

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

**Einfluss einer Insulintherapie bei diabetischen C57BL/6J-Wildtyp- und Carbohydrate
responsive element binding protein-Knockout-Mäusen im Rahmen des murinen
Pankreasinseltransplantationsmodells.**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2022

vorgelegt von:
Kristin Peters
geb. am: 09.05.1985
in: Neubrandenburg

Dekan:	Prof. Dr. med. Karlhans Endlich
1. Gutachter:	Prof. Dr. med. Silvia Ribback
2. Gutachter:	PD Dr. med. Carolin Mogler
Ort, Raum:	Loefflerstr. 23 e in Greifswald, Hörsaal Pathologie
Tag der Disputation:	31.03.2023

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

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	8
Abkürzungen und Symbole	8
Einheiten	10
1. Einleitung.....	11
1.1. Das hepatozelluläre Karzinom.....	11
1.2. Hormonell-induziertes Hepatokarzinogenese-Modell der diabetischen Ratte	11
1.3. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP).....	13
1.4. Pankreasinseltransplantationsmodell der diabetischen Maus	16
1.5. Zielsetzung dieser Arbeit.....	17
2. Material und Methoden	20
2.1. Versuchstiere und Haltung	20
2.2. Versuchsgruppen und Versuchsaufbau	20
2.2.1. Telexperiment 1: präoperative subkutane Insulintherapie	21
2.2.2. Telexperiment 2: Insulinsticktherapie	22
2.3. Diabetesinduktion.....	23
2.4. Insulintherapie	24
2.4.1. Telexperiment 1: präoperative subkutane Insulintherapie:	24
2.4.2. Telexperiment 2: Insulinsticktherapie:	25
2.5. Telexperiment 1: Pankreasinseltransplantation	26
2.5.1. Anästhesie und Analgesie.....	26
2.5.2. Pankreasgewebsentnahme.....	27
2.5.3. Verdau des Pankreasgewebes	28
2.5.4. Pankreasinselisolation	29
2.5.5. Pankreasinseltransplantation	31

2.6. Blutzucker- und Gewichtsbestimmung	34
2.7. Tötung in Narkose	35
2.7.1. Bromdesoxyuridin (BrdU)-Gabe	35
2.7.2. Perfusionsfixation	35
2.7.3. Exenteration und Gewebefixation	37
2.8. Zuschnitt.....	38
2.9. Histologische Auswertung	38
2.9.1. Bestimmung der Proliferationsaktivität (BrdU-Labeling-Index).....	39
2.10. Statistische Auswertung	39
2.10.1. Datenerhebung und verwendete Tests	39
2.10.2. Diabetesinduktion.....	40
2.10.3. Insulintherapie.....	41
2.10.4. Telexperiment 1: Pankreasinseltransplantation.....	41
2.10.5. 24h-Proliferationsaktivität.....	42
2.11. Materialien, Geräte und Chemikalien	42
3. Ergebnisse.....	43
3.1. Blutzucker und Gewicht nach Diabetesinduktion.....	43
3.1.1. Blutzucker	43
3.1.2. Gewicht	44
3.2. Insulintherapie	45
3.2.1. Telexperiment 1: Präoperative subkutane Insulintherapie.....	45
3.2.2. Telexperiment 2: Insulinsticktherapie	49
3.2.3. Vergleich subkutane Insulintherapie mit Insulinstick-Therapie:.....	54
3.3. Telexperiment 1: Pankreasinseltransplantation (TX)	58
3.3.1. Blutzuckerverlauf.....	58

3.3.2. Gewichtsverlauf.....	61
3.4. Histologie.....	63
3.4.1. Telexperiment 1: Subkutane Insulintherapie	63
3.4.2. Telexperiment 2: Insulinsticktherapie	69
3.5. 24h-Proliferationsaktivität (BrdU-Labeling-Index).....	71
3.5.1. Telexperiment 1: Subkutane Insulintherapie	71
3.5.2. Telexperiment 2: Insulinsticktherapie	74
3.6. Telexperiment 1: Häufigkeit der CCF nach Pankreasinseltransplantation mit präoperativer Insulintherapie.....	77
4. Diskussion	78
4.1. Insulintherapie.....	78
4.1.1. Telexperiment1: Subkutane Insulintherapie	78
4.1.2. Telexperiment 2: Insulinsticktherapie	80
4.1.3. Vergleich der Insulintherapie-Methoden.....	82
4.2. Vergleich der Genotypen.....	82
4.2.1. Höherer Blutzuckerspiegel diabetischer ChREBP-KO-Mäuse im Vergleich zu diabetischen WT-Mäusen.....	82
4.2.2. Niedrigeres Körpergewicht diabetischer ChREBP-KO-Mäuse im Vergleich zu diabetischen WT-Mäusen.....	85
4.3. Pankreasinseltransplantation	87
4.3.1. Transplantatabstoßung	88
4.4. Telexperiment 1: Morphologische Veränderungen der WT- und ChREBP-KO-Mäuse im Rahmen der 5-tägigen subkutanen Insulintherapie	89
4.4.1. Induzierte Herde (CCF) nach Pankreasinseltransplantation bei diabetischen WT-Mäusen	89
4.4.2. Spontanherde bei diabetischen ChREBP-KO-Mäusen	90
4.5. Telexperiment 1: Häufigkeit der klarzelligen Leberherde (CCF).....	94

5. Zusammenfassung	96
7. Literaturverzeichnis.....	98
I. Anhang.....	107
A. Versuchstiere und Haltung	107
B. Materialien	107
C. Geräte	110
D. Chemikalien.....	111
E. Ergänzende Tabellen	115

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen und Symbole

&	und (latein: <i>et</i>)
α	Irrtumswahrscheinlichkeit
Abs.	Absatz
ACC1	zytosolische Acetyl-CoA-Carboxylase
ACL	ATP-Citrat-Lyase
AG	Aktiengesellschaft
Akt	Proteinkinase B
BrdU	Bromdesoxyuridin
BZ	Blutzucker
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCF	glykogenspeichernde Foci (englisch: clear cell foci)
ChoRE	carbohydrate responsive element (englisch)
ChREBP	Carbohydrate responsive element binding protein (englisch)
ChREBP-KO	ChREBP-Knockout
c-Met	mesenchymal epithelial transition factor (englisch)
Co.	Compagnie
DAB	Diaminobenzidin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ERK	extracellular-signal regulated kinases (englisch)
<i>et al.</i>	und andere (lateinisch: <i>et alii (m)</i>)
FAH	Herde veränderter Hepatozyten (englisch: foci of altered hepatocytes)
FAS	Fettsäuresynthase
G-6-P	Glukose-6-Phosphat
G-6-Pase	Glukose-6-Phosphatase
G-6-PDH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GK	Glucokinase
GLUT 2	nicht insulinabhängiger Glukosetransporter
GLUT 4	insulinabhängiger Glukosetransporter

GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HCA	Hepatozelluläres Adenom (englisch: hepatocellular adenoma)
HCC	Hepatozelluläres Karzinom (englisch: hepatocellular carcinoma)
HE	Hämatoxylin-Eosin
IBMIR	sofortige blutvermittelte Entzündungsreaktion (englisch: instant blood mediated inflammatory reaction)
KG	Körpergewicht
KG	Kommanditgesellschaft (bei Firmenangabe)
LPK	leberspezifische Pyruvatkinase
LPL	Lipoproteinlipase
LSAB	Labelled Streptavidin Biotin
MAPK	mitogen-activated protein kinase (englisch)
mTOR	mammalian target of rapamycin (englisch)
N	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NAFLD	Nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (englisch: non-alcoholic fatty liver disease)
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NOD	Non-obese Diabetic Mouse (englisch)
NPH	Neutrales-Protamin-Hagedorn
n.s.	nicht signifikant
p	Signifikanz
p.a.	analysenrein (englisch: pro analysi)
PAS	Periodsäure-Schiff
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
pH	Potential des Wasserstoffs (latein: <i>pondus hydrogenii</i>)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
Ras	rat sarcoma (englisch)
raf-1	rapidly accelerated fibrosarcoma oder rat fibrosarcoma (englisch)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (englisch: standard error of the mean)
SO ₂	Schwefeldioxid
sog.	sogenannt
SREBP-1c	sterol regulatory element-binding protein-1c (englisch)
TGF-β 1	transforming growth factor-beta 1 (englisch)

TX	Pankreasinseltransplantation
u. a.	unter anderem
vs.	versus
WT	Wildtyp-Mäuse (Stamm: C57BL/6J)
ZnCl ₂	Zinkchlorid
z.T.	zum Teil

Einheiten

%	Prozent
°C	Grad Celsius
cm ²	Quadratcentimeter
g	Gramm
h	Stunden
IU	Internationale Einheit (englisch: international unit)
kg	Kilogramm
L	Liter
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ³	Kubikmillimeter
mmol	Millimolar
mol	Molar
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
rpm	Umdrehungen pro Minute (englisch: revolutions per minute)

1. Einleitung

1.1. Das hepatozelluläre Karzinom

Weltweit steht Leberkrebs an sechster Stelle der häufigsten neu diagnostizierten Krebserkrankungen und ist die vierthäufigste Todesursache der Tumorerkrankungen [1]. Die Inzidenz nimmt jährlich zu und die Prognose ist sehr ungünstig [2-4].

Der häufigste primäre Lebertumor ist das hepatozelluläre Karzinom (HCC) [1, 5]. Zu den häufigsten Risikofaktoren zählen chronische Infektionen mit dem Hepatitis-B-Virus und/oder dem Hepatitis-C-Virus, aflatoxinhaltige Lebensmittel, Alkoholabhängigkeit und erhöhter Nikotinkonsum [6, 7]. Zu den seltenen Ursachen zählen Hämochromatose, Alpha-1-Antitrypsinmangel, Glykogenspeicherkrankheiten, Porphyrinen, Tyrosinämie und Morbus Wilson [7]. Es kann sich sowohl mit als auch ohne Leberzirrhose ein HCC entwickeln [8].

Zusätzlich besteht auch beim metabolischen Syndrom, mit dazugehöriger Insulinresistenz, Adipositas, Dyslipidämie und arterieller Hypertonie, ein erhöhtes Risiko besonders in einer nicht-zirrhosisch veränderten Leber und im Rahmen einer nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung [6-11]. Aufgrund der stetig ansteigenden Inzidenz des metabolischen Syndroms mit weltweiter Ausbreitung [12], wird dieser Risikofaktor immer mehr an Bedeutung zunehmen [8].

Im Rahmen der Leberzirrhose sind dysplastische Knoten als Vorstufen des HCCs gut charakterisiert und anerkannt [13]. Tumorvorläuferläsionen in einer nicht-zirrhosisch veränderten Leber sind bis heute kaum beschrieben und nicht gut verstanden.

1.2. Hormonell-induziertes Hepatokarzinogenese-Modell der diabetischen Ratte

Insulinresistenz, Diabetes mellitus Typ 2 und Hyperinsulinämie stehen im engen Zusammenhang zueinander und beeinflussen sich gegenseitig [14-16].

Insulin hat in der Leber einen entscheidenden Einfluss auf viele Stoffwechselwege, u. a. den Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel, aber auch auf das Zellwachstum [17, 18].

Um die Rolle von Insulin in der Hepatokarzinogenese zu untersuchen, konnte von Dombrowski *et al.* erfolgreich ein hormonell-induziertes Hepatokarzinogenese-Modell der Ratte entwickelt und ausführlich untersucht werden [19-22]. Durch die Transplantation einer geringen Anzahl von Pankreasinseln von Spender-Ratten in die Pfortader von diabetischen Empfänger-Ratten entstand im Abstromgebiet der transplantierten Inseln in der Leber ein lokaler Hyperinsulinismus [19-21]. Durch die geringe Anzahl von Pankreasinseln blieb eine systemische Hyperglykämie erhalten, sodass die transplantierten Inseln stimuliert wurden, Insulin auszuschütten [19]. Die der Hyperinsulinämie ausgesetzten Hepatozyten zeigten morphologische Veränderungen in Form einer vermehrten Glykogen- und Fetteinlagerung mit gleichzeitig erhöhtem Zellumsatz [19-22]. Auch konnte in Langzeitversuchen die Entstehung hepatozellulärer Adenome (HCA) und HCCs beobachtet werden [19-21].

Diese Glykogenspeicherherde wiesen metabolische Veränderungen auf, wie eine Hochregulierung der Glykolyse, des Pentosephosphatweges und der Lipogenese sowie eine Herunterregulation der Glukoneogenese [19-21]. Diese Stoffwechselumstellung wird als aerobe Glykolyse oder Warburg-Effekt bezeichnet und ist typisch für Krebszellen, bei denen ein Großteil der Glukose unabhängig vom Sauerstoffangebot in Laktat umgewandelt wird [23-26].

Zusätzlich konnte auf molekularer Ebene eine zytoplasmatische Translokation und Hochregulierung des Insulinrezeptors, die Induktion des Insulinrezeptorsubstrates 1 sowie auch die Aktivierung des protoonkogenen rat sarcoma (Ras)/mitogen-activated protein kinase (MAPK)- und Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR)-Signalweges nachgewiesen werden [27-29].

Diese beschriebenen Eigenschaften zeigen Parallelen zum humanen HCC auf und sind mit einer schlechten Prognose assoziiert [30, 31].

Zudem konnten in der zirrhotischen Leber des Menschen sehr frühe präneoplastische Läsionen beschrieben werden, die sogenannten foci of altered hepatocytes (FAH), die in glykogenspeichernde Foci (sogenannte clear cell foci, CCF), gemischte Zellfoci und basophile Zellfoci unterteilt werden [32, 33]. Die glykogenspeichernden Foci sind darunter am häufigsten [33].

Um die insulinvermittelte Hepatokarzinogenese an sehr frühen präneoplastischen Läsionen weiter zu untersuchen, wurde von unserer Arbeitsgruppe das Pankreasinseltransplantationsmodell der Ratte erfolgreich auf die Maus übertragen und gleichzeitig mit einem ChREBP- (Carbohydrate responsive element binding protein) Knockoutmodell kombiniert [34].

1.3. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP)

Neben den oben genannten metabolischen Veränderungen und der Aktivierung des protoonkogenen Signalweges Akt/mTOR innerhalb der CCF und HCCs beim Menschen und bei der Ratte bestand eine auffällige Hochregulierung des Transkriptionsfaktors Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) [27, 31, 35].

ChREBP ist ein Transkriptionsfaktor mit regulatorischen Einflüssen auf den Stoffwechsel [36-40]. Er wird hauptsächlich in der Leber bei einer erhöhten Glukosekonzentration durch die Bildung von Glukose-6-Phosphat (G-6-P), unabhängig von Insulin, aktiviert [41]. Durch die Aktivierung kommt es zu einer Kerntranslokation mit anschließender Bindung an das carbohydrate responsive element (ChoRE) in den Promotorregionen glykolytischer Gene (z.B. der Glukokinase und der leberspezifischen Pyruvatkinase), lipogener Gene (z.B. der Acetyl-CoA-Carboxylase, der Fettsäure-Synthase und der Stearoyl-CoA-Desaturase) sowie an Genen für den Pentosephosphatweg (z.B. Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase) mit anschließender Hochregulierung der Glykolyse, Lipogenese und des Pentosephosphatweges [36, 37, 39, 40, 42].

Ein weiterer zu erwähnender Transkriptionsfaktor in der Leber ist das sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c), welches insulinabhängig in der Regulation des Glukose- und Lipidstoffwechsel beteiligt ist und synergistisch zu ChREBP wirkt [39, 40, 42-44].

Das Zusammenspiel dieser beiden Transkriptionsfaktoren führt bei erhöhter Glukose- und Insulinkonzentration zu einer gesteigerten Glykolyse und *De-novo*-Lipogenese sowie zu einer Hochregulierung des Pentosephosphatweges [39, 42-44], woraufhin

sich, aufgrund der vermehrten Bildung von Triglyceriden, in der Leber eine Steatosis hepatis entwickeln kann [39, 40, 45-47]. Somit ist anzunehmen das ChREBP im Rahmen der Steatosis hepatis, als Merkmal der Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD), auch Verbindungen zum metabolischen Syndrom aufweist [36, 39, 40, 45, 48-52]. Passend dazu zeigten Dentin *et al.*, dass eine leberspezifische Hemmung von ChREBP bei fettleibigen Mäusen sowohl eine Steatosis hepatis als auch die Insulinempfindlichkeit in der Leber und auch in der Skelettmuskulatur sowie im Fettgewebe verbesserte [45, 48].

Im Rahmen dieser stoffwechselregulatorischen Eigenschaften und auch darüber hinaus sind für den Transkriptionsfaktor ChREBP onkogene Eigenschaften beschrieben [42, 53].

Zum einen ist bekannt, dass für viele Tumorzellen zur Energiegewinnung eine vermehrte *De-novo*-Lipogenese als auch, trotz ausreichenden Sauerstoffgehalts, die Umstellung des Stoffwechsels auf Glykolyse charakteristisch ist, also die aerobe Glykolyse (sog. Warburg-Effekt) [23-26]. So konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung von ChREBP die aerobe Glykolyse verringerte, was darauf hindeutet das ChREBP in dem Wechsel zur aeroben Glykolyse eine entscheidende Rolle spielt [42, 53].

Zum anderen führte die Hemmung von ChREBP zu einer Aktivierung des Tumorsuppressor-Gens p53 und somit zu einem Zellzyklusstillstand [42, 53]. Das deutet daraufhin, dass p53 durch ChREBP gehemmt wird, was ein Tumorwachstum begünstigen kann [42, 53]. Zusätzlich unterdrückt p53, durch die Hemmung von Glukosetransportern und glykolytischen Enzymen, wiederum den Warburg-Effekt [53, 54].

Onkogene Eigenschaften von ChREBP wurden unter anderem auch in humanen kolorektalen Tumorzellen beschrieben, welche durch das Fehlen von ChREBP eine verminderte Glykolyse, einen erhöhten Sauerstoffverbrauch, eine geringere Proliferation und ein niedrigeres tumorigenes Potenzial aufzeigten [53]. In Prostatakarzinomzellen konnte zudem eine direkte Interaktion von ChREBP mit dem Androgenrezeptor nachgewiesen werden und mit förderndem Einfluss auf dessen Transkriptionsaktivität sowie auf das Wachstum von Prostatakarzinomzellen [55].

Im Gegensatz dazu zeigten Jiang et al., dass während der durch Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) induzierten epithelial-mesenchymalen-Transition, als ein Merkmal der Metastasierung, in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom-Zellen sowohl ChREBP als auch SREBP herunterreguliert werden [56]. Auch wurde beschrieben, dass ChREBP in Leukämie-initiiierenden Zellen eher als Tumorsuppressor wirkt, da dieser deren Differenzierung begünstigt und somit der Entwicklung einer akuten myeloischen Leukämie entgegenwirkt [57].

Es ist somit anzunehmen, dass die Rolle von ChREBP in der Tumorgenese vielschichtig und womöglich auch unter anderem gewebeabhängig ist.

Bezüglich der insulinvermittelten Hepatokarzinogenese konnte gezeigt werden, dass der Akt/mTOR-Signalweg und auch der RAS/MAPK-Signalweg entscheidende Rollen spielen [27-29, 35]. In-vitro und in-vivo Experimente in der Maus bestätigten eine zentrale Funktion von ChREBP bei der durch die Proto-Onkogene Akt und c-Met (mesenchymal epithelial transition factor) induzierten Hepatokarzinogenese, da eine Deletion von ChREBP die Entstehung von Akt/c-Met-abhängigen Tumoren vollständig verhinderte [38]. Selektiv Akt-abhängige Tumoren konnten jedoch lediglich reduziert, nicht aber vollständig verhindert werden [38]. Wohingegen eine Deletion der Fettsäuresynthase (FAS) weder in Akt-überexprimierenden noch in Akt/c-Met-überexprimierenden Mäusen jegliche präneoplastischen und auch neoplastischen Veränderungen aufwies [58, 59]. Zusätzlich zeigte sich, dass eine ChREBP-Deletion keine Auswirkung auf die Tumorentstehung bei einer Überexpression von Akt und mutierten Ras aufzeigte [38]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Transkriptionsfaktor ChREBP den onkogenen Akt/mTOR-Signalweg beeinflusst, wohingegen der onkogene Ras/MAPK-Signalweg in der Leber unabhängig von ChREBP funktioniert [38].

Somit scheint der Transkriptionsfaktor ChREBP in der Leber sowohl onkogene Eigenschaften zu haben als auch stoffwechselregulatorische Funktionen, die die Tumorentstehung begünstigen, wobei die genauen Mechanismen noch nicht ausreichend verstanden sind. Um die hormonell induzierte Hepatokarzinogenese weiter zu charakterisieren und den metabolischen Einfluss des Transkriptionsfaktor

ChREBP in Bezug auf eine onkogene Funktion zu erforschen, verwendete unsere Arbeitsgruppe ein ChREBP-Knockoutmodell (ChREBP-KO).

1.4. Pankreasinseltransplantationsmodell der diabetischen Maus

Das Pankreasinseltransplantationsmodell der diabetischen Ratte konnte von unserer Arbeitsgruppe erfolgreich auf die Maus übertragen und gleichzeitig mit einem ChREBP-Knockoutmodell kombiniert werden [34].

Bei den diabetischen C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen (WT) entstanden im Rahmen der lokalen Hyperinsulinämie in der Leber hellzellige Herde (CCF) mit einer vermehrten Glykogen- und Fettspeicherung [34].

Sowohl die nachgewiesene ähnliche Morphologie, die erhöhte Zellproliferation, die veränderten metabolischen Stoffwechselwege mit hochregulierter Glykolyse und Lipogenese sowie die Aktivierung der protoonkogenen Signaltransduktionswege Ras/raf-1/MAPK und Akt/mTOR in den CCF von WT-Mäusen ist vergleichbar mit den Beobachtungen in den Hepatokarzinogenesemodellen der Ratte sowie auch in den menschlichen HCCs [27, 31, 34].

In den ChREBP-KO-Mäusen entstanden ebenfalls CCF. Diese wiesen jedoch keinerlei Lipidspeicherung und eine noch stärkere Glykogenspeicherung auf [34]. Die Hepatozyten in den CCF waren deutlich größer mit einer enormen Glykogenanreicherung, sodass die Zellorganellen an den Rand der Zelle gedrängt wurden [34]. Auch im extrafokalen Leberparenchym konnte eine vermehrte Glykogenspeicherung in den Hepatozyten festgestellt werden [34]. Die Proliferation in den CCF der ChREBP-KO-Mäuse war signifikant geringer als in den CCF der WT-Mäuse bei zusätzlicher reduzierter *De-novo*-Lipogenese und Glykolyse [34].

Jedoch entstanden in den transplantierten diabetischen WT-Mäusen im Vergleich zu den ChREBP-KO-Mäusen sowohl nach einer Woche als auch nach vier Wochen signifikant weniger Herde [34].

1.5. Zielsetzung dieser Arbeit

Für die geplanten Langzeitexperimente zur Untersuchung einer Progression der CCF zu HCCs waren ein Anwachsen und ein langanhaltendes Überleben möglichst vieler transplantierte Inseln notwendig. Die Inzidenz der CCF in den WT-Mäusen war jedoch sehr gering und nahm nach vier Wochen ab [34], sodass eine Modifikation des Pankreasinseltransplantationsmodells der diabetischen Maus notwendig war.

In der Literatur werden Faktoren wie eine verminderte Sauerstoffversorgung sowohl vor als auch nach der Transplantation [60], ein unzureichender Schutz gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies [61], Schäden durch eine Hypoxie [62, 63] sowie niedrige Sauerstoffpartialdrücke an den transplantierten Inseln [64] beschrieben, die für das erschwerte Anwachsen der transplantierten Pankreasinseln verantwortlich sind. Auch über eine sofortige blutvermittelte Entzündungsreaktion (instant blood mediated inflammatory reaction, IBMIR) durch Komplement- und Thrombozytenaktivierung wurde berichtet [65].

Piemonti *et al.* beschrieb vier Hauptursachen für das gestörte Anwachsen und den Funktionsverlust von transplantierten Pankreasinseln [66]. Dazu zählten die Induktion einer sofortigen Entzündungsreaktion mit Entstehung von Thrombosen als frühes Transplantatversagen, die verzögerte Vaskularisierung der transplantierten Inseln, die Exposition gegenüber hohen Konzentrationen von absorbierten und teils toxischen Substanzen aus dem Darm innerhalb der Pfortader und die sogenannte Glukolipotoxizität [66].

Thrombosen, Entzündungen oder avitale Transplantate konnten bereits in vorherigen Modifikationsexperimenten unserer Arbeitsgruppe ausgeschlossen werden [34], sodass sich meine Arbeit auf die **Verringerung der Glukolipotoxizität** konzentrierte.

Die Glukolipotoxizität beschreibt die chronische Hyperglykämie im Rahmen des Diabetes mellitus und die gleichzeitige starke Lipidspeicherung in den Hepatozyten [66].

Bei den vorherigen Experimenten wurden häufig sehr hohe Blutzuckerspiegel bei den diabetischen Mäusen gemessen, welche nicht Streptozotocin dosisabhängig und daher schwer regulierbar waren. Durch die Hyperglykämie werden die

transplantierten Pankreasinseln stimuliert, Insulin zu bilden und zu sezernieren [19, 34]. Aufgrund dieser hohen lokalen Insulinkonzentration im Abstromgebiet der Inseln werden die benachbarten Hepatozyten dazu angeregt, vermehrt Lipide in Form von Triacylglycerol zu speichern. Auch wenn dieser Effekt in unserem Modell sogar erwünscht ist, wird angenommen, dass sich dieses Milieu rückwirkend negativ auf die frisch transplantierten Inseln auswirkt, da mitunter freie Fettsäuren die β -Zellen schädigen und die Apoptose induzieren können [66].

Auch Merino *et al.* fanden heraus, dass insulinbehandelte, diabetische C57BL/6-Mäuse eine bessere Funktion der transplantierten Betazellen aufwiesen und sogar in der Lage waren, die Betazellmasse zu erhöhen [67].

Meine Hypothese ist, dass durch eine präoperative Insulintherapie die Glukolipotoxizität verringert wird und damit ein optimiertes Milieu für die frisch transplantierten Pankreasinseln geschaffen wird, sodass anschließend nach vier Wochen eine höhere Herdfrequenz nachgewiesen werden kann.

Durch die präoperative Insulintherapie sollen exzessiv hohe Blutzuckerspiegel bis zum Anwachsen der Transplantate vermieden werden, um damit dem Effekt der Glukolipotoxizität entgegenzuwirken. Um das zu erreichen, sollte zunächst eine subkutane Insulintherapie sowohl für die WT-Mäuse als auch für die ChREBP-KO-Mäuse etabliert werden, um dann anschließend den Effekt der präoperativen Insulintherapie auf transplantierte WT-Mäuse zu untersuchen. Die Inzidenz der induzierten CCF sollte bei den WT-Mäusen nach vier Wochen auf mindestens 50 % erhöht werden.

Im **ersten Teil der vorliegenden Arbeit** sollte die präoperative Insulintherapie mit einer zweimal täglichen subkutanen Insulingabe über 5 Tage sowohl bei den WT-Mäusen als auch bei den ChREBP-KO-Mäusen erfolgen. Bei den WT-Mäusen sollte dann anschließend eine Pankreasinseltransplantation durchgeführt werden.

Der **zweite Teil der vorliegenden Arbeit** beschäftigte sich mit der Therapie einer kontinuierlichen Insulingabe mittels Implantation von Insulinsticks aufgrund von Schwierigkeiten der Blutzuckereinstellung im Verlauf des ersten Teils der Experimente. Bei beiden Genotypen sollten die Austestung einer geeigneten Dosis

und Wirkdauer erfolgen sowie die Auswirkungen nach einer mehrmaligen Gabe untersucht werden. Hauptaugenmerk in diesem Teilabschnitt war die Handhabung, der Blutzuckerverlauf und die Beobachtung über einen längeren Zeitraum im Hinblick auf die geplanten Langzeitexperimente unserer Arbeitsgruppe von mindestens 6 Monaten.

In den vorherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe fielen bei den Versuchstieren diabetische Nebenwirkungen wie Polydipsie, Polyurie und Gewichtsverlust auf [34]. Um die Auswirkungen der hormonell induzierten Hepatokarzinogenese in Langzeitexperimenten charakterisieren zu können, sollten exzessiv hohe Blutzuckerspiegel und damit diese Langzeitfolgen des Diabetes bei den Versuchstieren minimiert werden. Eine Pankreasinseltransplantation erfolgte in diesem zweiten Telexperiment nicht.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere und Haltung

Die tierexperimentellen Untersuchungen in dieser Arbeit wurden durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes genehmigt (Aktenzeichen: AZ LALLF MV/TSD/7221.3-1.1- 022/14).

Für die Versuche wurden männliche C57BL/6J Wildtyp-Mäuse (WT-Mäuse) der Firma Charles River Laboratories sowie männliche ChREBP-Knockout-Mäuse (ChREBP-KO-Mäuse) der Firma The Jackson Laboratory verwendet. Anschließend erfolgte die Weiterzucht im Tierstall des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin Greifswald.

Die Versuchstiere wurden in Makrolon-Käfigen Typ 3 und Typ 2 mit einem Gitterdeckel mit Fallbügelverschluss, einem herausnehmbaren Trennblech und einer Tränkflasche der Firma Zoonlab GmbH untergebracht. Der Boden der Käfige wurde mit Tiereinstreu (Ssniff®) ausgelegt und mit einem Polycarbonat Maus-Häuschen (Zoonlab GmbH) ausgestattet. Die Versuchstiere hatten ständig freien Zugang zu frischem Wasser und pelletiertem Futter (Sniff®). In einem Käfig wurden 4 bis 5 Mäuse gehalten, bei einer konstanten Raumtemperatur von 22 °C bis 24 °C und einer gleichbleibenden Luftfeuchtigkeit von 40 % bis 60 %. In einem 12/12-Stunden Rhythmus erfolgte der Wechsel zwischen Licht und Dunkelheit. Zur Unterscheidung der Versuchstiere in einem Käfig wurden diese mit einer Lochzange (Zoonlab GmbH) an den Ohren markiert.

2.2. Versuchsgruppen und Versuchsaufbau

Diese Arbeit setzt sich aus zwei voneinander getrennten Experimenten zusammen.

Im **ersten Teil** erfolgte eine präoperative subkutane Insulintherapie mit nachfolgender Pankreasinseltransplantation mit dem Ziel die Inzidenz von CCF bei den WT-Mäusen zu erhöhen.

Der **zweite Teil** dieser Arbeit beinhaltet eine kontinuierliche Insulintherapie mittels Gabe von Insulinsticks (nachfolgend als Insulinsticktherapie bezeichnet) ohne darauffolgende Pankreasinseltransplantation mit dem Ziel exzessiv hohe Blutzuckerspiegel über einen längeren Zeitraum zu vermeiden.

Insgesamt wurden 122 männliche WT- und ChREBP-KO-Mäuse verwendet.

Alle Versuchstiere wurden im Alter von etwa sechs Wochen und einem durchschnittlichen Körpergewicht von 25 bis 30 g nach einer Diabetesinduktion in die nachfolgenden Gruppen eingeteilt (siehe **Tabelle 1** und **2**).

2.2.1. Teilexperiment 1: präoperative subkutane Insulintherapie

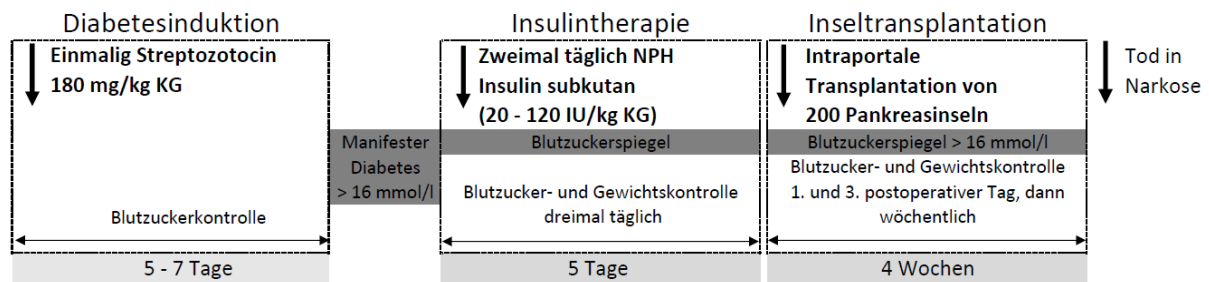
Gruppenbezeichnung	Anzahl	Stamm	Stoffwechsellage	Insulintherapie	Pankreasinseltransplantation	Tötung nach
1. Hauptgruppe	21	C57BL/6J	diabetisch	5 Tage	ja	4 Wochen nach Transplantation/ Ende Insulintherapie
2. Kontrollgruppe	17				nein	
3. Kontrollgruppe	10	ChREBP-KO				

Tabelle 1: Versuchsgruppen des ersten Teilexperiments mit präoperativer subkutaner Insulintherapie; ChREBP-KO Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) – Knockout.

