
24h KO nicht diab/ TX	13,64	1	-

Tabelle 7: Proliferationsaktivität der Hepatozyten in Glykogenspeicherherden von Wildtyp- und Knockout-Mäusen; in den nicht aufgezeigten Gruppen traten keine auswertbaren Glykogenspeicherherde auf; 1W, BrdU-Applikation über 1 Woche; 24h, BrdU-Applikation über 24 Stunden; WT, Wildtyp, KO, Knockout; S.E.M., Standardfehler des Mittelwerts; N, Anzahl der Tiere; #, signifikant ( $p<0,05$ ) gegenüber dem Kontrollgewebe; -, Testung nicht möglich

## 5.4 Nachweis der transplantierten Inseln

Die transplantierten Pankreasinseln können in den Leberpräparaten nachgewiesen werden. Allerdings war in diesem Versuch insgesamt nur bei einer von 17 Mäusen (5,9%) in der Gruppe nicht diab/TX der Knockout-Tiere Inseln nachweisbar (siehe Tabelle 8). In den im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführten und ausgewerteten Kurzzeitversuchen zeigten sich in dieser Gruppe nach vier Wochen bei 11,8% der Tiere und nach einer Woche sogar bei 33,3% der Tiere Inseln. Auch in der Hauptgruppe der Knockout-Mäuse waren histologisch Inseln zu finden. Nach vier Wochen war dies bei 22,2% und nach einer Woche bei 31,8% der Mäuse der Fall. Die Wildtyp-Tiere zeigten in der Hauptgruppe bei 9,1% (vier Wochen) und 17,5% (eine Woche) und in der Gruppe nicht diab/TX bei 10,5% (vier Wochen) und 4,5% (eine Woche) der Tiere Inseln (Daten der Kurzzeitversuche: unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe). Die Inselzahl der Wildtyp-Tiere unterschied sich sowohl nach einer Woche ( $p=0,006$ ) als auch nach vier Wochen ( $p=0,019$ ) signifikant von der nach drei Monaten. Gleiches gilt für die Knockout-Mäuse (1 Woche:  $p=0,0004$ , 4 Wochen:  $p=0,048$ ). Nach einer Woche konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockout festgestellt werden ( $p=0,027$ ), welcher nach vier Wochen und drei Monaten nicht mehr nachweisbar war.

Gruppe	1 Woche	4 Wochen	3 Monate
WT diab/TX	7/40 (17,5%)	3/33 (9,1%)	0/41 (0%)
WT nicht diab/TX	1/22 (4,5%)	2/19 (10,5%)	0/19 (0%)
KO diab/TX	7/22 (31,8%)	4/18 (22,2%)	0/22 (0%)
KO nicht diab/TX	7/21 (33,3%)	2/17 (11,8%)	1/17 (5,9%)

Tabelle 8: Anzahl angeschnittener transplantierte Pankreasinseln in Leberpräparaten; diab/TX, diabetisch/transplantiert; diab/nicht TX, diabetisch/nicht transplantiert; nicht diab/TX, nicht diabetisch/transplantiert; nicht diab/nicht TX, nicht diabetisch/nicht transplantiert; WT, Wildtyp; KO, Knockout; Daten eine und vier Wochen: unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe

## 5.5 Glykogenspeicherung der Hepatozyten

### 5.5.1 Glykogenspeicherung der Wildtyp-Mäuse

Die stärkste Glykogenspeicherung ist bei den Wildtyp-Mäusen mit einem Mittelwert von  $1,22 \pm 0,03$  (dimensionslos, siehe Kapitel 4.5.2) in der Gruppe nicht diab/TX zu finden. Im Vergleich dazu speichern die diab/nicht TX Mäuse signifikant ( $p=0,012$ ) weniger Glykogen. Sie weisen mit einem Mittelwert von  $1,13 \pm 0,01$  die niedrigste Glykogeneinlagerung aller Gruppen auf. Unter den anderen Gruppen können keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (siehe Tabelle 9). Insgesamt zeigt sich, dass die diabetischen Mäuse weniger Glykogen speichern, als die nicht diabetischen Tiere.

Gruppe	Glykogenspeicherung Mittelwert $\pm$ S.E.M.	N	Signifikanz- testung
WT diab/TX	$1,16 \pm 0,01$	36	#,§
WT diab/nicht TX	$1,13 \pm 0,01$	20	*,&
WT nicht diab/TX	$1,22 \pm 0,03$	19	§
WT nicht diab/nicht TX	$1,17 \pm 0,01$	20	#,§
KO diab/TX	$1,13 \pm 0,01$	18	§,&,§
KO diab/nicht TX	$1,10 \pm 0,01$	20	&
KO nicht diab/TX	$1,55 \pm 0,04$	17	*,&,§
KO nicht diab/nicht TX	$1,25 \pm 0,03$	19	*,#,&,§

Tabelle 9: Glykogenspeicherung extrafokaler Hepatozyten bei Wildtyp- und Knockout-Mäusen; WT, Wildtyp; KO, Knockout; diab/TX, diabetisch/transplantiert; diab/nicht TX, diabetisch/nicht transplantiert; nicht diab/TX, nicht diabetisch/transplantiert; nicht diab/nicht TX, nicht diabetisch/nicht transplantiert; S.E.M., Standardfehler des Mittelwerts; N, Anzahl der Tiere; signifikant ( $p<0,05$ ) gegenüber \*, diab/TX; #, diab/nicht TX; §, nicht diab/ TX; &, nicht diab/ nicht TX; §, WT gegenüber KO

### 5.5.2 Glykogenspeicherung der ChREBP-Knockout-Mäuse

Auch unter den Knockout-Tieren fällt auf, dass die diabetischen Tiere weniger Glykogen speichern, als die nicht diabetischen (siehe Tabelle 9). Die stärkste Glykogenspeicherung zeigen hier die Mäuse der nicht diab/TX Gruppe ( $1,55 \pm 0,04$ ). Ihre Speicherung unterscheidet sich signifikant von der aller anderen Knockout-Mäuse. Gefolgt werden sie von der Gruppe nicht diab/nicht TX ( $1,25 \pm 0,03$ ), welche sich auch signifikant von allen anderen Gruppen unterscheidet. Die diab/TX ( $1,13 \pm 0,01$ ) und diab/nicht TX ( $1,10 \pm 0,01$ ) Tiere ähneln sich in ihrer Glykogenspeicherung und zeigen keinen signifikanten Unterschied.

### 5.5.3 Vergleich der Glykogenspeicherung der Wildtyp- und ChREBP-Knockout-Mäuse

Im Vergleich der beiden Genotypen miteinander fällt auf, dass die diabetischen Wildtyp-Tiere eine stärkere Glykogenspeicherung als die diabetischen Knockout-Tiere zeigen, während die nicht diabetischen Wildtyp-Mäuse weniger Glykogen als die nicht diabetischen ChREBP-Knockout-Mäuse speichern. Zwischen den beiden Hauptgruppen lässt sich ein signifikanter Unterschied beobachten ( $p=0,022$ ). Sowohl bei den nicht diab/TX als auch bei den nicht diab/nicht TX Tieren zeigt sich eine signifikant höhere Speicherung bei den Knockout-Mäusen (nicht diab/TX:  $p=2,124e-6$ , nicht diab/nicht TX:  $p=0,005$ ).

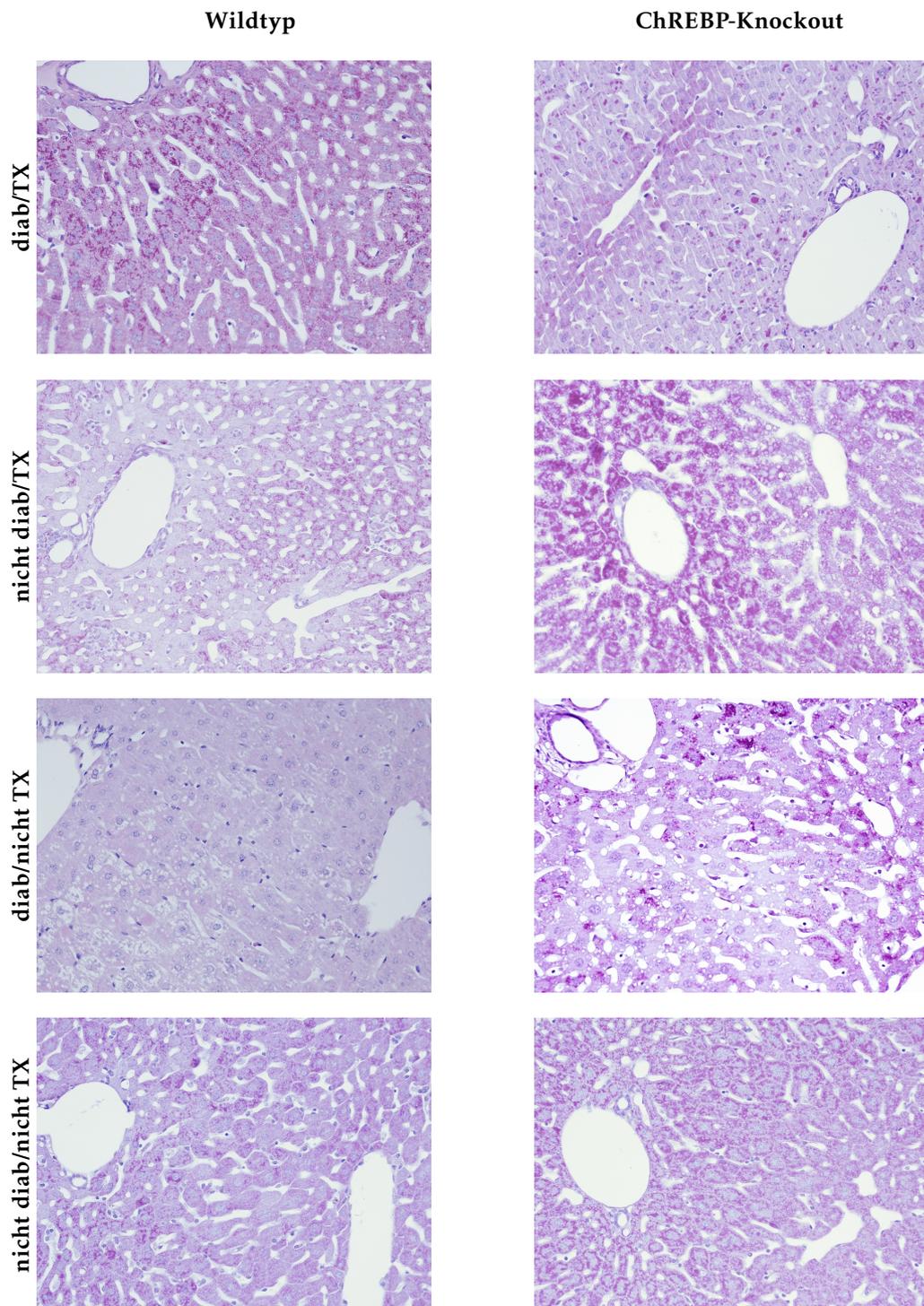


Abbildung 11: Histologische Abbildungen des Lebergewebes von Wildtyp (Spalte eins)- und Knockout-Mäusen (Spalte zwei). Es zeigt sich in der diab/TX Gruppe (Zeile eins) eine signifikant stärkere Glykogenspeicherung bei den Wildtyp-Tieren, während im Gegensatz dazu in den Gruppen nicht diab/TX (Zeile zwei) und nicht diab/nicht TX (Zeile vier) die Knockout-Tiere die signifikant stärkere Glykogenspeicherung zeigen. In der Gruppe diab/nicht TX (Zeile drei) besteht kein signifikanter Unterschied der Glykogenspeicherung zwischen den Genotypen; diab/TX, diabetisch/transplantiert; diab/nicht TX, diabetisch/nicht transplantiert; nicht diab/TX, nicht diabetisch/transplantiert; nicht diab/nicht TX, nicht diabetisch/nicht transplantiert; PAS-Reaktion; Länge untere Bildkante 0,5mm

## 6 Diskussion

### 6.1 Glykogenspeicherherde

Von den in dieser Arbeit beobachteten diabetischen und transplantierten Mäusen entwickelten 17,5% der Wildtyp- und 16,7% der Knockout-Tiere nach drei Monaten Glykogenspeicherherde. Dies steht in großer Diskrepanz zu den Ergebnissen der Kurzzeitversuche, wo nach 1 Woche 67% der Wildtyp- und sogar 95% der Knockout-Mäuse und nach 4 Wochen 45% der Wildtyp- und 82% der Knockout-Mäuse der Hauptgruppen CCFs entwickelt hatten [76].

Als Grund hierfür könnte eine Abstoßung und damit ein Verlust der transplantierten Pankreasinseln vermutet werden. Histologisch konnten diese bei einigen Mäusen im Lebergewebe nachgewiesen werden. Nach drei Monaten waren nur bei einer Maus (5,9%) der Gruppe nicht diab/TX der Knockout-Tiere Inseln zu finden. In allen anderen Gruppen konnten histologisch keine Inseln nachgewiesen werden. Wohingegen diese in den Kurzzeitversuchen nach einer Woche in der gleichen Gruppe sogar in 33,3% der Leberpräparate beobachtet werden konnten. Auch nach 4 Wochen wurden, im Vergleich zu 3 Monaten, signifikant mehr Inseln histologisch in den Leberpräparaten nachgewiesen. Diese Beobachtung betrifft sowohl die Wildtyp- als auch die Knockout-Mäuse. Die Abstoßung der Inseln scheint also nicht in Zusammenhang mit ChREBP zu stehen.

Das Problem, dass viele der transplantierten Inseln nicht anwachsen bzw. schon früh abgestoßen werden ist auch bei der humanen Inseltransplantation bekannt. Studien zeigen einen frühen Verlust von 50-70% der transplantierten Inseln [13]. Grund dafür ist z.B. eine Immunreaktion, die sowohl übers Blut als auch endogen vermittelt in der Leber entstehen kann [13]. Die früh stattfindende, übers Blut vermittelte, Immunreaktion ist durch die Entstehung eines dichten Infiltrats aus Lymphozyten und Makrophagen und den Aufbau von Thromben gekennzeichnet [82]. Die Thromben entstehen über eine Aktivierung sowohl des intrinsischen als auch des extrinsischen Wegs der Gerinnung, welche durch die negative Ladung der Zelloberfläche der Inseln und dem von den Inseln sezernierten tissue factor ausgelöst wird [8, 56]. Die lebereigene Immunreaktion wird unter anderem von Kupferzellen, sinusoidalen Endothelzellen, Sternzellen und dendritischen Zellen vermittelt. Die Kupferzellen werden über das Komplementsystem aufgrund der Ischämie im Bereich der transplantierten Inseln und durch die Sternzellen aktiviert [13, 90]. Einmal aktiviert findet die Schädigung auf zwei Wegen statt. Einerseits phagozytieren sie die transplantierten Inseln, andererseits sezernieren sie Entzündungsmediatoren und freie Radikale welche einen toxischen Effekt auf die Inseln haben [6]. Eine solche Immunreaktion könnte somit zu dem geringen Auftreten von Inseln und CCFs in den Lebern der Mäuse nach drei Monaten geführt haben.