Nach erfolgter Diabetesinduktion erhielten die Versuchstiere in diesem ersten Teilexperiment eine fünftägige Insulintherapie.

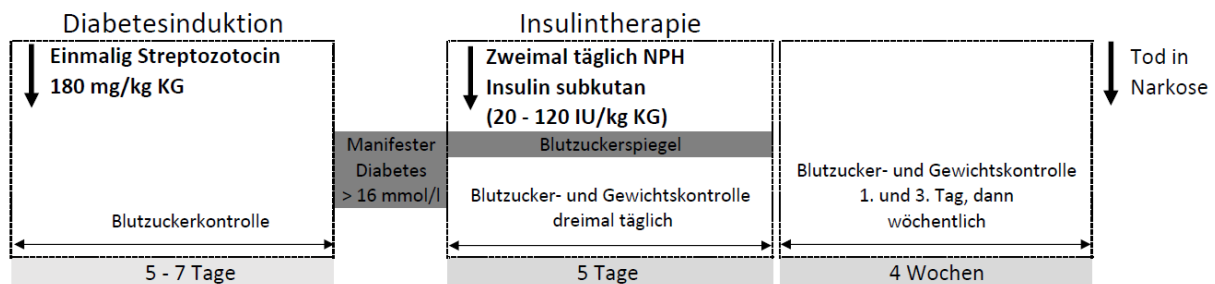
Nur die WT-Tiere erhielten nach der Insulintherapie eine Pankreasinseltransplantation, da bei den ChREBP-KO-Mäusen bereits bei den Vorversuchen ausreichend CCF in der Leber entstanden waren. Vier Wochen nach der Pankreasinseltransplantation bzw. nach Beendigung der Insulintherapie erfolgte die Tötung mittels Überdosierung des Narkosemittels bei allen Versuchstieren in diesem Teilexperiment. Die **Schemata 1** und **2** stellen eine Übersicht zu dem Versuchsaufbau dar.

1. Hauptgruppe (WT-Mäuse):



Schema 1: Versuchsablauf Hauptgruppe des ersten Teilerperiments; KG Körpergewicht, NPH neutrales-Protamin-Hagedorn, IU Internationale Einheit, WT Wildtyp.

2. und 3. Kontrollgruppen (WT- und ChREBP-KO-Mäuse):



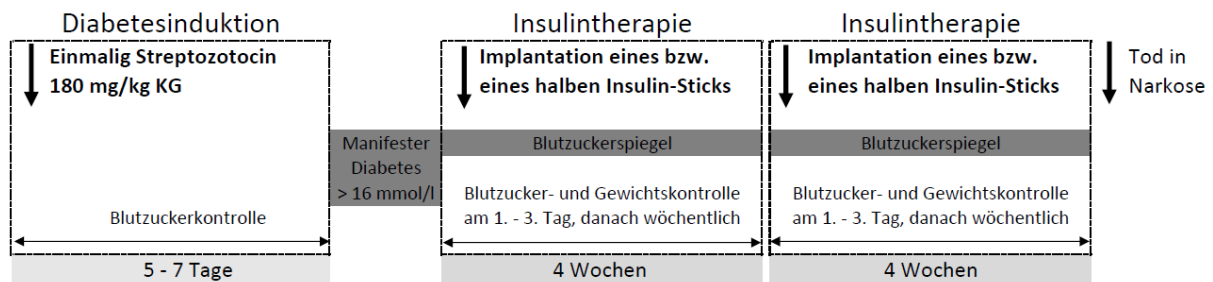
Schema 2: Versuchsablauf Kontrollgruppen des ersten Teilerperiments; KG Körpergewicht, NPH neutrales-Protamin-Hagedorn, IU Internationale Einheit, WT Wildtyp, ChREBP-KO Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) – Knockout.

2.2.2. Teilerperiment 2: Insulinsticktherapie

Gruppenbezeichnung	Anzahl	Stamm	Stoffwechsellage	Insulintherapie	Insulinstickgabe	Tötung nach
1. WT ½ Stick	7	C57BL/6J	diabetisch	zweimal jeweils für 4 Wochen	2 mal	Ende der Insulintherapie (nach 8 Wochen Therapie)
2. WT 1 Stick	7					
3. ChREBP-KO ½ Stick	7	ChREBP-KO				
4. ChREBP-KO 1 Stick	8					

Tabelle 2: Versuchsgruppen des zweiten Teilerperiments mit Insulinsticktherapie; WT Wildtyp, ChREBP-KO Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) – Knockout.

Nach erfolgter Diabetesinduktion erhielten die Versuchstiere in diesem zweiten Telexperiment eine Insulinstickimplantation und vier Wochen später erfolgte eine weitere Stickimplantation. Eine Pankreasinseltransplantation wurde in diesem Telexperiment bei keinem dieser Versuchstiere durchgeführt. Weitere vier Wochen später erfolgte die Tötung mittels Überdosierung des Narkosemittels. Das **Schema 3** gibt eine Übersicht zu diesem Versuchsaufbau.



Schema 3: Versuchsablauf der Insulinsticktherapie des zweiten Telexperiments mit Implantation eines ganzen oder eines halben Insulinsticks je nach Gruppenzuordnung; KG Körpergewicht.

2.3. Diabetesinduktion

Bei allen Versuchsgruppen beider Telexperimente erfolgte zunächst eine Diabetesinduktion mittels einmaliger intraperitonealer Injektion von 180 mg/kg Körpergewicht (KG) Streptozotocin (Sigma-Aldrich) [68]. Nach einer Woche wurde der Blutzucker (BZ) nach Punktion der Schwanzvene mittels 23 G Kanüle (BD Microlance 3™) und dem von uns verwendeten Blutzuckermessgerät sowie den zugehörigen Blutzuckermessstreifen (Accu-Chek®) kontrolliert. Ein Diabetes wurde definiert bei einem Blutzuckerspiegel von > 16 mmol/l.

Wenn sich nach einer Woche kein Diabetes entwickelte, erfolgte eine weitere Streptozotocin-Gabe und nach einer weiteren Woche die erneute Blutzuckerkontrolle. Stieg der BZ auch nach der zweiten Gabe nicht über 16 mmol/l an, wurden die Versuchstiere nicht in den Versuch aufgenommen.

2.4. Insulintherapie

2.4.1. Teilexperiment 1: präoperative subkutane Insulintherapie:

Nachdem sich bei den Versuchstieren ein Diabetes entwickelte, erfolgte über fünf Tage eine Insulintherapie mit neutralem-Protamin-Hagedorn (NPH)-Insulin (Protaphane®), zweimal täglich im 12h-Rhythmus, jeweils um 8 Uhr morgens und abends [69]. Das Insulin wurde mit einer 1 ml Spritze (BD® Plastipak™) und einer 26 G Kanüle (BD Microlance 3™) in den Rücken subkutan injiziert.

Zunächst wurden an einer kleinen Versuchsgruppe (N = 3) verschiedene Insulindosen sowohl bei den WT-Mäusen als auch bei den ChREBP-KO-Mäusen getestet. Für die verschiedenen Insulindosen musste das Insulin verdünnt werden. Hierzu wurde ein von Stammberger *et al.* [70] verwendetes Verdünnungsmedium (Zusammensetzung siehe **Anhang Tabelle 5**) mit einer Verdünnung mit 0,9 %igen Natriumchlorid (NaCl, Ecotainer®) verglichen.

Für die weiteren Experimente wurde dann anschließend 0,9 % NaCl als Verdünnungssubstanz verwendet.

Des Weiteren stellte sich heraus, dass jedes Versuchstier zum Erreichen einer Normoglykämie (5 bis 16 mmol/l) innerhalb eines begrenzten Zeitraums von 5 Tagen eine individuelle Insulindosis benötigte. Demnach wurde ein Dosisschema (siehe **Schema 4**) entwickelt, nach welchem die Insulinbehandlung in dem nachfolgenden Versuch angewandt wurde.

Bei einem BZ zwischen 16 und 30 mmol/l (sog. Startwert) vor der ersten Insulingabe wurde zunächst mit einer Anfangsdosis (sog. Startdosis) von 40 IU/kg KG begonnen. Bei Werten über 30 mmol/l als Startwert betrug die Anfangsdosis 60 IU/kg KG.

Die nachfolgenden Insulindosen wurden nach dem Blutzuckerwert nach ein bis sechs Stunden nach der Insulingabe (= Wert nach 1 – 6 h) und dem Blutzuckerwert nach 12 Stunden (= Wert nach 12 h) vor der nächsten Insulingabe entsprechend des Schemas (siehe **Schema 4**) angepasst. Die neue Dosis war zusätzlich von der vorherigen Dosis abhängig (= vorherige Dosis). War die letzte Dosis ≤ 40 IU/kg KG wurde die neue Dosis mit kleinen Einheiten (± 4 oder 8 IU/kg KG) entsprechend

angepasst. War die vorherige Dosis > 40 IU/kg KG erfolgte die Anpassung der neuen Dosis mit größeren Einheiten (± 8 bis 36 IU/kg KG) (siehe **Schema 4**).

Startwert BZ [mmol/l]	Startdosis IU/kg KG		
> 30	60		
16 - 30	40		

Wert nach 1 - 6 h BZ [mmol/l]	Wert nach 12 h BZ [mmol/l]	vorherige Dosis	
		≤ 40 IU/kg KG	> 40 IU/kg KG
> 16	> 16	+ 4	+ 20
	10 - 16	Dosis bleibt	
	5 - 10	- 4	- 16
	< 5	kein Insulin	

BZ [mmol/l]	BZ [mmol/l]	≤ 40 IU/kg KG	> 40 IU/kg KG
		6 - 16	
6 - 16	> 16	Dosis bleibt	
	10 - 16	- 4	- 8
	5 - 10	- 8	- 16
	< 5	kein Insulin	

BZ [mmol/l]	BZ [mmol/l]	≤ 40 IU/kg KG	> 40 IU/kg KG
		< 6	
< 6	> 16	- 4	- 12
	10 - 16	- 4	- 24
	5 - 10	- 8	- 36
	< 5	kein Insulin	

Schema 4: Etabliertes Dosisschema der subkutanen Insulintherapie des ersten Telexperiments; BZ Blutzucker, IU Internationale Einheit, KG Körpergewicht, h Stunden.

Der BZ wurde innerhalb der fünftägigen Insulintherapie insgesamt viermal täglich und das Körpergewicht morgens einmal täglich gemessen. Nach fünf Tagen wurde die Insulintherapie beendet bzw. die intraportale Pankreasinseltransplantation vorgenommen.

2.4.2. Telexperiment 2: Insulinsticktherapie:

In dem zweiten Teil dieser Arbeit sollte eine kontinuierliche Insulingabe mittels Insulinsticks über einen längeren Zeitraum von insgesamt 8 Wochen erfolgen.

Für die Insulinsticktherapie erhielt eine Gruppe von je 8 diabetischen WT- bzw. ChREBP-KO-Mäusen einen halben Insulinstick (LinBits) und eine weitere Gruppe von ebenfalls jeweils 8 Mäusen beider Genotypen einen ganzen Insulinstick in den Rücken zwischen den Schulterblättern subkutan implantiert. Dazu erfolgte eine Desinfektion mit 70 %igem Ethanol an der entsprechenden Implantationsstelle und anschließend eine kurze Narkose mit Diethylether (ROTIPURAN®). Der Insulinstick

wurde danach mit einem 12-Kaliber-Trokar (LinBits) subkutan im Nacken implantiert [67].

Daraufhin erfolgten Blutzuckermessungen und Gewichtsbestimmungen am ersten, zweiten und dritten Tag nach der Insulinstickimplantation und anschließend jeweils wöchentlich nach der Implantation für vier Wochen (siehe **Schema 3**).

Nach diesen vier Wochen erfolgte eine weitere Stickimplantation entsprechend der Gruppenaufteilung in der gleichen Vorgehensweise wie oben beschrieben. Und auch nach der zweiten Insulinstickimplantation wurden BZ und Körpergewicht der Mäuse am ersten, zweiten und dritten darauffolgenden Tag bestimmt und anschließend im wöchentlichen Abstand nach der Implantation für weitere vier Wochen (siehe **Schema 3**).

Nach den insgesamt 8 Wochen Insulinstickbehandlung wurden die Versuchstiere in Narkose getötet und die Organe perfusionsfixiert.

2.5. Teilexperiment 1: Pankreasinseltransplantation

Direkt nach der fünftägigen subkutanen Insulinbehandlung (präoperative subkutane Insulintherapie) erfolgte bei der Hauptgruppe des ersten Teilexperiments eine intraportale Pankreasinseltransplantation.

2.5.1. Anästhesie und Analgesie

Die allgemeine Narkose für Spender- und Empfängermause erfolgte mittels intraperitonealer Gabe von Ketamin (100 mg/kg KG, Selectavet Dr. Otto Fischer GmbH) und Xylazin (10 mg/kg KG, Selectavet Dr. Otto Fischer GmbH) [71]. Die Injektion erfolgte mit einer 1 ml Spritze (BD®) und einer 26 G Kanüle (BD Microlance 3™). Eine Aufrechterhaltung der Narkose bei langsamem Nachlassen der Wirkung erfolgte mittels Diethylether (ROTIPURAN®).

Die postoperative Schmerzbehandlung wurde mit 200 mg/kg Acetylsalicylsäure (Aspirin®) *per os* durchgeführt.

2.5.2. Pankreasgewebsentnahme

Für die Transplantation einer diabetischen WT-Maus wurden drei nicht diabetische WT-Mäuse als Spender benötigt, um etwa 200 Pankreasinseln zu erhalten.

Zu Beginn erfolgte eine BZ- und Gewichtsbestimmung der Spendermäuse. Nachdem die Narkose zu wirken begann, wurden die Spendermäuse auf dem Operationstisch mit zurechtgeschnittenen (Größe etwa 2 x 1 cm) Autoklavierbändern (Kartell S.p.A. – Labware Division) an Armen und Beinen fixiert. Nach Rasur mittels Rasiergerät (Aesculap®) und Desinfektion des Abdomens mit 70 %igem Ethanol (Rotipuran®) erfolgte eine mediane Laparotomie mittels Skalpells (P. J. Dahlhausen & Co. GmbH), einer feinen geraden Schere (Aesculap AG) und der Zuhilfenahme von anatomischen Pinzetten (Asanus® Medizintechnik; Bochem Instrumente GmbH; Karl Hammacher GmbH). Das geöffnete Abdomen wurde anschließend steril abgedeckt mit einem zurechtgeschnittenen und in der Mitte längs inzidiertem Abdecktuch (Steri-Drape™).

Das Darmkonvolut wurde außerhalb des Abdomens zur rechten Seite verlagert und die Vena cava inferior sowie die Aorta abdominalis freigelegt. Mit einer Venenpunktionsnadel (Venofix® A), welche zuvor um 90° gebogen wurde, erfolgte unter Sicht mit Hilfe eines Operationsmikroskops mit einem Tischstativ (Leica Microsystems AG) die Punktion der Aorta abdominalis direkt proximal der Aortenbifurkation und mittels einer 20 ml Spritze (BD Discardit™) ein retrogrades Anfärben des Pankreasgewebes von insgesamt 60 ml Neutralrotlösung [50 mg Neutralrot (Merck KGaA), gelöst in 500 ml 0,9 % NaCl]. Diese Neutralrotlösung färbt nach Gray *et al.* die Pankreasinseln spezifisch an [72].

Als sich die Leber gestaut hatte und eine marmorierte Farbe annahm, wurde durch Inzision der Vena cava inferior auf Höhe des Abganges der Venae hepaticae (unterhalb der Leber) der Kreislauf mit einer gebogenen Schere (Bochem Instrumente GmbH) eröffnet. Nach dem erfolgreichen Anfärben des Pankreasparenchyms erfolgte die Pankreasgewebeentnahme und die Zwischenlagerung in auf crushed-ice gekühlter Hanks' Balanced Salt Solution (Sigma-Aldrich Chemie GmbH; 1:10 Verdünnung mit Aqua dest. (Ampuwa®

Spüllösung)) in einer Petrischale, bis bei allen Spendern das angefärbte Pankreasgewebe entnommen werden konnte.

2.5.3. Verdau des Pankreasgewebes

Nachdem bei allen Spendern das gefärbte Pankreasgewebe entnommen war, erfolgte die Zerkleinerung des Gewebes mittels einer in 96 %igen Ethanol (Rotipuran®) sterilisierten und anschließend in 0,9 % NaCl gespülten Rasierklinge (Feintechnik GmbH Eisfeld) auf einem Schneidebrett, bis das Gewebe einen Durchmesser von etwa 0,3 mm bis 0,5 mm aufwies (siehe **Abbildung 1**). Da das Gewebe zu dieser Zeit nicht gekühlt wurde, wurde das Zerkleinern auf weniger als 20 min bei sieben Pankreata begrenzt. Bei einer geringeren Spenderanzahl wurde das Zeitlimit entsprechend verringert.



Abbildung 1: Mit einer Rasierklinge zerkleinertes und mit Neutralrotlösung angefärbtes Pankreasgewebe nach der Entnahme aus den Spender-Mäusen als Vorbereitung für den enzymatischen Verdau für die nachfolgende Pankreasinseltransplantation in die Empfänger-Mäuse im Rahmen des ersten Telexperiments.

Das Verdaugemisch bestand aus Kollagenase (SERVA Electrophoresis GmbH) und Albumin (Serva Electrophoresis GmbH) in einem Verhältnis von 2:1. Es wurden pro entnommenes Pankreas 2 mg Kollagenase und 1 mg Albumin in einem 25 ml Erlenmeyerkolben abgewogen und dieser dann im Wärmeschrank samt Magnetstäbchen (Rotilabo®) vorgewärmt.

Nach der Zerkleinerung wurde das Gewebe sofort in frische und auf crushed-ice gekühlte Hanks' Balanced Salt Solution in einer Petrischale überführt und anschließend mittels drei bis vier (bei sieben Pankreata) 2 ml Spritzen (BD Discardit™ II) aufgezogen und von überschüssiger Hanks' Balanced Salt Solution befreit. Nachdem das gesamte Pankreasgewebe aufgenommen wurde, wurde die Gewebemenge in ml durch Ablesen der Spritzenskala bestimmt. Anschließend wurde das Gewebe in einen 25 ml Erlenmeyerkolben (Simax®) überführt, der im Wärmeschrank (Thermo Electron corporation) auf 37,5 °C vorgewärmt und zuvor mit einem Verdaugemisch versehen wurde. Die Spritzen wurden mit etwa 0,3 ml warmer Hanks' Balanced Salt Solution gespült und der Erlenmeyerkolben mit Parafilm (Parafilm®) abgedeckt.

Der Verdau des Pankreasgewebes erfolgte im Wärmeschrank bei 37,5 °C unter vorsichtigem und langsamem Rühren mittels Magnetrührer (Variomag®) für 9 min. Danach wurde der Verdau abrupt durch Überführen der Verdaulösung in 6 (bei 7 Spender-Mäusen) zuvor mit 4 °C gekühlter Hanks' Balanced Salt Solution halbvoll gefüllter Zentrifugengläser (Carl Roth GmbH+Co. KG) gestoppt. Die Zentrifugengläser wurden anschließend mit gekühlter Hanks' Balanced Salt Solution $\frac{3}{4}$ vollgefüllt, gut geschwenkt und für 8 min auf crushed-ice stehen gelassen, damit sich das Pankreasgewebe absetzen konnte. Somit konnte nach dieser Zeit der Überstand mit einer Glaspasteurpipette (VWR International GmbH) mit einer Saughilfe (Carl Roth GmbH + Co. KG) gut abpipettiert und verworfen werden. Dieser Spülvorgang wurde insgesamt viermal wiederholt.

2.5.4. Pankreasinselisolaton

Nach dem letzten Spülvorgang wurden die Zentrifugengläser nur noch zur Hälfte mit frischer, gekühlter Hanks' Balanced Salt Solution gefüllt und ein Teil dieser Lösung

mit einer Glaspipette in eine Petrischale überführt, bis der Boden gleichmäßig mit den angefärbten Pankreasinseln bedeckt war. Mit Hilfe von Stereomikroskopen der Firma Leica wurden anschließend die homogen dunkelrot angefärbten Pankreasinseln mit einer zuvor präparierten Glaspipette (unter einem Bunsenbrenner am Ende verjüngt und um ca. 45° gebogen) und Pipettierhilfe (Brand GmbH + Co KG) isoliert und anschließend in einem 1,5 ml großen Reaktionsgefäß (Eppendorf Tubes®) gesammelt (siehe **Abbildung 2**).

Nachdem 200 Pankreasinseln isoliert wurden, erfolgte zügig die Transplantation dieser Inseln in eine Empfänger-Maus.

Nach der Transplantation wurden erneut 200 Pankreasinseln isoliert. Anschließend wurden diese der nächsten Empfänger-Maus transplantiert. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis keine 200 Inseln mehr isoliert werden konnten.



Abbildung 2: Arbeitsplatz zur Pankreasinselisolation mit Hilfe des Stereomikroskops und Pipettierhilfe für die nachfolgende Pankreasinseltransplantation im Rahmen des ersten Telexperiments.

2.5.5. Pankreasinseltransplantation

Für die Transplantation der Pankreasinseln wurde ein Transplantationssystem [34] genutzt, welches aus einer 1 ml Spritze (BD® Plastipak™), einem Verbindungsschlauch (B. Braun Melsungen AG) und einer 26 G Kanüle (BD Microlance 3™) bestand (siehe **Abbildung 3**).



Abbildung 3: Transplantationssystem mit aufgezogenen Pankreasinseln in Hanks' Balanced Salt Solution gekühlt auf crushed-ice kurz vor der Pankreasinseltransplantation im Rahmen des ersten Telexperiments.

Die isolierten Pankreasinseln wurden mittels dieses Transplantationssystems aufgezogen und bis unmittelbar vor der Transplantation darin auf crushed-ice gekühlt (siehe **Abbildung 3** und **4**).



Abbildung 4: In Hanks' Balanced Salt Solution aufgezogene, mit Neutralrot angefärbte und auf crushed-ice gekühlte Pankreasinseln im Verbindungsschlauch des Transplantationssystems kurz vor der Pankreasinseltransplantation im Rahmen des ersten Teilexperiments; roter Pfeil zeigt auf Pankreasinseln.

Bei den narkotisierten Empfänger-Mäusen erfolgte zunächst die Rasur der ventralen Bauchdecke und anschließend die Fixierung auf dem Operationstisch. Die ventrale Bauchdecke wurde desinfiziert und mit einem in der Mitte längsinzidierten Abdecktuch abgedeckt. Anschließend wurde eine Laparotomie durchgeführt und das Darmkonvolut außerhalb der Bauchhöhle zur Seite verlagert. Das Darmkonvolut wurde mit einer Mullkomresse (Fuhrmann®) bedeckt und mit 37,5 °C warmer 0,9 % NaCl-Lösung (B. Braun Melsungen AG) feucht gehalten. Mit einer stumpfen Pinzette erfolgte die Freilegung der Vena portae hepatis auf Höhe der Vena splenica. Nun konnten die Pankreasinseln mittels des zuvor vorbereiteten Transplantationssystems (siehe **Abbildung 3**) unter Sicht mit Hilfe des Operationsmikroskops in die Vena portae hepatis injiziert werden. Anschließend erfolgte für etwa 5 bis 20 min die Blutstillung der Injektionsstelle mit einer in 96 %igen Ethanol (verdünnt, Rotipuran®) gespülten Blutstillkonstruktion, bestehend aus einer mit Autoklavierband umwickelten Impföse (Nerbe plus GmbH & Co. KG). Nach dem die Blutung gestoppt wurde,

erfolgte die Rückverlagerung des Darmkonvolutes und ein ausgiebiges Spülen der Bauchhöhle mittels warmer 0,9 %iger NaCl-Lösung. Das Peritoneum wurde anschließend mit einer fortlaufenden Naht von kranial nach kaudal vernäht (Marilon®). Daraufhin die Bauchdecke mit Wundklammern (Aesculap®) verschlossen.

Die Empfänger-Mäuse wurden nach der Operation in einen, auf einer Heizmatte (Happet Sp. Z o.o.) stehenden, sauberen Käfig der Größe 2 gelegt. Es wurde gewartet, bis diese aus der Narkose erwachten.

2.6. Blutzucker- und Gewichtsbestimmung

Die Blutzuckerbestimmung erfolgte mittels Blutzuckermessgerät (Accu-Chek® Performa) und den dazu passenden Blutzucker-Messstreifen (Accu-Chek® Inform II) durch Punktion der Schwanzvene mittels 23 G Kanüle (BD Microlance 3™). Die Gewichtserhebungen wurden mit einer Laborkompaktwaage (Kern und Sohn GmbH) durchgeführt.

Im Rahmen der Diabetesinduktion wurde bei beiden Genotypen innerhalb beider Telexperimente direkt vor und eine Woche nach der Streptozotocingabe der BZ und das Gewicht bestimmt.

Anschließend erfolgten im ersten Telexperiment innerhalb der fünftägigen subkutanen Insulintherapie die Blutzuckerbestimmungen dreimal täglich und die Gewichtsbestimmungen einmal täglich bei jedem Versuchstier. Anschließend wurde direkt vor sowie nach der Transplantation am ersten und am dritten Tag der BZ und das Gewicht kontrolliert. Nachfolgend erfolgte die Bestimmung einmal wöchentlich (siehe **Schema 1** und **2**) für insgesamt vier Wochen, sowie unmittelbar vor der Tötung. Auch bei den nicht-transplantierten Versuchstieren wurde die BZ- und Gewichtsbestimmung nach Beendigung der Insulintherapie zu den gleichen Zeiten durchgeführt.

Im zweiten Telexperiment erfolgten am ersten, zweiten und dritten Tag nach der Insulinstickimplantation die Blutzuckermessungen und Gewichtsbestimmungen sowie

anschließend jeweils wöchentlich nach der Implantation für vier Wochen (siehe **Schema 3**). Nach der zweiten Insulinstickimplantation erfolgten die BZ- und Gewichtsbestimmungen in den gleichen Zeitabständen sowie unmittelbar vor der Tötung.

2.7. Tötung in Narkose

Vier Wochen nach der Beendigung der Insulintherapie bzw. nach der Pankreasinseltransplantation wurden alle Versuchstiere des ersten Telexperiments in Narkose getötet und die Organe perfusionsfixiert (siehe Punkt **2.7.2**).

Die Versuchstiere des zweiten Telexperiments wurden nach insgesamt acht Wochen Insulinstickbehandlung in Narkose getötet und ebenfalls die Organe perfusionsfixiert.

2.7.1. Bromdesoxyuridin (BrdU)-Gabe

Zur Bestimmung der Proliferationsaktivität wurden allen Versuchstieren Bromdesoxyuridin (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH) 24 und 12 Stunden subkutan sowie eine Stunde intraperitoneal vor der Tötung injiziert.

BrdU ist ein Thymidin-Analogon, welches während der Desoxyribonukleinsäure (DNS) – Synthese in die DNS der Zellen eingebaut wird [73].

Die dadurch markierten Zellen konnten nachfolgend unter Verwendung eines monoklonalen Maus-Antikörpers gegen BrdU (Dako Denmark A/S) immunhistochemisch durch ein nukleäres Anfärben erkennbar gemacht werden [73] (**BrdU/Eosin – Färbeprotokoll siehe Anhang Tabelle 16**).

2.7.2. Perfusionsfixation

Für die Perfusionsfixation wurde eine zuvor angesetzte Spül- und Perfusionsfixationslösung (Zusammensetzung siehe **Anhang Tabelle 6 und 7**) verwendet, welche bis zur Verwendung portioniert bei -20 °C tiefgefroren wurden.

Nach Auftauen der Spüllösung (siehe **Anhang Tabelle 6**) wurde diese filtriert (Whatman™) und der pH-Wert mit Natriumhydroxid bzw. Salzsäure auf 7,4 eingestellt.

Der Perfusionsfixationslösung (siehe **Anhang Tabelle 7**) wurde nach dem Auftauen 25 % Glutaraldehyd (Carl Roth GmbH + Co. KG) hinzugegeben (10 ml Glutaraldehyd auf 500 ml Perfusionsfixationslösung, Endkonzentration 0,5 %), dann die Lösung filtriert und der pH ebenfalls auf 7,4 eingestellt.

Die narkotisierten Tiere wurden auf dem Operationstisch fixiert und laparotomiert.

Nach makroskopischer Begutachtung der Leber erfolgte die Freilegung der Aorta abdominalis bis zur Bifurkation. Hier erfolgte die Punktion mittels Venenverweilkatheter (BD Insite-N™). Nach dem Herausziehen der Kanüle wurde zunächst Blut in einem 2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf Tubes®) aufgefangen und bei 12800 rpm für 10 min zentrifugiert. Nachfolgend wurde das Serum mit einer 100 µl Pipette (Eppendorf Research®) abpipettiert, in einem 2 ml Kryoröhrchen (Cryo.S™) überführt und in flüssigen Stickstoff bei -196 °C schockgefroren. Die Asservierung erfolgte anschließend bei -80 °C.

Nach der Blutgewinnung wurde die Spüllösung an den Venenverweilkatheter mittels Infusionsbesteck (Intrafix®) konnektiert und vorsichtig in die Aorta abdominalis geleitet, bis sich die Leber staute und hell wurde. Dann erfolgte die Eröffnung des Kreislaufes durch Eröffnung der Vena cava inferior mit einer kleinen, gebogenen Schere. Nun konnte die Spüllösung bei eröffnetem Kreislauf infundiert werden. Der einliegende Venenverweilkatheter wurde mit Hilfe eines Gazetupfers (Fuhrmann GmbH) und Autoklavierband fixiert.

Als die Leber und beide Nieren eine homogen gelbliche Farbe aufwiesen, erfolgten die ersten Organentnahmen. Begonnen wurde mit der linken Niere durch Abklemmen mittels Bulldog-Klemme (Medicon eG), anschließender Freipräparation und nachfolgender Nephrektomie. Dann wurde etwas Pankreasgewebe mit einer Schere entnommen. Anschließend wurde der Thorax eröffnet und die Leber vorsichtig frei präpariert. Der Mittellappen der Leber wurde mittels Bulldog-Klemme abgeklemmt und entfernt. Anschließend wurde der entnommene Mittellappen der Leber in ca.

1 mm dicke Scheiben geschnitten. Von einer Scheibe wurden 2 kleine Stücke (etwa 1 mm³ Größe) in 2 % Osmium-Fixierungslösung (**Ansatz siehe Anhang Tabelle 8**) für die Elektronenmikroskopie für etwa zwei Stunden auf crushed-ice fixiert. Anschließend wurde die Fixierungslösung vorsichtig abgegossen und das Gewebe für elektronenmikroskopische Untersuchungen mit Natrium-Cacodylatpuffer abgepuffert und danach im Kühlschrank bei 4 °C bis zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt. Das restliche Gewebe vom entnommenen Mittellappen der Leber wurde auf Filterpapier (Tissue-Tek®) in 2-Methylbutan (Carl Roth GmbH + Co. KG) in flüssigen Stickstoff bei etwa -196 °C schockgefroren. Die Lagerung der schockgefrorenen Organstücke erfolgte in einem Innenröhrchen (Engelbrecht GmbH) bei -80 °C.

Anschließend wurde die Spüllösung durch eine Perfusionsfixationslösung ersetzt, bis alle Organe eine feste Konsistenz aufwiesen.

2.7.3. Exenteration und Gewebefixation

Direkt nach der Perfusionsfixation wurden die restlichen Organe exentert. Herz, Lunge, Milz, Pankreas, Hoden, mesenteriales Fettgewebe und Muskelgewebe (vom Musculus iliopsoas) wurden für mindestens 24 Stunden in 4,5 %igem Formalin in einer 20 ml großen Kunststoffschraubdose (Süsse Labortechnik GmbH & Co. KG) fixiert und im Kühlschrank bei 4 °C bis zum Zuschneiden aufbewahrt.

Die Leber, die rechte Niere und der Darm wurden für mindestens 24 Stunden in einer Nachfixierungslösung (**Zusammensetzung siehe Anhang Tabelle 9**) fixiert und im Kühlschrank bei 4 °C bis zum Zuschnitt aufbewahrt.

Auch die Nachfixierungslösung konnte nach dem Ansetzen portioniert bei -20 °C tiefgefroren werden. Nach dem Auftauen erfolgte die Zugabe von 25 % Glutaraldehyd (1,5 ml Glutaraldehyd auf 100 ml Nachfixierungslösung). Anschließend wurde die Lösung filtriert, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und die Lösung in 20 ml große Kunststoffschraubdosen (Süsse Labortechnik GmbH & Co. KG) pro getötete Maus abgefüllt.

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurde von der Leber nach der Nachfixation ein bis zwei kleine 1 mm³ große Stücke in 2,5 % Glutaraldehydfixierungslösung (Ansatz siehe **Anhang Tabelle 10**) fixiert und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

2.8. Zuschnitt

Die Leber wurde in 1 mm dicke Scheiben geschnitten und mit bloßem Auge bzw. mit Hilfe eines Stereomikroskops (Leica Microsystems AG) nach Herden oder Tumoren untersucht und z.T. fotodokumentiert. Bei makroskopisch sichtbaren Herden erfolgten das Anfärben der Leberscheiben mit Sudanrot (Dr. K. Hollborn & Söhne GmbH & Co. KG) für 5 Minuten und ebenfalls eine anschließende Fotodokumentation.

Abschließend wurde das Lebergewebe in Paraffin eingebettet und davon 1 µm dicke Serienschritte angefertigt.

2.9. Histologische Auswertung

Von den angefertigten Serienschritten wurde nachfolgend eine Hämatoxylin-Eosin (HE) Übersichtsfärbung (Färbeprotokoll siehe **Anhang Tabelle 11**) sowie eine Periodsäure-Schiff (PAS)-Reaktion (Färbeprotokoll siehe **Anhang Tabelle 14**) angefertigt.

Die Auswertung erfolgte mithilfe eines Lichtmikroskops (Leica Mikroskopie & Systeme GmbH).

In der HE-Übersichtsfärbung wurde in allen Schnitten das Vorkommen klarzelliger Leberherde dokumentiert, deren Morphologie und der Glykogengehalt mit Hilfe der PAS-Reaktion im Vergleich zum extrafokalen Lebergewebe beschrieben. Gleichzeitig wurde die Anzahl an angewachsenen Pankreasinseln dokumentiert.

Für die Bestimmung der Proliferationsaktivität erfolgte die immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper gegen BrdU in Kombination mit einer Eosinfärbung (Färbeprotokoll siehe **Anhang Tabelle 16**).

2.9.1. Bestimmung der Proliferationsaktivität (BrdU-Labeling-Index)

Die Bestimmung der Proliferationsaktivität innerhalb der Herde sowie im extrafokalen Gewebe erfolgte mittels der BrdU/Eosin-Färbung über die Bestimmung des BrdU-Labeling-Index, d.h. der Anteil BrdU-positiver Hepatozyten bezogen auf 100 Hepatozytenzellkerne (in %).

Bei den Herden wurden alle Hepatozytenzellkerne bzw. BrdU-positiven Zellkerne gezählt. Im extrafokalen Lebergewebe wurden pro Mausleber mindestens 2000 Zellkerne sowie die BrdU-positiven Zellen gezählt.

Von jeder Gruppe erfolgte zusätzlich repräsentativ die Fotodokumentation von allen Färbungen mit einem Fotomikroskop (Leica Mikroskopie & Systeme GmbH), welches mit einer Kamera (Nikon Corporation) ausgestattet war.

2.10. Statistische Auswertung

2.10.1. Datenerhebung und verwendete Tests

Die erhobenen BZ- und Gewichtsdaten wurden für jede Gruppe in beiden Telexperimenten tabellarisch (Microsoft® Excel 2016) dokumentiert und anschließend der Mittelwert, die Standardabweichung und der Standardfehler des Mittelwerts (SEM, standard error of the mean) mithilfe von Microsoft® Excel 2016 berechnet. Zusätzlich wurden diese berechneten Daten mit Microsoft® Excel 2016 grafisch dargestellt.

Die Proliferationsaktivität innerhalb der Leber aus beiden Telexperimenten wurde mittels BrdU-Labeling-Index bestimmt (siehe **2.9.1. Bestimmung der Proliferationsaktivität**). Anschließend erfolgte die Bestimmung des Mittelwerts, der Standardabweichung und des SEM mit Microsoft® Excel 2016.

Ferner erfolgte der Vergleich der Proliferationsaktivitäten sowie der BZ- und Gewichtsdaten für jeden Teilabschnitt der Experimente separat sowohl im Verlauf innerhalb einer Gruppe als auch im Vergleich zu den anderen Gruppen. Hierfür wurde zunächst durch den Kolmogorov-Smirnov-Test (Microsoft® Excel 2016) überprüft, ob die erhobenen Daten normalverteilt waren. Nach erfolgreicher Überprüfung der Normalverteilung konnten die Ergebnisse durch Berechnung der Signifikanz (p) mittels Student's ungepaarten t-Test (Microsoft® Excel 2016) nach signifikanten Unterschieden untersucht werden. Die Unterschiede wurden als statistisch signifikant bewertet, wenn die Signifikanz kleiner als die angenommene Irrtumswahrscheinlichkeit (α) war, entsprechend $p < \alpha$. Als Irrtumswahrscheinlichkeit wurde $\alpha = 0,05$ angenommen. Somit galt als signifikant, wenn $p < 0,05$ war.

Der Vergleich der Versuchstierausfälle nach der präoperativen subkutanen Insulintherapie des ersten Telexperiments zwischen beiden Genotypen und die Komplikationen der Insulinsticktherapie des zweiten Telexperiments zwischen beiden Genotypen sowie die Überprüfung der Signifikanz für die Frequenz der hellzelliger Herde der diabetischen, transplantierten WT-Mäuse des ersten Telexperiments erfolgte mittels Fischer's exact Test. Auch bei diesem Test wurden die Unterschiede als signifikant gewertet, wenn $p < 0,05$ war.

2.10.2. Diabetesinduktion

Zum Abschnitt der Diabetesinduktion wurden die BZ- und Gewichtsdaten sowohl für die WT-Mäuse als auch für die ChREBP-KO-Mäuse vor und eine Woche nach der Streptozotocin-Gabe innerhalb der jeweiligen Gruppen verglichen. Zusätzlich wurden die Daten beider Genotypen miteinander verglichen. Für diesen Abschnitt wurden die Daten aus beiden Telexperimenten herangezogen.

2.10.3. Insulintherapie

Teilexperiment 1: Präoperative subkutane Insulintherapie

Vor Beginn des ersten Teilexperiments erfolgte für das Verdünnen des Insulins ein Vergleich des Verdünnungsmediums von Stammberger *et al.* [70] mit 0,9 % NaCl auf signifikante Unterschiede.

Anschließend wurden für den Zeitraum der fünftägigen präoperativen subkutanen Insulintherapie die BZ- und Gewichtsdaten der WT-Mäuse und der ChREBP-KO-Mäuse separat im Verlauf auf signifikante Unterschiede überprüft. Des Weiteren wurden die einzelnen Daten beider Genotypen miteinander verglichen.

Teilexperiment 2: Insulinsticktherapie

Die BZ- und Gewichtsdaten der WT-Mäuse und der ChREBP-KO-Mäuse wurden während der Insulinsticktherapie des zweiten Teilexperiments jeweils in ihrem Verlauf von acht Wochen nach zweimaliger Stickimplantation sowohl mit einem halben als auch mit einem ganzen Insulinstick auf signifikante Unterschiede überprüft. Zusätzlich wurden die BZ- und Gewichtsdaten der WT-Mäuse und auch der ChREBP-KO-Mäuse bei Gabe eines halben Insulinsticks mit denen bei Gabe eines ganzen Insulinsticks verglichen.

Vergleich beider Insulintherapie-Methoden

Nachfolgend erfolgte ein Vergleich der BZ- und Gewichtsdaten für beide Insulintherapie-Methoden beider Teilexperimente im Zeitraum von etwa einer Woche sowohl für die WT-Mäuse als auch für die ChREBP-KO-Mäuse.

2.10.4. Teilexperiment 1: Pankreasinseltransplantation

Für den vierwöchigen Zeitraum innerhalb des ersten Teilexperiments nach der Pankreasinseltransplantation bzw. der Beendigung der subkutanen Insulintherapie bis zur Tötung der Versuchstiere wurden die BZ- und Gewichtsdaten innerhalb der einzelnen Gruppen im Verlauf verglichen. Zusätzlich wurden in diesem Zeitraum die Daten der diabetischen, mit Insulin behandelten WT-Mäuse mit und ohne erfolgte

Transplantation verglichen sowie auch die Daten beider Genotypen ohne erfolgte Transplantation.

2.10.5. 24h-Proliferationsaktivität

Im Rahmen der präoperativen subkutanen Insulintherapie des ersten Teilexperiments erfolgte ein Vergleich der Proliferationsaktivitäten zwischen den CCF und dem extrafokalen Lebergewebe der diabetischen, präoperativ mit Insulin behandelten, transplantierten WT-Mäuse. Des Weiteren wurden die Proliferationsaktivitäten des extrafokalen Lebergewebes der diabetischen, präoperativ mit Insulin behandelten, transplantierten WT-Mäuse und die der diabetischen, mit Insulin behandelten, nicht-transplantierten WT-Mäuse miteinander verglichen. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich der Proliferationsaktivitäten des unveränderten Lebergewebes der diabetischen, mit Insulin behandelten, nicht-transplantierten WT-Mäuse mit dem der diabetischen, mit Insulin behandelten, nicht-transplantierten ChREBP-KO-Mäuse.

Im Rahmen des zweiten Teilexperiments (Insulinsticktherapie) erfolgte der Vergleich der Proliferationsaktivitäten in dem veränderten und nicht veränderten Lebergewebe der diabetischen, mit Insulinsticks behandelten, ChREBP-KO-Mäuse sowie der Vergleich der Proliferationsaktivitäten innerhalb des unveränderten Lebergewebes von den diabetischen, mit Insulinsticks behandelten WT-Mäusen mit den diabetischen, mit Insulinsticks behandelten ChREBP-KO-Mäusen.

2.11. Materialien, Geräte und Chemikalien

Eine detaillierte Auflistung der in dieser Arbeit genutzten Materialien, Geräte und Chemikalien finden sich zur Ergänzung im **Anhang**.

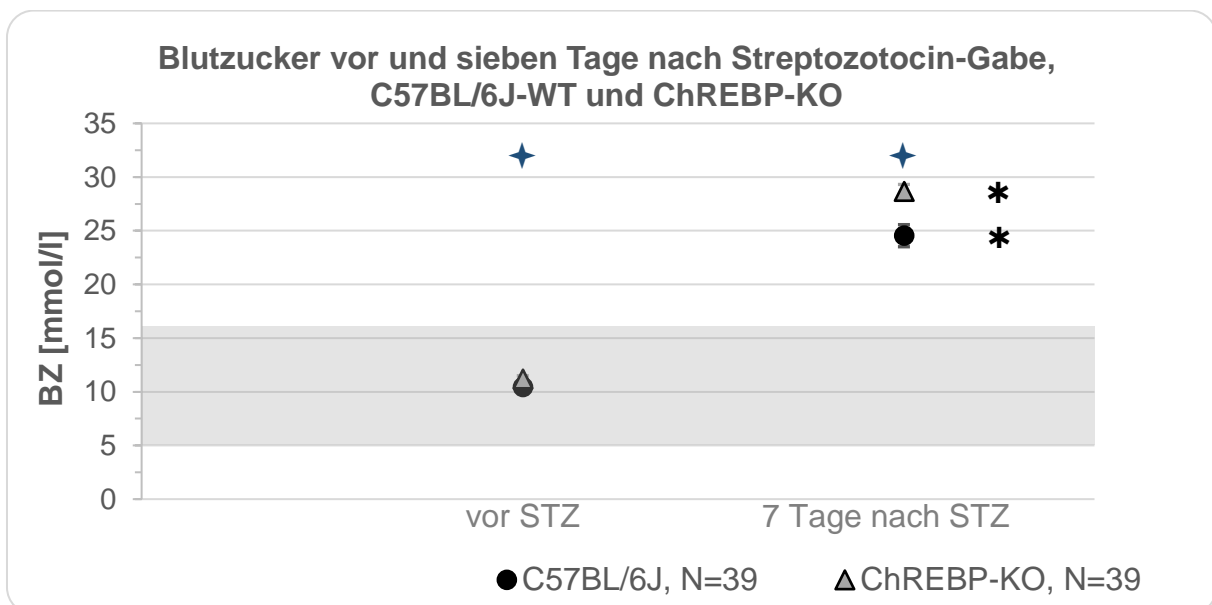
3. Ergebnisse

3.1. Blutzucker und Gewicht nach Diabetesinduktion

Die BZ- und Gewichtsdaten wurden für die Erstellung der nachfolgenden Ergebnisse bzw. Grafiken für den Abschnitt Diabetesinduktion von allen Versuchstieren aus beiden Telexperimenten herangezogen.

3.1.1. Blutzucker

Bei den WT-Mäusen erhöhte sich nach der Streptozotocin-Gabe nach einer Woche der BZ signifikant von $10,4 \pm 0,2$ mmol/l auf $24,5 \pm 1,0$ mmol/l (siehe **Grafik 1**, $N=39$, $p < 0,001$). Bei den ChREBP-KO-Mäusen erhöhte sich der Blutzuckerspiegel nach einer Woche von $11,2 \pm 0,3$ mmol/l auf $28,6 \pm 0,7$ mmol/l signifikant (siehe **Grafik 1**, $N=39$, $p < 0,001$).

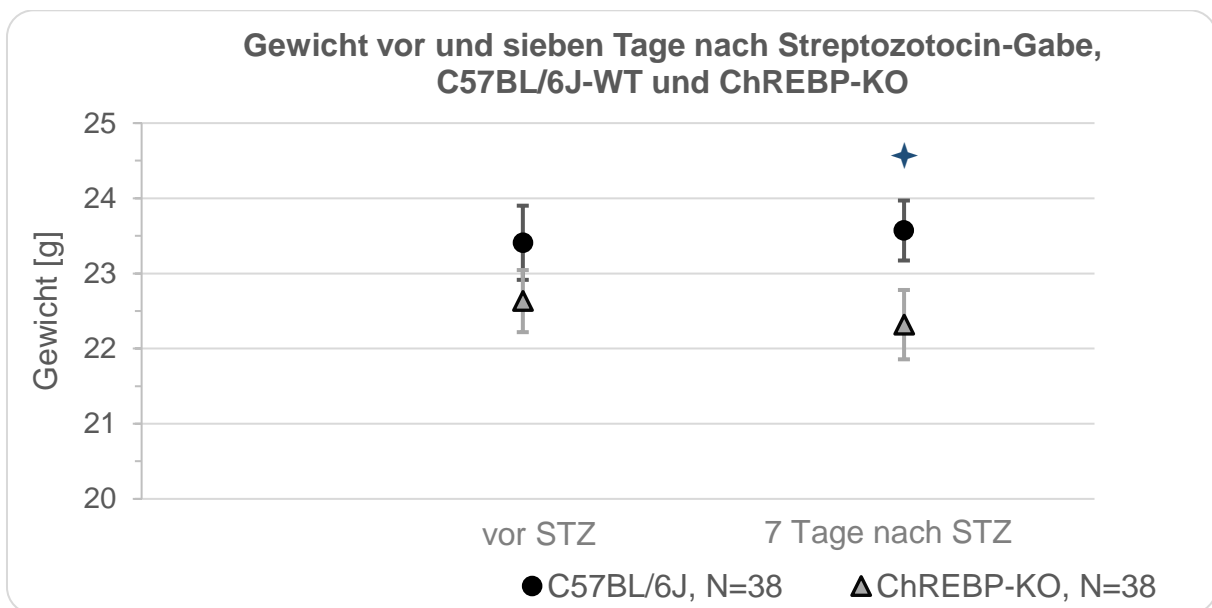


Grafik 1: Diabetesinduktion mit Streptozotocin. Blutzuckerwerte von C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen und ChREBP-KO-Mäusen vor und sieben Tage nach der Streptozotocin-Gabe. ★ C57BL/6J vs. ChREBP-KO, $p < 0,05$; * vor Streptozotocin-Gabe vs. nach Streptozotocin-Gabe, $p < 0,05$. Der graue Balken zeigt den normoglykämischen Bereich von 5 bis 16 mmol/l an. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. BZ Blutzucker, STZ Streptozotocin, ChREBP-KO Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) – Knockout, WT Wildtyp, N Anzahl, vs. versus.

Der Blutzuckerspiegel der ChREBP-KO-Mäuse war sowohl vor als auch nach der Streptozotocin-Gabe signifikant höher als bei den WT-Mäusen (siehe **Grafik 1**, $p < 0,05$).

3.1.2. Gewicht

Ausgeprägte Gewichtsveränderungen fanden in diesem Zeitraum nicht statt (siehe **Grafik 2**). Jedoch wogen eine Woche nach der Streptozotocin-Gabe die ChREBP-KO-Mäuse mit $22,3 \pm 0,5$ g signifikant weniger als die WT-Mäuse mit $23,6 \pm 0,4$ g (siehe **Grafik 2**, $p < 0,05$).



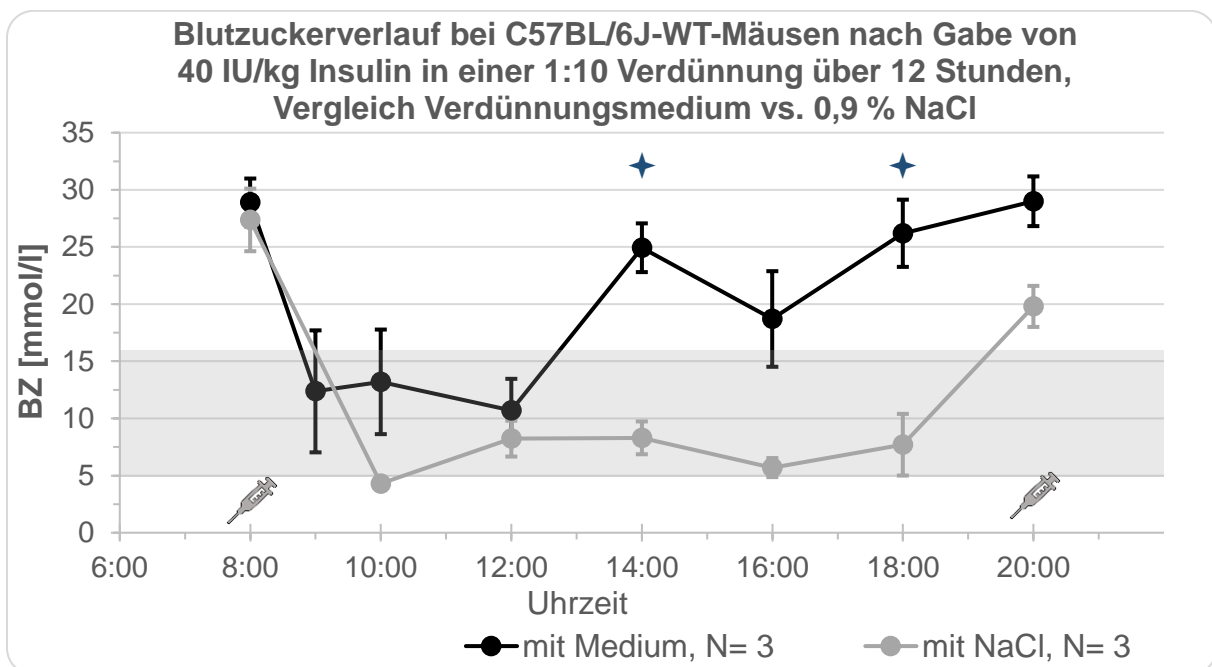
Grafik 2: Diabetesinduktion mit Streptozotocin. Gewichtsdaten von C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen und ChREBP-KO-Mäusen vor und sieben Tage nach der Streptozotocin-Gabe. * C57BL/6J vs. ChREBP-KO, $p < 0,05$. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. STZ Streptozotocin, ChREBP-KO Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) – Knockout, WT Wildtyp, N Anzahl, vs. versus.

3.2. Insulintherapie

3.2.1. Teilexperiment 1: Präoperative subkutane Insulintherapie

Vergleich der Verdünnung des NPH-Insulins mit Verdünnungsmedium und 0,9 % NaCl

Aufgrund einer individuellen Insulindosis der Versuchstiere musste das Insulin verdünnt werden. **Grafik 3** zeigt den Blutzuckerungsverlauf für 12-Stunden nach einer morgendlichen und abendlichen (jeweils um 8 Uhr) Insulingabe von 40 IU/kg mit einer 1:10 Verdünnung im Vergleich mit einem von Stammberger *et al.* [70] verwendeten Verdünnungsmedium sowie mit einer Verdünnung mit 0,9 % NaCl.



Grafik 3: Teilexperiment 1: Vergleich einer 1:10 Verdünnung des NPH-Insulins mit Verdünnungsmedium nach Stammberger *et al.* [70] vs. mit 0,9 % NaCl von C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen; ★ Medium vs. 0,9 % NaCl, $p < 0,05$. Der graue Balken zeigt den normoglykämischen Bereich von 5 bis 16 mmol/l an. Das Spritzensymbol zeigt den Zeitpunkt der Insulininjektion an. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. BZ Blutzucker, IU Internationale Einheit, NaCl Natriumchlorid, WT Wildtyp, N Anzahl, vs. versus.

Der BZ blieb mit NaCl als Verdünnungssubstanz für eine längere Zeit (10 Stunden vs. 4 Stunden) im normoglykämischen Bereich (5 bis 16 mmol/l) und wies signifikant (siehe **Grafik 3**, $p < 0,05$) niedrigere Werte 6 Stunden (um 14 Uhr) und 10 Stunden (um 18 Uhr) nach Insulingabe auf. Entsprechend wurde für die weiteren Experimente 0,9 % NaCl als Verdünnungssubstanz verwendet.

Blutzuckerverlauf von C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen und ChREBP-KO-Mäusen

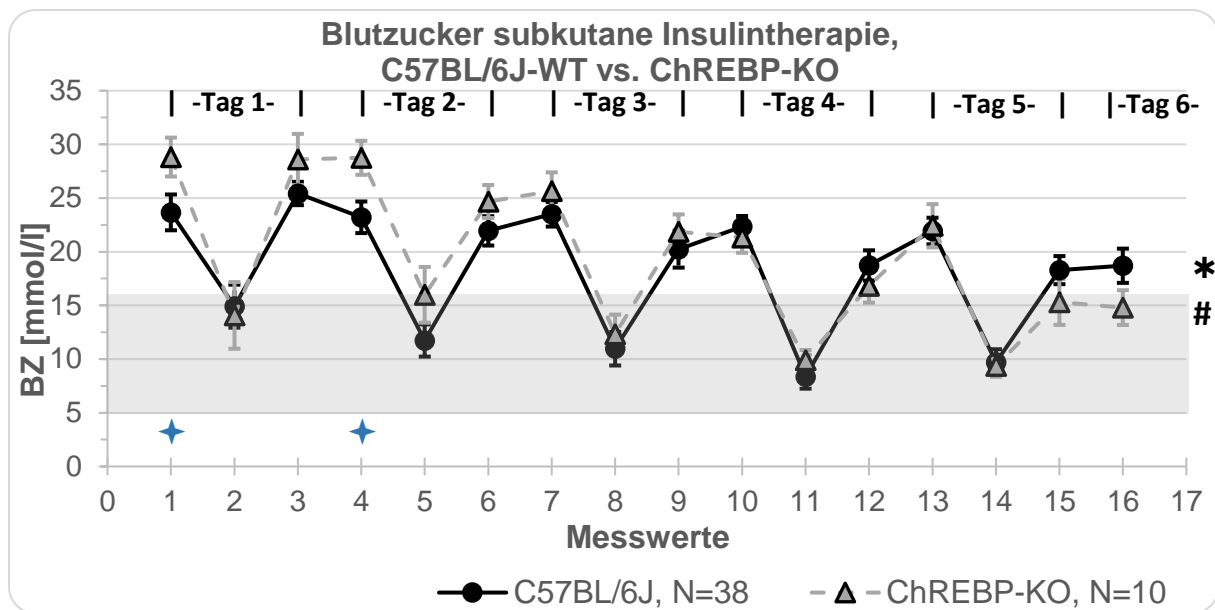
Zur Einstellung einer annähernden Normoglykämie benötigten die WT-Mäuse (N=38) zwischen 28 und 80 IU und die ChREBP-KO-Mäuse (N=10) zwischen 40 und 60 IU NPH-Insulin als subkutane Injektion für 5 Tage.

Während der fünftägigen Insulintherapie sank der Blutzuckerspiegel sowohl bei den WT- als auch bei den ChREBP-KO-Mäusen innerhalb von ein bis sechs Stunden nach den morgendlichen Insulingaben signifikant auf ca. 9 bis 16 mmol/l und stieg dann wieder signifikant auf ca. 15 bis 28 mmol/l bis zu den abendlichen Injektionen an (siehe **Grafik 4**, $p < 0,05$).

Die Werte zeigten hohe Schwankungen. Ein konstanter Blutzuckerspiegel konnte mit der fünftägigen subkutanen Insulintherapie nur bei sehr wenigen Versuchstieren erreicht werden.

Der Blutzuckerspiegel sank im Verlauf während der fünftägigen subkutanen Insulintherapie bei beiden Stämmen signifikant ab (siehe **Grafik 4**, Vergleiche Messwert $1_{\text{Tag 1, 8 Uhr}}$ vs. Messwert $16_{\text{Tag 6, 8 Uhr}}$ für WT: $23,7 \pm 1,0$ mmol/l vs. $18,7 \pm 1,1$ mmol/l, $p < 0,05$; für ChREBP-KO: $28,8 \pm 1,8$ mmol/l vs. $14,8 \pm 1,6$ mmol/l, $p < 0,001$).

Am Ende der fünftägigen Insulintherapie hielt sich der BZ der WT-Mäuse im leicht hyperglykämischen Bereich zwischen 15 und 20 mmol/l und bei den ChREBP-KO-Mäusen sank dieser bis in den normoglykämischen Bereich mit hochnormalen Blutzuckerwerten um die 15 mmol/l (siehe **Grafik 4**).



Grafik 4: Teilerperiment 1: Präoperative subkutane Insulintherapie. Blutzuckerungsverlauf während der fünftägigen subkutanen Insulintherapie mit NPH-Insulin von C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen und ChREBP-KO-Mäusen. Die Insulininjektionen erfolgten täglich um 8 Uhr morgens (Messwerte 1, 4, 7, 10, 13, 16) und um 8 Uhr abends (Messwerte 3, 6, 9, 12, 15). Die Messwerte 2, 5, 8, 11 und 14 geben den Zeitpunkt ca. 6 Stunden nach der morgendlichen Insulin-Gabe an. * C57BL/6J: Messwert 1 (Tag 1, 8 Uhr morgens) vs. Messwert 16 (Tag 6, 8 Uhr morgens), $p < 0,05$; # ChREBP-KO: Messwert 1 (Tag 1, 8 Uhr morgens) vs. Messwert 16 (Tag 6, 8 Uhr morgens), $p < 0,001$; † C57BL/6J vs. ChREBP-KO, $p < 0,05$. Der graue Balken zeigt den normoglykämischen Bereich von 5 bis 16 mmol/l an. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. ChREBP-KO Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) – Knockout, WT Wildtyp, BZ Blutzucker, N Anzahl, NPH Neutrales-Protamin-Hagedorn, vs. versus.

Blutzuckervergleich von C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen und ChREBP-KO-Mäusen

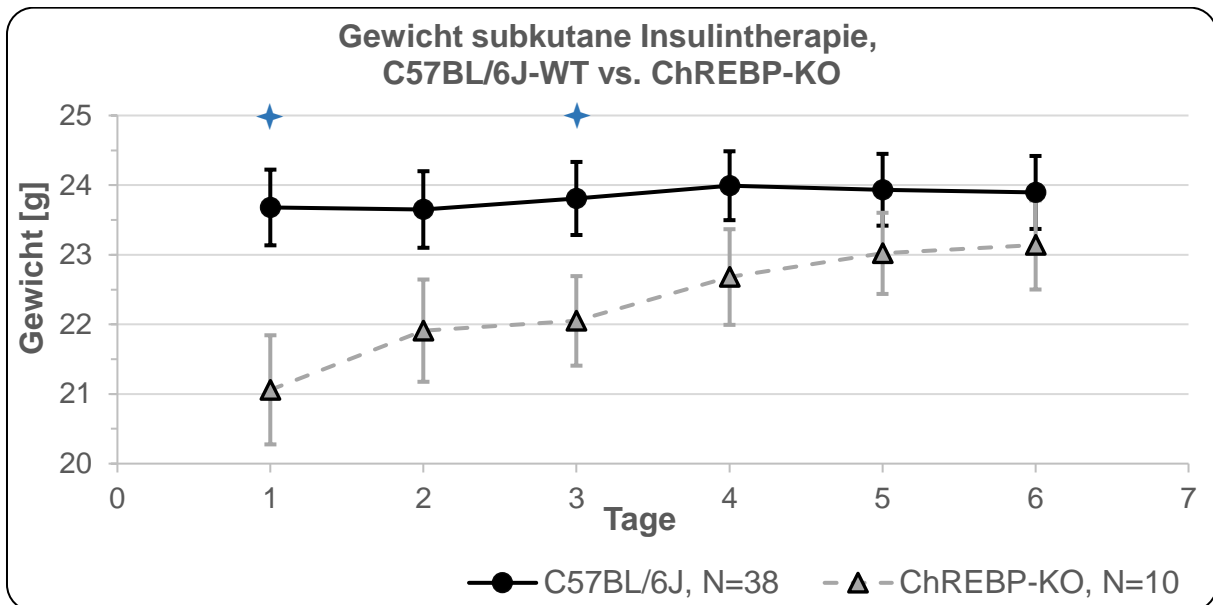
Signifikante Unterschiede zwischen beiden Stämmen zeigten sich jeweils um 8 Uhr morgens an den ersten beiden Tagen (siehe **Grafik 4**, Vergleiche Messwert 1_{Tag 1}, 8 Uhr WT vs. ChREBP-KO: $23,7 \pm 1,0$ mmol/l vs. $28,8 \pm 1,8$ mmol/l; Messwert 4_{Tag 2}, 8 Uhr WT vs. ChREBP-KO: $23,2 \pm 0,9$ mmol/l vs. $28,8 \pm 1,6$ mmol/l, $p < 0,05$).

Gewichtsverlauf und -vergleich von C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen und ChREBP-KO-Mäusen

Während der fünftägigen Insulintherapie bestanden im Verlauf keine signifikanten Gewichtsveränderungen. Die Körpergewichte hielten sich bei beiden Stämmen relativ konstant (siehe **Grafik 5**).

Die Tiere der ChREBP-KO-Gruppe wogen am ersten und dritten Tag während der Insulinbehandlung signifikant weniger als die der WT-Gruppe (siehe **Grafik 5**, Tag 1

WT vs. ChREBP-KO: $23,7 \pm 0,4$ g vs. $21,1 \pm 0,8$ g; Tag 3: $23,8 \pm 0,4$ g vs. $22,1 \pm 0,6$ g, $p < 0,05$).



Grafik 5: *Teilexperiment 1: Präoperative subkutane Insulintherapie. Gewichtsverlauf während der fünftägigen subkutanen Insulintherapie mit NPH-Insulin von C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen und ChREBP-KO-Mäusen. Die Insulininjektionen erfolgten täglich um 8 Uhr morgens mit einmal täglicher Gewichtsbestimmung und um 8 Uhr abends. ★ C57BL/6J vs. ChREBP-KO, $p < 0,05$. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. ChREBP-KO Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) – Knockout, WT Wildtyp, N Anzahl, NPH Neutrales-Protamin-Hagedorn, vs. versus.*

Komplikationen der subkutanen Insulintherapie

Der BZ unterlag sehr hohen Schwankungen mit häufigen, oft auch tödlich verlaufenden Hypoglykämien, so dass eine erhöhte Versuchstieranzahl notwendig wurde.

Insgesamt wurden für diesen Teilversuch 72 WT-Mäuse und 12 ChREBP-KO-Mäuse verwendet (siehe **Tabelle 3**). Bei den WT-Mäusen konnten 53 % (38 von 72) und bei den ChREBP-KO-Mäusen 83 % (10 von 12) in den Versuch aufgenommen werden (siehe **Tabelle 3**, $p < 0,05$).