Ein weiterer Faktor, der das Anwachsen der Inseln verhindern könnte ist die, durch die Transplantation entstehende, Thrombosierung der kleinen Pfortaderäste [13]. Diese würde aber nur einen Verlust der Inseln zu frühen Zeitpunkten nach der Transplantation erklären. Da in den Kurzzeitversuchen auch nach vier Wochen noch deutlich mehr Herde auftraten und mehr Inseln histologisch nachweisbar waren als nach drei Monaten, gehen wir eher von einer späteren Abstoßung bzw. einem Absterben der zunächst angewachsenen Inseln aus.

In einer schwedischen Studie wurde die Oxygenierung transplantiertter Pankreasinseln in Mäusen untersucht. Es zeigte sich, dass einen Tag bzw. einen Monat nach Transplantation doppelt so viele Inseln (etwa 70%) niedrig oxygeniert ( $pO_2 < 10 \text{ mmHg}$ ) waren wie im gesunden Pankreasgewebe. Drei Monate nach der Transplantation hingegen war die Zahl der niedrig oxygenierten Inseln in der Leber auf den Normwert im Pankreas gesunken [61]. Dem könnten zwei Ursachen zugrunde liegen. Einerseits könnten die niedrig oxygenierten Inseln untergegangen und nur die gut oxygenierten zurückgeblieben sein. Andererseits könnte sich die Vaskularisierung weiter ausgebildet haben. Diese ist zwar nach 14 Tagen abgeschlossen, jedoch erfolgt ein Remodelling der ausgesprosten Gefäße bis drei Monate nach der Transplantation [29].

Um diese Hypothese zu überprüfen wäre es bei einem zukünftigen Versuch möglich, die Spenderinseln radioaktiv zu markieren. In einer Studie, die das Anwachsen transplantiertter Pankreasinseln in Schweinelebern zu quantifizieren versuchte, wurden die Inseln vor der Transplantation mit 2-deoxy-2[18F]fluoro-D-glucose (FDG) radioaktiv markiert. Später konnten die Inseln durch eine Positronen-Emissions-Tomographie in den Körpern der Schweine nachgewiesen werden [21].

Eine weitere Möglichkeit wäre, die Spenderinseln aus Mäusen zu gewinnen, die ein grün fluoreszierendes Protein exprimieren. Diese Methode wurde von Liljebäck *et al.* [50] genutzt, um herauszufinden, welchen Einfluss eine zweite Transplantation auf das Anwachsen der Inseln in den Empfänger-mäusen hat. Hierzu wurde C57BL/6 Mäusen grün fluoreszierende Inseln transplantiert. Eine Woche später folgte dann eine Transplantation mit nicht markierten Inseln. Die Autoren entdeckten, dass 70 % der Inseln, die nach dem Versuchsende (einen Tag oder einen Monat nach der zweiten Transplantation) in den Lebern der Mäuse zu finden waren, aus der zweiten Transplantation stammten. Den Tieren der Kontrollgruppe wurde während des ersten Eingriffs keine Inseln sondern isotonische Kochsalzlösung transplantiert. Eine Woche später erhielten sie, wie die Hauptgruppe, eine Inseltransplantation. Die Zahl der angewachsenen Inseln in den Lebern der Kontrolltiere war gleich der Inselzahl aus der ersten Transplantation der Hauptgruppentiere und somit deutlich niedriger, als die Zahl der angewachsenen Inseln nach der zweiten

Transplantation der Hauptgruppentiere. Daraus lässt sich ableiten, dass nach einer zweiten Inseltransplantation mehr Inseln in den Lebern der Mäuse anwachsen, als nach einer einmaligen Transplantation [50].

## 6.2 Tumoren

In keiner der Versuchsgruppen traten Tumoren auf. Jedoch zeigten die Glykogenspeicherherde im Vergleich zum Kontrollgewebe eine signifikant höhere Proliferationsaktivität ( $p=0,031$ ). Dies könnte dafür sprechen, dass sich im weiteren Verlauf Tumoren aus diesen Herden entwickeln könnten. Nach sechs und nach 12 Monaten traten sowohl bei den Wildtyp- als auch bei den Knockout-Tieren HCAs und HCCs auf. Jedoch zeigte sich hier kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und Knockout (unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe). Auch im Rahmen der Experimente von Dombrowski et al. an Ratten waren Tumoren erst nach frühestens 6 Monaten Versuchszeitraum nachweisbar [17].

## 6.3 Proliferationsaktivität im extrafokalen Lebergewebe

Um den Einfluss von ChREBP auf das Hepatozytenwachstum außerhalb der präneoplastischen Herde untersuchen zu können wurde der BrdU-LI im extrafokalen Lebergewebe bestimmt. Unter den Wildtyp-Tieren, die BrdU über eine Woche erhielten, wiesen die Gruppen der nicht diabetischen Tiere (sowohl transplantiert als auch nicht transplantiert) die geringste Proliferationsaktivität auf. Hingegen war die Proliferationsrate der Gruppe der diabetisch, nicht transplantierten Tiere deutlich höher. Dies ist auf den peripheren Energiemangel bei Insulinmangel zurückzuführen: Die Leberzellen versuchen vermehrt Substrate für die Energiegewinnung (z.B. Ketonkörper, Glukose) bereitzustellen und ans Blut abzugeben [45]. Aufgrund des systemischen Insulinmangels können die peripheren Zellen die bereitgestellte Glukose jedoch nicht aufnehmen. Der periphere Energiemangel bleibt erhalten und die Leber wird immer weiter zur Produktion oben genannter Substrate angeregt [63]. Dies könnte ein Wachstumsreiz für die Hepatozyten sein.

Die höchste Proliferationsaktivität war bei den Tieren der Hauptgruppe, d.h. der diabetischen und transplantierten Wildtyp-Mäuse, zu beobachten. Auch hier könnte der Diabetes, wie oben bereits diskutiert, ein Aktivator der Zellteilung sein. Außerdem ist das Lebergewebe dieser Tiere einer Hyperinsulinämie ausgesetzt und Insulin erhöht, als Wachstumsfaktor, die Proliferationsaktivität [3, 20].

Auch im Falle der Knockout-Tiere zeigt die Gruppe nicht diab/nicht TX die geringste Proliferationsaktivität nach BrdU-Applikation über eine Woche. Die Proliferationsaktivität in der diab/nicht TX Gruppe ist fast so niedrig wie bei den nicht diab/nicht TX

Tieren. Die Hauptgruppentiere unterscheiden sich in ihrer Proliferationsaktivität nicht von denen der Wildtyp-Gruppe. Da die Hepatozyten Glukose auch insulinunabhängig aufnehmen können [42], gelangt diese zwar in die Leberzellen, ohne ChREBP kann sie jedoch nicht ausreichend zur Energiegewinnung genutzt werden. Denn ChREBP aktiviert über die Pyruvat-Kinase die Glykolyse, welche somit bei einem ChREBP-Knockout gehemmt wird [37]. Dementsprechend haben die Hepatozyten der Knockout-Mäuse weniger Energie für die Mitose zur Verfügung und könnten deshalb die geringere Proliferationsaktivität in der Gruppe diab/nicht TX aufweisen. Außerdem aktiviert ChREBP über die G6PDH den Pentosephosphatweg, welcher Ribosephosphate für die Nukleotidsynthese und somit für die Zellteilung bereitstellt [37, 71]. Auch diese, durch den ChREBP-Knockout fehlenden Metabolite, beeinträchtigen die Mitose der Knockout-Tiere.

Ungewöhnlich ist, dass die Gruppe nicht diab/TX der Knockout-Mäuse eine signifikant höhere Proliferationsaktivität zeigt, als die anderen Knockout-Gruppen. Dem Lebergewebe dieser Gruppe steht aufgrund des fehlenden Diabetes und der zusätzlichen Inseltransplantation theoretisch genügend Insulin zur Verfügung. Einen möglichen Erklärungsansatz könnte daher die Insulinsensitivität darstellen. Wenn die ChREBP-Knockout-Leber über eine bessere Insulinsensitivität verfügte, könnte das meine Ergebnisse erklären. Jois *et al.* [40] untersuchten Mäuse mit einem spezifischen Knockout des Leber-ChREBP. Sie beobachteten, dass diese Tiere eine gestörte Anpassung des Leberstoffwechsels an das Nahrungsangebot zeigten. Dies war durch eine gestörte Glukosetoleranz und eine Insulinresistenz gekennzeichnet [40]. Auch bei einem ChREBP-Knockout im Fettgewebe von Mäusen zeigte sich in diesem eine Insulinresistenz [89]. Diesen Daten zufolge sollten also eher die Wildtyp-Tiere eine höhere Insulinsensitivität zeigen. Jedoch beschränkt sich diese Herangehensweise ausschließlich auf die metabolischen Effekte des Insulins. Als Aktivator der Mitose wirkt das Hormon über eine Aktivierung des G-Proteins Ras (siehe Abbildung 12). Dieses aktiviert im weiteren Verlauf die MAPK, welche dann im Zellkern für die mitogenen Effekte des Insulins sorgt [57]. Im Rahmen der Kurzzeitversuche führte unsere Arbeitsgruppe ([76]) immunhistochemische Untersuchungen in den CCF durch. Sie entdeckten, dass die Proteine IRS1 und Erk, welche diesem mitogenen Arm des Insulineffekts angehören, in den CCF der Knockout-Mäuse niedriger exprimiert waren, als bei den Wildtyp-Tieren [76]. Auch diese Ergebnisse sprechen eher für eine höhere Insulinsensitivität und Proliferationsaktivität der Wildtyp-Mäuse. Daher lassen sich die Ergebnisse nicht über die Insulinsensitivität erklären. Ein weiterer Erklärungsansatz könnte der globale ChREBP-Knockout der Mäuse in unserem Projekt, im Gegensatz zum spezifischen Knockout in Leber oder Fettgewebe in den oben beschriebenen Studien sein.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass ChREBP auch in nicht präneoplastischen oder maligne entarteten Geweben einen Einfluss auf die Proliferationsaktivität hat. Schein-

bar hängt dieser von der Stoffwechsellage in der Mausleber ab.

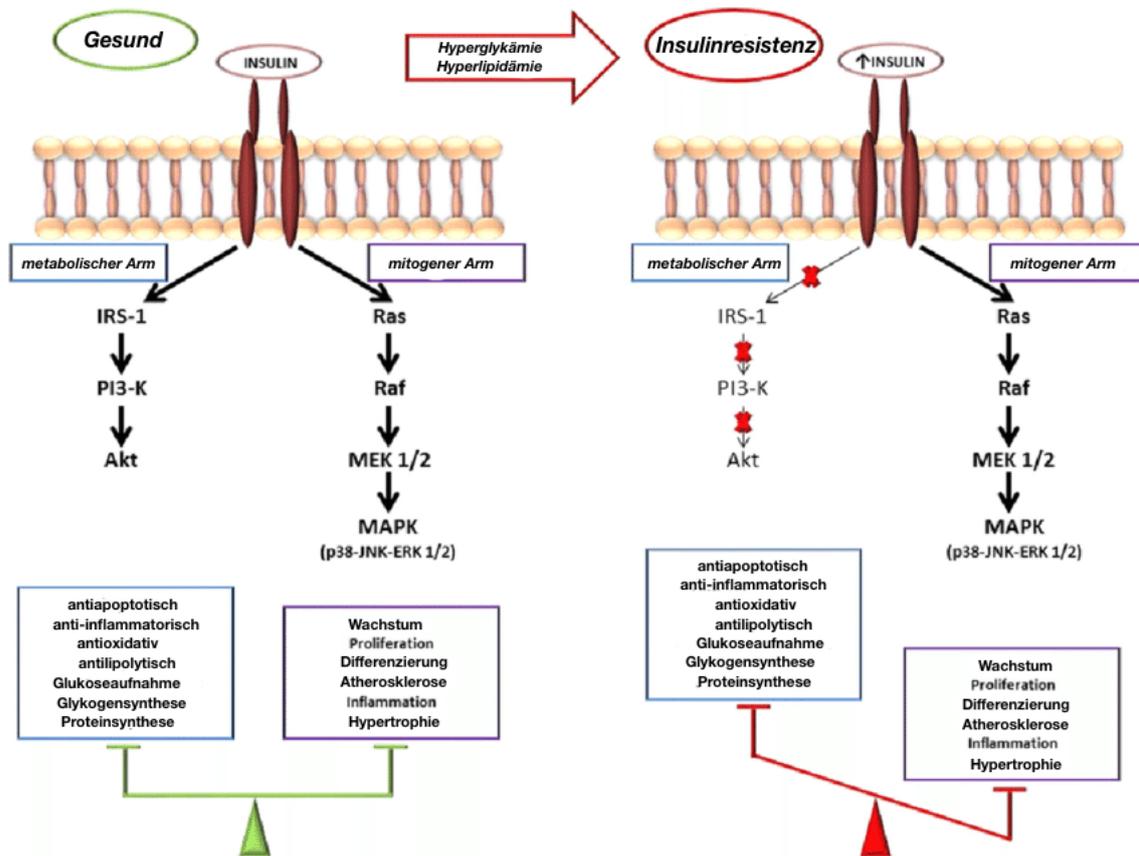


Abbildung 12: Insulinsignalweg im gesunden Zustand und bei Insulinresistenz. Modifiziert nach [20]. Im gesunden Zustand kann Insulin sowohl über seinen metabolischen Arm antiapoptotisch, antiinflammatorisch und auf den Zuckerstoffwechsel, als auch über seinen mitogenen Arm verstärkend auf die Proliferation, das Zellwachstum und die Inflammation wirken. Diese unterschiedlichen Wirkungen sind ausgewogen. Im Zustand der Insulinresistenz hingegen kann Insulin seine metabolischen Effekte nicht mehr ausreichend entfalten. Als Folge wird mehr Insulin ausgeschüttet. Da der mitogene Arm nicht beeinträchtigt ist, überwiegt dieser nun gegenüber der metabolischen Wirkungen.