Bei den WT-Mäusen starben 15 % (11 von 72) durch die subkutane Insulintherapie an einer Hypoglykämie. Zusätzlich waren 14 % (10 von 72) innerhalb der kurzen Zeit nicht therapierbar (Therapieresistenz), das heißt der Blutzuckerspiegel konnte innerhalb der fünf Tage nicht bis auf Werte unter 17 mmol/l gesenkt werden. Bei 3 %

(2 von 72) der WT-Tiere entwickelte sich auch nach zweimaliger Streptozotocingabe kein Diabetes. Die spätere Pankreasinseltransplantation überlebten 15 % (11 von 72) der WT-Tiere nicht. (siehe **Tabelle 3**)

Bei den ChREBP-KO-Mäusen starb kein Versuchstier an einer Hypoglykämie. Nicht therapierbar waren 8 % (1 von 12) der ChREBP-KO-Mäuse und 8 % (1 von 12) wurden auch nach zweimaliger Streptozotocingabe nicht diabetisch. Eine Pankreasinseltransplantation fand bei den ChREBP-KO-Mäusen nicht statt. (siehe **Tabelle 3**)

Übersicht über Versuchstierausfälle		
	C57BL/6J-WT (N= 72)	ChREBP-KO (N= 12)
Tod durch Hypoglykämie	11/72 (15 %)	0/12 (0 %)
Therapieresistenz	10/72 (14 %)	1/12 (8 %)
nicht diabetisch	2/72 (3 %)	1/12 (8 %)
Tod nach Transplantation	11/72 (15 %)	Keine Transplantation erfolgt
Aufnahme in Versuch	38/72 (53 %) *	10/12 (83 %) *

Tabelle 3: *Teilexperiment 1: Präoperative subkutane Insulintherapie. Komplikationen der subkutanen Insulintherapie mit Ursachen für den Ausschluss der Versuchstiere aus dem Versuch bei C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen und ChREBP-KO-Mäusen. * C57BL/6J vs. ChREBP-KO, $p < 0,05$. Die Daten sind als Absolutzahlen und in Klammern als prozentuale Werte angegeben. ChREBP-KO Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) – Knockout, WT Wildtyp, N Anzahl, vs. versus.*

3.2.2. Teilexperiment 2: Insulinsticktherapie

Blutzuckerverlauf

Blutzuckerverlauf von C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen

Bei den WT-Mäusen zeigte sich nach Implantation sowohl eines halben als auch eines ganzen Insulinsticks eine signifikante Blutzuckersenkung:

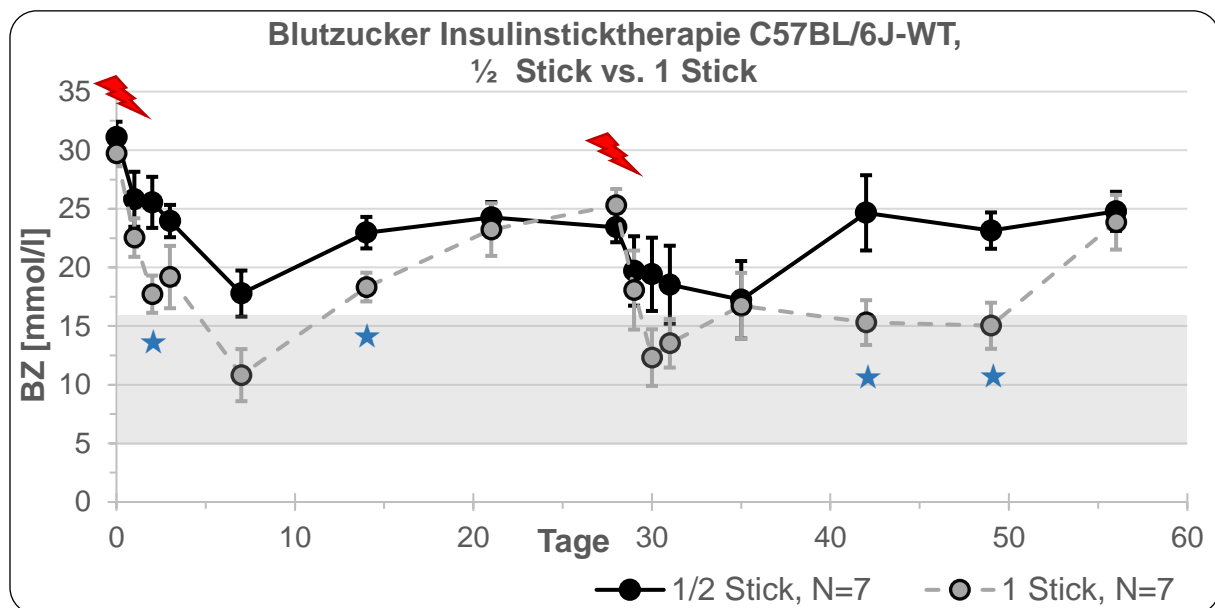
Der BZ nahm mit einem ganzen Stick bereits am ersten Tag nach der ersten Implantation (siehe **Grafik 6**, 1 Stick Tag 0 vs. Tag 1: $29,7 \pm 1,1$ mmol/l vs. $22,6 \pm 1,6$ mmol/l, $p < 0,05$) signifikant ab. Mit einem halben Stick dauerte dies 3 Tage (siehe **Grafik 6**, $\frac{1}{2}$ Stick Tag 0 vs. Tag 3: $31,1 \pm 1,3$ mmol/l vs. $24 \pm 1,4$ mmol/l, $p < 0,05$) nach der ersten Implantation.

Eine Woche nach der ersten Implantation sank der BZ sowohl bei einem ganzen als auch bei einem halben Insulinstick nicht weiter ab. Anschließend kam es wieder zu

einem signifikanten Blutzuckeranstieg mit einem halben Stick nach der dritten Woche (siehe **Grafik 6**, $\frac{1}{2}$ Stick Tag 7 vs. Tag 21: $17,8 \pm 2$ mmol/l vs. $24,3 \pm 1,3$ mmol/l, $p < 0,05$) und mit einem ganzen Stick bereits nach zwei Wochen (siehe **Grafik 6**, 1 Stick Tag 7 vs. Tag 14: $10,8 \pm 2,2$ mmol/l vs. $18,3 \pm 1,2$ mmol/l, $p < 0,05$).

Der BZ sank mit Implantation eines ganzen Insulinsticks teilweise in den normoglykämischen Bereich (siehe **Grafik 6**). Mit einem halben Insulinstick blieb der Blutzuckerspiegel für mindestens vier Wochen im milden hyperglykämischen Bereich (siehe **Grafik 6**, BZ zwischen 16 und 25 mmol/l).

Der Verlauf der Werte zeigte bei einem ganzen Stick höhere Schwankungen als bei einem halben Insulinstick (siehe **Grafik 6**).



Grafik 6: *Teilexperiment 2: Insulinsticktherapie. Blutzuckerungsverlauf von C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen während der Insulinsticktherapie für insgesamt 8 Wochen mit zweimaliger Implantation eines halben vs. eines ganzen Insulinsticks am Tag 0 und vier Wochen danach am Tag 28. ★ $\frac{1}{2}$ Stick vs. 1 Stick, $p < 0,05$. Der graue Balken zeigt den normoglykämischen Bereich von 5 bis 16 mmol/l an. Das Blitz-Symbol zeigt den Zeitpunkt der Stickimplantationen an. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. BZ Blutzucker, WT Wildtyp, N Anzahl, vs. versus.*

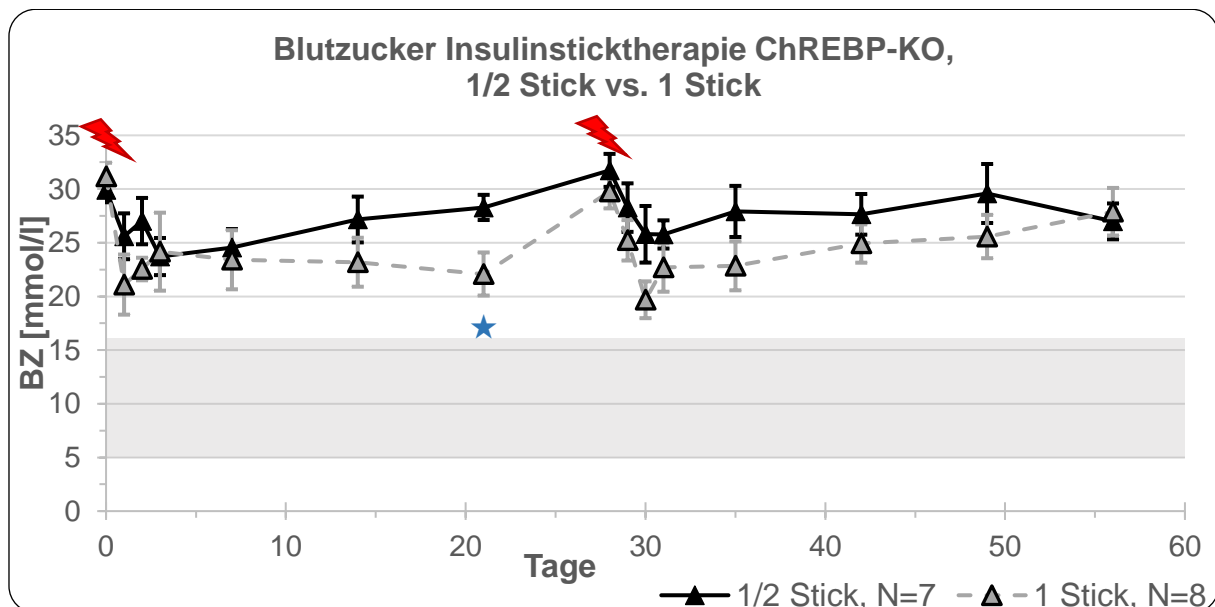
Blutzucker Verlauf von ChREBP-KO-Mäusen

Auch bei den ChREBP-KO-Mäusen zeigte sich nach Implantation eines halben und eines ganzen Insulinsticks eine signifikante Abnahme des Blutzuckerspiegels:

Nach Implantation eines halben Insulinsticks sank der BZ signifikant ab dem dritten Tag (siehe **Grafik 7**, ½ Stick Tag 0 vs. Tag 3: $29,9 \pm 1,1$ mmol/l vs. $23,7 \pm 1,7$ mmol/l, $p < 0,05$) und bei einem ganzen Insulinstick bereits am zweiten Tag (siehe **Grafik 7**, 1 Stick Tag 0 vs. Tag 2: $31,2 \pm 1,3$ mmol/l vs. $22,6 \pm 1,1$ mmol/l, $p < 0,05$) nach der ersten Insulinstickgabe.

Daraufhin erhöhte sich der BZ wieder tendenziell (siehe **Grafik 7**, n.s.).

Der Blutzuckerspiegel der ChREBP-KO-Mäuse hielt sich mit Behandlung eines ganzen Insulinsticks für mindestens zwei Wochen im milden hyperglykämischen Bereich (siehe **Grafik 7**, BZ zwischen 16 und 25 mmol/l). Mit Behandlung eines halben Insulinsticks waren die Werte meist über 25 mmol/l (siehe **Grafik 7**).



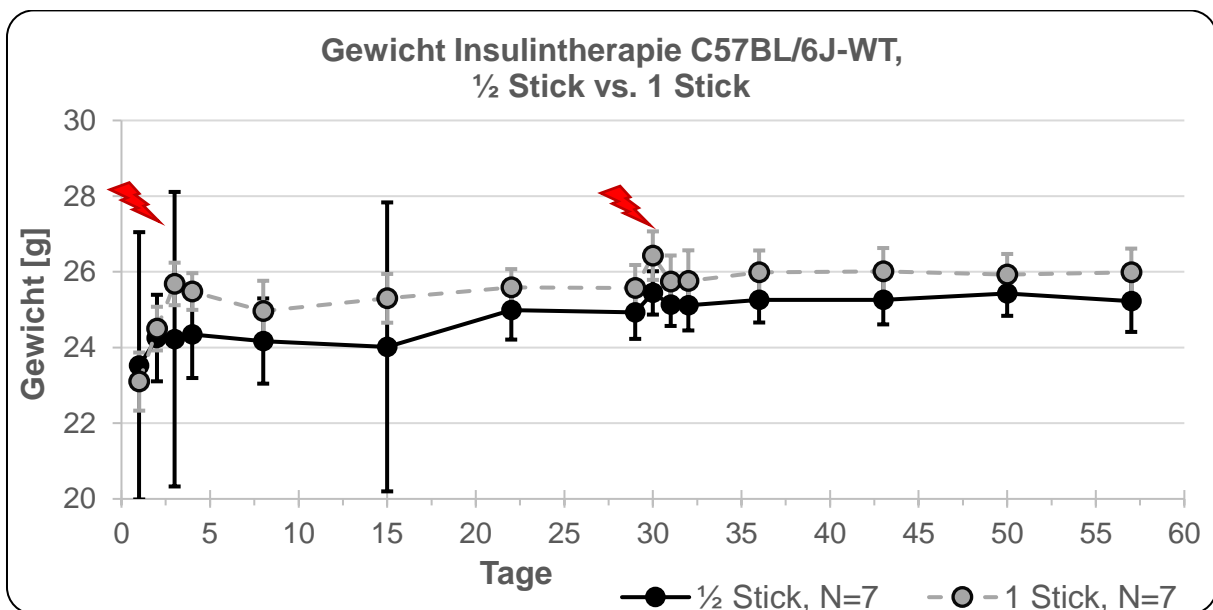
Grafik 7: Teilerperiment 2: Insulinsticktherapie. Blutzucker Verlauf von ChREBP-KO-Mäusen während der Insulinsticktherapie für insgesamt 8 Wochen mit zweimaliger Implantation eines halben vs. eines ganzen Insulinstick am Tag 0 und vier Wochen danach am Tag 28. ★ ½ Stick vs. 1 Stick, $p < 0,05$. Der graue Balken zeigt den normoglykämischen Bereich von 5 bis 16 mmol/l an. Das Blitz-Symbol zeigt den Zeitpunkt der Stickimplantationen an. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. ChREBP-KO Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) – Knockout, BZ Blutzucker, N Anzahl, vs. versus.

Gewichtsverlauf

Gewichtsverlauf von C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen

Nach Gabe eines halben Insulinsticks stieg bei den WT-Mäusen das Körpergewicht direkt nach der Gabe tendenziell an und blieb dann konstant (siehe **Grafik 8**, ½ Stick Tag 0 vs. Tag 1: $23,5 \pm 3,5$ g vs. $24,3 \pm 1,1$ g, n.s.).

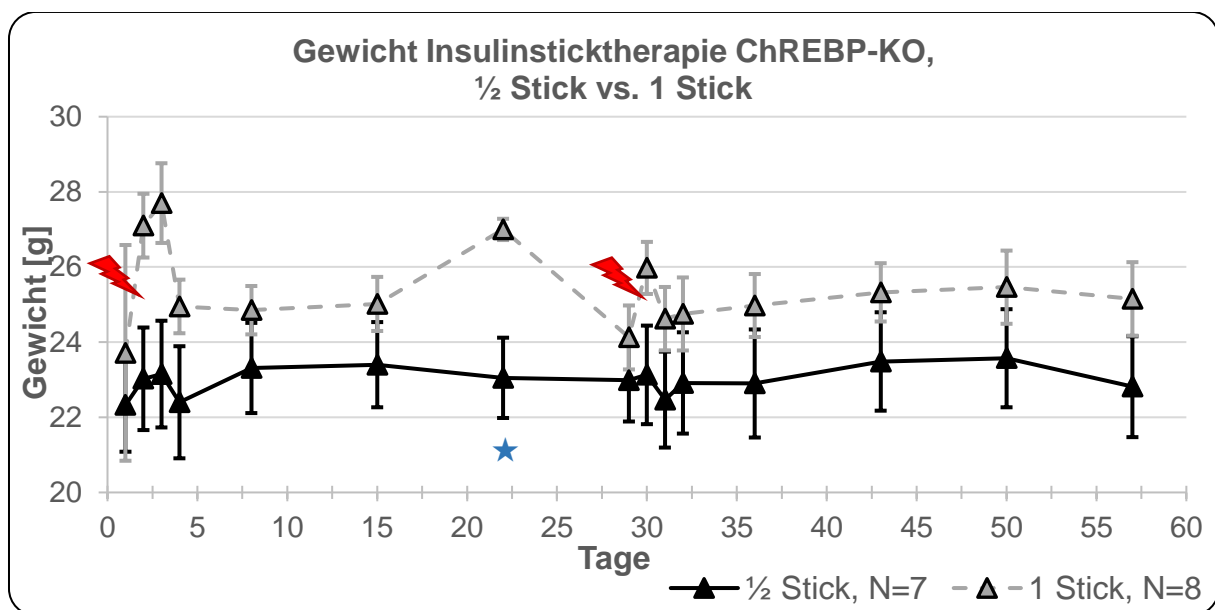
Die Behandlung mit einem ganzen Stick bewirkte am zweiten Tag eine signifikante Gewichtszunahme (siehe **Grafik 8**, 1 Stick Tag 0 vs. Tag 2: $23,1 \pm 0,8$ g vs. $25,7 \pm 0,6$ g, $p < 0,05$).



Grafik 8: Teilerperiment 2: Insulinsticktherapie. Gewichtsverlauf von C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen während der Insulinsticktherapie für insgesamt 8 Wochen mit zweimaliger Implantation eines halben vs. eines ganzen Insulinsticks am Tag 0 und vier Wochen danach am Tag 28. Das Blitz-Symbol zeigt den Zeitpunkt der Stickimplantationen an. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. WT Wildtyp, N Anzahl, vs. versus.

Gewichtsverlauf von ChREBP-KO-Mäusen

Bei den ChREBP-KO-Mäusen hielt sich das Körpergewicht bei Implantation eines halben Insulinsticks weitestgehend konstant (siehe **Grafik 9**, n.s.). Die Implantation eines ganzen Insulinsticks bewirkte nach drei Wochen eine signifikante Gewichtszunahme (siehe **Grafik 9**, 1 Stick Tag 0 vs. Tag 21: $23,7 \pm 2,9$ g vs. $27 \pm 0,3$ g, $p < 0,05$).



Grafik 9: Telexperiment 2: Insulinsticktherapie. Gewichtsverlauf von ChREBP-KO-Mäusen während der Insulinsticktherapie für insgesamt 8 Wochen mit zweimaliger Implantation eines halben vs. eines ganzen Insulinsticks am Tag 0 und vier Wochen danach am Tag 28. Das Blitz-Symbol zeigt den Zeitpunkt der Stickimplantationen an. ★ ½ Stick vs. 1 Stick, $p < 0,05$. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. ChREBP-KO Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) – Knockout, N Anzahl, vs. versus.

Komplikationen der Insulinsticktherapie

Bei der Implantation der Insulinsticks starben 2 von 16 WT- und 1 von 16 ChREBP-KO-Mäuse (siehe **Tabelle 4**).

Komplikationen nach der Insulinsticktherapie		
	C57BL/6J-WT (N= 16)	ChREBP-KO (N= 16)
Tod nach Stickimplantation	2/16 (12,5 %)	1/16 (6,3 %)
Aufnahme in Versuch	87,5 %	93,8 %

Tabelle 4: Telexperiment 2: Insulinsticktherapie. Komplikationen der Insulinsticktherapie mit Ausschluss der Versuchstiere aus dem Versuch bei C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen und ChREBP-KO-Mäusen. C57BL/6J vs. ChREBP-KO, n.s. Die Daten sind als Absolutzahlen und in Klammern als prozentuale Werte angegeben. ChREBP-KO Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) – Knockout, WT Wildtyp, N Anzahl, vs. versus.

Bei einigen Versuchstieren konnten nach Tötung narbig abgekapselte Sticks im Nackenbereich festgestellt werden (2 von 14 WT-Mäuse und 2 von 15 ChREBP-KO-Mäuse). Eine Entzündung bestand jedoch nicht. Diese Komplikation wird in der Produktinformation der Insulinsticks beschrieben und ist auf mit implantierte Hautgewebs- und/ oder Haarreste zurückzuführen [74]. Da die Wirkung der abgekapselten Sticks abrupt nachlässt, wurde an einer anderen Stelle ein neuer Stick implantiert.

3.2.3. Vergleich subkutane Insulintherapie mit Insulinstick-Therapie:

Ein direkter Vergleich der Methoden zur exogenen Insulinzufuhr kann nicht erfolgen, da die Austestung der Methoden unter unterschiedlichen Aspekten erfolgte:

Die subkutane Therapie im ersten Telexperiment erfolgte präoperativ zur Pankreasinseltransplantation mit dem Ziel eine Normoglykämie zu erreichen.

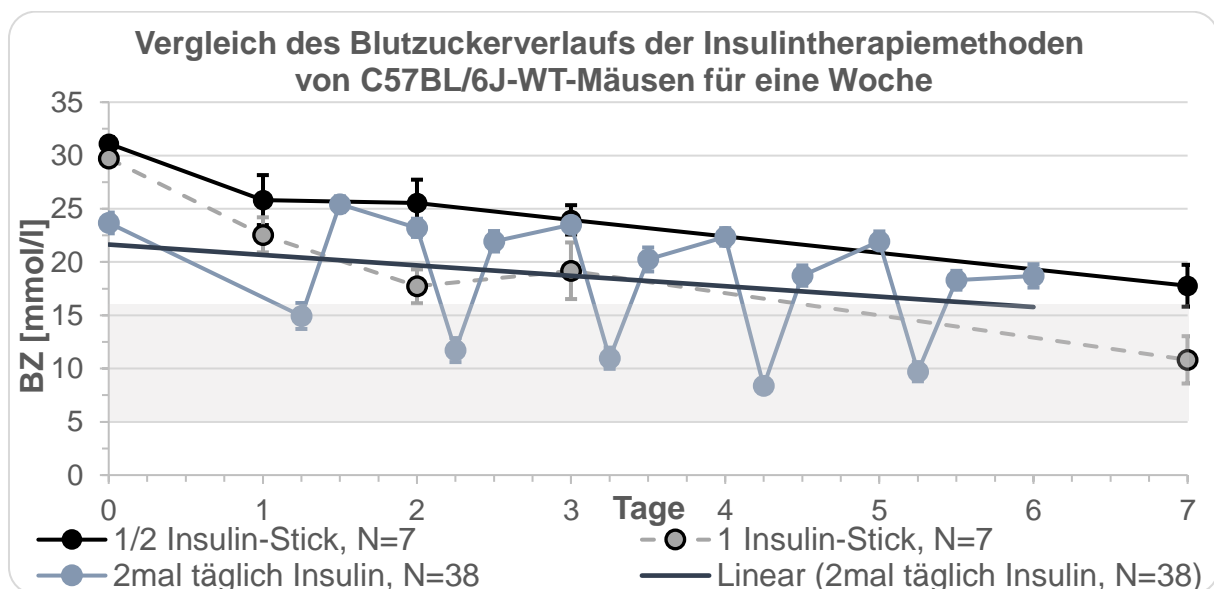
Die Insulinsticktherapie im zweiten Telexperiment hatte das Ziel, bei den Langzeitversuchen exzessiv hohe Blutzuckerspiegel nach der Pankreasinseltransplantation zu vermeiden und das Gesamtüberleben der Tiere zu verlängern. Eine milde Hyperglykämie sollte bestehen bleiben, damit die transplantierten Pankreasinseln zur Insulinbildung und -sekretion stimuliert werden.

Blutzucker Verlauf

Die Blutzuckermessungen erfolgten bei der subkutanen Therapie dreimal täglich und bei der Insulinsticktherapie einmal täglich.

C57BL/6J-Wildtyp-Mäuse

Bei beiden Methoden fiel bei den WT-Mäusen ein sinkender Blutzuckerspiegel auf (siehe **Grafik 10**). Der Verlauf des Blutzuckerspiegels bei der Insulinsticktherapie mit einem ganzen Stick ähnelte tendenziell dem der subkutanen Therapie - hervorgehoben durch eine Trendlinie in **Grafik 10**.

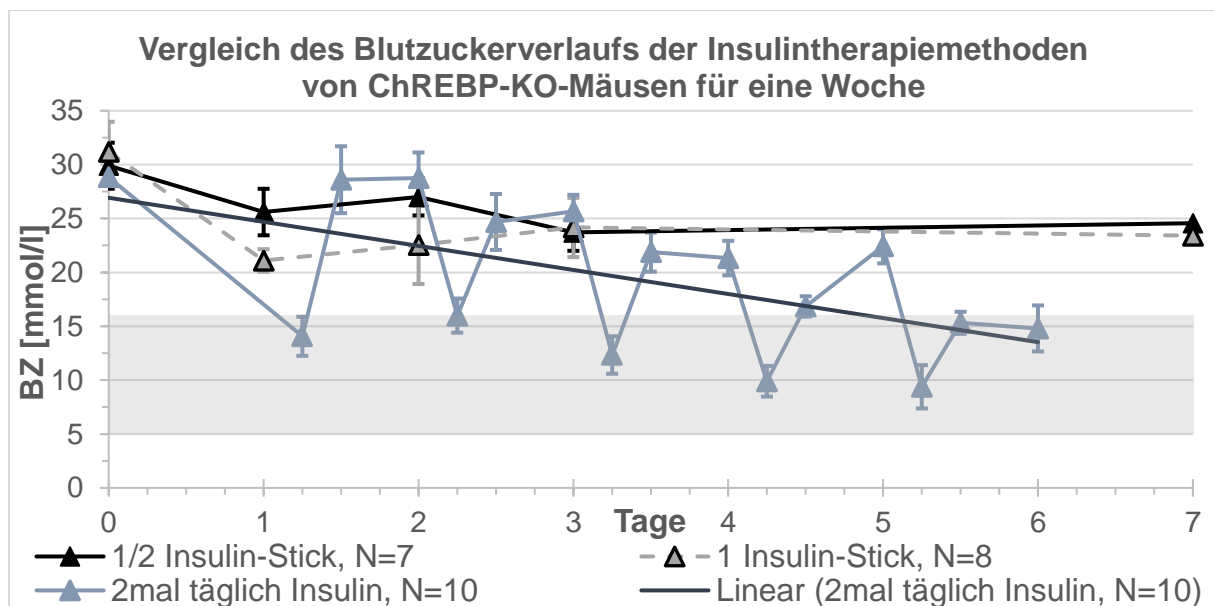


Grafik 10: Vergleich des Blutzuckerspiegels zwischen der subkutanen Insulintherapie (aus dem ersten Telexperiment, 2mal täglich Insulin) und der Insulinsticktherapie (aus dem zweiten Telexperiment) von C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen für eine Woche. Für die subkutane Therapie wurde zusätzlich eine lineare Trendlinie in die Grafik eingefügt. Der graue Balken zeigt den normoglykämischen Bereich von 5 bis 16 mmol/l an. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. BZ Blutzucker, WT Wildtyp, N Anzahl.

ChREBP-KO-Mäuse

Innerhalb einer Woche zeigte sich bei der subkutanen Insulintherapie eine stärkere Abnahme des BZs als bei der Insulinsticktherapie beider angewendeter Mengen (siehe **Grafik 11**, Trendlinie der subkutanen Therapie). Es besteht ein signifikanter Unterschied (Differenz des Blutzuckers vor der Insulinbehandlung und etwa eine Woche danach) zwischen der subkutanen Insulintherapie und der Insulinsticktherapie mit Implantation eines halben Insulinsticks (siehe **Grafik 11**, Differenz Tag 0 und Tag 6 bzw. Tag 7, 2mal täglich Insulin vs. ½ Stick: $14 \pm 1,9$ mmol/l vs. $5,3 \pm 0,9$ mmol/l, $p < 0,05$).

Bei der Sticktherapie sank der BZ in dieser Zeit nur leicht und erreichte nicht den normoglykämischen Bereich (siehe **Grafik 11**).



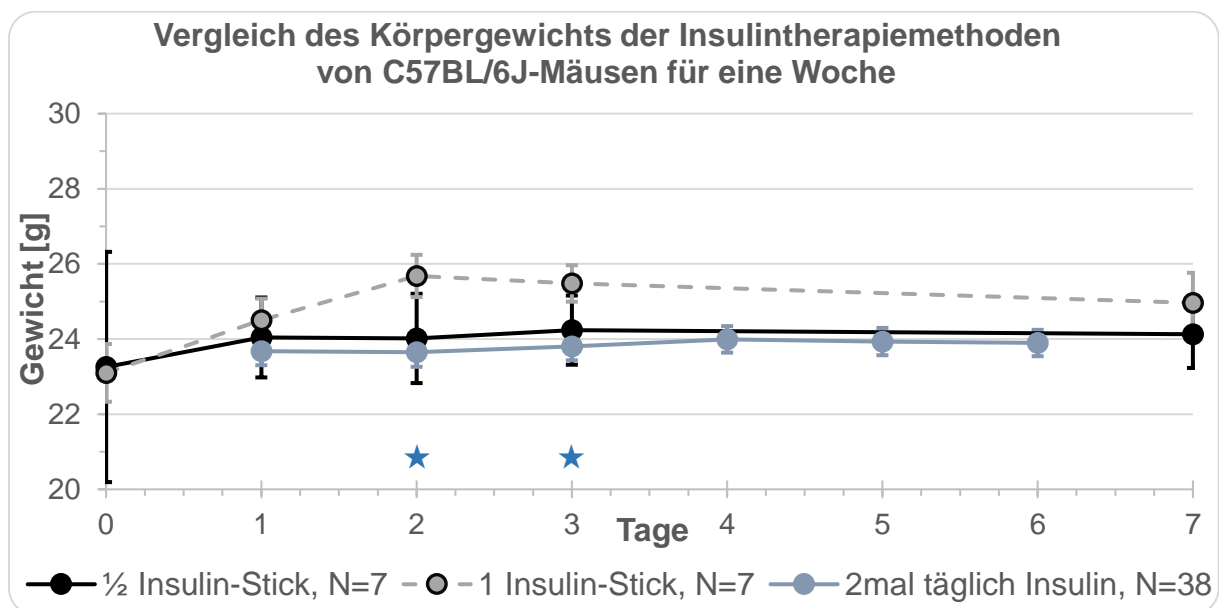
Grafik 11: Vergleich des Blutzuckerspiegels zwischen der subkutanen Insulintherapie (aus dem ersten Telexperiment, 2mal täglich Insulin) und der Insulinsticktherapie (aus dem zweiten Telexperiment) von ChREBP-KO-Mäusen für eine Woche. Für die subkutane Therapie wurde zusätzlich eine lineare Trendlinie in die Grafik eingefügt. Der graue Balken zeigt den normoglykämischen Bereich von 5 bis 16 mmol/l an. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. ChREBP-KO Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) – Knockout, BZ Blutzucker, N Anzahl.

Gewichtsverlauf

C57BL/6J-Wildtyp-Mäuse

Beim Vergleich der subkutanen Therapie mit der Insulinsticktherapie unter Verwendung eines halben Sticks waren die Körpergewichte der WT-Mäuse weitestgehend gleich.

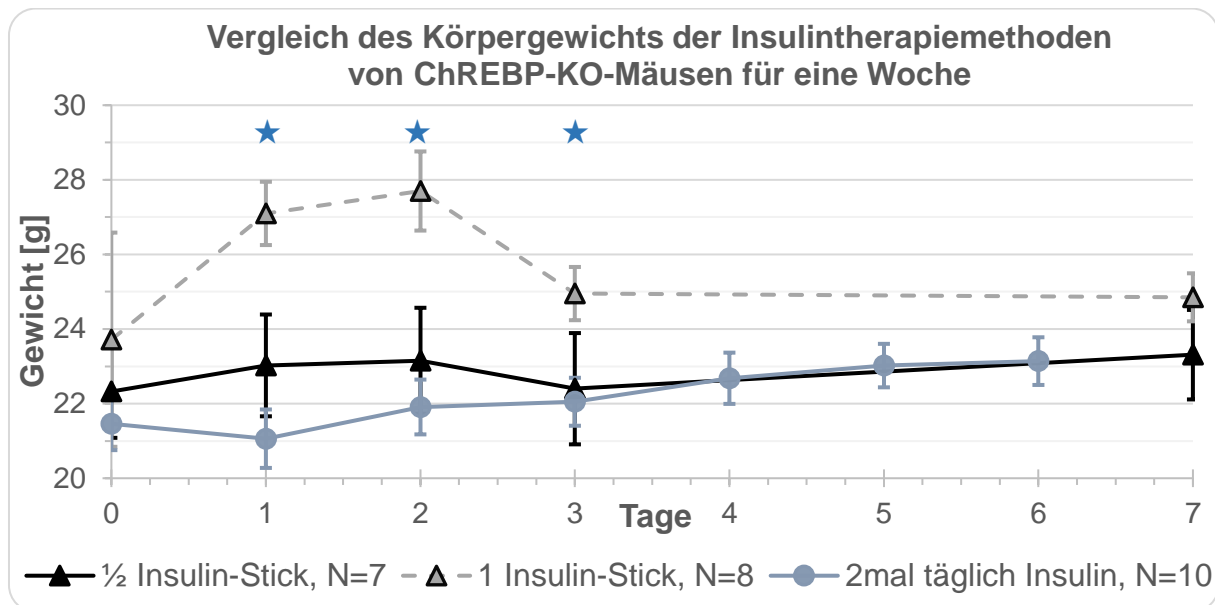
Unter Verwendung eines ganzen Insulinsticks zeigten sich signifikant höhere Gewichte im Vergleich zur subkutanen Therapie am zweiten und dritten Tag der Behandlung (siehe **Grafik 12**, 1 Stick vs. subkutane Therapie, Tag 2: $25,7 \pm 0,6$ g vs. $23,7 \pm 0,4$ g; Tag 3: $25,5 \pm 0,5$ g vs. $23,8 \pm 0,4$ g, $p < 0,05$).