IRS-1, insulin receptor substrate-1; PI3-K, phosphatidylinositol-3-kinase; Akt, V-akt murine thymoma viral oncogene homolog; Ras, rat sarcoma; Raf, rapidly accelerated fibrosarcoma; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MEK 1/2, MAP kinase kinase 1/2

## 6.4 Glykogenspeicherung

Bei der Betrachtung der Wildtyp-Tiere zeigt sich, dass die beiden diabetischen Gruppen weniger Glykogen in den Hepatozyten speichern, als die nicht diabetischen. Die Leber kann Glukose über den Glukosetransporter GLUT2 insulinunabhängig aufnehmen [42]. Da Insulin jedoch ein Aktivator der Glykogensynthese darstellt, wird bei seinem Fehlen

weniger Glykogen aufgebaut [72, 70]. Das erklärt, warum die diabetischen Tiere weniger Glykogen speichern. Vor allem in der Gruppe diab/nicht TX, die kein Insulin zur Verfügung hat, zeigte sich deshalb eine signifikant geringere Glykogenspeicherung als in allen anderen Gruppen der Wildtyp-Mäuse. In der Gruppe nicht diab/TX ist aufgrund des fehlenden Diabetes und der zusätzlichen Inseltransplantation anzunehmen, dass hier die Insulinkonzentration hoch ist und diese Tiere daher auch am meisten Glykogen speichern.

Im Falle der Knockout-Mäuse zeigt sich eine ähnliche Verteilung innerhalb der Gruppen. Auch hier speicherte die Gruppe nicht diab/TX, gefolgt von nicht diab/nicht TX, am meisten Glykogen. Bei der Hauptgruppe, die durch die Transplantation ein gewisses Maß an Insulin zur Verfügung hat, konnte etwas mehr Glykogen aufgebaut werden, als bei den rein diabetischen Tieren.

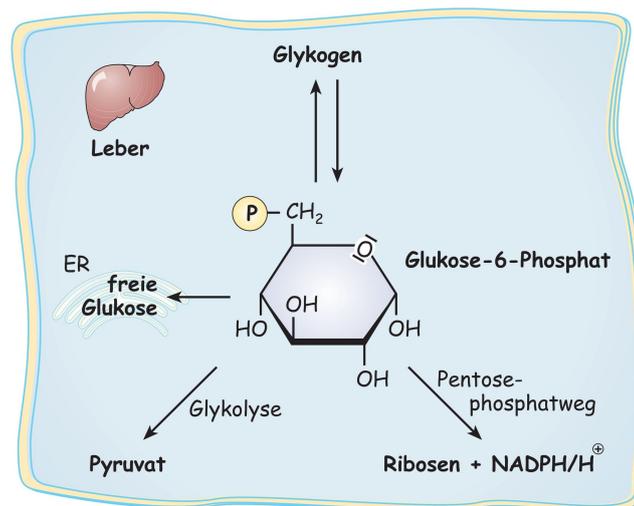


Abbildung 13: Glukose-6-Phosphat in der Leber [32]

Glukose-6-Phosphat kann in der Leber zum Glykogenaufbau genutzt oder als freie Glukose über das endoplasmatische Retikulum (ER) ins Blut abgegeben werden. Außerdem kann es in die Glykolyse oder den Pentosephosphatweg eingespeist werden. NADPH, Nicotinamidadenindinukleotidphosphat oxidierte Form

Beim Vergleich der Genotypen miteinander fällt auf, dass die nicht diabetischen Tiere mit ChREBP-Knockout mehr Glykogen speichern als die Wildtyp-Tiere. Das glykolytische Enzym G6Pase ist ein Target-Gen von ChREBP und wird von diesem aktiviert [37]. Es ist dafür zuständig, das aus dem Glykogen abgebaute Glukose-6-Phosphat (G6P) zu dephosphorylieren und so Glukose bereitzustellen, welche dann ans Blut abgegeben werden kann (siehe Anhang A.1, Abbildung 14) [34, 70]. Dieser Schritt ist bei den Knockout-Mäusen nicht mehr bzw. nur in sehr geringem Maße möglich. Das akkumulierende G6P

könnte in die Glykolyse eingespeist werden (siehe Abbildung 13). Diese wird jedoch auch von ChREBP, unter anderem über die gesteigerte Expression der Pyruvat-Kinase reguliert [37]. Sie überträgt als Schlüsselenzym im letzten Schritt der Glykolyse (siehe Anhang A.1, Abbildung 15) eine Phosphatgruppe von Phosphoenolpyruvat auf Adenosin-Diphosphat (ADP) und bildet so Pyruvat [34, 69]. Beim ChREBP-Knockout wird die Pyruvat-Kinase vermindert synthetisiert wodurch die Pyruvatbildung und somit auch die gesamte Glykolyse nicht ausreichend stattfinden kann. Deshalb akkumuliert das G6P und hemmt, über einen negativen Feedback-Mechanismus, den weiteren Glykogenabbau [33]. Auf diese Weise können die Knockout-Mäuse weniger Glykogen abbauen.

Fraglich ist, warum die beiden diabetischen Knockout-Gruppen weniger Glykogen speichern als ihre Wildtyp-Vertreter. Ein Erklärungsansatz könnte über die Glukosetransporter GLUT2 und GLUT4, deren Transkription von ChREBP aktiviert wird, erfolgen [39]. Über GLUT2 gelangt Glukose insulinunabhängig in die Zelle [70]. Bei einem diabetischen ChREBP-Knockout Tier gelangt somit nur wenig Glukose in die Hepatozyten weshalb diese dementsprechend auch nur sehr wenig Glykogen aufbauen können.

## 7 Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit dem Einfluss des Transkriptionsfaktors ChREBP und eines Diabetes mellitus auf die hepatische Tumorgenese sowie das Wachstum und die Glykogenspeicherung der Hepatozyten. Im speziellen sollte untersucht werden, inwieweit sich die in den Kurzzeitversuchen beobachteten Glykogenspeicherherde nach drei Monaten Versuchszeitraum weiterentwickeln.

ChREBP beeinflusst als Transkriptionsfaktor maßgeblich den Zucker- und Fettstoffwechsel, indem es unter anderem die Lipogenese, Glykolyse und den Pentosephosphatweg aktiviert und die Glukoneogenese hemmt. Zudem ist ChREBP an der Tumorentstehung in verschiedenen Geweben z.B. der Leber, des Kolons und der Brust beteiligt, indem es unter anderem den zellulären Metabolismus in Richtung einer starken Proliferation und einer erhöhten Glykolyse, Laktatbildung und Aktivierung des Pentosephosphatwegs verändert.

Mäusen mit einem durch Streptozotocin induzierten Diabetes wurden je 200 isolierte, isologe Pankreasinseln intraportal transplantiert. Somit entstand in den Empfängertieren lokal in der Leber sowohl eine Hyperglykämie als auch eine Hyperinsulinämie im Sinne eines Typ 2 Diabetes. Der Einfluss von ChREBP auf die Leber wurde durch den Einsatz eines Knockout-Stammes untersucht. Nach drei Monaten wurden die Tiere nach einer Perfusion getötet und Paraffinschnittpräparate der Lebern angefertigt und hinsichtlich ihrer Proliferationsaktivität, Glykogenspeicherung und Herd- bzw. Tumorentstehung histologisch ausgewertet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen ein deutlich geringeres Auftreten von Glykogenspeicherherden nach drei Monaten Versuchsdauer im Vergleich zu den Kurzzeitversuchen nach einer und vier Wochen. Auch sind nach drei Monaten noch keine manifesten Leberzelltumoren entstanden. Es gab keinen Unterschied in der Herdfrequenz zwischen den beiden Genotypen.

Weiterhin wurde der Einfluss von ChREBP auf die Proliferationsaktivität der Hepatozyten untersucht. In der nicht diabetischen, transplantierten Gruppe zeigten die ChREBP-Knockout-Tiere eine stärkere und bei den diabetischen nicht transplantierten Mäusen eine geringere Proliferationsaktivität als die Wildtyp-Tiere.

Die Hepatozyten der diabetischen Knockout-Tiere speicherten weniger und die der nicht diabetischen mehr Glykogen als ihre Vertreter aus der Wildtyp-Gruppe.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ChREBP zu einer veränderten Glykogenspeicherung der Hepatozyten führt. Sein Einfluss zeigt sich bei der diabetischen Stoffwechsellage durch eine Steigerung und bei der nicht diabetischen durch eine Verminderung dieser. Auch die Proliferationsaktivität der Hepatozyten wird von ChREBP beeinflusst, indem es sie beim Vorliegen eines Diabetes mellitus steigert. Da sich auch aus den vorhandenen klarzelligen Herden keine Tumoren entwickelt haben scheint die Tumorentstehung bei der Maus bei beiden Genotypen länger als drei Monate zu dauern.

## Abbildungsverzeichnis

1	Einfluss einer Hyperinsulinämie auf Tumoren . . . . .	4
2	Schematische Darstellung der molekularen Mechanismen im CCF der Ratte und des Menschen . . . . .	8
3	Pankreasgewebe vor und nach dem Zerschnitt . . . . .	18
4	Spülung der Pankreasfragmente . . . . .	18
5	Vorbereitung der Transplantation . . . . .	19
6	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Wildtyp- und Knockout-Mäusen zur Darstellung der Glykogenspeicherung . . . . .	23
7	Glykogenspeicherung der Leber einer Maus: (links) Original, (rechts) nach Erhöhung der Helligkeit um 10 %. PAS-Reaktion. Länge untere Bildkannte 0,5mm . . . . .	25
8	Histologische Abbildungen der Gruppen diab/TX und nicht diab/TX . . .	29
9	Histologische Abbildungen der Gruppen diab/nicht TX und nicht diab/nicht TX . . . . .	30
10	Histologische Abbildungen von Glykogenspeicherherden . . . . .	32
12	Insulinsignalweg im gesunden Zustand und bei Insulinresistenz . . . . .	42
13	Glukose-6-Phosphat in der Leber . . . . .	43
14	Glykogenstoffwechsel . . . . .	57
15	Glykolyse . . . . .	58
16	Pentosephosphatweg . . . . .	59

## Tabellenverzeichnis

1	Versuchsgruppen und Anzahl der Tiere . . . . .	15
2	Intervall der Blutzucker- und Körpergewichtsmessungen . . . . .	16
3	Auswertung der Glykogenkonzentration am Beispiel . . . . .	25
4	Proliferationsaktivität extrafokaler Hepatozyten bei Wildtyp- und Knockout-Mäusen nach BrdU-Applikation über eine Woche . . . . .	26
5	Proliferationsaktivität extrafokaler Hepatozyten bei Wildtyp- und Knockout-Mäusen nach BrdU-Applikation über 24 Stunden . . . . .	27
6	Häufigkeit von Glykogenspeicherherden bei Wildtyp- und Knockout-Mäusen	31
7	Proliferationsaktivität der Hepatozyten in Glykogenspeicherherden von Wildtyp- und Knockout-Mäusen . . . . .	33
8	Anzahl angeschnittener Pankreasinseln in Leberpräparaten . . . . .	34
9	Glykogenspeicherung extrafokaler Hepatozyten bei Wildtyp- und Knockout-Mäusen . . . . .	35
10	Score zur Überwachung des Allgemeinzustands von Versuchstieren . . . . .	60
11	Allgemeine Versuchsmaterialien . . . . .	64
12	Materialien Tierhaltung . . . . .	65
13	Materialien OP-Besteck . . . . .	66
14	Chemikalien . . . . .	72
15	Lösungen zur Konservierung der Mausorgane . . . . .	73
16	Zusammensetzung der Spüllösung . . . . .	73
17	Zusammensetzung der Fixationslösung . . . . .	74
18	Zusammensetzung der Nachfixationslösung . . . . .	75
19	Zusammensetzung des Natrium-Phosphatpuffers 0.1 mol . . . . .	75
20	Zusammensetzung des Natrium-Phosphatpuffers 0.2 mol . . . . .	76
21	Zusammensetzung des Aufbewahrungspuffers 0.1 mol . . . . .	76
22	Zusammensetzung des Cacodylatpuffers 0.1 mol . . . . .	76
23	Zusammensetzung des Cacodylatpuffers 0.2 mol . . . . .	77

## Literaturverzeichnis

- [1] A. Abdul-Wahed, S. Guilmeau und C. Postic. “Sweet Sixteenth for ChREBP: Established Roles and Future Goals.” eng. In: *Cell metabolism* 26 (2 2017), S. 324–341.
- [2] R. E. Airley, P. McHugh, A. R. Evans, B. Harris, L. Winchester, F. M. Buffa, W. Al-Tameemi, R. Leek und A. L. Harris. “Role of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) in generating an aerobic metabolic phenotype and in breast cancer progression (Abstrakt)”. In: *British Journal of Cancer* 110.3 (2014), S. 715–723.
- [3] M. J. Amaya, A. G. Oliveira, E. S. Guimarães, M. C. F. Casteluber, S. M. Carvalho, L. M. Andrade, M. C. X. Pinto, A. Mennone, C. A. Oliveira, R. R. Resende, G. B. Menezes, M. H. Nathanson und M. F. Leite. “The insulin receptor translocates to the nucleus to regulate cell proliferation in liver.” eng. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 59 (2014), S. 274–83.
- [4] P. Bannasch. “Pathogenesis of hepatocellular carcinoma: sequential cellular, molecular, and metabolic changes.” eng. In: *Progress in liver diseases* 14 (1996), S. 161–97.
- [5] P. Bannasch, D. Mayer und R. Krech. “Neoplastic and preneoplastic lesions in rats after oral administration of a single dose of N-nitrosomorpholine”. In: *Journal of cancer research and clinical oncology* 94 (1979), S. 233–48.
- [6] N. R. Barshes, S. Wyllie und J. A. Goss. “Inflammation-mediated dysfunction and apoptosis in pancreatic islet transplantation: implications for intrahepatic grafts.” eng. In: *Journal of leukocyte biology* 77 (5 2005), S. 587–97.
- [7] F. Benhamed, P.-D. Denechaud, M. Lemoine, C. Robichon, M. Moldes, J. Bertrand-Michel, V. Ratziu, L. Serfaty, C. Housset, J. Capeau, J. Girard, H. Guillou und C. Postic. “The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans.” eng. In: *The Journal of clinical investigation* 122 (2012), S. 2176–94.
- [8] W. Bennet, C. G. Groth, R. Larsson, B. Nilsson und O. Korsgren. “Isolated human islets trigger an instant blood mediated inflammatory reaction: implications for intraportal islet transplantation as a treatment for patients with type 1 diabetes.” eng. In: *Uppsala journal of medical sciences* 105 (2 2000), S. 125–33.
- [9] N. C. for Biotechnology Information. PubChem Database. *5-Bromo-2'-deoxyuridine*, CID=6035. URL: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5-Bromo-2\\_-deoxyuridine](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5-Bromo-2_-deoxyuridine) (besucht am 19.02.2020).
- [10] D. Calvisi, M. Evert und F. Dombrowski. “Hepatocarcinogenesis following pancreatic islet transplantation in streptozotocin- and autoimmune-diabetic rats”. In: *Archives of physiology and biochemistry* 115 (2009), S. 97–104.

- [11] D. F. Calvisi, C. Wang, C. Ho, S. Ladu, S. A. Lee, S. Mattu, G. Destefanis, S. Delogu, A. Zimmermann, J. Ericsson, S. Brozzetti, T. Staniscia, X. Chen, F. Dombrowski und M. Evert. "Increased lipogenesis, induced by AKT-mTORC1-RPS6 signaling, promotes development of human hepatocellular carcinoma." eng. In: *Gastroenterology* 140 (2011), S. 1071–83.
- [12] Z. Chen, M. Liu, L. Li und L. Chen. "Involvement of the Warburg effect in non-tumor diseases processes." eng. In: *Journal of cellular physiology* 233 (4 2018), S. 2839–2849.
- [13] V. Delaune, T. Berney, S. Lacotte und C. Toso. "Intraportal islet transplantation: the impact of the liver microenvironment." eng. In: *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 30 (2017), S. 227–238.
- [14] R. Dentin, F. Benhamed, I. Hainault, V. Fauveau, F. Fougelle, J. R. B. Dyck, J. Girard und C. Postic. "Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice." eng. In: *Diabetes* 55 (2006), S. 2159–70.
- [15] R. Dentin, L. Tomas-Cobos, F. Fougelle, J. Leopold, J. Girard, C. Postic und P. Ferré. "Glucose 6-phosphate, rather than xylulose 5-phosphate, is required for the activation of ChREBP in response to glucose in the liver (Abstrakt)". In: *Journal of Hepatology* 56.1 (2012), S. 199–209.
- [16] F. Dombrowski. "Tumorigenesis after intra-portal pancreatic islet transplantation in diabetic rats". In: *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 84 (2000), S. 136–50.
- [17] F. Dombrowski, P. Bannasch und U. Pfeifer. "Hepatocellular neoplasms induced by low-number pancreatic islet transplants in streptozotocin diabetic rats". eng. In: *The American journal of pathology* 150 (1997), S. 1071–1087.
- [18] F. Dombrowski, E. Filsinger, P. Bannasch und U. Pfeifer. "Altered liver acini induced in diabetic rats by portal vein islet isografts resemble preneoplastic hepatic foci in their enzymic pattern." eng. In: *The American journal of pathology* 148 (1996), S. 1249–56.
- [19] F. Dombrowski, M. Lehringer-Polzin und U. Pfeifer. "Hyperproliferative liver acini after intraportal islet transplantation in streptozotocin-induced diabetic rats." eng. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 71 (1994), S. 688–99.
- [20] R. D'Oria, L. Laviola, F. Giorgino, V. Unfer, S. Bettocchi und M. Scioscia. "PKB/Akt and MAPK/ERK phosphorylation is highly induced by inositols: Novel potential insights in endothelial dysfunction in preeclampsia". In: *Pregnancy Hypertension* 10 (2017), S. 107–112.

- [21] T. Eich, O. Eriksson, A. Sundin, S. Estrada, D. Brandhorst, H. Brandhorst, B. Langstrom, B. Nilsson, O. Korsgren und T. Lundgren. "Positron Emission Tomography: A Real-Time Tool to Quantify Early Islet Engraftment in a Preclinical Large Animal Model". In: *Transplantation* 84.7 (2007), S. 893–898.
- [22] L. Eissing, T. Scherer, K. Tödter, U. Knippschild, J. W. Greve, W. A. Buurman, H. O. Pinnschmidt, S. S. Rensen, A. M. Wolf, A. Bartelt, J. Heeren, C. Buettner und L. Scheja. "De novo lipogenesis in human fat and liver is linked to ChREBP- and metabolic health." eng. In: *Nature communications* 4.1528 (2013).
- [23] H. B. El-Serag, T. Tran und J. E. Everhart. "Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma." In: *Gastroenterology* 126 (2004), S. 460–468.
- [24] J. Ertle, A. Dechêne, J.-P. Sowa, V. Penndorf, K. Herzer, G. Kaiser, J. F. Schlaak, G. Gerken, W.-K. Syn und A. Canbay. "Non-alcoholic fatty liver disease progresses to hepatocellular carcinoma in the absence of apparent cirrhosis." In: *International journal of cancer* 128 (2011), S. 2436–2443.
- [25] M. Evert, D. F. Calvisi, K. Evert, V. De Murtas, G. Gasparetti, S. Mattu, G. Destefanis, S. Ladu, A. Zimmermann, S. Delogu, S. Thiel, A. Thiele, S. Ribback und F. Dombrowski. "V-AKT murine thymoma viral oncogene homolog/mammalian target of rapamycin activation induces a module of metabolic changes contributing to growth in insulin-induced hepatocarcinogenesis". In: *Hepatology* 55 (2012), S. 1473–1484.
- [26] M. Evert, J. Sun, S. Pichler, N. Slavova, R. Schneider-Stock und F. Dombrowski. "Insulin Receptor, Insulin Receptor Substrate-1, Raf-1, and Mek-1 during Hormonal Hepatocarcinogenesis by Intrahepatic Pancreatic Islet Transplantation in Diabetic Rats". In: *Cancer Research* 64.21 (2004), S. 8093–8100.
- [27] I. D. Federation. *IDF Diabetes Atlas, 9th edition Brussels*. Techn. Ber. Belgien: International Diabetes Federation, 2019.
- [28] S. L. Friedman, B. A. Neuschwander-Tetri, M. Rinella und A. J. Sanyal. "Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies." eng. In: *Nature medicine* 24 (2018), S. 908–922.
- [29] A. Gamble, A. R. Pepper, A. Bruni und A. M. J. Shapiro. "The journey of islet cell transplantation and future development." eng. In: *Islets* 10 (2018), S. 80–94.
- [30] M. A. Herman, O. D. Peroni, J. Villoria, M. R. Schön, N. A. Abumrad, M. Blüher, S. Klein und B. B. Kahn. "A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism." eng. In: *Nature* 484 (2012), S. 333–8.

- [31] S. von Holstein-Rathlou, L. D. BonDurant, L. Peltekian, M. C. Naber, T. C. Yin, K. E. Claflin, A. I. Urizar, A. N. Madsen, C. Ratner, B. Holst, K. Karstoft, A. Vandenbeuch, C. B. Anderson, M. D. Cassell, A. P. Thompson, T. P. Solomon, K. Rahmouni, S. C. Kinnamon, A. A. Pieper, M. P. Gillum und M. J. Potthoff. "FGF21 Mediates Endocrine Control of Simple Sugar Intake and Sweet Taste Preference by the Liver." eng. In: *Cell metabolism* 23 (2016), S. 335–43.
- [32] F. Horn. "Stoffwechsel der Kohlenhydrate". In: *Biochemie des Menschen*. Hrsg. von F. Horn. 7. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2019. Kap. 8, S. 111–157.
- [33] H. R. Horton, L. A. Moran, K. G. Scrimgeour, M. D. Perry und J. D. Rawn. "Gluconeogenese, Pentosephosphatweg und Glycogenstoffwechsel". In: *Biochemie*. Hrsg. von H. R. Horton, L. A. Moran, K. G. Scrimgeour, M. D. Perry und J. D. Rawn. 4. Aufl. München: Pearson Studium, 2008. Kap. 12, S. 479–514.
- [34] H. R. Horton, L. A. Moran, K. G. Scrimgeour, M. D. Perry und J. D. Rawn. "Glycolyse". In: *Biochemie*. Hrsg. von H. R. Horton, L. A. Moran, K. G. Scrimgeour, M. D. Perry und J. D. Rawn. 4. Aufl. München: Pearson Studium, 2008. Kap. 11, S. 441–478.
- [35] Y. Ido-Kitamura, T. Sasaki, M. Kobayashi, H.-J. Kim, Y.-S. Lee, O. Kikuchi, H. Yokota-Hashimoto, K. Iizuka, D. Accili und T. Kitamura. "Hepatic FoxO1 Integrates Glucose Utilization and Lipid Synthesis through Regulation of ChREBP O-Glycosylation". In: *PloS one* 7 (Okt. 2012), e47231.
- [36] K. Iizuka. "Recent progress on the role of ChREBP in glucose and lipid metabolism." eng. In: *Endocrine journal* 60 (2013), S. 543–55.
- [37] K. Iizuka. "The transcription factor carbohydrate-response element-binding protein (ChREBP): A possible link between metabolic disease and cancer". In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1863.2 (2017), S. 474–485.
- [38] K. Iizuka, R. K. Bruick, G. Liang, J. D. Horton und K. Uyeda. "Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis." eng. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (2004), S. 7281–6.
- [39] T. Jois und M. W. Sleeman. "The regulation and role of carbohydrate response element-binding protein in metabolic homeostasis and disease." eng. In: *Journal of neuroendocrinology* 29 (2017).
- [40] T. Jois, W. Chen, V. Howard, R. Harvey, K. Youngs, C. Thalmann, P. Saha, L. Chan, M. A. Cowley und M. W. Sleeman. "Deletion of hepatic carbohydrate response element binding protein (ChREBP) impairs glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice". In: *Molecular Metabolism* 6.11 (2017), S. 1381–1394.

- [41] A. K. Kaushik, A. Shojaie, K. Panzitt, R. Sonavane, H. Venghatakrishnan, M. Manikkam, A. Zaslavsky, V. Putluri, V. T. Vasu, Y. Zhang, A. S. Khan, S. Lloyd, A. T. Szafran, S. Dasgupta, D. A. Bader, F. Stossi, H. Li, S. Samanta, X. Cao, E. Tsouko, S. Huang, D. E. Frigo, L. Chan, D. P. Edwards, B. A. Kaiparettu, N. Mitsiades, N. L. Weigel, M. Mancini, S. E. McGuire, R. Mehra, M. M. Ittmann, A. M. Chinnaiyan, N. Putluri, G. S. Palapattu, G. Michailidis und A. Sreekumar. "Inhibition of the hexosamine biosynthetic pathway promotes castration-resistant prostate cancer". In: *Nature Communications* 7.1 (2016), S. 11612.
- [42] J. Khoury, Y. Zohar, N. Shehadeh und T. Saadi. "Glycogenic hepatopathy". In: *Hepatobiliary Pancreatic Diseases International* 17.2 (2018), S. 113–118. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1499387218300511>.
- [43] M.-S. Kim, S. A. Krawczyk, L. Doridot, A. J. Fowler, J. X. Wang, S. A. Trauger, H.-L. Noh, H. J. Kang, J. K. Meissen, M. Blatnik, J. K. Kim, M. Lai und M. A. Herman. "ChREBP regulates fructose-induced glucose production independently of insulin signaling." eng. In: *The Journal of clinical investigation* 126 (2016), S. 4372–4386.
- [44] R. Kursawe, S. Caprio, C. Giannini, D. Narayan, A. Lin, E. D'Adamo, M. Shaw, B. Pierpont, S. W. Cushman und G. I. Shulman. "Decreased transcription of ChREBP / isoforms in abdominal subcutaneous adipose tissue of obese adolescents with prediabetes or early type 2 diabetes: associations with insulin resistance and hyperglycemia." eng. In: *Diabetes* 62 (2013), S. 837–44.
- [45] M. Königshoff und T. Brandenburger. "Lipide". In: *Kurzlehrbuch Biochemie*. Hrsg. von M. Königshoff und T. Brandenburger. 4. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2018. Kap. 3.
- [46] H.-J. Lee und J.-Y. Cha. "Recent insights into the role of ChREBP in intestinal fructose absorption and metabolism." eng. In: *BMB reports* 51 (2018), S. 429–436.
- [47] P. D. Lee, C. A. Conover und D. R. Powell. "Regulation and function of insulin-like growth factor-binding protein-1. (Abstrakt)". In: *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 204 (1993), S. 4–29.
- [48] X. Li, X. Wang und P. Gao. "Diabetes Mellitus and Risk of Hepatocellular Carcinoma." eng. In: *BioMed research international* 2017 (2017), S. 1–10.
- [49] M. V. Liberti und J. W. Locasale. "The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?" eng. In: *Trends in biochemical sciences* 41 (3 2016), S. 211–218.
- [50] H. Liljebäck, M. Quach, P.-O. Carlsson und J. Lau. "Fewer Islets Survive from a First Transplant than a Second Transplant: Evaluation of Repeated Intraportal Islet Transplantation in Mice". In: *Cell Transplantation* 28 (2019). PMID: 31359771, S. 1455–1460.

- [51] S. Y. Lunt und M. G. Vander Heiden. "Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation." eng. In: *Annual review of cell and developmental biology* 27 (2011), S. 441–64.
- [52] L. Ma, L. Robinson und H. Towle. "ChREBP\**Mlx* Is the Principal Mediator of Glucose-induced Gene Expression in the Liver". In: *The Journal of biological chemistry* 281 (2006), S. 28721–30.
- [53] N. N. Massarweh und H. B. El-Serag. "Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma and Intrahepatic Cholangiocarcinoma". eng. In: *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center* 24.28975830 (2017), S. 1–11.
- [54] S. Masuda, S. Mizukami, A. Eguchi, R. Ichikawa, M. Nakamura, K. Nakamura, R. Okada, T. Tanaka, M. Shibutani und T. Yoshida. "Immunohistochemical expression of autophagosome markers LC3 and p62 in preneoplastic liver foci in high fat diet-fed rats". In: *The Journal of Toxicological Sciences* 44.8 (2019), S. 565–574.
- [55] M. R. Metukuri, P. Zhang, M. K. Basantani, C. Chin, R. E. Stamateris, L. C. Alonso, K. K. Takane, R. Gramignoli, S. C. Strom, R. M. O'Doherty, A. F. Stewart, R. C. Vasavada, A. Garcia-Ocana und D. K. Scott. "ChREBP mediates glucose-stimulated pancreatic beta-cell proliferation." eng. In: *Diabetes* 61 (2012), S. 2004–15.
- [56] L. Moberg, H. Johansson, A. Lukinius, C. Berne, A. Foss, R. Källén, Østraat, K. Salmela, A. Tibell, G. Tufveson, G. Elgue, K. Nilsson Ekdahl, O. Korsgren und B. Nilsson. "Production of tissue factor by pancreatic islet cells as a trigger of detrimental thrombotic reactions in clinical islet transplantation." eng. In: *Lancet (London, England)* 360 (9350 2002), S. 2039–45.
- [57] H. F.B. S. Moc Isabelle. "Energieversorgung". In: *Biochemie des Menschen*. Hrsg. von F. Horn. 7. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2019. Kap. 21, S. 397–426.
- [58] L. Muskhelishvili, J. R. Latendresse, R. L. Kodell und E. B. Henderson. "Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA." eng. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 51 (2003), S. 1681–8.
- [59] T. Nakagawa, Q. Ge, R. Pawlosky, R. M. Wynn, R. L. Veech und K. Uyeda. "Metabolite regulation of nucleo-cytosolic trafficking of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP): role of ketone bodies." eng. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (2013), S. 28358–67.
- [60] K. O. Nielsen, A. H. Mirza, S. Kaur, K. S. Jacobsen, T. N. Winther, D. Glebe, F. Pociot, B. Høgh und J. Størling. "Hepatitis B virus suppresses the secretion of insulin-like growth factor binding protein 1 to facilitate anti-apoptotic IGF-1 effects in HepG2 cells." In: *Experimental cell research* 370 (2018), S. 399–408.