Grafik 12: Vergleich des Körpergewichts zwischen der subkutanen Insulintherapie (aus dem ersten Telexperiment, 2mal täglich Insulin) und der Insulinsticktherapie (aus dem zweiten Telexperiment) von C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen für eine Woche. ★ 1 Insulin-Stick vs. 2mal täglich Insulin (subkutane Insulintherapie), $p < 0,05$. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. N Anzahl, vs. versus.

ChREBP-KO-Mäuse

Bei den ChREBP-KO-Mäusen bestanden signifikant höhere Körpergewichte bei der Insulinsticktherapie unter Verwendung eines ganzen Insulinsticks im Vergleich zu der subkutanen Insulintherapie am ersten und am dritten Tag (siehe **Grafik 13**, 1 Stick vs. subkutane Therapie, Tag 1: $27,1 \pm 0,8$ g vs. $21,1 \pm 0,8$ g; Tag 3: $25 \pm 0,7$ g vs. $22,1 \pm 0,6$ g; $p < 0,05$).



Grafik 13: Vergleich des Körpergewichts zwischen der subkutanen Insulintherapie (aus dem ersten Telexperiment, 2mal täglich Insulin) und der Insulinsticktherapie (aus dem zweiten Telexperiment) von ChREBP-KO-Mäusen für eine Woche. ★ 1 Insulin-Stick vs. 2mal täglich Insulin (subkutane Insulintherapie), $p < 0,05$. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. ChREBP-KO Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) – Knockout, N Anzahl, vs. versus.

3.3. Telexperiment 1: Pankreasinseltransplantation (TX)

3.3.1. Blutzuckerverlauf

C57BL/6J-Wildtyp-Mäuse mit und ohne TX

TX vs. \emptyset TX innerhalb der 1. Woche

Der Blutzuckerspiegel der WT-Mäuse sank nach der Pankreasinseltransplantation signifikant in den normoglykämischen Bereich (5 bis 16 mmol/l) von $17,5 \pm 1,5$ mmol/l (Tag 0) auf $13,1 \pm 1,2$ mmol/l (Tag 1) ab (siehe **Grafik 14**, $p < 0,05$). Nach einer Woche erhöhte sich der BZ wieder signifikant auf $18,4 \pm 1,3$ mmol/l (siehe **Grafik 14**, $p < 0,05$).

Nach Beendigung der Insulintherapie ohne Transplantation war bei den WT-Kontrollgruppen (\emptyset TX) ein solcher Blutzuckerabfall nicht zu verzeichnen.

TX vs. \emptyset TX innerhalb von vier Wochen

Nach vier Wochen nahm der Blutzuckerspiegel der nicht transplantierten WT-Kontroll-Mäuse signifikant von $20,1 \pm 1,6$ mmol/l (Tag 0) auf $28,2 \pm 0,9$ mmol/l zu (Tag 28) (siehe **Grafik 14**). Im Vergleich nahm der BZ der transplantierten WT-Mäuse nach vier Wochen auf $23,9 \pm 1,5$ mmol/l (Tag 28) zwar auch signifikant, aber dennoch geringer zu und überstieg damit nicht 25 mmol/l (siehe **Grafik 14**, $p < 0,05$).

Blutzuckervergleich mit und ohne TX

Signifikante Unterschiede zwischen den beiden WT-Gruppen zeigten sich nach einem Tag (WT mit TX vs. ohne TX: $13,1 \pm 1,2$ mmol/l vs. $20,0 \pm 1,5$ mmol/l) sowie nach einer Woche (WT mit TX vs. ohne TX: $18,4 \pm 1,3$ mmol/l vs. $24,5 \pm 1,2$ mmol/l) und nach 4 Wochen (WT mit TX vs. ohne TX: $23,9 \pm 1,5$ mmol/l vs. $28,2 \pm 0,9$ mmol/l) (siehe **Grafik 14**, $p < 0,05$).

Kontrolltiere ohne TX (WT- und ChREBP-KO-Mäuse)

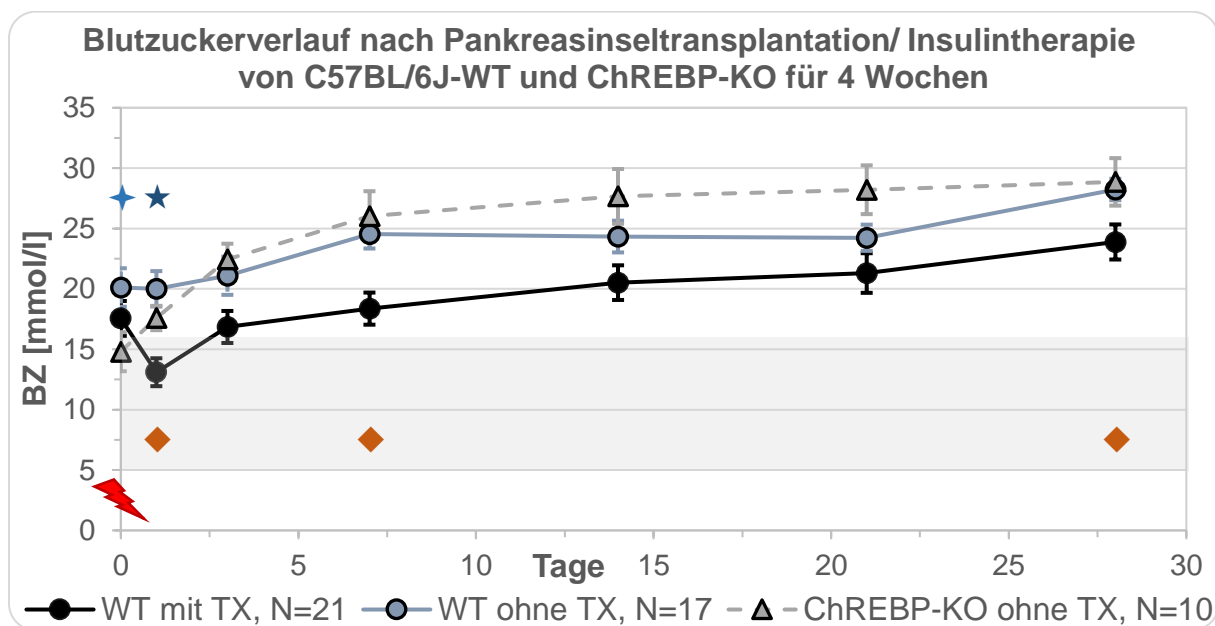
WT vs. ChREBP-KO innerhalb der 1. Woche

Der Blutzuckerspiegel der WT-Kontrolltiere, also ohne Transplantation, erhöhte sich eine Woche nach Beendigung der Insulintherapie signifikant von $20,1 \pm 1,6$ mmol/l (Tag 0) auf $24,5 \pm 1,2$ mmol/l (Tag 7) (siehe **Grafik 14**, $p < 0,05$). Bei den ChREBP-KO-Kontrolltieren nahm dieser bereits nach drei Tagen von $17,6 \pm 1,0$ mmol/l (Tag 0) auf $22,4 \pm 1,3$ mmol/l (Tag 3) signifikant zu (siehe **Grafik 14**, $p < 0,05$).

WT vs. ChREBP-KO innerhalb von vier Wochen

Die Kontrolltiere beider Stämme verhielten sich in diesen vier Wochen im Verlauf sehr ähnlich, ein signifikanter Unterschied bestand nur direkt nach Beendigung der Insulintherapie (siehe **Grafik 14**, Tag 0 WT-Kontrolle vs. ChREBP-KO-Kontrolle: $20,1 \pm 1,6$ mmol/l vs. $17,6 \pm 1,0$ mmol/l, $p < 0,05$).

Außerdem erhöhte sich der Blutzuckerspiegel am dritten Tag nach der Insulintherapie bei den ChREBP-KO-Mäusen signifikant von $17,6 \pm 1,0$ mmol/l auf $22,4 \pm 1,3$ mmol/l, bei den WT-Kontrolltieren erst nach einer Woche von $20,1 \pm 1,6$ mmol/l (Tag 0) auf $24,5 \pm 1,2$ mmol/l (Tag 7) (siehe **Grafik 14**, $p < 0,05$).



Grafik 14: Teilexperiment 1: Verlauf des Blutzuckerspiegels nach Pankreasinseltransplantation bzw. nach Beendigung der fünftägigen subkutanen Insulintherapie von C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen und ChREBP-KO-Mäusen für vier Wochen. ♦ C57BL/6J, TX vs. øTX, $p < 0,05$; ★ Kontrolltiere øTX, C57BL/6J-WT vs. ChREBP-KO, $p < 0,05$; ★ C57BL/6J-WT mit TX, vor TX vs. 1 Tag nach TX, $p < 0,05$. Das Blitz-Symbol zeigt den Zeitpunkt der Pankreasinseltransplantation am Tag 0 an. Der graue Balken zeigt den normoglykämischen Bereich von 5 bis 16 mmol/l an. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. ChREBP-KO Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) – Knockout, BZ Blutzucker, WT Wildtyp, TX Pankreasinseltransplantation, N Anzahl, vs. versus.

3.3.2. Gewichtsverlauf

C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen mit und ohne TX

TX vs. Ø TX innerhalb der 1. Woche

Die transplantierten WT-Mäuse verzeichneten eine signifikante Gewichtsabnahme ein Tag und drei Tage nach Transplantation (siehe **Grafik 15**, WT mit TX, Tag 0 vs. Tag 1: $23,7 \pm 0,5$ g vs. $22,0 \pm 0,5$ g, Tag 0 vs. Tag 3: $23,7 \pm 0,5$ g vs. $22,2 \pm 0,5$ g, jeweils $p < 0,05$).

Eine solche signifikante Gewichtsabnahme trat bei der WT-Kontrollgruppe nicht auf.

TX vs. Ø TX innerhalb von vier Wochen

Zwei Wochen nach der Transplantation nahm die transplantierte Gruppe wieder signifikant an Gewicht zu, bis zum Erreichen des Ausgangsgewichts vor der Transplantation von $23,7 \pm 0,5$ g (siehe **Grafik 15**, WT mit TX, Tag 1 vs. Tag 14: $22,0 \pm 0,5$ g vs. $23,4 \pm 0,5$ g, $p < 0,05$).

Die nicht transplantierten WT-Mäuse hielten ihr Gewicht nach Beendigung der Insulintherapie konstant.

Gewichtvergleich mit und ohne TX

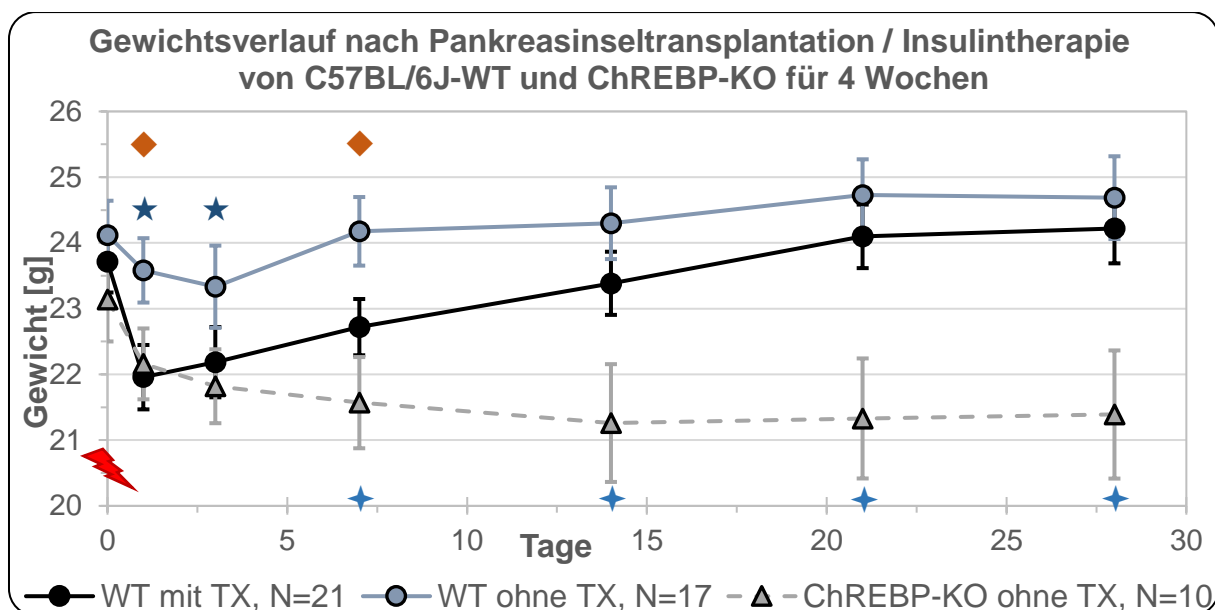
Im Vergleich zu den transplantierten WT-Mäusen bestanden am ersten Tag und nach einer Woche signifikante Gewichtsunterschiede (siehe **Grafik 15**, WT mit TX vs. WT ohne TX Tag 1: $22,0 \pm 0,5$ g vs. $23,6 \pm 0,5$ g; Tag 7: $22,7 \pm 0,4$ g vs. $24,2 \pm 0,5$ g, $p < 0,05$).

Kontrollgruppen ohne TX (WT- und ChREBP-KO-Mäuse)

Beide Kontrollgruppen hielten ihr Gewicht nach Beendigung der Insulintherapie konstant. Eine signifikante Gewichtsabnahme trat nach Beendigung der Insulintherapie bei beiden Stämmen ohne Pankreasinseltransplantation nicht auf.

Gewichtvergleich der Kontrollgruppen ohne TX (WT- und ChREBP-KO-Mäuse)

Signifikante Gewichtsunterschiede zwischen den beiden Kontrollgruppen bestanden nach einer bis vier Wochen (siehe **Grafik 15**, Kontrolle WT vs. ChREBP-KO, 1. Woche: $24,2 \pm 0,5$ g vs. $21,6 \pm 0,7$ g, 2. Woche: $24,3 \pm 0,5$ g vs. $21,3 \pm 0,9$ g, 3. Woche: $24,7 \pm 0,5$ g vs. $21,3 \pm 0,9$ g, 4. Woche: $24,7 \pm 0,6$ g vs. $21,4 \pm 1,0$ g, jeweils $p < 0,05$).



Grafik 15: Telexperiment 1: Gewichtsverlauf nach Pankreasinseltransplantation bzw. nach Beendigung der fünftägigen subkutanen Insulintherapie von C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen und ChREBP-KO-Mäusen für vier Wochen. ♦ C57BL/6J, TX vs. øTX, $p < 0,05$; ★ Kontrolltiere øTX, C57BL/6J-WT vs. ChREBP-KO, $p < 0,05$; ★ C57BL/6J-WT mit TX, vor TX vs. 1 Tag nach TX, $p < 0,05$. Das Blitz-Symbol zeigt den Zeitpunkt der Pankreasinseltransplantation am Tag 0 an. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. ChREBP-KO Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) – Knockout, WT Wildtyp, TX Pankreasinseltransplantation, N Anzahl, vs. versus.

3.4. Histologie

3.4.1. Teilexperiment 1: Subkutane Insulintherapie

Hauptgruppe: C57BL/6J-Wildtyp, diabetisch nach Streptozotocin-Gabe, subkutane Insulintherapie, Pankreasinseltransplantation, Alter 4 Wochen

Im Abstromgebiet der transplantierten Pankreasinseln ließen sich bei 7 von 21 (33,3 %) der transplantierten WT-Mäuse gut abgrenzbare hellzellige Leberherde (sog. clear cell foci, CCF) nachweisen (siehe **Abbildung 5a**).

Diese CCF bestanden aus veränderten Hepatozyten, welche ein helles, in der PAS-Reaktion PAS-positives glykogenreiches Zytoplasma aufwiesen mit kleintropfigen Fettvakuolen (siehe **Abbildung 5a bis d**). Die Zellkerne waren vergrößert mit vergrößertem Kernchromatin. Vereinzelt sah man auch Mitosen (siehe **Abbildung 5b**).

Die **Abbildungen 5e und f** zeigen, dass die Proliferationsaktivität (BrdU-Labeling-Index) in den Herden im Vergleich zu den benachbarten Hepatozyten erhöht war.

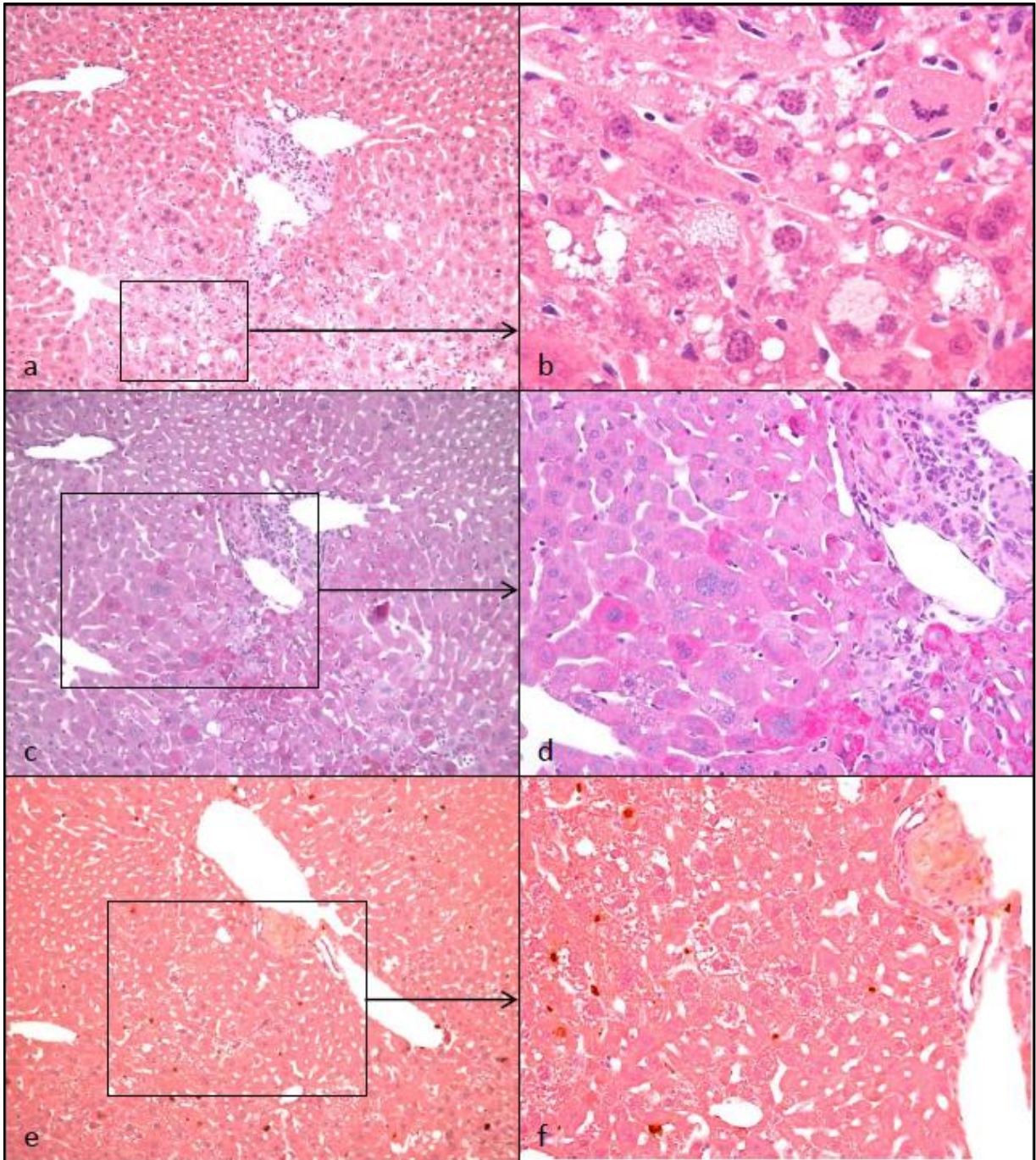


Abbildung 5: Teilexperiment 1: a-f Clear Cell Foci einer diabetischen C57BL/6J-Wildtyp-Maus mit präoperativer fünftägiger subkutaner Insulintherapie 4 Wochen nach Pankreasinseltransplantation mit transplanteder Insel in einer Portalvene (siehe **Abbildung 6**). a und b HE-Färbung; c und d PAS-Reaktion; e und f BrdU/ Eosin-Immundefärbung. a, c und e Länge der unteren Bildkante 0,87 mm; b Länge der unteren Bildkante 0,22 mm; d und f Länge der unteren Bildkante 0,44 mm. HE Hämatoxylin-Eosin, PAS Periodsäure-Schiff, BrdU Bromdesoxyuridin.

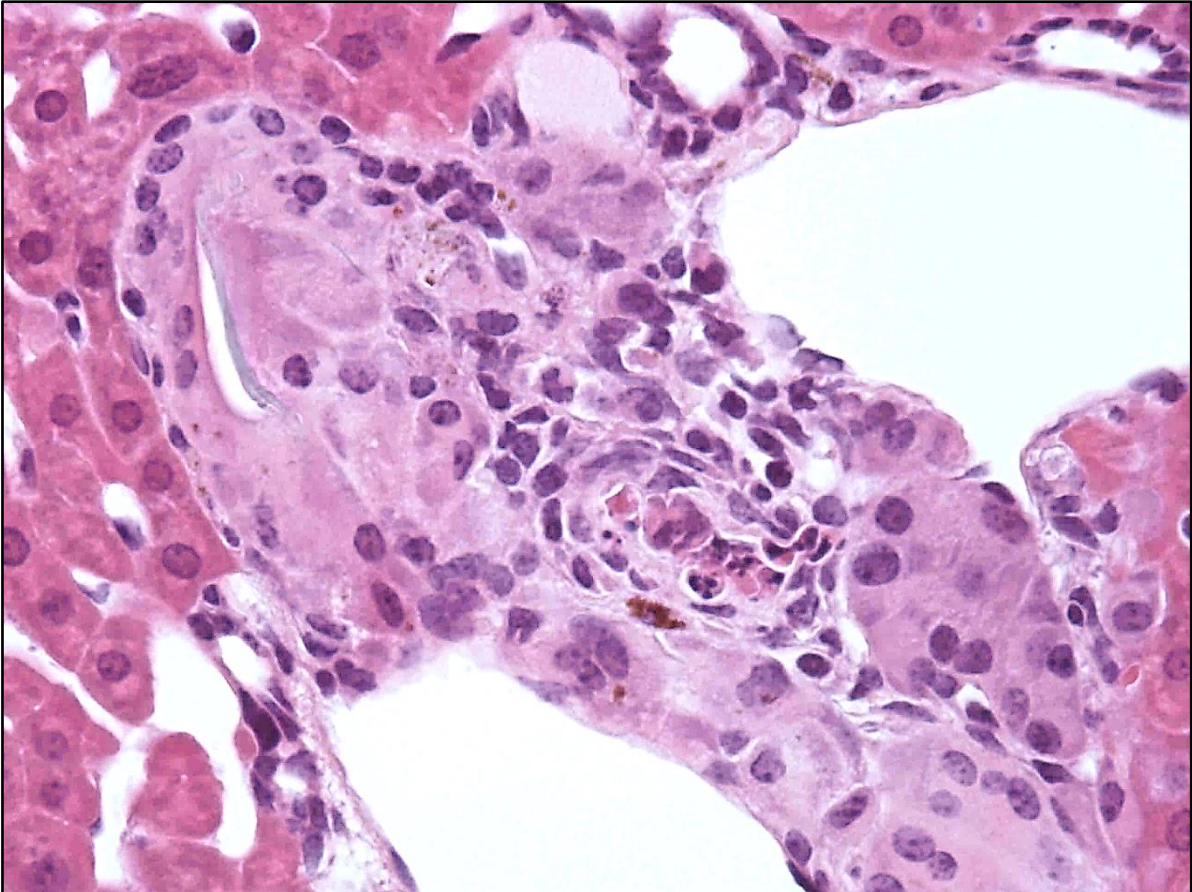


Abbildung 6: Telexperiment 1: Transplantierte Pankreasinsel in einer Portalvene bei einer C57BL/6J-Wildtyp-Maus 4 Wochen nach Pankreasinseltransplantation, Vergrößerung aus Abbildung 5. HE-Färbung. Länge der unteren Bildkante 0,22 mm. HE Hämatoxylin-Eosin.

WT-Kontrollgruppe: C57BL/6J-Wildtyp, diabetisch nach Streptozotocin-Gabe, subkutane Insulintherapie, Alter 4 Wochen

Die nicht transplantierten, diabetischen und für fünf Tage subkutan mit Insulin behandelte WT-Mäuse zeigten nach vier Wochen nur geringe Veränderungen in der Leber. Der Glykogengehalt der Hepatozyten in der PAS-Reaktion war vermindert (siehe **Abbildung 7**).

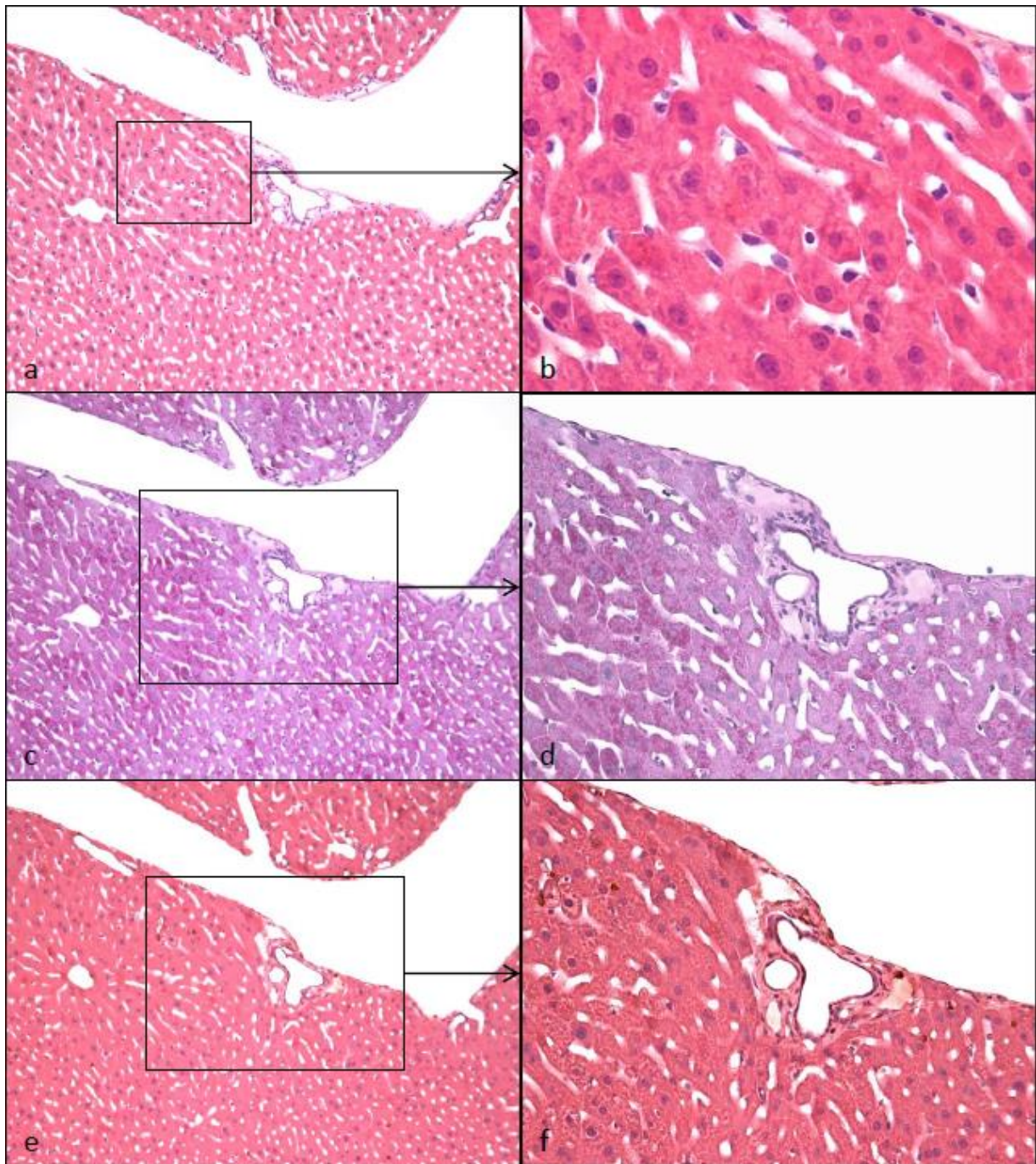


Abbildung 7: Teilexperiment 1: a-f diabetische C57BL/6J-Wildtyp-Maus mit fünftägiger subkutaner Insulintherapie 4 Wochen nach Beendigung der Therapie. a und b HE-Färbung; c und d PAS-Reaktion; e und f BrdU/ Eosin-Immunfärbung. a, c und e Länge der unteren Bildkante 0,87 mm; b Länge der unteren Bildkante 0,22 mm; d und f Länge der unteren Bildkante 0,44 mm. HE Hämatoxylin-Eosin, PAS Periodsäure-Schiff, BrdU Bromdesoxyuridin.

ChREBP-KO-Kontrollgruppe: ChREBP-KO, diabetisch nach Streptozotcin-Gabe, subkutane Insulintherapie, Alter 4 Wochen

Bei 90 % der ChREBP-KO-Kontrollgruppe (9 von 10) wies die gesamte Leber eine vermehrte Glykogenspeicherung auf (dargestellt in der PAS-Reaktion, siehe **Abbildung 8c** und **8d**).

Innerhalb dieser diffusen Glykogenose zeigten sich zusätzlich ohne stattgehabte Pankreasinseltransplantation hellzellige Veränderungen in der Leber (siehe **Abbildung 8**). Diese Veränderungen traten betont perivenulär bzw. innerhalb der Azinuszone 3 der Leber auf (siehe **Abbildung 8**).

Die Hepatozyten waren zum Teil balloniert mit sehr glykogenreichem Zytoplasma (siehe **Abbildung 8a** und **8b**). Der Zellkern war nicht vergrößert und durch die enorme Glykogenspeicherung an den Rand der Zelle gedrängt (siehe **Abbildung 8b**).

Dazwischen konnten zum Teil begleitende Entzündungsinfiltrate nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 8b**). Eine Verfettung bestand nicht. Zusätzlich sah man auch einige Glykogenlochkerne.

Es bestand insgesamt eine erhöhte Proliferationsaktivität im Vergleich zu den nichttransplantierten Wildtyp-Mäusen (Vergleich **Abbildung 8e** und **8f** mit **Abbildung 7e** und **7f**).

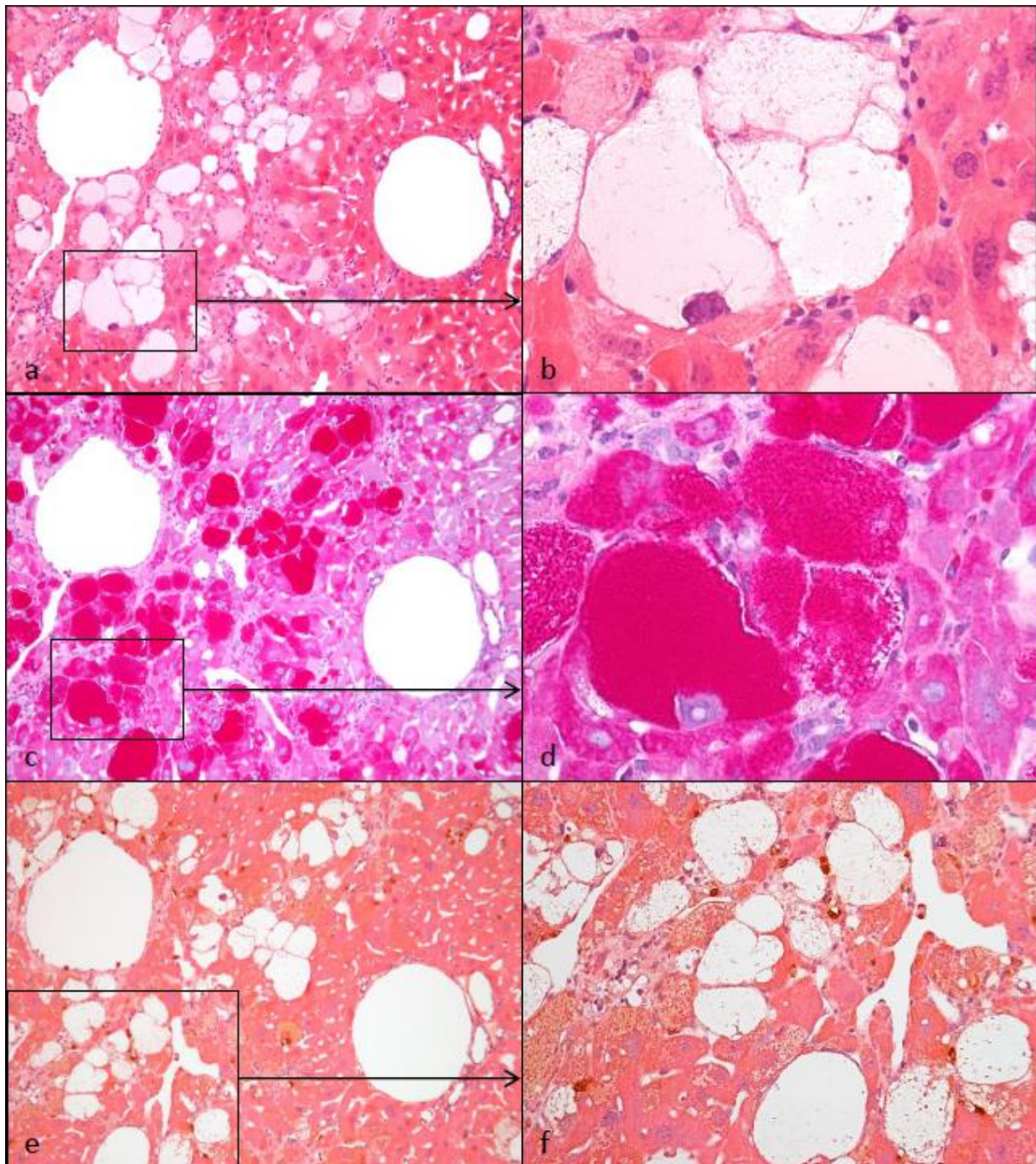


Abbildung 8: Telexperiment 1: a-f diffuse Glykogenose einer diabetischen ChREBP-KO-Maus mit fünftägiger subkutaner Insulintherapie 4 Wochen nach Beendigung der Therapie. a und b HE-Färbung; c und d PAS-Reaktion; e und f BrdU/ Eosin-Immunfärbung. a, c und e Länge der unteren Bildkante 0,87 mm; b und d Länge der unteren Bildkante 0,22 mm; f Länge der unteren Bildkante 0,44 mm. ChREBP-KO Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) – Knockout, HE Hämatoxylin-Eosin, PAS Periodsäure-Schiff, BrdU Bromdesoxyuridin.