- [61] R. Olsson, J. Olerud, U. Pettersson und P.-O. Carlsson. "Increased Numbers of Low-Oxygenated Pancreatic Islets After Intraportal Islet Transplantation". In: *Diabetes* 60.9 (2011), S. 2350–2353.
- [62] P. Ortega-Prieto und C. Postic. "Carbohydrate Sensing Through the Transcription Factor ChREBP." eng. In: *Frontiers in genetics* 10 (2019), S. 472.
- [63] J. Ozougwu, K. Obimba, C. Belonwu und C. Unakalamba. "The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus". In: *Academic Journals* 4 (Jan. 2013), S. 46–57.
- [64] N. Pongvarin, J. K. Lee, V. K. Yechoor, M. V. Li, T. Assavapokee, P. Suksaranjit, J. J. Thepsongwajja, P. K. Saha, K. Oka und L. Chan. "Carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) plays a pivotal role in beta cell glucotoxicity." eng. In: *Diabetologia* 55 (2012), S. 1783–96.
- [65] N. Pongvarin, B. Chang, M. Imamura, J. Chen, K. Moolsuwan, C. Sae-Lee, W. Li und L. Chan. "Genome-Wide Analysis of ChREBP Binding Sites on Male Mouse Liver and White Adipose Chromatin." eng. In: *Endocrinology* 156 (2015), S. 1982–94.
- [66] C. H. del Pozo, G. Vesperinas-García, M. Ángel Rubio, R. Corripio-Sánchez, A. J. Torres-García, M.-J. Obregon und R. M. Calvo. "ChREBP expression in the liver, adipose tissue and differentiated preadipocytes in human obesity". In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1811.12 (2011), S. 1194–1200.
- [67] D. J. K. Prof. Dirk Müller-Wieland. *Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2019*. Techn. Ber. Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG) und diabetesDE – Deutsche Diabetes-Hilfe, 2019.
- [68] S. B. Q., C. C. J. und H. S. A. "Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: A weighty connection". In: *Hepatology* 51.5 (2010), S. 1820–1832.
- [69] J. Rassow. "Abbau der Kohlenhydrate zu Pyruvat bzw. Lactat". In: *Duale Reihe Biochemie*. Hrsg. von J. Rassow, K. Hauser, R. Netzker und R. Deutzmann. 3. Aufl. Reihe, DUALE REIHE. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2012. Kap. A6, S. 70–96.
- [70] J. Rassow. "Biochemie der Leber". In: *Duale Reihe Biochemie*. Hrsg. von J. Rassow, K. Hauser, R. Netzker und R. Deutzmann. 3. Aufl. Reihe, DUALE REIHE. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2012. Kap. F2, S. 745–749.
- [71] J. Rassow. "Die Bereitstellung von Fettsäuren, Triacylglycerinen und Ketonkörpern". In: *Duale Reihe Biochemie*. Hrsg. von J. Rassow, K. Hauser, R. Netzker und R. Deutzmann. 3. Aufl. Reihe, DUALE REIHE. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2012. Kap. A13, S. 221–251.

- [72] J. Rassow. "Speicherung und Bereitstellung von Kohlenhydraten". In: *Duale Reihe Biochemie*. Hrsg. von J. Rassow, K. Hauser, R. Netzker und R. Deutzmann. 3. Aufl. Reihe, DUALE REIHE. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2012. Kap. A12, S. 200–220.
- [73] P. Rawla, T. Sunkara, P. Muralidharan und J. P. Raj. "Update in global trends and aetiology of hepatocellular carcinoma." eng. In: *Contemporary oncology (Poznan, Poland)* 22 (2018), S. 141–150.
- [74] S. Ribback, D. F. Calvisi, A. Cigliano, J. Rausch, C.-D. Heidecke, M. Birth und F. Dombrowski. "Molekulare und metabolische Veränderungen in humanen klarzelligen Leberherden". In: *Der Pathologe* 36.2 (2015), S. 210–215.
- [75] S. Ribback, D. F. Calvisi, A. Cigliano, V. Sailer, M. Peters, J. Rausch, C.-D. Heidecke, M. Birth und F. Dombrowski. "Molecular and metabolic changes in human liver clear cell foci resemble the alterations occurring in rat hepatocarcinogenesis." eng. In: *Journal of hepatology* 58 (2013), S. 1147–56.
- [76] S. Ribback, J. Sonke, A. Lohr, J. Frohme, K. Peters, J. Holm, M. Peters, A. Cigliano, D. F. Calvisi und F. Dombrowski. "Hepatocellular glycogenotic foci after combined intraportal pancreatic islet transplantation and knockout of the carbohydrate responsive element binding protein in diabetic mice." eng. In: *Oncotarget* 8 (2017), S. 104315–104329.
- [77] G. d.e.K.i.D. e. Robert Koch-Institut. *Krebs in Deutschland für 2015/2016*. Techn. Ber. Robert Koch-Institut, Berlin, 2019.
- [78] L. Rui. "Energy metabolism in the liver." eng. In: *Comprehensive Physiology* 4 (2014), S. 177–97.
- [79] P. Schirmacher, W. Jochum und C. Lackner. "Leber und intrahepatische Gallenwege". In: *Pathologie*. Hrsg. von W. Böcker, H. Denk, P. U. Heitz, G. Höfler, H. Kreipe und H. Moch. 5. Aufl. München: Elsevier GmbH, 2012. Kap. 33, S. 623–666.
- [80] A. M. Schmidt. "Highlighting Diabetes Mellitus: The Epidemic Continues." eng. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 38 (2018), e1–e8.
- [81] S. F. Schmidt, J. G. S. Madsen, K. O. Frafjord, L. I. C. Poulsen, S. Salo, M. Boergesen, A. Loft, B. D. Larsen, M. S. Madsen, J. J. Holst, P. Maechler, L. T. Dalgaard und S. Mandrup. "Integrative Genomics Outlines a Biphasic Glucose Response and a ChREBP-RORgamma Axis Regulating Proliferation in beta Cells." eng. In: *Cell reports* 16 (2016), S. 2359–72.
- [82] C. E. Sever, A. J. Demetris, Y. Zeng, A. Tzakis, J. J. Fung, T. E. Starzl und C. Ricordi. "Islet cell allotransplantation in diabetic patients. Histologic findings in four adults simultaneously receiving kidney or liver transplants". eng. In: *The American journal of pathology* 140.1580334 (1992), S. 1255–1260.

- [83] G. Shlomai, B. Neel, D. LeRoith und E. J. Gallagher. "Type 2 Diabetes Mellitus and Cancer: The Role of Pharmacotherapy." eng. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 34 (2016), S. 4261–4269.
- [84] E. J. Sloan und D. E. Ayer. "Myc, mondo, and metabolism." eng. In: *Genes & cancer* 1 (2010), S. 587–96.
- [85] Y. Tang, M. Wallace, J. Sanchez-Gurmaches, W.-Y. Hsiao, H. Li, P. L. Lee, S. Vernia, C. M. Metallo und D. A. Guertin. "Adipose tissue mTORC2 regulates ChREBP-driven de novo lipogenesis and hepatic glucose metabolism." eng. In: *Nature communications* 7 (2016), S. 11365.
- [86] J. L. Temple, P. Cordero, J. Li, V. Nguyen und J. A. Oben. "A Guide to Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Childhood and Adolescence." eng. In: *International journal of molecular sciences* 17 (2016).
- [87] X. Tong, F. Zhao, A. Mancuso, J. J. Gruber und C. B. Thompson. "The glucose-responsive transcription factor ChREBP contributes to glucose-dependent anabolic synthesis and cell proliferation." eng. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (2009), S. 21660–5.
- [88] K. K. Tsilidis, J. C. Kasimis, D. S. Lopez, E. E. Ntzani und J. P. A. Ioannidis. "Type 2 diabetes and cancer: umbrella review of meta-analyses of observational studies". In: *BMJ* 350 (2015), g7607.
- [89] A. Vijayakumar, P. Aryal, J. Wen, I. Syed, R. P. Vazirani, P. M. Moraes-Vieira, J. P. Camporez, M. R. Gallop, R. J. Perry, O. D. Peroni, G. I. Shulman, A. Saghatelian, T. E. McGraw und B. B. Kahn. "Absence of Carbohydrate Response Element Binding Protein in Adipocytes Causes Systemic Insulin Resistance and Impairs Glucose Transport". In: *Cell Reports* 21.4 (2017), S. 1021–1035.
- [90] R. Weiskirchen und F. Tacke. "Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology." eng. In: *Hepatobiliary surgery and nutrition* 3 (6 2014), S. 344–63.
- [91] R. G. R. Woods. "Digital Image Processing". In: New Jersey: Pearson Education International, 2008. Kap. Histogram Processing, S. 120–144.
- [92] W. Wu, H. Tsuchida, T. Kato, H. Niwa, Y. Horikawa, J. Takeda und K. Iizuka. "Fat and carbohydrate in western diet contribute differently to hepatic lipid accumulation". In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 461.4 (2015), S. 681–686.
- [93] A. Wutthisathapornchai, T. Vongpipatana, S. Muangsawat, T. Boonsaen, M. J. MacDonald und S. Jitrapakdee. "Multiple E-boxes in the distal promoter of the rat pyruvate carboxylase gene function as a glucose-responsive element." eng. In: *PLoS one* 9 (2014), e102730.

# A Anhang

## A.1 Schematische Abbildungen zum Glukose- und Glykogenstoffwechsel

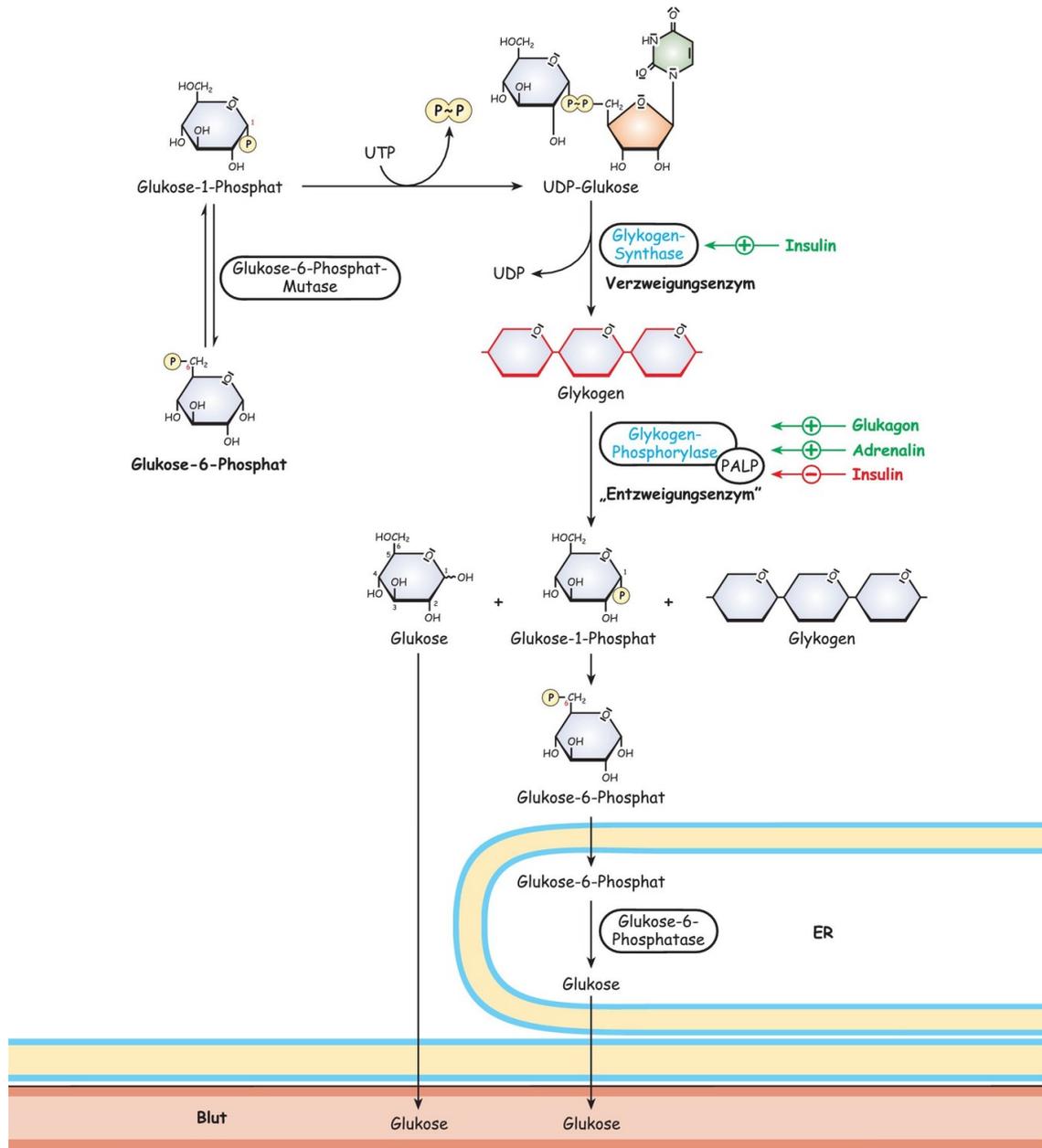


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Glykogen Auf- und Abbaus in der Leber und dessen Regulation; UTP, Uridin-Triphosphat; UDP, Uridin-Diphosphat [32]

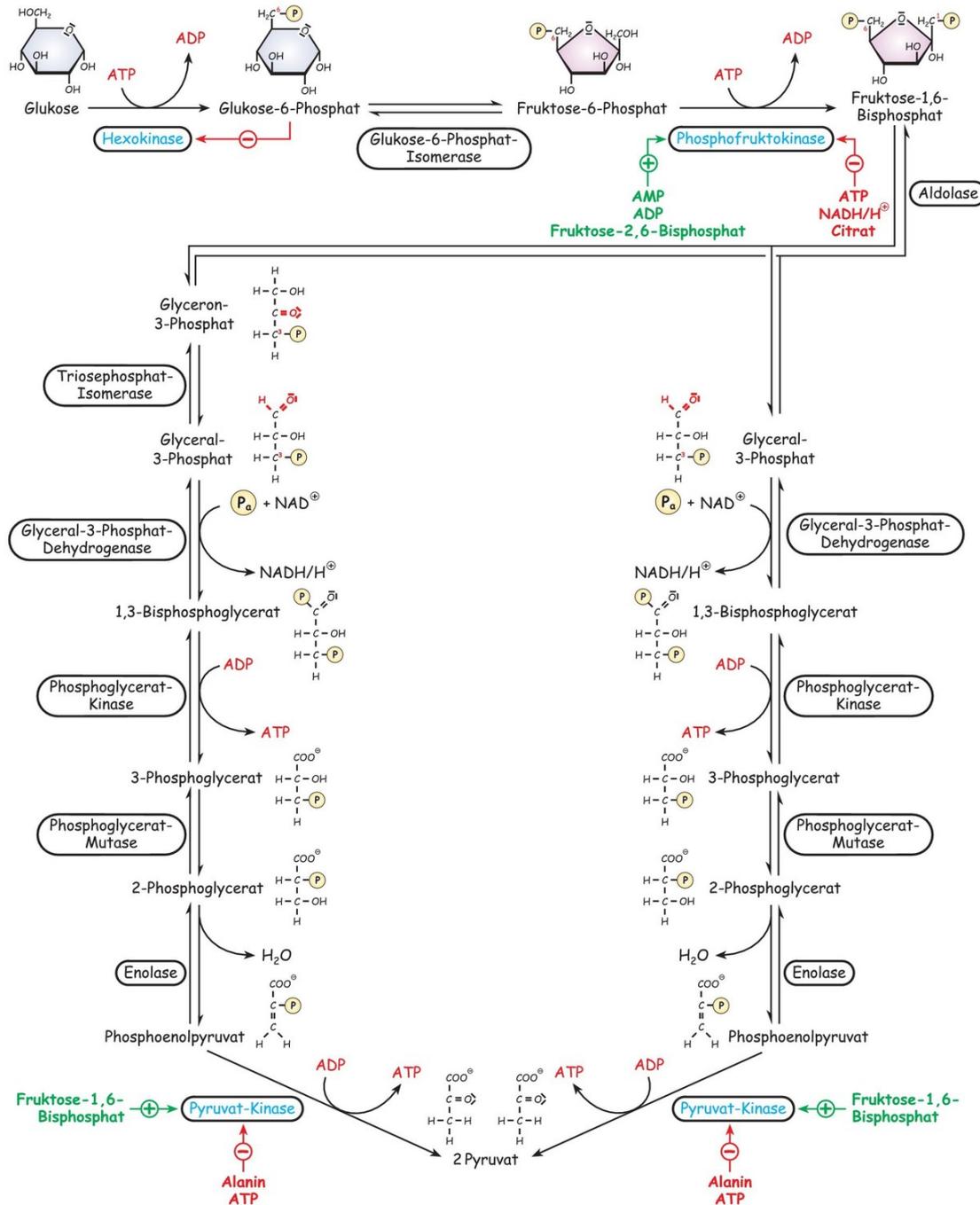


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Glykolyse und ihre Regulation; ATP, Adenosin-Triphosphat; ADP, Adenosin-Diphosphat; AMP, Adenosin-Monophosphat; NAD, Nicotinamadenindinukleotid; NADH, Nicotinamadenindinukleotid oxidierte Form [32]

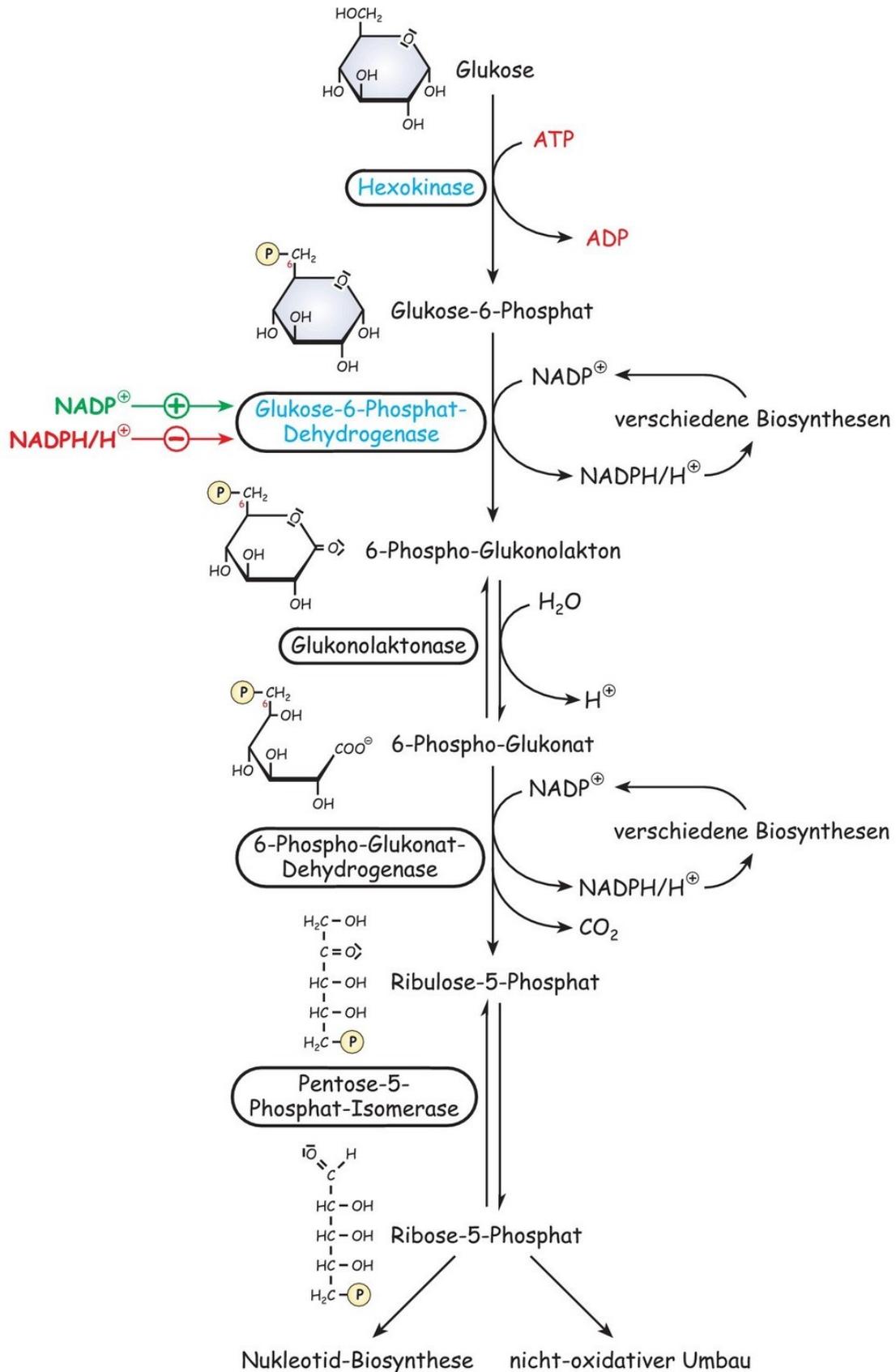


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Pentosephosphatwegs und seine Regulation; ATP, Adenosin-Triphosphat; ADP, Adenosin-Diphosphat; NADP, Nicotinamadenindinukleotidphosphat; NADPH, Nicotinamadenindinukleotidphosphat oxidierte Form [32]

## A.2 Score zur Überwachung des Allgemeinzustands von Versuchstieren

Parameter	Untersuchung	Bewertung	Punkte
Erscheinungsbild	Inspektion	normales, gepflegtes Fell	0
		leicht gesträubtes Fell	1
		mäßig gesträubtes Fell	2
		dauerhaft gesträubtes Fell, Dehydratation	3
Atmung	Inspektion	normal	0
		beschleunigt	1
		schwer	2
		schwach	3
Gewichtsverlust	Wiegen	< 5%	0
		< 15%	1
		< 20%	2
		> 20%	3
Spontanverhalten	Beobachten	lebhaft, neugierig	0
		verlangsamt, sitzend	1
		träge, buckelige Haltung	2
		schwankender Gang	3
provoziertes Verhalten	Beobachten	Flucht bei Käfigöffnung	0
		Flucht bei Annäherung	1
		Flucht bei Berührung	2
		keine Flucht	3
Mundhöhle	Inspektion	rosige Schleimhaut	0
		Erosionen	1
		kleine Ulzera/Tumoren	2
		blutige Ulzera/Tumoren	3

Tabelle 10: Score zur Überwachung des Allgemeinzustands von Versuchstieren; Tiere mit einem Gesamt-Score von  $\geq 9$  oder einem Einzelwert von 3 werden aus dem Versuch genommen und getötet.

## A.3 Materialien

### A.3.1 Allgemeine Versuchsmaterialien

Produktbezeichnung	Hersteller	Herkunft	Funktion
Einwegspritzen BD Plastic™ 1 ml	Becton Dickinson S.A.	Madrid, Spanien	Transplantation und Perfusion (Narkose, Tx-System)

Einwegspritzen BD Plastic™ 5 ml	Becton Dickinson S.A.	Madrid, Spanien	Transplantation (Pankreasisolation)
Einwegspritzen BD Plastic™ 20 ml	Becton Dickinson S.A.	Madrid, Spanien	Transplantation (Pankreasisolation)
Kanülen BD Microlance™ 3, 26 G 3/8	Becton Dickinson and Company Limited	Drogheda, Irland	Transplantation, Perfusion (Narkose)
sterile Einweg-Subkutannadeln AGANI™ NEEDLE	Shanghai International Holding Corp. GmbH (Europe)	Hamburg, Deutschland	Transplantation (Tx-System)
Rasierklingen Croma®Blades, Klingienstärke 0,1mm	Feintechnik GmbH Eisfeld	Eisfeld, Deutschland	Transplantation (Pankreasisolation), Perfusion (Probengewinnung) und Zuschnitt
Punktionskanüle Venofix®A, orange, G25, 0,50 x 15 mm	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland	Transplantation (Pankreasisolation)
Wecker	Carl-Roth-GmbH und Co. KG	Karlsruhe, Deutschland	Transplantation, Perfusion (Zeitmessung)
Brutschrank (37,5 °C)	Heraeus/Thermo Electro Corporation	Langenselboldt, Deutschland	Transplantation (Enzymatischer Verdau, Lagerung)
Vortexer	neolab®	Heidelberg, Deutschland	Aufbereitung von Streptozotocin und BrdU
Glaspipetten (Disposable Glass Pasteur Pipettes), Diameter: 7mm	vwr® International	Radnor, USA	Transplantation (Inselisolation)
Stereomikroskop	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH	Wetzlar, Deutschland	Transplantation (Inselisolation)
Stereomikroskop	Olympus Biosystems GmbH	Planegg, Deutschland	Transplantation (Inselisolation)
Leica DMRB 301	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH	Wetzlar, Deutschland	Auswertung der histologischen Präparate
Nikon DS-Fi1	Nikon Corporation	Tokio, Japan	Auswertung der histologischen Präparate
Blutzuckermessgerät PerformaAccu-Chek®	Accu-Chek	Mannheim, Deutschland	BZ-Messung
Blutzucker-Teststreifen Accu-Chek Inform II	Accu-Chek	Mannheim, Deutschland	BZ-Messung

Kaltlichtquelle KL1500 electronic	Schott Elektrotechnik	Mannheim, Deutschland	Transplantation (Inselisolation)
Kaltlichtquelle KL2500 LED	Olympus Biosystems GmbH	Planegg, Deutschland	Transplantation (Inselisolation)
Pipettierhilfe micro-classic	Brand GmbH und Co. KG	Wertheim, Deutschland	Transplantation (Inselisolation)
Handzähler	Conrad Electronic	Berlin, Deutschland	Transplantation (Gewinnung von Pankreasinseln)
Rührplatte MonoVariomag®	H und P Labortechnik AG	Oberschleißheim, Deutschland	Herstellung Chemikalien
Einweg-Plastikpipetten, 3.5 ml	Sarstedt AG und Co. KG	Nümbrecht, Deutschland	Herstellung Chemikalien
pH-Elektrode SenTix®81	Xylem Analytics Germany Sales GmbH und Co. KG	Weilheim, Deutschland	Herstellung Chemikalien (pH-Messung)
pH-Meter inolab	Xylem Analytics Germany Sales GmbH und Co. KG	Weilheim, Deutschland	Herstellung Chemikalien (pH-Messung)
Centrifuge 5415D, $\geq 10.0 \times 1000$ rpm	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH	Hamburg, Deutschland	Perfusion (Serumgewinnung)
Waage EMB 500-I	Kern und Sohn GmbH	Balingen, Deutschland	wiegen (Maus)
Feinwaage FZ-300i-EC	A und D Instruments, Limited	Abington, Großbritannien	Herstellung Chemikalien
Operationsleuchte Mach 130	Dr. Mach	Ebersberg, Deutschland	Beleuchtung OP-Tisch
Serumgefäße Cryo S™	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, Deutschland	Perfusion (Serumgewinnung)
Einwegplastikbecher (mit Deckel, klein)	Sarstedt AG und Co. KG	Nümbrecht, Deutschland	Perfusion (Probenaufgewahrung)
Eppendorfpipette Reference, 100 $\mu$ l	Kinesis GmbH	Langenfeld, Deutschland	Perfusion (Serumgewinnung)
Eppendorf Pipettenspitzen	Kinesis GmbH	Langenfeld, Deutschland	Perfusion (Serumgewinnung)
Papierstreifen	Vogel GmbH und Co. KG	Gießen, Deutschland	Perfusion (Kryokonservierung)
Pipettierball	Carl-Roth-GmbH und Co. KG	Karlsruhe, Deutschland	Transplantation (Spülung)
Autoklavierband	LabWare	Weinheim, Deutschland	Transplantation und Perfusion (Fixierung)
Steri Drape™	3M Health Care	Neuss, Deutschland	Transplantation und Perfusion (Operationstuch)