3.4.2. Teilexperiment 2: Insulinsticktherapie

C57BL/6J-Wildtyp, diabetisch nach Streptozotocin-Gabe, Insulinsticktherapie, Alter 8 Wochen

Nach acht Wochen zeigte sich bei den WT-Mäusen im Rahmen der Insulinsticktherapie histomorphologisch normales Leberparenchym mit einem verminderten Glykogengehalt (siehe **Abbildung 9**).

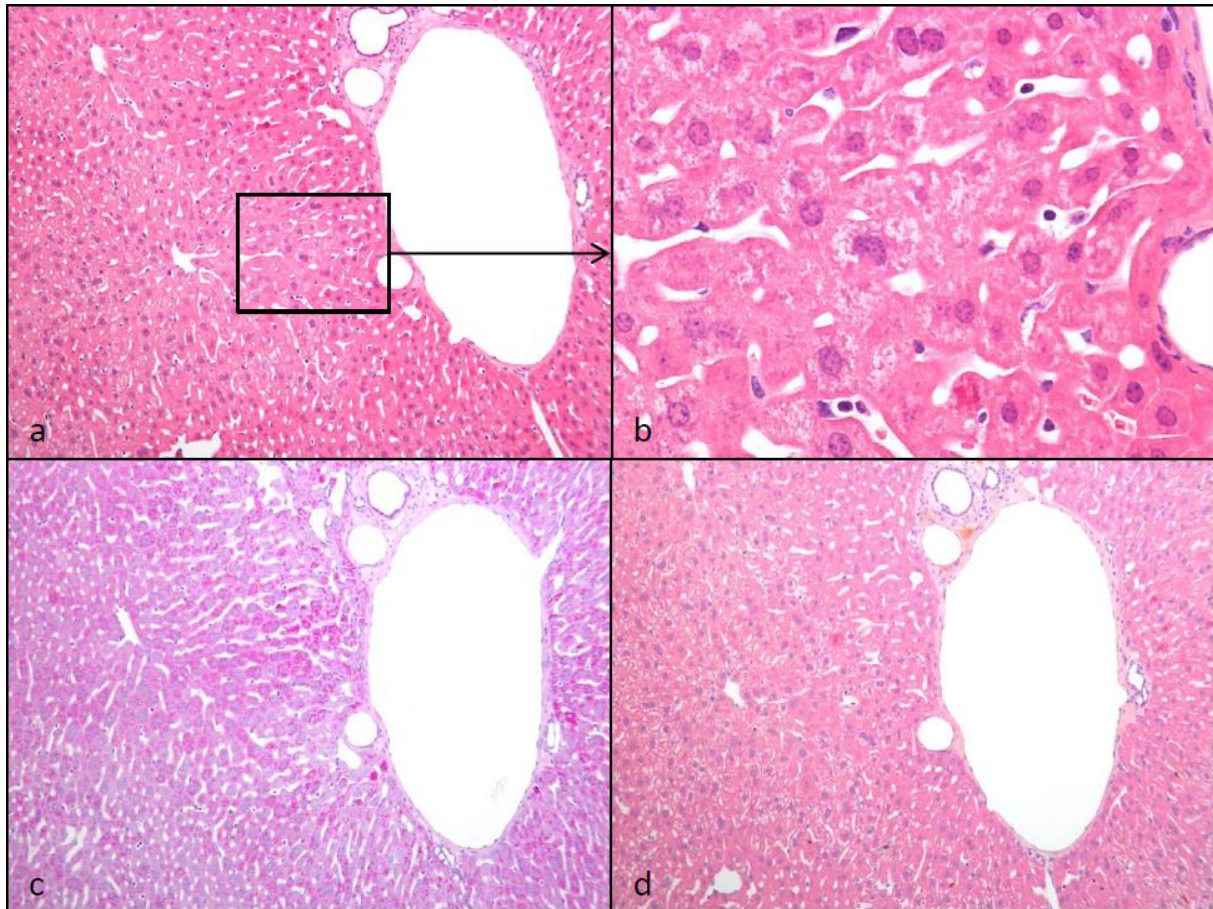


Abbildung 9: *Teilexperiment 2: a-d Unverändertes Leberparenchym einer diabetischen C57BL/6J-Wildtyp-Maus im Alter von 8 Wochen mit zweimaliger Insulinsticktherapie für jeweils 4 Wochen. a und b HE-Färbung; c PAS-Reaktion; d BrdU/ Eosin-Immunfärbung. a, c und d Länge der unteren Bildkante 0,87 mm; b Länge der unteren Bildkante 0,22 mm. HE Hämatoxylin-Eosin, PAS Periodsäure-Schiff, BrdU Bromdesoxyuridin.*

ChREBP-KO, diabetisch nach Streptozotocin-Gabe, Insulinsticktherapie, Alter 8 Wochen

Bei 13 % (2 von 15) der Tiere bestand wieder eine spontane diffuse Glykogenose mit einer leichten Entzündungsreaktion und auffallend vielen Glykogenlochkernen (siehe **Abbildung 10**).

Bei 73 % der Mäuse (11 von 15) konnte eine herdförmige Glykogenose nachgewiesen werden, die wieder perivenulär lokalisiert war (siehe **Abbildung 10**). Innerhalb dieser Glykogenoseveränderungen zeigte sich ebenfalls eine leichte Entzündungsreaktion (siehe **Abbildung 10**). Auffallend war auch hier das vermehrte Aufkommen von Hepatozyten mit Glykogenlochkernen (siehe Kreis-Inlet in **Abbildung 10b**).

Innerhalb dieser herdförmigen Glykogenose war die Proliferationsaktivität im Vergleich zu dem nicht veränderten Leberparenchym erhöht (siehe **Abbildung 10d**).

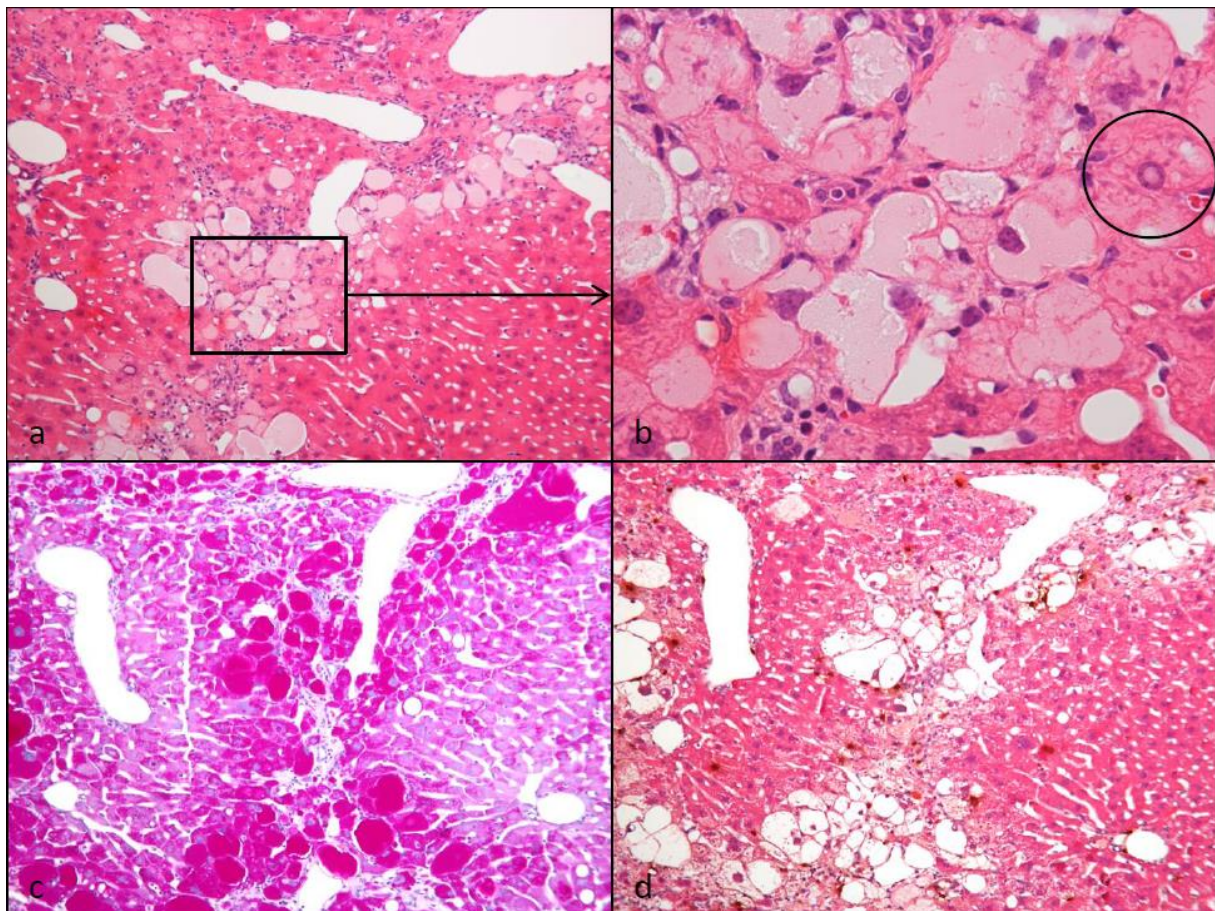


Abbildung 10: Telexperiment 2: a-d Diffuse Glykogenose einer diabetischen ChREBP-KO-Maus im Alter von 8 Wochen mit zweimaliger Insulinsticktherapie für jeweils 4 Wochen mit Entzündungsreaktion und Hepatozyten mit Glykogenlochkernen (siehe Kreis-Inlet). a und b HE-Färbung; c PAS-Reaktion; d BrdU/ Eosin-Immunfärbung. a, c und d Länge der unteren Bildkante 0,87 mm; b Länge der unteren Bildkante 0,22 mm. ChREBP-KO Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) – Knockout, HE Hämatoxylin-Eosin, PAS Periodsäure-Schiff, BrdU Bromdesoxyuridin.

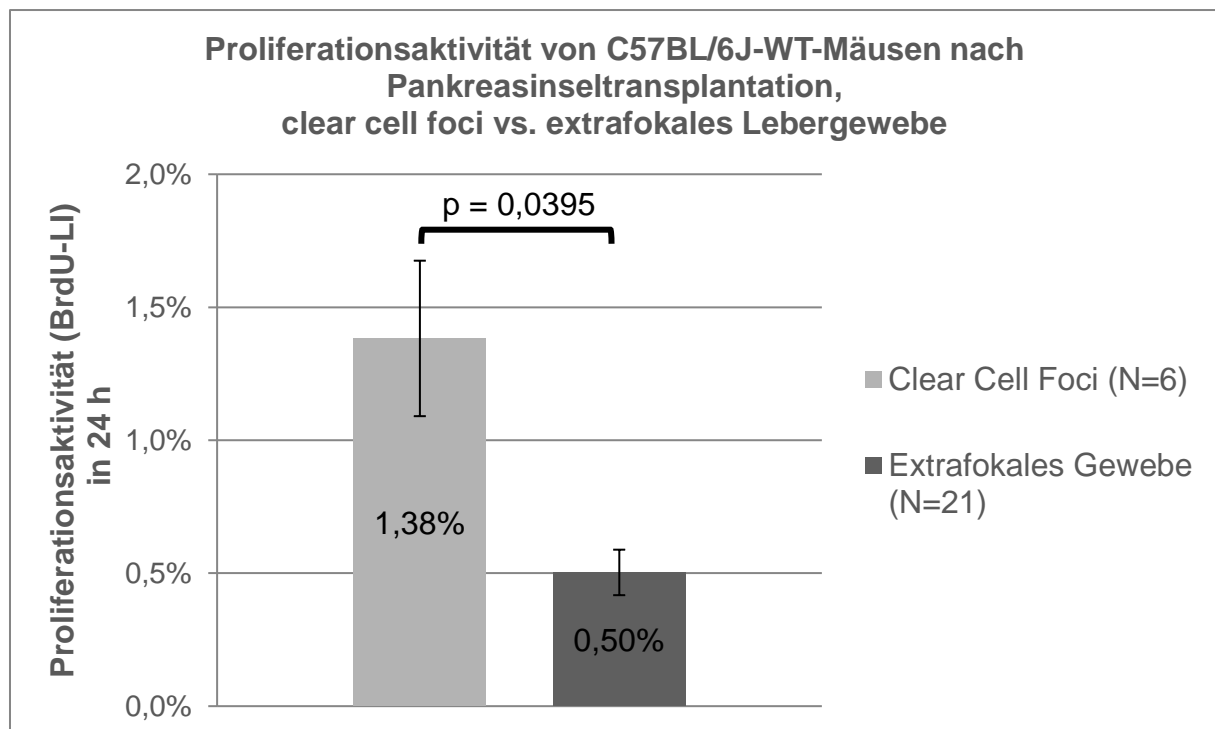
3.5. 24h-Proliferationsaktivität (BrdU-Labeling-Index)

3.5.1. Teilexperiment 1: Subkutane Insulintherapie

C57BL/6J-Wildtyp-Mäuse mit und ohne Pankreasinseltransplantation

Vergleich CCF vs. extrafokales Lebergewebe

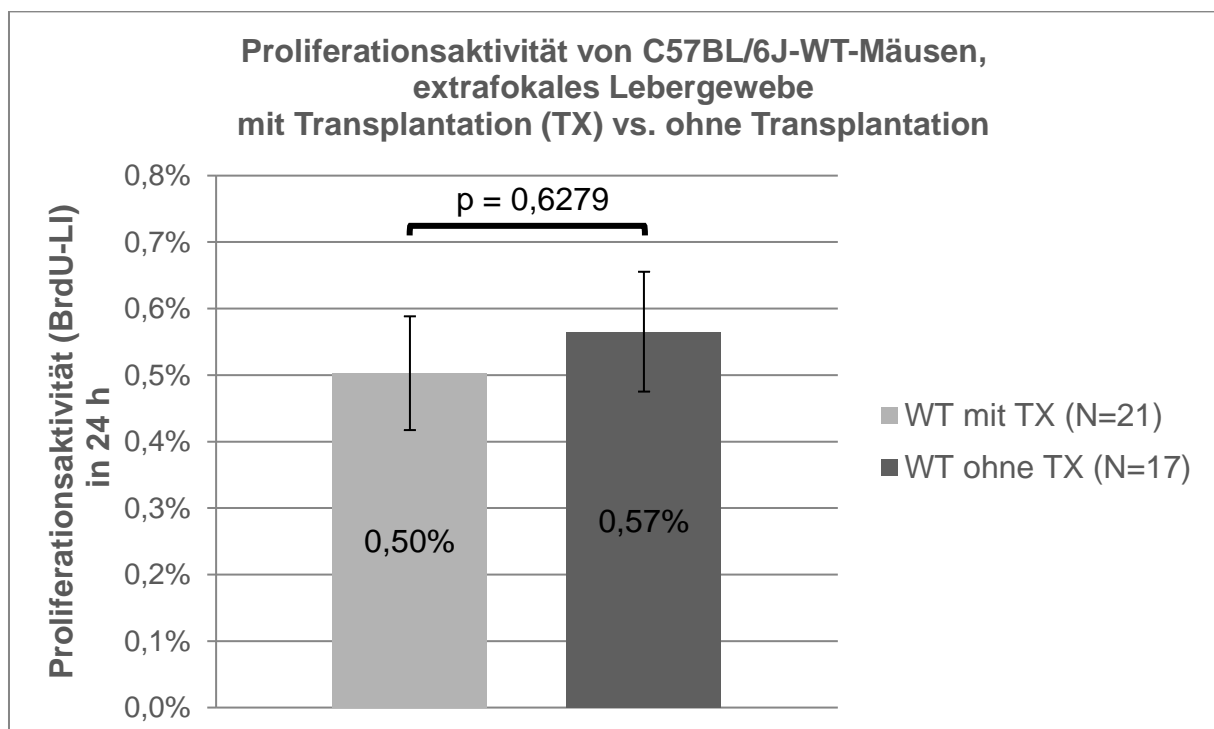
Bei den transplantierten WT-Mäusen (N= 21) war die 24h-Proliferationsaktivität (BrdU-Labeling-Index) in den CCF (N=6) mit $1,38 \pm 0,29$ % im Vergleich zum extrafokalen Lebergewebe (N=21) mit $0,5 \pm 0,09$ % signifikant erhöht (siehe **Grafik 16**, $p < 0,05$; die Daten im Text sind als Mittelwert \pm SEM angegeben).



Grafik 16: Teilexperiment 1: Proliferationsaktivität (BrdU-LI) in 24 Stunden [%]: clear cell foci im Vergleich zum extrafokalen Lebergewebe bei diabetischen C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen 4 Wochen nach Pankreasinseltransplantation mit fünftägiger präoperativer subkutaner Insulintherapie; clear cell foci vs. extrafokales Lebergewebe. Balkendiagramm mit Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM, p-Wert oberhalb der Klammer, $p < 0,5$. SEM Standardfehler des Mittelwerts, WT Wildtyp, vs. versus, BrdU Bromdesoxyuridin, BrdU-LI BrdU-Labeling-Index, N Anzahl, vs. versus.

Vergleich extrafokales Lebergewebe mit vs. ohne Transplantation

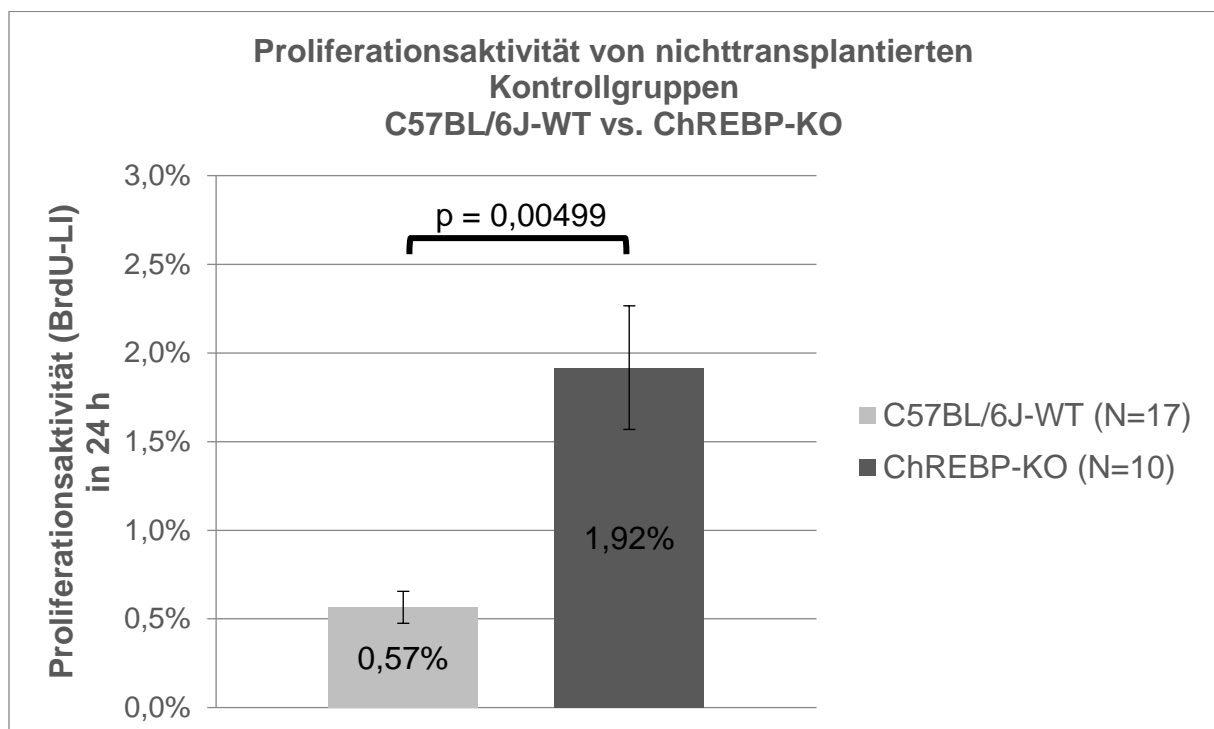
Die 24h-Proliferationsaktivität (BrdU-Labeling-Index) des extrafokalen Leberparenchyms der transplantierten WT-Mäuse mit $0,5 \pm 0,09$ % (N=21) zeigte im Vergleich zu den nicht-transplantierten WT-Mäusen mit $0,57 \pm 0,09$ % (N=17) keine signifikanten Unterschiede auf (siehe **Grafik 17**; die Daten im Text sind als Mittelwert \pm SEM angegeben).



Grafik 17: Teilexperiment 1: Proliferationsaktivität (BrdU-LI) in 24 Stunden [%]: Extrafokales Lebergewebe bei C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen 4 Wochen nach Pankreasinseltransplantation mit fünftägiger präoperativer subkutaner Insulintherapie im Vergleich zum extrafokalen Lebergewebe bei C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen 4 Wochen nach Beendigung der fünftägigen subkutanen Insulintherapie ohne erfolgter Pankreasinseltransplantation. Balkendiagramm mit Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM, p-Wert oberhalb der Klammer, n.s. SEM Standardfehler des Mittelwerts, n.s. nicht signifikant, WT Wildtyp, BrdU Bromdesoxyuridin, BrdU-LI BrdU-Labeling-Index, TX Pankreasinseltransplantation, N Anzahl.

C57BL/6J-WT- und ChREBP-KO-Mäuse ohne Pankreasinseltransplantation

Bei den nicht-transplantierten Kontrollgruppen war die 24h-Proliferationsaktivität (BrdU-Labeling-Index) bei den ChREBP-KO-Mäusen mit überwiegend spontaner Glykogenose mit $1,92 \pm 0,35$ % (N=10) signifikant höher als im Lebergewebe nicht transplantierte WT-Mäuse mit $0,57 \pm 0,09$ % (N=17) (siehe **Grafik 18**, $p < 0,05$; die Daten im Text sind als Mittelwert \pm SEM angegeben).

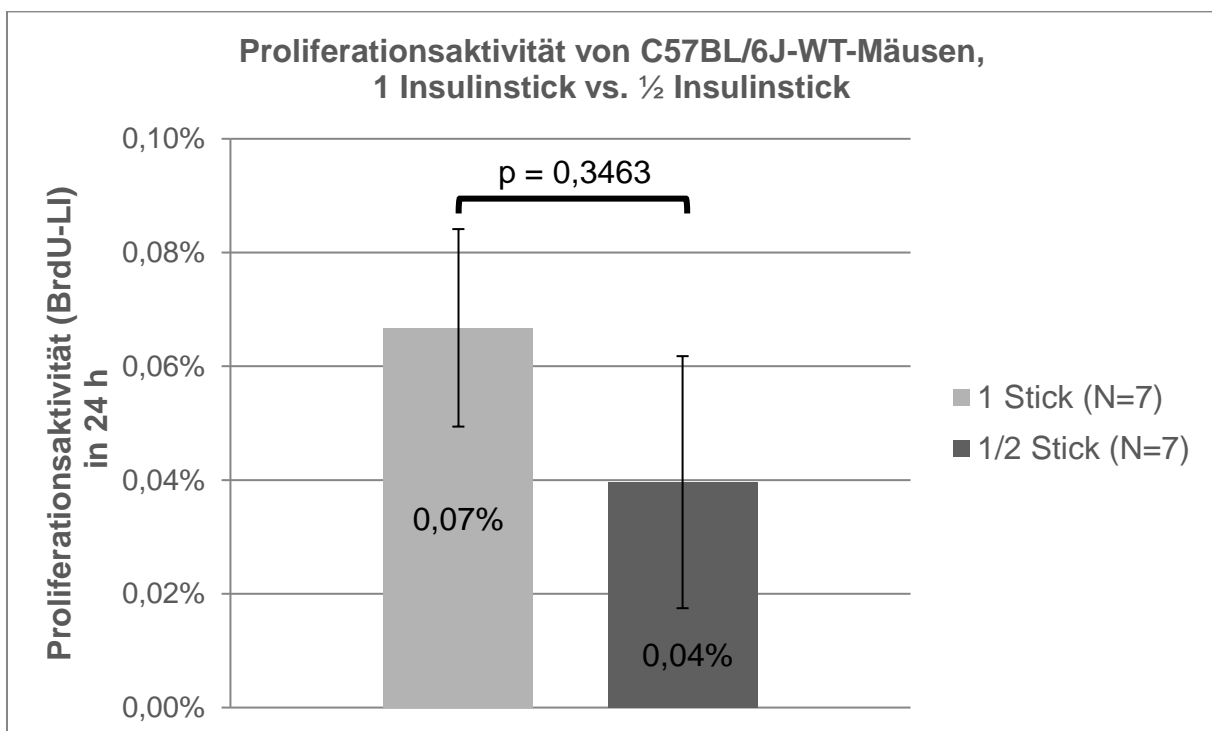


Grafik 18: Teilexperiment 1: Proliferationsaktivität (BrdU-LI) in 24 Stunden [%]: Lebergewebe nichttransplantierte C57BL/6J-Wildtyp-Mäuse 4 Wochen nach Beendigung der fünftägigen subkutanen Insulintherapie im Vergleich zum Lebergewebe mit überwiegend spontaner Glykogenose nichttransplantierte ChREBP-KO-Mäuse 4 Wochen nach Beendigung der fünftägigen subkutanen Insulintherapie; C57BL/6J-WT vs. ChREBP-KO. Balkendiagramm mit Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM, p-Wert oberhalb der Klammer, $p < 0,5$. SEM Standardfehler des Mittelwerts, WT Wildtyp, ChREBP-KO Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) – Knockout, vs. versus, BrdU Bromdesoxyuridin, BrdU-LI BrdU-Labeling-Index, N Anzahl, vs. versus.

3.5.2. Teilexperiment 2: Insulinsticktherapie

C57BL/6J-Wildtyp-Mäuse

Die 24h-Proliferationsaktivität (BrdU-Labeling-Index) der WT-Mäuse bei zweimaliger Implantation eines ½ Insulinsticks für insgesamt 8 Wochen wies mit $0,04 \pm 0,0002$ % (N=7) keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den WT-Mäusen bei zweimaliger Implantation eines ganzen Insulinsticks mit $0,07 \pm 0,0002$ % (N=7) auf (siehe **Grafik 19**, die Daten im Text sind als Mittelwert \pm SEM angegeben).

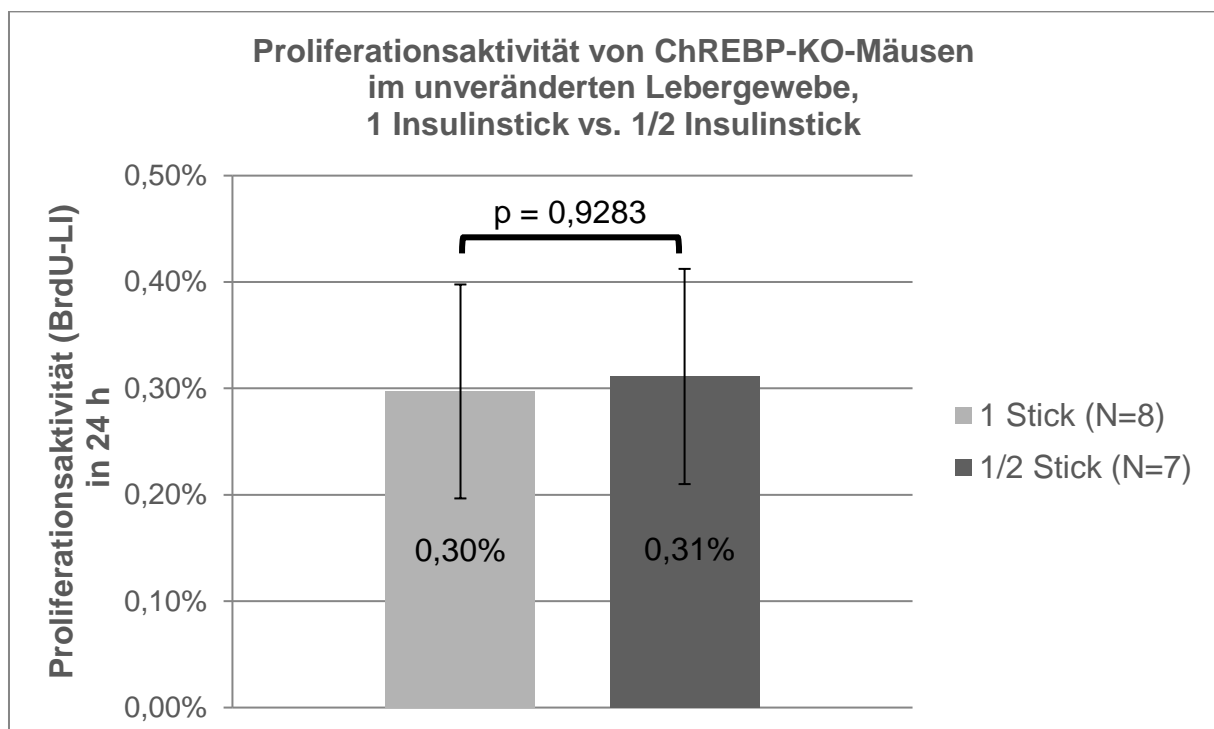


Grafik 19: Teilexperiment 2: Proliferationsaktivität (BrdU-LI) in 24 Stunden [%]: Lebergewebe bei C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen nach zweimaliger Gabe eines ganzen Insulinsticks für insgesamt 8 Wochen im Vergleich zum Lebergewebe bei C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen nach zweimaliger Gabe eines ½ Insulinsticks für insgesamt 8 Wochen. Balkendiagramm mit Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM, p-Wert oberhalb der Klammer, n.s. SEM Standardfehler des Mittelwerts, n.s. nicht signifikant, WT Wildtyp, BrdU Bromdesoxyuridin, BrdU-LI BrdU-Labeling-Index, N Anzahl.