Kühlschrank (4,2 °C) ML 305C	B Medical Systems	Houson, Luxemburg	Lagerung (Proben, Chemikalien)
Gefrierschrank (-22,0 °C)	B Medical Systems	Houson, Luxemburg	Lagerung (Proben, Chemikalien)
Gefriertruhe (-44,0 °C) Profiline	Liebherr- International Deutschland GmbH	Biberach, Deutschland	Lagerung (Proben, Chemikalien)
Bunsenbrenner Campinggaz® Labogaz 470	Camping Gaz GmbH	Hattersheim, Deutschland	Transplantation (Inselisolation)
Wattestäbchen Best premium	Consumer Medical Care	Sontheim/Brenz, Deutschland	Transplantation und Perfusion (Operation)
sterile Mullkompressen Fuhrmann, 17-fädig aus Baumwolle, 10x10cm, DIN EN 14079	Fuhrmann GmbH	München, Deutschland	Transplantation und Perfusion (Operation)
unsterile Mullkompressen Fuhrmann, 17-fädig aus Baumwolle, 10x10cm, DIN EN 14079	Fuhrmann GmbH	München, Deutschland	Transplantation und Perfusion (Operation)
Schlingzangentupfer	Fuhrmann GmbH	München, Deutschland	Transplantation und Perfusion (Operation)
Venenverweilkatheter mit Flügeln BD-Insyste-N, gelb, 24 G, 0.7x14 mm	Becton Dickinson Infusion Therapy Systems	Utah, USA	Perfusion
Skalpellklinge	Feather Safety Razor Co., Ltd.	FKita-Ku, Japan	Transplantation (Hautschnitt)
Faden MARILON® aus Polyvinylidenfluorid, monofil, nicht resorbierbar, blau, 5/0 USP, 45cm	Catgut GmbH	Markneukirchen, Deutschland	Transplantation (Peritonealnaht)
Wundklammern Michel, 7.5 x 1.75 mm	Aesculap AG	Tuttlingen, Deutschland	Transplantation (Hautverschluss)
Rasierer Electra II GH 204	Aesculap AG	Tuttlingen, Deutschland	Transplantation und Perfusion (Haarrasur Bauchdecke)
Einweghandschuhe Peha-Soft nitril	Paul Hartmann AG	Heidenheim, Deutschland	Transplantation und Perfusion, Tierhaltung
Nitrilhandschuhe (chemoresistent)	Kirchhoff Group Deutschland	Hamburg, Deutschland	Herstellung Chemikalien
Schutzhandschuhe Cryogloves®	Tempshield Cryo Protection, INC	Trenton, USA	arbeiten mit Stickstoff
Mundschutz	3M Health Care	Minnesota, USA	Transplantation und Perfusion, Herstellung Chemikalien

Schutzbrille Armamax	Honeywell Safety Products Deutschland GmbH und Co. KG	Lübeck, Deutschland	Herstellung Chemikalien
Impfösen	nerbe plus	Winsen/Luhe, Deutschland	Transplantation (Blutstillung)
Manuelle Pipettierhilfe	Carl-Roth-GmbH und Co. KG	Karlsruhe, Deutschland	Transplantation (Spülung)
Filterpapier	Whatman™ GE Healthcare Lifesciences	München, Deutschland	Perfusion (Herstellung Chemikalien)
Heidelberger-Extension-Type Verlängerungsleitung, Größe: 30 cm, 1.2 x 2.2 mm	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland	Transplantation (Tx-System)
Intrafix® Primeline	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland	Perfusion (Infusionsbesteck)
alzet® mini osmotic pump 2001, 1,0 µl/h, 200 µl	Charles River Laboratories, Inc.	Wilmington, USA	Perfusion (BrdU-Applikation)
Hitzesterilisator Sterilisator 205	Melag Medizintechnik	Berlin, Deutschland	Transplantation (Sterilisation OP-Besteck)
Parafilm „M“	Pechiney Plastic packaging	Chicago, USA	Transplantation (Abdeckung HANKS)
Terrarium Heizmatte „Terra Mat 20“, 20W, 42x28 cm	GarPet GmbH und Co. KG	Cadolzburg, Deutschland	Wärmeerhalt
Terrarium Heizmatte „Terra Mat 5“, 5W, 14x15 cm	GarPet GmbH und Co. KG	Cadolzburg, Deutschland	Wärmeerhalt
Serumkügelchen	Sarstedt AG und Co. KG	Nümbrecht, Deutschland	Serumherstellung

Tabelle 11: Allgemeine Versuchsmaterialien

### A.3.2 Tierhaltung

Bezeichnung	Hersteller	Herkunft	Funktion
Käfig aus Makrolon (Typ3), Bodenfläche: 800cm <sup>2</sup> , Höhe: 150 mm	FA Zoonlab (ehemals EBECO)	Castrop-Rauxel, Deutschland	Tierhaltung
Käfig aus Makrolon (Typ2), Bodefläche: 350cm <sup>2</sup> , Höhe: 140mm	FA Zoonlab (ehemals EBECO)	Castrop-Rauxel, Deutschland	Tierhaltung
Standardkäfigdeckel DST3	FA Zoonlab (ehemals EBECO)	Castrop-Rauxel, Deutschland	Tierhaltung
Standardkäfigdeckel DST2	FA Zoonlab (ehemals EBECO)	Castrop-Rauxel, Deutschland	Tierhaltung
Tränkflasche aus Makrolon (F75), Volumen:750ml	FA Zoonlab (ehemals EBECO)	Castrop-Rauxel, Deutschland	Tierhaltung

Tränkflsche aus Makrolon (F50), Volumen: 500ml	FA Zoonlab (ehemals EBECO)	Castrop-Rauxel, Deutschland	Tierhaltung
Tränkkappe (TR 25/1,8), Kanüle:25mm, Bohrung:1,8mm	FA Zoonlab (ehemals EBECO)	Castrop-Rauxel, Deutschland	Tierhaltung
Silikondichtungsring für Tränkflasche SDR1	FA Zoonlab (ehemals EBECO)	Castrop-Rauxel, Deutschland	Tierhaltung
Trennblech für Futterraufe (TB3)	FA Zoonlab (ehemals EBECO)	Castrop-Rauxel, Deutschland	Tierhaltung
Trennblech für Futterraufe (TB2)	FA Zoonlab (ehemals EBECO)	Castrop-Rauxel, Deutschland	Tierhaltung
Maus-Häusschen aus Polycarbonat, Farbe: rot, transparent	FA Zoonlab (ehemals EBECO)	Castrop-Rauxel, Deutschland	Tierhaltung
Gestell (G3e/24L) für 24 Makrolonkäfige (Typ 3)	FA Zoonlab (ehemals EBECO)	Castrop-Rauxel, Deutschland	Tierhaltung
Gestell (Le/30L) für 30 Makrolonkäfige (Typ 2)	FA Zoonlab (ehemals EBECO)	Castrop-Rauxel, Deutschland	Tierhaltung
Verbandzellstoff, ungebleicht	Universitätsmedizin Greifswald	Greifswald, Deutschland	Tierhaltung
Maus-Zuchtfutter, 10mm	ssniff Spezialdiäten GmbH	Soest, Deutschland	Tierhaltung
Maus-Haltungsfutter, 10mm	ssniff Spezialdiäten GmbH	Soest, Deutschland	Tierhaltung
Einstreu für Kleintiere, Grade: 5, Material: Fichte, Faser/Fibre: 1,0-2,5 mm, Bulk Density: 120-140 g/L	ssniff Spezialdiäten GmbH	Soest, Deutschland	Tierhaltung

Tabelle 12: Materialien Tierhaltung

### A.3.3 OP-Besteck

Produkt	Hersteller	Herkunft	Artikel-Nr.	Funktion
anatomische Pinzette, mittelbreit, Größe: 115mm, 4 1/2	Aesculap AG	Tüttlingen, Deutschland	BD023R	Transplantation, Perfusion
anatomische Pinzette, mittelbreit, Größe: 130mm, 5 1/8	Aesculap AG	Tüttlingen, Deutschland	BD025R	Transplantation, Perfusio
chirurgische Pinzette, mittelbreit, 1x2 Zähne, Größe: 120mm, 4 3/4	Aesculap AG	Tüttlingen, Deutschland	BD506R	Transplantation, Perfusion
Irispinzette, stark gebogen, sehr fein, spitz, Größe: 100mm, 4	Aesculap AG	Tüttlingen, Deutschland	OC026R	Transplantation, Perfusion
Irispinzette, stark gebogen, sehr fein, stumpf, Größe: 100mm, 4	Aesculap AG	Tüttlingen, Deutschland	OC026R	Transplantation, Perfusion
Anlege-/Abnhemezange, Größe: 125mm, 5	Aesculap AG	Tüttlingen, Deutschland	BN750R	Transplantation, Perfusion

Schere, fein, gerade, spitz/spitz, Größe: 105mm, 4 1/8	Aesculap AG	Tüttlingen, Deutschland	BC060R	Transplantation, Perfusion
Gefäßschere, 1 Blatt geknöpft, Größe: 120mm, 4 3/4	Aesculap AG	Tüttlingen, Deutschland	BC060R	Transplantation, Perfusion
Skalpellgriff(Aufnahme No. 3 für Klingen Figur 10-15 und 40,42), Größe: 125mm, 5	Aesculap AG	Tüttlingen, Deutschland	BB073R	Transplantation, Perfusion
Bulldogklemme, gewinkelt, Maullänge: 20 mm, Gesamtlänge: 34mm	Aesculap AG	Tüttlingen, Deutschland	BH030R	Transplantation, Perfusion
Durogrip Nadelhalter, Größe: 130mm, 5 1/8	Aesculap AG	Tüttlingen, Deutschland	BM012R	Transplantation, Perfusion
Mikro-Präparierschere aus WIRONIT, gerade, spitz/spitz, Größe: 130mm, 5 1/8	Karl Hammacher GmbH	Solingen, Deutschland	HWB 002-11	Transplantation, Perfusion

Tabelle 13: Materialien OP-Besteck

## A.3.4 Chemikalien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Identifikation	Hersteller	Funktion
Bode Bacillol ® 25	1-Propanol (45g), 2-Propanol (25g), Ethanol (4,7g)	REF: 92385, PZN: 7438053	BODE Chemie, Hamburg, Deutschland	Flächendesinfektion
—	Ethanol 70 Vol.-%	—	Universitätsapotheke Greifswald, Greifswald, Deutschland	Transplantation und Perfusion (Desinfektion)
—	Ethanol 96 Vol.-%	Index: 603-002-00-5	Universitätsapotheke Greifswald, Greifswald, Deutschland	Transplantation und Perfusion (Desinfektion)
HI7073L Protein Cleaning Solution Set	—	Lot: 50017/17	Hanna Instruments SRL Com., Salaj, Rumänien	Transplantation und Perfusion (Säuberung des pH-Meters)
B. Braun NaCl 0,9 %	Natriumchlorid (9g/ 1000ml)	Lot: 171248001	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland	Transplantation und Perfusion (Neutralrot-Lösung, Säuberung, Feuchtigkeitserhalt)
Ketamin 10 %- Injektionslösung	Ketaminhydrochlorid (100 mg/ml)	Ch.B.: H4114-10, Zul.Nr.: 9089.01.00	Dr. Otto Fischer GmbH, Weyan-Holzolling, Deutschland	Transplantation, Perfusion (Narkose, Analgesie)
Lin βIT® Lin βIT®-Insulinimplan- tate	—	U.S.-Patent-Nr.: 5939380	Linshin Canada, INC., Toronto, Kanada	Insulinstick-Implantation

Natriumhydroxid-Lösung 99 %	Natriumhydroxid	Art.Nr.: 6771.1, Ch.B.: 054209415	Carl-Roth-GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Transplantation und Perfusion (pH-Einstellung von HANKS, Spül- und Fixationslösungen)
Novaminsulfon ratiopharm ®	Metamizol-Matrium 1 H <sub>2</sub> O (500mg/ml)	Ch.B.: R378662, Zul.Nr.: 6137816.00.00	ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland	Analgesie
Potassium chloride solution	Kaliumchlorid	Lot: HC67083717	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Analgesie
ROTIPIURAN ≥ 99,5 % ®	Diethylether	Ch.B.: 406247625	Carl-Roth-GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Narkose
Salzsäure	HCl 37 % (rauchend)	Lot: K48518817 650	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Transplantation und Perfusion (pH-Einstellung von HANKS, Spül- und Fixationslösungen), Zuschnitt (Pufferlösung)
Sensiva ®	1-Propanol (Ph.Eur.) 45.0g/100g, 2-Propanol (Ph.Eur.) 28.0 g/100g, Milchsäure (Ph.Eur.) 0.3g/100g	Ch.B.: 1280424, Art.Nr.: 115203	Schülke Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland	Transplantation und Perfusion (Desinfektion)
Xylasel ®-Injektions- lösung	Xylazinchlorid (20mg/ml)	Ch.B.: 1570150A	Dr. Otto Fischer GmbH, Weyan-Holzolling, Deutschland	Narkose

Hank's balanced salt solution, 10X CMF-HBSS concentrate	CMF-HBSS	Lot: RNBF1803	SIGMA Life Science ALDRICH, St. Louis, USA	Transplantation (HANKS, Nährlösung für isoliertes Pankreasgewebe)
Plastipur®-Spüllösung	Aqua ad iniectabilia	Ch.B.: 13LAP061	Fresenius Kabi France, Sevres, Frankreich	Transplantation und Perfusion (Lösung für HANKS, Fixation und Nachfixation), Zuschnitt (Pufferlösung)
Neutralrot-Lösung	Neutralrot (10g/500ml)	Ch.B.: 306247424	Carl-Roth-GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Transplantation (Anfärbung der Pankreasinseln)
Mini-Plasco® connect- Injektionslösung	Natriumchlorid 0.9 % (0.09g/10ml)	Ch.B.: 17035011, Zul.Nr.: 6697366.00.00	Braun AG, Melsungen, Deutschland	Transplantation (sterile Spüllösung)
Collagenase NB8 Broad Range	Collagenase NB8 Broad Range (aus Clostridium histolyticum)	Lot: 150842 , EC: 232-582-9 , CAS: 9001-12-1	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	Transplantation (Enzymatischer Verdau des Pankreasgewebe)
Albumin bovine cryst. lyophil.	Albumin bovine cryst. lyophil.	Lot: 150969 , EC: 232-936-2 , CAS: 9048-46-8	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	Transplantation (Enzymatischer Verdau des Pankreasgewebe)
2-Methylbutan ≥ 99 %	2-Methylbutan ≥ 99 %	Ch.B.: 436250995	Carl-Roth-GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Perfusion (Kryokonservierung)
BrdU	5-Bromo-2- desoxyuridin ≥ 99 %	Lot: HMBF6912V, CAS: 59-14-3 , EC-Nr.:200-415-9	SIGMA Life Science ALDRICH, St. Louis, USA	Perfusion (Anfärbung mitotischer Zellen)