ChREBP-KO-Mäuse

Unverändertes Lebergewebe

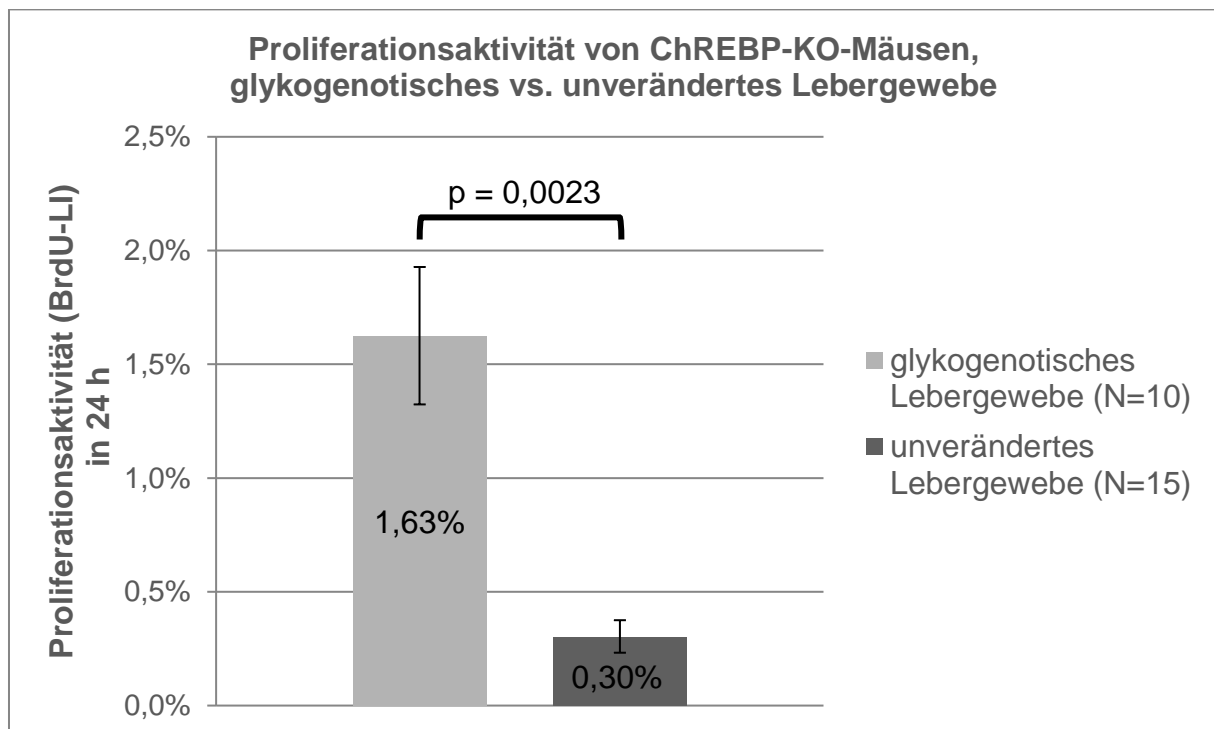
Auch bei den ChREBP-KO-Mäusen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der 24h-Proliferationsaktivität (BrdU-Labeling-Index) des unveränderten Lebergewebes bei zweimaliger Implantation eines ½ Insulinstick für insgesamt 8 Wochen mit $0,31 \pm 0,001$ % (N=7) im Vergleich zu den ChREBP-KO-Mäusen bei Implantation eines ganzen Insulinstick mit $0,3 \pm 0,001$ % (N=8) (siehe **Grafik 20**, die Daten im Text sind als Mittelwert \pm SEM angegeben).



Grafik 20: Teilexperiment 2: Proliferationsaktivität (BrdU-LI) in 24 Stunden [%]: unverändertes Lebergewebe bei ChREBP-KO-Mäusen nach zweimaliger Gabe eines ganzen Insulinsticks für insgesamt 8 Wochen im Vergleich zum unveränderten Lebergewebe bei ChREBP-KO-Mäusen nach zweimaliger Gabe eines ½ Insulinsticks für insgesamt 8 Wochen. Balkendiagramm mit Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM, p-Wert oberhalb der Klammer, n.s. SEM Standardfehler des Mittelwerts, n.s. nicht signifikant, vs. versus, BrdU Bromdesoxyuridin, BrdU-LI BrdU-Labeling-Index, ChREBP-KO Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) – Knockout, N Anzahl, vs. versus.

Glykogenotisch verändertes vs. nicht verändertes Lebergewebe

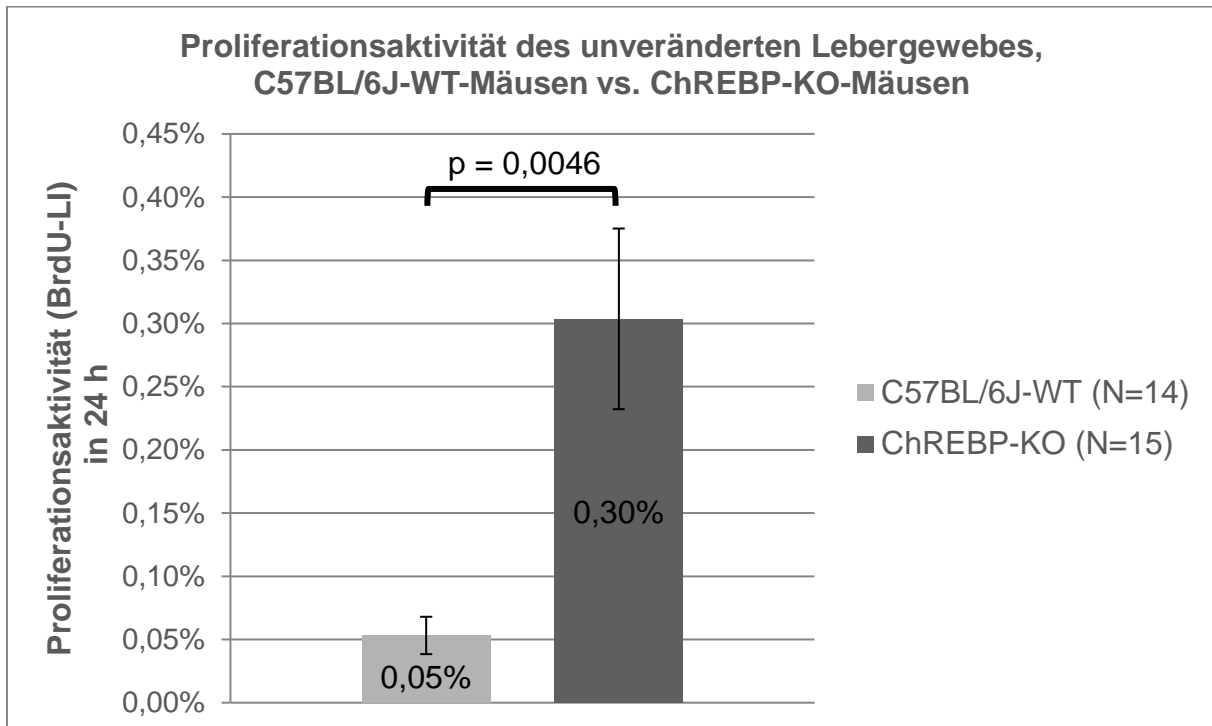
Jedoch bestand bei den ChREBP-KO-Mäusen eine signifikant erhöhte 24h-Proliferationsaktivität (BrdU-Labeling-Index) in dem glykogenotisch veränderten Lebergewebe mit $1,63 \pm 0,3 \%$ (N=10) im Vergleich zu dem nicht veränderten Lebergewebe mit $0,3 \pm 0,07 \%$ (N=15) (siehe **Grafik 21**, $p < 0,05$; die Daten im Text sind als Mittelwert \pm SEM angegeben).



Grafik 21: Teilexperiment 2: Proliferationsaktivität (BrdU-LI) in 24 Stunden [%]: spontan glykogenotisch verändertes Lebergewebe im Vergleich zum unverändertem Lebergewebe bei ChREBP-KO-Mäusen nach zweimaliger Insulinsticktherapie für insgesamt 8 Wochen. Balkendiagramm mit Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM, p-Wert oberhalb der Klammer, $p < 0,5$. SEM Standardfehler des Mittelwerts, ChREBP-KO Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) – Knockout, BrdU Bromdesoxyuridin, BrdU-LI BrdU-Labeling-Index, N Anzahl, vs. versus.

Vergleich C57BL/6J-Wildtyp-Mäuse und ChREBP-KO-Mäuse

Die 24h-Proliferationsaktivität (BrdU-Labeling-Index) in dem nicht veränderten Leberparenchym war bei den ChREBP-KO-Mäusen mit $0,3 \pm 0,07$ % (N=15) signifikant höher als bei den WT-Mäusen mit $0,05 \pm 0,01$ % (N=14) (siehe **Grafik 22**, $p < 0,05$, die Daten im Text sind als Mittelwert \pm SEM angegeben).



Grafik 22: Teilexperiment 2: Proliferationsaktivität (BrdU-LI) in 24 Stunden [%]: unverändertes Lebergewebe bei C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu ChREBP-KO-Mäusen nach zweimaliger Insulinsticktherapie für insgesamt 8 Wochen. Balkendiagramm mit Darstellung der Daten als Mittelwert \pm SEM, p-Wert oberhalb der Klammer, $p < 0,5$. SEM Standardfehler des Mittelwerts, WT Wildtyp, ChREBP-KO Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) – Knockout, BrdU Bromdesoxyuridin, BrdU-LI BrdU-Labeling-Index, N Anzahl, vs. versus.

3.6. Teilexperiment 1: Häufigkeit der CCF nach

Pankreasinseltransplantation mit präoperativer Insulintherapie

Vier Wochen nach der intraportalen Transplantation von 200 Pankreasinseln konnten bei den WT-Mäusen mit einer präoperativen subkutanen Insulin-Therapie bei 33,3 % (7 von 21) der WT-Mäuse CCF nachgewiesen werden.

4. Diskussion

4.1. Insulintherapie

4.1.1. Teilexperiment1: Subkutane Insulintherapie

Effekt der Therapie

Mit Hilfe der subkutanen Insulintherapie konnte sowohl bei den WT-Mäusen als auch bei den ChREBP-KO-Mäusen eine signifikante Senkung des Blutzuckers nach fünf Tagen Therapie erreicht werden.

In den vorherigen Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnte bei den diabetischen WT-Mäusen im Verlauf von vier Wochen ein Gewichtsverlust beobachtet werden im Vergleich zu den diabetischen 1-Wochen-alten WT-Tieren [34]. Da in dieser hier vorliegenden Arbeit bei den diabetischen Mäusen beider Genotypen im Verlauf von vier Wochen kein Gewichtsverlust beobachtet werden konnte, ist davon auszugehen, dass dies auf die subkutane präoperative Insulintherapie zurückzuführen ist.

Zusätzlich bestanden in unserer vorherigen Arbeit typische diabetische Komplikationen wie Polydipsie und Polyurie, die subjektiv mit steigendem Alter zunahmen. Im Rahmen der Insulintherapie konnten subjektiv deutliche Verbesserungen der diabetischen Nebenwirkungen wie Polydipsie und Polyurie beobachtet werden. Es traten bei beiden Genotypen neben den weniger häufigen sehr hohen Blutzuckerwerten auch Gewichtsnormalisierungen und Allgemeinzustandsverbesserungen (wie gepflegtes Fell, lebhaftes und neugieriges Verhalten) auf, sodass auch hier von einem positiven Effekt durch die Insulintherapie ausgegangen werden kann.

Blutzuckerschwankungen und Stressbelastung

Es konnte aber auch gezeigt werden, dass die subkutane Insulintherapie aus folgenden Gründen mit einer erheblichen Stressbelastung einhergeht:

Der BZ hielt sich nicht konstant, sondern unterlag sehr hohen Schwankungen mit häufigen, zum Teil auch tödlich verlaufenden Hypoglykämien.

Geringere Insulindosen könnten die starken Blutzuckerschwankungen sowie das damit verbundene Risiko der Hypoglykämie verringern, jedoch müsste dann womöglich die Therapiezeit verlängert werden, was den Stressfaktor für die Versuchstiere wiederum erhöhen würde [69, 75]. Pei *et al.* konnten durch eine zweiwöchige subkutane Insulintherapie mit NPH-Insulin den Blutzuckerspiegel bei diabetischen C57BL/6J-Mäusen von $23,7 \pm 1,3$ mmol/l auf $7,9 \pm 0,8$ mmol/l signifikant senken [75], wohingegen in dieser hier vorliegenden Arbeit sowohl bei den WT- als auch bei den ChREBP-KO-Mäusen durch eine 5-tägige subkutane Insulintherapie der Blutzuckerspiegel nicht dauerhaft gesenkt werden konnte. Auch Grant *et al.* berichten über schwankende Blutzuckerwerte sowie nicht effiziente Senkungen des BZs bei Testung verschiedener Insulinwirkstoffe innerhalb eines 4- bis 5-tägigen Therapiezeitraums bei NOD-Mäusen [69]. Jedoch ist bei NOD-Mäusen eine Resistenz einer Insulintherapie bekannt [69, 76].

Handling der Insulintherapie-Methode

Um eine effiziente Senkung des BZs innerhalb einer kurzen Zeit zu erreichen, verwendeten wir ein von uns entwickeltes Dosisschema, bei welchem vor jeder Insulininjektion die Insulindosis auf den zuvor gemessenen Blutzuckerwert angepasst werden musste. Dieser individuelle Insulinbedarf jedes einzelnen Versuchstiers erschwerte die Durchführung der Insulintherapie. Eine einheitliche Insulindosis erbrachte jedoch nicht die gewünschte Senkung des Blutzuckerspiegels bei jedem Versuchstier.

Die häufigen Blutzuckermessungen und auch die Notwendigkeit des Verdünnens des Insulins machten die zweimalige tägliche subkutane Insulinbehandlung zusätzlich sehr zeitaufwendig. Die starken Blutzuckerschwankungen mit zum Teil starken Blutzuckersenkungen, besonders direkt nach den Injektionen sowie auch die häufigen Blutzuckermessungen führten bei den Versuchstieren wiederum zu einer erhöhten Stressbelastung. Patocková *et al.* konnten nachweisen, dass eine schwere Hypoglykämie im Gehirn zu erhöhtem oxidativem Stress führt [77]. Beschriebene Symptome waren in deren Arbeit eine Atonie und Hypotonie der Versuchstiere [77]. Auch wir sahen im Rahmen der Hypoglykämie eine Abgeschlagenheit und Mobilisierungsschwäche mit fehlenden Fluchreflexen.

Zudem ist bekannt, dass Hypoglykämien neuronale Nekrosen verursachen können, was indirekt ebenfalls als Belastung angesehen werden kann [78, 79].

4.1.2. Teilexperiment 2: Insulinsticktherapie

Die bei unseren Experimenten beschriebenen Blutzuckerschwankungen bei der subkutanen Insulintherapie waren Anlass für die Austestung einer kontinuierlichen Insulingabe mittels Implantation von Insulinsticks.

Grant *et al.* beschrieben minimale Blutzuckerschwankungen durch eine kontinuierliche Insulingabe unter Einsatz von osmotischen Insulinpumpen bei ihren Experimenten [69].

Für eine kontinuierliche Insulintherapie nutzten wir Insulinsticks in einem zweiten Teilexperiment der hier vorliegenden Arbeit. Die Verwendung der Insulinsticks sollte in diesem zweiten Teilexperiment ausgetestet werden, um in erster Linie exzessiv hohe Blutzuckerspiegel zu vermeiden und die Komplikationen des Langzeitdiabetes [80-85] zu verringern. Der BZ sollte jedoch bei dieser Methode im milden hyperglykämischen Level (16 bis 25 mmol/l) gehalten werden, um in den nachfolgenden Experimenten unserer Arbeitsgruppe die transplantierten Inseln zu stimulieren, weiterhin Insulin zu bilden und sezernieren [34]. Hierzu sollte eine geeignete Dosis und die Wirkdauer bei beiden Genotypen ermittelt und die Auswirkung mehrmaliger Gaben ausgetestet werden. Auf eine Pankreasinseltransplantation wurde in diesem Teilexperiment verzichtet.

Effekt der Therapie

Beide Genotypen reagierten wie erwartet mit einem Abfall des erhöhten Blutzuckerspiegels. Der BZ zeigte bei der Insulinstickanwendung einen stabilen Verlauf und wies nur wenige Schwankungen auf. Mit Implantation eines $\frac{1}{2}$ Insulinsticks konnte bei den diabetischen WT-Mäusen eine milde Hyperglykämie von 16 bis 25 mmol/l für 4 Wochen erreicht werden.

Die diabetischen ChREBP-KO-Mäuse konnten für 2 Wochen den BZ im milden hyperglykämischen Bereich bei Implantation eines ganzen Insulinsticks halten. Ein

Nachlassen der Wirkung war durch Anstieg des Blutzuckerspiegels über 25 mmol/l erkennbar, sodass ein neuer Insulinstick transplantiert wurde, der eine ähnliche Wirkung zeigte wie der zuvor implantierte Stick. Hypoglykämien traten nicht auf.

Zusätzlich konnte bei beiden Genotypen eine signifikante Gewichtszunahme beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass die Versuchstiere gut auf die Insulinbehandlung ansprachen [86].

Blutzuckerschwankungen und Stressbelastung

Während der Insulinstick-Behandlung traten keine Blutzuckerschwankungen wie bei der subkutanen Insulintherapie auf. Der BZ hielt sich bei beiden Genotypen konstant. Hypoglykämien traten nicht auf.

Eine signifikante Gewichtszunahme bei beiden Genotypen ist ein Kennzeichen für ein gutes Ansprechen der Therapie [86] und spricht für eine geringe Stressbelastung.

Aufgrund der kontinuierlichen Insulinabgabe durch die Insulinsticks konnte die Häufigkeit des Blutzuckermessens reduziert werden, was wiederum die Stressbelastung der Versuchstiere minimierte.

Handling der Insulintherapie

Die Versuchstiere beider Genotypen erhielten je nach Gruppenzuordnung einen halben oder einen ganzen Insulinstick. Da innerhalb dieses Telexperiments der BZ bei allen Versuchstieren in den gewünschten milden hyperglykämischen Bereich von 16 bis 25 mmol/l ohne Nachweis von Hypoglykämien sank, musste die Dosis nicht für jedes Versuchstier angepasst werden, was die Handhabung erleichterte.

Aufgrund der nicht aufgetretenen Hypoglykämien und der kontinuierlichen Wirkstoffabgabe konnten die Blutzuckermessungen auf wenige Messungen reduziert werden, was die Stressbelastung für die Versuchstiere minimierte und auch den Zeitaufwand verringerte.

Der Insulinstick konnte leicht mit einem Skalpell halbiert werden und anschließend mit einer kurzen Narkose implantiert werden, was die Handhabung sehr einfach machte.

Während der Implantation der Insulinsticks starben nur wenige Versuchstiere.

4.1.3. Vergleich der Insulintherapie-Methoden

Zusammenfassend ist die Insulinsticktherapie im Vergleich zu der subkutanen Insulinbehandlung eine geeignetere Methode hinsichtlich der einfacheren Handhabung, den geringeren Risiken für die Versuchstiere, den weniger häufig notwendigen Blutzuckermessungen und der konstanten Wirkstoffabgabe.

Bei den später durchgeführten Langzeitexperimenten (6 bis 12 Monate) unserer Arbeitsgruppe [87], wurden die Insulinsticks entsprechend der Ergebnisse dieser hier vorliegenden Arbeit erfolgreich eingesetzt.

Die Kriterien für die Implantation eines Insulinstick waren in den späteren Langzeitversuchen ein Blutzuckerspiegel von > 30 mmol/l und eine nachweisbare Verschlechterung des Allgemeinzustandes nach einem Belastungsscore.

4.2. Vergleich der Genotypen

Aufgrund der Austestung einer Insulinbehandlungsmethode erfolgten im Rahmen dieser Arbeit häufige BZ- und Gewichtskontrollen. Im Vergleich fielen deutliche Unterschiede zwischen den Genotypen auf.

4.2.1. Höherer Blutzuckerspiegel diabetischer ChREBP-KO-Mäuse im Vergleich zu diabetischen WT-Mäusen

Bei den ChREBP-KO-Mäusen bestanden sowohl vor als auch nach der Diabetesinduktion sowie zu Beginn der subkutanen Insulintherapie signifikant höhere Blutzuckerwerte als bei den diabetischen WT-Mäusen. Auch nach Beenden der subkutanen Insulintherapie wiesen die Knockouttiere tendenziell einen höheren

Blutzuckerspiegel auf. Des Weiteren benötigten sie bei der Insulinstickbehandlung eine höhere Dosis an Insulin und auch bei der subkutanen Therapie waren insgesamt höhere Dosen notwendig, um den BZ zu senken. Hingegen traten schwere Komplikationen wie schwere Hypoglykämien, z.T. mit Todesfolge, während der subkutanen Insulintherapie bei den WT-Mäusen häufiger auf. Hypoglykämien mit Todesfolge traten bei den ChREBP-KO-Mäusen nicht auf.

Unsere Arbeitsgruppe untersuchte bereits Schlüsselenzyme des Kohlenhydratstoffwechsels in ChREBP-KO Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen [34, 88].

Die Glykolyse und Glukoneogenese mit den Enzymen, welche hier nachfolgend erwähnt werden, sind zur Übersicht in **Grafik 23** vereinfacht dargestellt.

Glukosestoffwechsel bei diabetischen WT-Mäusen

Unsere Arbeitsgruppe konnte in histochemischen Untersuchungen zeigen, dass in diabetischen WT-Mäusen die Aktivität der Glukokinase (GK; Umwandlung von Glukose in Glukose-6-Phosphat) und auch die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH; Schlüsselenzym des Pentosephosphatweges), im Vergleich zu nicht-diabetischen WT-Mäusen vermindert sind [34, 88]. Gleichzeitig konnte eine stark erhöhte Aktivität der Glukose-6-Phosphatase (G-6-Pase; einem Schlüsselenzym der Glukoneogenese), bei den diabetischen WT-Mäusen nachgewiesen werden [34, 88].

Allein ein Insulinmangel scheint demnach in der Leber zu einer verminderten Glykolyse, einem verminderten Pentosephosphatweg und zu einer vermehrten Glukoneogenese zu führen [88-91].

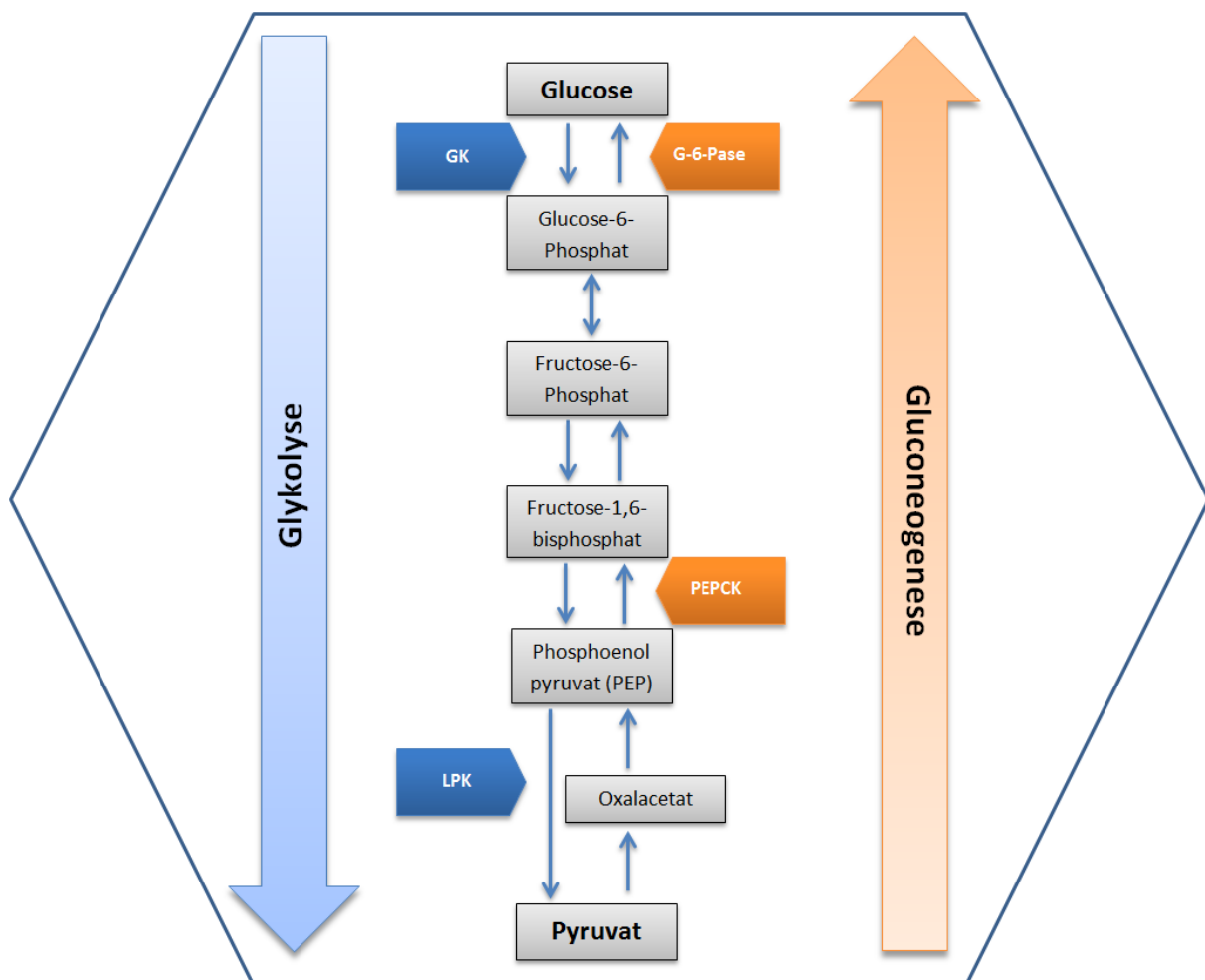
Glukosestoffwechsel in ChREBP-KO-Mäusen

Im Gegenzug dazu waren sowohl in den diabetischen als auch in den nicht-diabetischen ChREBP-KO-Mäusen im Vergleich zu nicht-diabetischen WT-Mäusen die GK und die G-6-PDH nur leicht vermindert und die G-6-Pase-Aktivität stark vermindert, was darauf hindeutet, dass die Glukoseaufnahme (indirekt durch GK) sowie die Glykolyse, der Pentosephosphatweg (durch G-6-PDH) und die

Gluconeogenese (durch G-6-Pase) durch einen Knockout von ChREBP unabhängig von ihrer diabetischen Stoffwechsellage herunterreguliert werden [34, 36, 42, 51, 88].

Die demnach etwas höhere Aktivität der GK bei den ChREBP-KO-Tieren im Vergleich zu diabetischen WT-Mäusen und auch die verminderten Aktivitäten der G-6-Pase und G-6-PDH korrelieren zu den von Iizuka *et al.* nachgewiesenen erhöhten Konzentrationen von Glukose-6-Phosphat (G-6-P) in der Leber, welches unter anderem als Substrat für die Glykogensynthese dient [34, 36, 42, 51, 88].

Zusätzlich konnten Iizuka *et al.* in ihren Experimenten in nicht diabetischen ChREBP-KO-Mäusen eine verminderte Expression der leberspezifischen Pyruvatkinase (LPK) - einem zentralen Enzym der Glykolyse - nachweisen, was zusammen mit der geringeren Aktivität der GK auf eine reduzierte Glykolyse hindeutet [34, 36, 88].



Grafik 23: Gegenüberstellung der Glykolyse und Gluconeogenese mit Konzentration auf die im Text erwähnten Enzyme; modifiziert aus [92]. GK Glucokinase, LPK leberspezifische Pyruvatkinase, PEPCCK Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, G-6-Pase Glucose-6-Phosphatase.

Darüber hinaus fanden Iizuka *et al.* heraus, dass in ChREBP-KO-Mäusen eine geringere Expression des nicht insulinabhängigen Glukosetransporters (GLUT 2) vorliegt [36]. Dies weist darauf hin, dass sowohl die Glukoseaufnahme in die Leber jedoch auch gleichzeitig die Glukoseabgabe in das Blut in den ChREBP-KO-Mäusen verringert ist und es damit zu einer nachweisbaren Glukose- und G-6-P-Akkumulation in der Leber kommt [36], was möglicherweise auch indirekt die höheren Blutzuckerspiegel bei unseren ChREBP-KO-Mäusen begünstigte.

Insulinresistenz bei ChREBP-KO-Mäusen

Vijayakumar *et al.* beschrieben eine systemische Insulinresistenz durch das Fehlen von ChREBP infolge einer gestörten GLUT 4 Translokation zur Zellmembran für die Glukoseaufnahme in Adipozyten [93]. Da GLUT 4 für den Großteil der insulinstimulierenden Glukoseaufnahme in Adipozyten verantwortlich ist [94], und dieser von ChREBP reguliert wird [93, 94], stellt dies eine mögliche Erklärung der erhöhten Blutzuckerwerte und den weniger häufig auftretenden Hypoglykämien bei unseren ChREBP-KO-Mäusen dar.

Dennoch zeigten unsere Experimente auch, dass die ChREBP-KO-Mäuse auf die Insulintherapie ansprechen, da sie signifikant sinkende Blutzuckerspiegel direkt nach der subkutanen Insulingabe aufwiesen und auch tendenziell an Gewicht zunahmen.

Auch die Insulinsticktherapie zeigte ein solches Therapieansprechen. Jedoch fiel auf, dass die Knockoutmäuse eher höhere Insulindosen benötigten, sowohl bei der subkutanen als auch bei der kontinuierlichen Insulintherapie mittels Stickimplantation.

Der erhöhte Insulinbedarf bei den Knockout-Tieren kann als Effekt einer milden peripheren Insulinresistenz gewertet werden [36, 50, 93].

4.2.2. Niedrigeres Körpergewicht diabetischer ChREBP-KO-Mäuse im Vergleich zu diabetischen WT-Mäusen

Darüber hinaus bestanden zum Teil signifikant niedrigere Körpergewichte der ChREBP-KO-Mäuse im Rahmen der Diabetesinduktion, im Zeitraum der subkutanen Insulinbehandlung und auch nach der subkutanen Insulintherapie für vier Wochen.

Bei der kontinuierlichen Insulintherapie bestand nach Gabe eines ganzen Insulinsticks eine stärkere Gewichtszunahme als bei einem halben Stick.

Der Transkriptionsfaktor ChREBP ist nicht nur ein wichtiger insulinunabhängiger Koordinator des Glukosestoffwechsels, sondern reguliert auch den Fettstoffwechsel [36, 41, 43, 51, 95-97].

Verminderte Fettsäuresynthese in ChREBP-KO-Mäusen

Iizuka *et al.* konnten mit ihrem Knockoutmodell durch den Einsatz einer kohlenhydratreichen Diät eine reduzierte Expression lipogener Schlüsselenzyme wie die ATP-Citrat-Lyase (ACL), die Fettsäuresynthase (FAS) und das Malatenzym als wichtige Enzyme der Fettsäuresynthese nachweisen [36]:

Die verminderte Expression der oben erwähnten lipogenen Enzyme und der LPK bei den ChREBP-KO-Mäusen zeigt, dass durch das Fehlen von ChREBP die Glukoseverwertung für die Fettsäuresynthese reduziert ist, woraus eine geringere Fettspeicherung resultiert [36]. Iizuka *et al.* berichten in diesem Zusammenhang von niedrigeren Organgewichten des Nebenhodens und des braunen Fettgewebes bei der Knockoutgruppe [36], passend zu den zum Teil signifikant geringeren Körpergewichten in der hier vorliegenden Arbeit bei den diabetischen ChREBP-KO-Mäusen.

Die zusätzlich verminderte Glukoseaufnahme über GLUT 4 in Adipozyten und damit weniger Substrat für die *De-novo*-Lipogenese [98], korreliert ebenfalls zu den geringeren Körpergewichten der ChREBP-KO-Mäuse.

Möglicher Einfluss des Transkriptionsfaktors SREBP-1c

Auch der Transkriptionsfaktor sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c), welcher durch Insulin und Glukose reguliert wird, koordiniert den Cholesterin- und Fettstoffwechsel in der Leber sowie in Adipozyten [43, 99-104]. Insulin vermittelt über SREBP-1c unter anderem die Induktion der Expression der GK [100, 102], der FAS und der Lipoproteinlipase (LPL) [101, 104]. Es ist demnach vorstellbar, dass durch die subkutane Insulintherapie das exogen zugeführte Insulin über SREBP-1c

entscheidende Schlüsselenzyme des Glukose- und Lipidstoffwechsels beeinflusste [103], sodass das Körpergewicht der ChREBP-KO-Mäuse mit Hilfe der Insulintherapie auf annähernd ähnlichem Niveau ansteigen konnte wie das der WT-Mäuse.

Ribback *et al.* konnten zudem in induzierten CCF in ChREBP-KO-Mäusen sogar eine erhöhte Expression von SREBP-1 nachweisen, was die These noch zusätzlich untermauert, dass das zugeführte Insulin (bei den CCF durch transplantierte Pankreasinseln) über SREBP-1 den Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel koordiniert [34].

Die in dieser Arbeit auffallenden hohen Blutzuckerspiegel bei den ChREBP-KO-Mäusen können demnach die Folgen einer verminderten Glukoseaufnahme über die oben erwähnten Glukosetransporter sowohl in die Leber als auch in Adipozyten durch einen ChREBP-Mangel widerspiegeln. Eine mäßige Insulinresistenz könnte die höheren benötigten Insulindosen erklären und die verminderte *De-novo*-Lipogenese die niedrigeren Körpergewichte bei den ChREBP-KO-Mäusen.