Natriumkakodylat	Sodium cacodylate trihydrate, 0.1 mol (pH=7,4)	Lot: 130182, CAS: 6131-99-3, EC.Nr.: 204-708-2	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	Perfusion (Fixation), Zuzchnitt (Pufferlösung)
Dextran FP40	Dextran FP40	Lot: 161077, CAS: 9009-54-0, EC.Nr.: 232-677-5	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	Perfusion (Spülung und Fixation)
Paraformaldehyd	Paraformaldehyd	Art.Nr.: 0335.3, Ch.B.: 31898748	Carl-Roth-GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Perfusion (Fixation und Nachfixation)
EMPROVE® ESSENTIAL BP, USP	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Ch.B.: A998546 844	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Perfusion (Fixation und Nachfixation), Zuzchnitt (Pufferlösung)
EMPROVE® EXPERT Ph Eur, BP, USP	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Lot: K43237480 230	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Perfusion (Fixation und Nachfixation) Zuzchnitt (Pufferlösung)
Glutaraldehyd- lösung 25 %	Glutaraldehydlösung 25 %	Art.Nr.: 4157.1, Ch.B.: 365233969	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Perfusion (Fixation und Nachfixation), Zuzchnitt (Probenkonservierung)
Formaldehyd- lösung 4.5 %	Formaldehyd 4.5 %	Art.Nr.: 4157.1, Ch.B.: 365233969	Universitätsapotheke Greifswald, Greifswald, Deutschland	Perfusion (Probenkonservierung), Zuzchnitt (Probenkonservierung)
Paraformaldehyd	Paraformaldehyd	Art.Nr.: 4157.1, Ch.B.: 365233969	Universitätsapotheke Greifswald, Greifswald, Deutschland	Perfusion (Fixation und Nachfixation)

Procainhydrochlorid	Procainhydrochlorid	Ch.B.: 60998467, Art.Nr.: 2553	Caesar und Loretz GmbH, Hilden, Deutschland	Perfusion (Spüllösung)
Ringer B. Braun-Spüllösung	Natriumchlorid (8,60g/1000ml), Kaliumchlorid (0.30g/1000ml), Kalziumchlorid 2H2O (0.33g/1000ml)	Lot: 164758001	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland	Perfusion (Spüllösung)
Stickstoff	Stickstoff	Nr.: 9927, DEA90J167	Universitätsmedizin Greifswald, Greifswald, Deutschland	Perfusion (Kryokonservierung)
Osmiumtetroxid ≥ 99,95 %	OsO4	Ch.B.: 276245913, Art.Nr.: 8371.3	Carl-Roth-GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Perfusion (Aufbereitung für Elektronenmikroskopie)
Sudan (IV-)-Farbstofflösung	Sudanrot	Ch.B.: 1011	Dr. K. Hollborn und Söhne, Leipzig, Deutschland	Zuschnitt (Anfärbung von makroskopischen Leberherden)
Backpulver „Original Backin“	E 450 Diphosphate, Natriumcarbonat E500, Stärke	—	Dr. August Oetker Nahrungsmittel KG, Bielefeld, Deutschland	Transplantation (Tx-System)
Sekundenkleber „UHU Minis“, flüssig, Einkomponenten- Reaktionsklebstoff	Cyanacrylsäureethylester	—	UHU GmbH und Co.KG, Bühl, Deutschland	Transplantation (Tx-System)

EPON-Härter MNA	Methylnadicanhydrid	CAS: 25134-21-8	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	Bestandteil des Epoxidharzes
EPON-Härter DDSA	2-Dodecenybernstein- säureanhydrid	CAS: 26544-38-7	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	Bestandteil des Epoxidharzes
Glycidether 100	1,2,3-Propantriol- glycidylether	CAS: 90529-77-4	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	Bestandteil des Epoxidharzes
EPON-Beschleuniger	2,4,6-Tris(dimethyl- aminomethyl)phenol	CAS: 90-72-2	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	Bestandteil des Epoxidharzes
Paraplast PLUS	Paraffin	Artikelnummer: X881	Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland	Einbettung der Gewebe

Tabelle 14: Chemikalien

## A.4 Konservierung der Mausorgane

Formaldehyd-Lösung 4.5%	Nachfixationslösung	OsO <sub>4</sub> (>99,95%)	-80 °C
Herz	Leber	Leber	Leber
Lunge	rechte Niere	Niere	Niere
Pankreas	Darm	Pankreas	Pankreas
Milz			Harnblase
Hoden			
Muskel (Musculus iliopsoas)			
Mesenterium			
Niere			

Tabelle 15: Lösungen zur Konservierung der Mausorgane

## A.5 Materialien zur Konservierung der Mausorgane

### A.5.1 Spüllösung

Chemikalie	Hersteller	1 Liter	2 Liter	5 Liter
Dextran (FP40)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg (Deutschland)	40 g	80 g	200 g
Procainhydrochlorid	Caesar und Loretz GmbH, Hilden (Deutschland)	5 g	10 g	25 g

Tabelle 16: Zusammensetzung der Spüllösung

- mit Ringer-Lösung ( ) auf entsprechende Endvolumen (1,2 oder 5 l) auffüllen
- Lagerung bei -20 °C
- vor Gebrauch filtrieren und pH auf 7,4 einstellen

### A.5.2 Fixationslösung

Chemikalie	Hersteller	1 Liter	2 Liter	5 Liter
Dextran (FP40)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg (Deutschland)	40 g	80 g	200 g
Paraformaldehyd	Caesar und Loretz GmbH, Hilden (Deutschland)	30 g	60 g	150 g
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)	2,65 g	5,3 g	13,25 g
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)	13,9 g	27,8 g	69,5 g

Tabelle 17: Zusammensetzung der Fixationslösung

- mit aqua dest. () auf 3/4 des Endvolumens (1,2 oder 5 l) auffüllen
- unter Rühren auf 70 °C erhitzen, bis die Lösung klar wird
- nach dem Abkühlen aufs Endvolumen mit aqua dest. auffüllen
- Lagerung bei -20 °C
- vor Gebrauch 10 ml Glutaraldehyd (25 %, Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland) pro 500 ml Lösung hinzugeben
- Filtrieren und pH auf 7,4 einstellen

### A.5.3 Nachfixationslösung

Chemikalie	Hersteller	1 Liter	2 Liter	5 Liter
Paraformaldehyd	Caesar und Loretz GmbH, Hilden (Deutschland)	30 g	60 g	150 g
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)	2,65 g	5,3 g	13,25 g
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)	13,9 g	27,8 g	69,5 g

Tabelle 18: Zusammensetzung der Nachfixationslösung

- mit aqua dest. auf 3/4 des Endvolumens (1,2 oder 5l) auffüllen
- unter Rühren auf 70 °C erhitzen, bis die Lösung klar wird
- nach dem Abkühlen aufs Endvolumen mit aqua dest. auffüllen
- Lagerung bei -20 °C
- vor Gebrauch 10 ml Glutaraldehyd (25 %, Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland) pro 500 ml Lösung hinzugeben
- Filtrieren und pH auf 7,4 einstellen

### A.5.4 Natrium-Phosphatpuffer 0.1 mol

Gesamtvolumen	Lösung 1	Lösung 2
500 ml	116 ml	384 ml
1000 ml	232 ml	768 ml

Tabelle 19: Zusammensetzung des Natrium-Phosphatpuffers 0.1 mol

- Lösung 1= 13,8 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland) in 1,0l aqua dest.
- Lösung 2= 17,89 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland) in 1,0l aqua dest.
- vor Gebrauch pH auf 7,4 einstellen
- Einsatz: Spülung und Lagerung in Glutaraldehyd für 24h

**A.5.5 Natrium-Phosphatpuffer 0.2 mol**

Gesamtvolumen	Lösung 1	Lösung 2
500 ml	95 ml	405 ml
1000 ml	190 ml	810 ml

Tabelle 20: Zusammensetzung des Natrium-Phosphatpuffers 0.2 mol

- Lösung 1= 27,6 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland) in 1,0 l aqua dest.
- Lösung 2= 35,6 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland) in 1,0 l aqua dest.
- vor Gebrauch pH auf 7,4 einstellen
- Einsatz: Lagerung in OsO<sub>4</sub> (≥ 99,95 %; Carl-Roth-GmbH und Co. KG, Karlsruhe/Deutschland) für 2h nach Lagerung über Nacht

**A.5.6 Aufbewahrungspuffer 0.1 mol**

Gesamtvolumen	Lösung 1	Lösung 2	Saccharose
50 ml	11,6 ml	38,4 ml	3,42 g

Tabelle 21: Zusammensetzung des Aufbewahrungspuffers 0.1 mol

- Lösung 1= 13,8 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland) in 1,0 l aqua dest.
- Lösung 2= 17,89 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland) in 1,0 l aqua dest.
- vor Gebrauch pH auf 7,4 einstellen
- Einsatz: für Zupfer

**A.5.7 Cacodylatpuffer 0.1 mol**

Gesamtvolumen	Lösung A	Lösung B	aqua dest.
100 ml	50 ml	5,6 ml	44,4 ml

Tabelle 22: Zusammensetzung des Cacodylatpuffers 0.1 mol

- Lösung A= 0,856 g Natriumkakodylat (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg/Deutschland) in 100 ml aqua dest.

- Lösung B= 1,66 ml konz.HCl (37 %; Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland) in 100 ml aqua dest.
- vor Gebrauch pH auf 7,4 einstellen
- Einsatz: Spülung nach Lagerung für 2h in Natriumphosphatpuffer (0.2 mol)

### A.5.8 Cacodylatpuffer 0.2 mol

Gesamtvolumen	Lösung A	Lösung B	aqua dest.
100 ml	50 ml	5,6 ml	44,4 ml

Tabelle 23: Zusammensetzung des Cacodylatpuffers 0.2 mol

- Lösung A= 1,712 g Natriumkakodylat (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg/ Deutschland) in 100 ml aqua dest.
- Lösung B= 3,32 ml konz.HCl (37 %; Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland) in 100 ml aqua dest.
- vor Gebrauch pH auf 7,4 einstellen
- Einsatz: Umlagerung von in OsO<sub>4</sub> gelagerten Proben (2h nach Perfusion)

## A.6 Anfertigung histologischer Präparate

### A.6.1 Protokoll zur Durchführung der PAS-Reaktion

- Allgemeines
  - normale Objektträger verwenden
  - mehrere Schnittdicken wählen
  - über Nacht bei 37 °C lagern
- Ablauf
  - Perjodsäure 1 %; 10 min.
  - Spülung mit aqua dest., 2 bis 3x
  - aqua dest., 3 min.
  - Schiff'sches Reagenz; 30 min. im Wasserbad (37 °C)
  - Schwefelwasser auf Schüttler; 9 min.
    - \* Schwefelwasser: 450ml H<sub>2</sub>O, 15 ml HCl (1N), 15ml Kaliummetabisulfid
  - Spülung mit Leitungswasser (fließend); 10 min.

- Kernfärbung mit Hämalaun, 2min.
- aufsteigende Alkoholreihe
- Xylol
- mit Roti-Histokitt eindecken

#### A.6.2 Protokoll zur Durchführung der BrdU-Reaktion mit vorheriger HE-Färbung

- Tag 1

- langsames Entparafinieren mit
  - \* Xylol; 5 min.
  - \* Alkohol, 3 min.
  - \* aqua dest., 5 min.
- Citratpuffer ansetzen
  - \* Zitronensäure (0,1M); 18 ml
  - \* Natriumcitrat (1M); 82 ml
  - \* aqua dest.; 1000 ml
  - \* mit Puffer pH auf 6,0 einstellen
    - Puffersubstanzen: Citronensäure-Monohydrat (Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland), tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland)
  - \* Citratpuffer im Schnellkochtopf zum Sieden bringen
  - \* OT im Ständer hinzufügen
  - \* Druckaufbau; 3 min. bei Stufe 8.5
  - \* Dampfablass (unter kaltem Wasser)
  - \* Decke öffnen und
    - Abkühlen lassen; 20 min.
    - aqua dest. auf Schüttler, 5 min.
    - Proteinase bacterial (0,075 g/100 ml; Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland) inkubieren; 10 min. im Wasserbad (37 °C)
    - aqua dest. auf Schüttler, 5 min.
    - Formamid 95 % (deionisiert, Carl-Roth-GmbH und Co. KG, Karlsruhe/Deutschland); 60 min. im Wasserbad (70 °C)
    - Trispuffer hinzugeben, für 1 l: 900 ml aqua dest., 100 ml Tris-Stammlösung (Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland), 200 µl Tween-20 (Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland)
    - Einbau der OT in Coverplate-Schienen

- mit Trispuffer spülen; 5 min.
  - Peroxidase-Block („Novocastra“; Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch/Deutschland); 3xTropfen/Schnitt, 30 min.
  - Spülung mit Trispuffer; 5min.
  - Schweinenormalserum (SNS) mit Trispuffer (Verhältnis 1:5); für 30 Proben= 800 µl SNS (Agilent Technologies, Santa Clara/USA), 3200 µl Trispuffer
  - BrdU-Antikörper (Verhältnis 1:50) hinzugeben; für 30 Proben= 3920 µl Antibody Diluent (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim/Deutschland), 80 µl BrdU-Ak (Monoclonal Mouse Anti-Bromodeoxyuridine Clone Bu20a; Agilent Technologies, Santa Clara/USA)
- Tag 2
    - Spülung mit Trispuffer; 5min.
    - biotinylated LINK (Agilent Technologies, Santa Clara/USA); 30min.
    - Spülung mit Trispuffer; 5min.
    - Streptavidin-POD-Komplex, 30min.
    - Spülung mit Trispuffer; 5min.
    - DAB (inkl. Substratpuffer und Chromogen; Agilent Technologies, Santa Clara/USA); 15min.
    - Spülung mit aqua dest.; 5min.
    - Hämatoxylin, 1 min.
    - Bläuen unter Leitungswasser; 5 min.
    - Eosin; 7 min.
    - Xylol
    - Eindecken mit Rosti-Histokitt

# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift



# Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Frank Dombrowski und Frau Prof. Dr. Silvia Ribback für die Überlassung des Themas und Betreuung während der Durchführung der Experimente und des Verfassens der Arbeit bedanken.

Außerdem danke ich Frau Ines Zimak für die Pflege der Tiere und Frau Stefanie Bockhahn und den weiteren medizinisch technischen Assistent\*innen des pathologischen Instituts für die Anfertigung der histologischen Präparate.

Des weiteren möchte ich mich herzlich bei dem Institut für Bioinformatik unter der Leitung von Prof. Dr. Lars Kaderali für die Beratung bei der statistischen Auswertung meiner Daten bedanken.

Zuletzt bedanke ich mich bei dem stellvertretenden Leiter des Institute For Applied Computer Science der Hochschule Stralsund Herrn Prof. Dr. Hans-Heino Ehrlicke für die Hilfe bei der Entwicklung des Auswertverfahrens der Glykogenspeicherung.