4.3. Pankreasinseltransplantation

Durch die engmaschigen Blutzuckerkontrollen konnte gezeigt werden, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit die transplantierten Pankreasinseln in den Pfortaderästen der Leber anwuchsen, Insulin bildeten und auch sezernierten, da der BZ zunächst signifikant sank und auch im Verlauf niedrigere Blutzuckerspiegel innerhalb des Untersuchungszeitraums von vier Wochen im Vergleich zu den nicht-transplantierten diabetischen WT-Mäusen aufwies.

Der signifikante Gewichtsverlust direkt nach der Transplantation der transplantierten WT-Mäuse im Vergleich zu den nicht-transplantierten WT-Mäusen kann als Stressreaktion durch die Operation gedeutet werden. Ein solcher Gewichtsabfall war bei den Kontrollgruppen nicht zu verzeichnen. Bereits nach wenigen Tagen deutet das ansteigende Körpergewicht an, dass sich die Versuchstiere von der Operation erholten [105-107].

4.3.1. Transplantatabstoßung

Der langsame Blutzuckeranstieg bereits drei Tage nach der Pankreasinseltransplantation lässt vermuten, dass es anscheinend zu einer frühen Transplantatabstoßung kam. Eine histologisch nachweisbare Entzündungsreaktion ließ sich nach vier Wochen nicht nachweisen.

Durch Transplantation von Pankreasinseln unter die Nierenkapsel konnte bei C57BL/6J-Mäusen gezeigt werden, dass durch Apoptose und Nekrose bereits nach wenigen Tagen rund 60 % der Transplantate verloren gehen [108]. Dieser hohe Verlust von transplantierten Inseln, besonders wenige Tage nach der Transplantation, kann den Blutzuckeranstieg bei unseren Experimenten erklären. Auch Lee *et al.* berichten über eine frühe Transplantatabstoßung bei Ratten, die eine Pankreasinseltransplantation in die Leber erhielten [109]. Sie konnten mittels *in-vivo*-Magnetresonanztomographie-Bildgebung und Pankreasinseln, welche vorher mit magnetischen Nanopartikeln markiert wurden, nachweisen, dass bereits in den ersten Tagen nach Transplantation ein Transplantatabbau sowie ein gleichzeitiges Einwandern von Makrophagen in die allogenen Transplantate erfolgt [109].

Es ist anzunehmen, dass eine immunsuppressive Therapie diesen hohen Verlust verringern könnte. Eine Verbesserung des Überlebens von u. a. intraportal in die Leber transplantierten Pankreasinseln konnten Chhabra *et al.* bei C57BL/6-Mäusen erzielen durch Einsatz von Adenosin-A(2A)-Rezeptor-Agonisten, welche den frühen entzündlichen Transplantatverlust verringern durch die hemmende Wirkung auf Entzündungszellen [110].

In unserem hormonell induzierten Hepatokarzinogenese-Modell sind jedoch vor allem systemisch wirkende Medikamente ungeeignet, da diese gegebenenfalls Einflüsse auf den Metabolismus haben könnten bzw. schädigende oder sogar karzinogene Veränderungen in der Leber hervorrufen könnten.

4.4. Teilexperiment 1: Morphologische Veränderungen der WT- und ChREBP-KO-Mäuse im Rahmen der 5-tägigen subkutanen Insulintherapie

4.4.1. Induzierte Herde (CCF) nach Pankreasinseltransplantation bei diabetischen WT-Mäusen

Wie bereits in den vorherigen Studien unserer Arbeitsgruppe gezeigt, konnten auch in meinem Versuchsaufbau nach vier Wochen in den diabetischen WT-Mäusen im Abstromgebiet der transplantierten Pankreasinseln klarzellige Herde (CCF) in der Leber nachgewiesen werden [34]. Die CCF zeigten eine erhöhte Glykogen- und Fettspeicherung sowie im Vergleich zu dem benachbarten Leberparenchym eine gesteigerte Proliferationsaktivität, wie es ebenfalls in vorangegangenen Experimenten in der Maus und der Ratte nachgewiesen werden konnte [19, 20, 22, 34, 111].

Somit konnte bestätigt werden, dass die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe bezüglich des Auftretens und der Morphologie der CCF in den WT-Mäusen im Rahmen des insulin-induzierten Hepatokarzinogenese-Modells der Maus reproduzierbar sind.

CCF stellen präneoplastische Läsionen in der Leber dar

Die erhöhte Proliferationsaktivität in den Herden korreliert mit einer Aktivierung protoonkogener Signalwege von Ras/raf-1/MAPK und Akt/mTOR sowohl bei der Maus als auch bei der Ratte, sodass diese CCF präneoplastische Läsionen in der Leber darstellen [19, 20, 22, 34, 111]. Zusätzlich konnte in den CCF eine vermehrte Glykolyse und Lipogenese nachgewiesen werden [19, 20, 22, 34, 111].

Die These der präneoplastischen Läsionen wird damit untermauert, dass in den bereits erfolgten Langzeitversuchen aus diesen Leberherden nach 6 und 12 Monaten Hepatozelluläre Adenome und Karzinome nach Transplantation von 200 Pankreasinseln entstanden sind [87].

4.4.2. Spontanherde bei diabetischen ChREBP-KO-Mäusen

Interessanterweise entwickelten sich im Rahmen dieser hier vorliegenden Arbeit in den diabetischen ChREBP-KO-Mäusen spontan, ohne eine Pankreasinseltransplantation, ebenfalls klarzellige Läsionen in der Leber mit einer hohen Glykogenanreicherung, bei jedoch fehlender Fettspeicherung. Insgesamt bestand eine vermehrte, diffus verteilte Glykogenose im gesamten Lebergewebe.

Vermehrter Glykogengehalt in der Leber diabetischer ChREBP-KO-Mäuse

In den vorherigen Studien unserer Arbeitsgruppe wurde bereits ein erhöhter Glykogengehalt bei den diabetischen, nicht transplantierten ChREBP-KO-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen beschrieben [34]. Eine diffuse Glykogenose bzw. spontane herdförmige Leberveränderungen bestanden hier jedoch nicht.

Izuka *et al.* berichteten ebenfalls über eine vermehrte Glykogenablagerung in der Leber in ChREBP-KO-Mäusen bei Fütterung mit Standardfutter aber auch mit kohlenhydratangereichertem Futter im Vergleich zu WT-Mäusen [36]. Zusätzlich konnten sie bei den ChREBP-KO-Mäusen unter kohlenhydratreicher Fütterung ein erhöhtes Lebergewicht nachweisen [36]. Auch hier wurde nicht von herdförmigen Veränderungen in der Leber berichtet.

Der vermehrte Glykogengehalt und auch die bei uns aufgetretenen herdförmigen glykogenreichen Veränderungen der Leber in den ChREBP-KO-Mäusen deuten auf eine Glykogenakkumulation der Leber hin [34, 36].

Es konnte bereits gezeigt werden, dass das vermehrte Glykogen nicht auf eine gesteigerte Glukoneogenese in der Leber zurückzuführen ist, aufgrund der verminderten Expression wichtiger Enzyme der Glukoneogenese insbesondere der G-6-Pase aber auch der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) in ChREBP-KO-Mäusen [34, 36, 50]. Wie oben bereits beschrieben (siehe Abschnitt **4.2.1.**) konnten Izuka *et al.* zudem erhöhte Konzentrationen von Glukose und G-6-P, als Substrat der Glykogensynthese, nachweisen [36]. Die G-6-P-Akkumulation ist zudem auch auf eine stark verminderte Aktivität der G-6-Pase und der reduzierten Expression der G-6-PDH und der GK zurückzuführen. Korrespondierend dazu spricht

die beschriebene reduzierte Expression des insulinunabhängigen Glukosetransporters GLUT 2 in ChREBP-KO-Mäusen nicht nur für eine verminderte Glukoseaufnahme, sondern auch für eine reduzierte Glukoseabgabe [34, 36, 50].

Fehlende Fettspeicherung in der Leber diabetischer ChREBP-KO-Mäuse

Des Weiteren konnte histologisch bei den ChREBP-KO-Mäusen keine Verfettung der Leber nachgewiesen werden, was auf eine reduzierte *De-novo*-Lipogenese hindeutet [34, 36]. Korrespondierend dazu konnte in ChREBP-KO-Mäusen eine verminderte Expression entscheidender Enzyme der Fettsäuresynthese wie ACL, FAS, Malatenzym und der zytosolischen Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC1) nachgewiesen werden [34, 36, 50].

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Transkriptionsfaktor ChREBP einen entscheidenden Faktor für die Koordination von Glukoseverwertung und *De-novo*-Lipogenese darstellt und zusätzlich vor einer Steatosis hepatis bei einem Überangebot von Kohlenhydraten schützt [34, 36, 50].

Insulintherapie als Auslöser der Glykogenose?

Im Unterschied zu den vorherigen Studien [34] und auch den bereits erfolgten Langzeitexperimenten unserer Arbeitsgruppe [87] erfolgte in der hier vorliegenden Arbeit bei den nicht transplantierten, diabetischen ChREBP-KO-Mäusen eine fünftägige subkutane Insulintherapie bzw. im zweiten Telexperiment eine Insulinsticktherapie.

Insulin führt sowohl direkt als auch indirekt zu einer gesteigerten Glykogensynthese [112] und *De-novo*-Lipogenese [113-115] sowie zu einer Herunterregulation der Glykogenolyse und Glukoneogenese in der Leber [116]. Es ist somit denkbar, dass diese Insulinbehandlung zu einem zusätzlichen Stimulus der Glykogenakkumulation in der Leber bei fehlender Möglichkeit der Fettspeicherung durch ein Fehlen von ChREBP führte.

Bereits durch die Untersuchungen der Enzymaktivitäten in CCF von ChREBP-KO-Tieren konnte gezeigt werden, dass innerhalb der CCF eine Hochregulation der GK

bei gleichzeitiger Herunterregulation der G-6-Pase sowie der G-6-PDH besteht [34, 88]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der Transkriptionsfaktor ChREBP eine entscheidende Rolle im Wechsel vom glykogenotischen zum lipogenen Phänotyp in präneoplastischen Läsionen hat [34, 88].

Es kann bislang nicht geklärt werden, über welche Wege die Entstehung der spontanen Leberherde in den ChREBP-KO-Mäusen zurückzuführen ist und in welcher Form sich diese Herde weiterentwickeln. Die erhöhte Proliferation lässt jedoch vermuten, dass ein gewisser protoonkogener Charakter bestehen könnte.

Proliferationsaktivität

Auch in den spontan entstandenen glykogenreichen Herden konnte ich eine signifikant erhöhte Proliferationsaktivität im Vergleich zu den nicht transplantierten WT-Mäusen nachweisen. Dies korreliert zwar nicht mit den vorherigen Experimenten unserer Arbeitsgruppe, bei denen die Proliferation in den diabetischen, nicht-transplantierten ChREBP-KO-Mäusen signifikant geringer war als bei den diabetischen, nicht-transplantierten WT-Mäusen [34]. Jedoch bestanden in diesen Studien in den ChREBP-KO-Mäusen auch keine diffuse Glykogenose in den Hepatozyten und auch keine spontane Ausbildung von glykogenreichen Herden.

In einer weiteren Arbeit unserer Arbeitsgruppe konnten jedoch ebenfalls in 10 von 13 ChREBP-KO-Mäusen (76,9 %) spontane Glykogenspeicherherde nachgewiesen werden, in denen eine signifikant höhere Proliferation im Vergleich zu den nicht-transplantierten, diabetischen WT-Mäusen bestand [Frohme, J., Morphologische und proliferationskinetische Unterschiede klarzelliger Leberherde in diabetischen Wildtyp- und Carbohydrate responsive element-binding protein-knockout-Mäusen nach Modifikation der intraportalen Pankreasinseltransplantation. Dissertation in Vorbereitung].

Daneben ist auch zu diskutieren, ob die begleitende Entzündungsreaktion innerhalb der glykogenotisch veränderten Hepatozyten die erhöhte Proliferationsaktivität im Sinne einer Regeneration zu verstehen ist.

Die mögliche Rolle der protoonkogenen Signalwege von Ras/MAPK/ERK und Akt/mTOR/PI3K

Ribback *et al.* konnten nachweisen, dass der protoonkogene Ras/MAPK/ERK-Signalweg unabhängig von dem Transkriptionsfaktor ChREBP funktioniert [38]. Es ist somit denkbar, dass die erhöhte Proliferationsaktivität und auch vermehrte Glykogenspeicherung in den ChREBP-KO-Mäusen über diesen Signalweg getriggert wurde.

In der Aktivierung des Ras/MAPK/ERK-Signalweges könnte die Insulinbehandlung ebenfalls eine entscheidende Rolle spielen. Über Insulinrezeptorkinasen bewirkt Insulin unter anderem die Aktivierung der Ras/MAPK/ERK-Signalkaskade und beteiligt sich mitunter an Zellwachstum, Überleben und zellulärer Differenzierung [117-120]. Des Weiteren bewirkt Insulin über Insulinrezeptorkinasen eine Aktivierung des Akt/mTOR/PI3K-Signalweges und fördert über diese Kaskade unter anderem die Glykogensynthese [118, 121]. Somit ist anzunehmen, dass die in diesem Experiment durchgeführte subkutane Insulintherapie nicht nur die vermehrte Glykogenspeicherung bewirkte, sondern auch zu einer erhöhten Zellproliferation führte.

Interessanterweise konnten Zeng *et al.* zeigen, dass eine Deletion von ChREBP zu einer vermehrten Proliferation und verminderten Differenzierung von Leukämie-initiiierenden Zellen führt und somit ChREBP hier eher eine tumorsuppressive Funktion erfüllt [57].

Zusammenfassend sprechen die spontan entstandenen Glykogenspeicherherde in dieser Arbeit mit erhöhter Proliferation für einen gewissen tumorsuppressiven Charakter von ChREBP, der bislang nicht vollständig verstanden ist und weiter untersucht werden sollte.

Im Gegenzug dazu spricht das verzögerte und verringerte Auftreten von HCCs in den ChREBP-KO-Mäusen nach Pankreasinseltransplantation in den Langzeitversuchen unserer Arbeitsgruppe [87] für eine reduzierte oder eine verlangsamte Karzinogenese durch einen ChREBP-Knockout und somit für einen protoonkogenen Charakter von ChREBP.

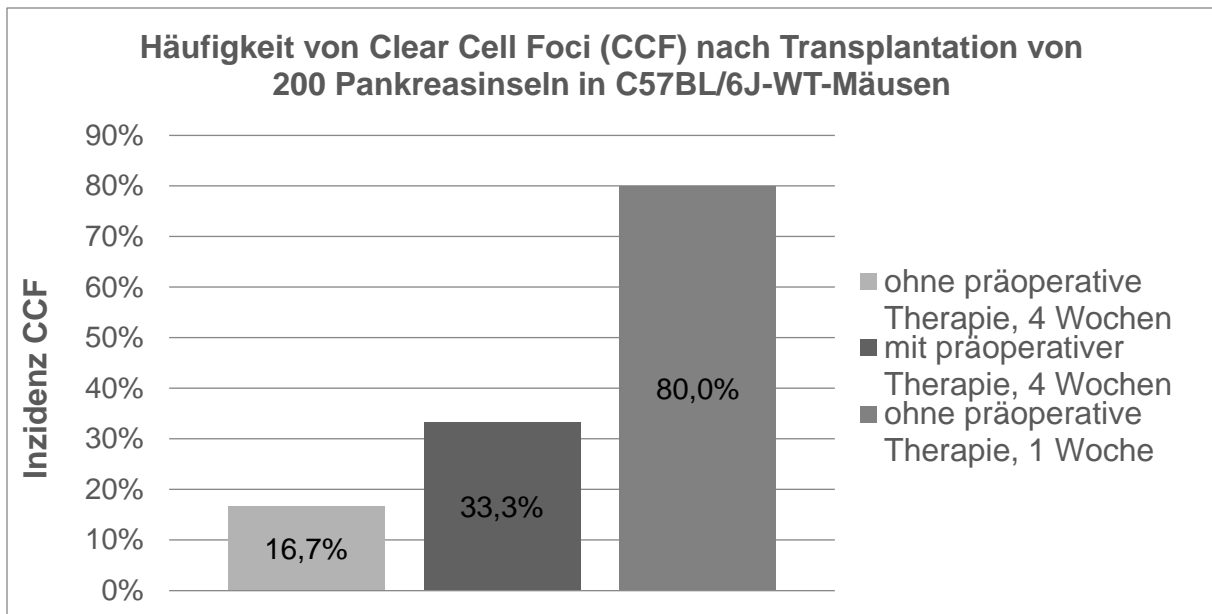
4.5. Teilexperiment 1: Häufigkeit der klarzelligen Leberherde (CCF)

Vier Wochen nach der Pankreasinseltransplantation entstanden mit einer präoperativen Insulintherapie bei 33 % (7 von 21) der diabetischen WT-Mäuse die sogenannten CCF im Abstromgebiet der transplantierten Inseln.

Ein Ziel dieser Arbeit war, die Häufigkeit der CCF bei den WT-Mäusen im Vergleich zu den vorherigen Studien unserer Arbeitsgruppe mittels der präoperativen Insulintherapie zur Reduzierung einer möglichen Glukolipotoxizität auf mindestens 50 % zu erhöhen [34, 66, 122].

Während der fünftägigen Insulintherapie konnte der Blutzuckerspiegel auf annähernd normoglykämie Werte gesenkt werden. Nach der Pankreasinseltransplantation blieb der BZ im milden hyperglykämischen Bereich, sodass die transplantierten Inseln stimuliert wurden Insulin zu bilden [19, 20, 22, 34, 111]. Mit diesem Versuchsaufbau herrschte lokal im Abstromgebiet der transplantierten Inseln eine Hyperinsulinämie und durch die Diabetesinduktion eine systemische milde Hyperglykämie [19, 20, 22, 34, 111].

In den vorangegangenen Experimenten unserer Arbeitsgruppe entstanden ohne eine vorangegangene präoperative Insulintherapie vier Wochen nach Transplantation von 200 Pankreasinseln bei 17 % (1 von 6) der diabetischen WT-Mäuse präneoplastische Herde und nach einer Woche waren es 80 % (4 von 5) ([34] [Frohme, J., Morphologische und proliferationskinetische Unterschiede klarzelliger Leberherde in diabetischen Wildtyp- und Carbohydrate responsive element-binding protein-knockout-Mäusen nach Modifikation der intraportalen Pankreasinseltransplantation. Dissertation in Vorbereitung] siehe **Grafik 24**).



Grafik 24: Inzidenz der entstandenen Clear Cell Foci (CCF) [%] nach intraportalen Transplantation von 200 Pankreasinseln in C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen ohne präoperative subkutane Insulintherapie nach 1 und 4 Wochen [34], [Frohme, J., Morphologische und proliferationskinetische Unterschiede klarzelliger Leberherde in diabetischen Wildtyp- und Carbohydrate responsive element-binding protein-knockout-Mäusen nach Modifikation der intraportalen Pankreasinseltransplantation. Dissertation in Vorbereitung] im Vergleich mit präoperativer Insulintherapie nach 4 Wochen aus dem ersten Telexperiment; n.s. WT Wildtyp, n.s. nicht signifikant.

Somit konnte zwar mittels präoperativer Insulintherapie die Herdfrequenz nach vier Wochen um etwa 17 % leicht, aber nicht signifikant erhöht werden, und eine Erhöhung auf mindestens 50 % konnte ebenfalls nicht erreicht werden.

Demnach ist anzunehmen, dass der Effekt der Glukolipotoxizität für das Überleben der transplantierten Pankreasinseln eine eher untergeordnete Relevanz hat [34, 66, 122].

Grant *et al.* konnten mittels Insulinpumpen eine kontinuierliche Senkung des Blutzuckerspiegels erreichen [69], sodass in der hier vorliegenden Arbeit, aufgrund der doch positiven Effekte des exogen zugeführten Insulins, eine weitere Insulinbehandlungsmethode bei beiden Genotypen untersucht werden sollte.

5. Zusammenfassung

Bei der Entstehung des hepatozellulären Karzinoms (HCC) nimmt das metabolische Syndrom zunehmend einen bedeutenden Risikofaktor ein. In diesem Zusammenhang konnte ein von F. Dombrowski *et al.* entwickeltes Tiermodell darstellen, dass nach intraportaler Pankreasinseltransplantation durch erhöhte Insulin- und Glukosekonzentrationen sehr frühe präneoplastische Läsionen in der Leber entstehen, die sich zu hepatozellulären Karzinomen weiterentwickelt haben. Dieses hormonelle Karzinogenesemodell konnte von S. Ribback *et al.* bereits erfolgreich auf die Maus übertragen und mit einem ChREBP-Knockoutmodell erweitert werden.

In meiner Arbeit sollte die Häufigkeit dieser Leberherde im Mausmodell erhöht werden, um deren Signifikanz in der experimentellen Hepatokarzinogenese ermitteln zu können.

Es konnte in dieser Arbeit eine präoperative subkutane Insulinbehandlung etabliert werden, um den Blutzucker innerhalb von fünf Tagen bei diabetischen WT- (C57BL/6J) und ChREBP-KO-Mäusen auf normoglykämie Werte zu halten. Das Ziel, die Häufigkeit präneoplastischer CCF in der Leber bei den WT-Mäusen zu erhöhen, konnte jedoch mit der subkutanen Insulintherapie nicht erreicht werden. Des Weiteren stellte sich die subkutane Insulintherapie aufgrund starker Blutzuckerschwankungen als eine ungeeignete Behandlungsmethode dar.

Durch die Behandlung mit Insulinsticks konnte jedoch der Blutzuckerspiegel auf konstante Werte eingestellt werden. Damit konnte eine geeignete Methode gefunden werden, um die diabetischen Komplikationen für spätere Langzeitversuche zu minimieren und ein langes Überleben der Versuchstiere zu gewährleisten.

In der Leber diabetischer ChREBP-KO-Mäuse entstanden spontane glykogenotische Veränderungen, die zuvor in dieser Form noch nicht beschrieben wurden, von kleinen herdförmigen Glykogenspeicherherden bis hin zu einer diffusen Glykogenose der Leber. Innerhalb dieser diffusen Glykogenose bestand eine leichte steatohepatitis-ähnliche Entzündung und es konnte eine gesteigerte Proliferationsaktivität nachgewiesen werden, was eine Tumorentstehung begünstigen könnte. ChREBP könnte daher, neben seinen bislang nachgewiesenen

protoonkogenen Eigenschaften, auch tumorsuppressive Funktionen in der Leber haben.

7. Literaturverzeichnis

1. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.
2. Golabi, P., et al., *Mortality assessment of patients with hepatocellular carcinoma according to underlying disease and treatment modalities*. Medicine (Baltimore), 2017. **96**(9): p. e5904.
3. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2019*. CA Cancer J Clin, 2019. **69**(1): p. 7-34.
4. Valery, P.C., et al., *Projections of primary liver cancer to 2030 in 30 countries worldwide*. Hepatology, 2018. **67**(2): p. 600-611.
5. Petrick, J.L., et al., *International trends in hepatocellular carcinoma incidence, 1978-2012*. Int J Cancer, 2020. **147**(2): p. 317-330.
6. McGlynn, K., J. Petrick, and W. London, *Chaper 33. Liver Cancer In: Thun MJ, Linet MS, Cerhan JR, Haiman C, Schottenfeld D, eds. Schottenfeld and Fraumeni cancer epidemiology and prevention*. 2018, New York, NY: Oxford University Press.
7. McGlynn, K.A., J.L. Petrick, and H.B. El-Serag, *Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma*. Hepatology, 2021. **73 Suppl 1**: p. 4-13.
8. Evert, M. and F. Dombrowski, *[Hepatocellular carcinoma in the non-cirrhotic liver]*. Pathologe, 2008. **29**(1): p. 47-52.
9. El-Serag, H.B., T. Tran, and J.E. Everhart, *Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma*. Gastroenterology, 2004. **126**(2): p. 460-8.
10. Marengo, A., C. Rosso, and E. Bugianesi, *Liver Cancer: Connections with Obesity, Fatty Liver, and Cirrhosis*. Annu Rev Med, 2016. **67**: p. 103-17.
11. Regimbeau, J.M., et al., *Obesity and diabetes as a risk factor for hepatocellular carcinoma*. Liver Transpl, 2004. **10**(2 Suppl 1): p. S69-73.
12. Saklayen, M.G., *The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome*. Curr Hypertens Rep, 2018. **20**(2): p. 12.
13. Libbrecht, L., V. Desmet, and T. Roskams, *Preneoplastic lesions in human hepatocarcinogenesis*. Liver Int, 2005. **25**(1): p. 16-27.
14. Del Prato, S., et al., *Effect of sustained physiologic hyperinsulinaemia and hyperglycaemia on insulin secretion and insulin sensitivity in man*. Diabetologia, 1994. **37**(10): p. 1025-35.

15. Tsuchiya, K. and D. Accili, *Liver sinusoidal endothelial cells link hyperinsulinemia to hepatic insulin resistance*. *Diabetes*, 2013. **62**(5): p. 1478-89.
16. Weyer, C., et al., *A high fasting plasma insulin concentration predicts type 2 diabetes independent of insulin resistance: evidence for a pathogenic role of relative hyperinsulinemia*. *Diabetes*, 2000. **49**(12): p. 2094-101.
17. Bucher, M.L. and M.N. Swaffield, *Regulation of hepatic regeneration in rats by synergistic action of insulin and glucagon*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975. **72**(3): p. 1157-60.
18. Titchenell, P.M., M.A. Lazar, and M.J. Birnbaum, *Unraveling the Regulation of Hepatic Metabolism by Insulin*. *Trends Endocrinol Metab*, 2017. **28**(7): p. 497-505.
19. Dombrowski, F., P. Bannasch, and U. Pfeifer, *Hepatocellular neoplasms induced by low-number pancreatic islet transplants in streptozotocin diabetic rats*. *Am J Pathol*, 1997. **150**(3): p. 1071-87.
20. Dombrowski, F., et al., *Altered liver acini induced in diabetic rats by portal vein islet isografts resemble preneoplastic hepatic foci in their enzymic pattern*. *Am J Pathol*, 1996. **148**(4): p. 1249-56.
21. Dombrowski, F., M. Lehringer-Polzin, and U. Pfeifer, *Hyperproliferative liver acini after intraportal islet transplantation in streptozotocin-induced diabetic rats*. *Lab Invest*, 1994. **71**(5): p. 688-99.
22. Dombrowski, F., C. Mathieu, and M. Evert, *Hepatocellular neoplasms induced by low-number pancreatic islet transplants in autoimmune diabetic BB/Pfd rats*. *Cancer Res*, 2006. **66**(3): p. 1833-43.
23. Liberti, M.V. and J.W. Locasale, *Correction to: 'The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?': [Trends in Biochemical Sciences, 41 (2016) 211]*. *Trends Biochem Sci*, 2016. **41**(3): p. 287.
24. Liberti, M.V. and J.W. Locasale, *The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?* *Trends Biochem Sci*, 2016. **41**(3): p. 211-218.
25. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. *Science*, 2009. **324**(5930): p. 1029-33.
26. Warburg, O., *On the origin of cancer cells*. *Science*, 1956. **123**(3191): p. 309-14.
27. Evert, M., et al., *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*. *Hepatology*, 2012. **55**(5): p. 1473-84.

28. Evert, M., R. Schneider-Stock, and F. Dombrowski, *Overexpression of fatty acid synthase in chemically and hormonally induced hepatocarcinogenesis of the rat*. *Lab Invest*, 2005. **85**(1): p. 99-108.
29. Evert, M., et al., *Insulin receptor, insulin receptor substrate-1, Raf-1, and Mek-1 during hormonal hepatocarcinogenesis by intrahepatic pancreatic islet transplantation in diabetic rats*. *Cancer Res*, 2004. **64**(21): p. 8093-100.
30. Calvisi, D.F., et al., *Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC*. *Gastroenterology*, 2006. **130**(4): p. 1117-28.
31. Calvisi, D.F., et al., *Increased lipogenesis, induced by AKT-mTORC1-RPS6 signaling, promotes development of human hepatocellular carcinoma*. *Gastroenterology*, 2011. **140**(3): p. 1071-83.
32. Bannasch, P., *Pathogenesis of hepatocellular carcinoma: sequential cellular, molecular, and metabolic changes*. *Prog Liver Dis*, 1996. **14**: p. 161-97.
33. Su, Q., et al., *Human hepatic preneoplasia: phenotypes and proliferation kinetics of foci and nodules of altered hepatocytes and their relationship to liver cell dysplasia*. *Virchows Arch*, 1997. **431**(6): p. 391-406.
34. Ribback, S., et al., *Hepatocellular glycogenotic foci after combined intraportal pancreatic islet transplantation and knockout of the carbohydrate responsive element binding protein in diabetic mice*. *Oncotarget*, 2017. **8**(61): p. 104315-104329.
35. Ribback, S., et al., *Molecular and metabolic changes in human liver clear cell foci resemble the alterations occurring in rat hepatocarcinogenesis*. *J Hepatol*, 2013. **58**(6): p. 1147-56.
36. Iizuka, K., et al., *Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(19): p. 7281-6.
37. Poupeau, A. and C. Postic, *Cross-regulation of hepatic glucose metabolism via ChREBP and nuclear receptors*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1812**(8): p. 995-1006.
38. Ribback, S., et al., *Oncogene-dependent addiction to carbohydrate-responsive element binding protein in hepatocellular carcinoma*. *Cell Cycle*, 2018. **17**(12): p. 1496-1512.
39. Wang, Y., et al., *Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015. **16**(11): p. 678-89.
40. Xu, X., et al., *Transcriptional control of hepatic lipid metabolism by SREBP and ChREBP*. *Semin Liver Dis*, 2013. **33**(4): p. 301-11.

41. Dentin, R., et al., *Glucose 6-phosphate, rather than xylulose 5-phosphate, is required for the activation of ChREBP in response to glucose in the liver.* J Hepatol, 2012. **56**(1): p. 199-209.
42. Iizuka, K., *The transcription factor carbohydrate-response element-binding protein (ChREBP): A possible link between metabolic disease and cancer.* Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017. **1863**(2): p. 474-485.
43. Dentin, R., J. Girard, and C. Postic, *Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver.* Biochimie, 2005. **87**(1): p. 81-6.
44. Dentin, R., et al., *Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression.* J Biol Chem, 2004. **279**(19): p. 20314-26.
45. Dentin, R., et al., *Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice.* Diabetes, 2006. **55**(8): p. 2159-70.
46. Donnelly, K.L., et al., *Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease.* J Clin Invest, 2005. **115**(5): p. 1343-51.
47. Rajas, F., A. Gautier-Stein, and G. Mithieux, *Glucose-6 Phosphate, A Central Hub for Liver Carbohydrate Metabolism.* Metabolites, 2019. **9**(12).
48. Denechaud, P.D., et al., *Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance.* FEBS Lett, 2008. **582**(1): p. 68-73.
49. Iizuka, K., B. Miller, and K. Uyeda, *Deficiency of carbohydrate-activated transcription factor ChREBP prevents obesity and improves plasma glucose control in leptin-deficient (ob/ob) mice.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **291**(2): p. E358-64.
50. Jois, T., et al., *Deletion of hepatic carbohydrate response element binding protein (ChREBP) impairs glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice.* Mol Metab, 2017. **6**(11): p. 1381-1394.
51. Uyeda, K. and J.J. Repa, *Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis.* Cell Metab, 2006. **4**(2): p. 107-10.
52. Marchesini, G., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome.* Diabetes, 2001. **50**(8): p. 1844-50.
53. Tong, X., et al., *The glucose-responsive transcription factor ChREBP contributes to glucose-dependent anabolic synthesis and cell proliferation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(51): p. 21660-5.

54. Lunt, S.Y. and M.G. Vander Heiden, *Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011. **27**: p. 441-64.
55. Wang, X.L., et al., *Chrebp regulates the transcriptional activity of androgen receptor in prostate cancer*. *Tumour Biol*, 2014. **35**(8): p. 8143-8.
56. Jiang, L., et al., *Metabolic reprogramming during TGFbeta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition*. *Oncogene*, 2015. **34**(30): p. 3908-16.
57. Zeng, H., et al., *ChREBP promotes the differentiation of leukemia-initiating cells to inhibit leukemogenesis through the TXNIP/RUNX1 pathways*. *Oncotarget*, 2016. **7**(25): p. 38347-38358.
58. Hu, J., et al., *Co-activation of AKT and c-Met triggers rapid hepatocellular carcinoma development via the mTORC1/FASN pathway in mice*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 20484.
59. Li, L., et al., *Inactivation of fatty acid synthase impairs hepatocarcinogenesis driven by AKT in mice and humans*. *J Hepatol*, 2016. **64**(2): p. 333-341.
60. Linn, T., et al., *Ischaemia is linked to inflammation and induction of angiogenesis in pancreatic islets*. *Clin Exp Immunol*, 2006. **144**(2): p. 179-87.
61. Rao, P., et al., *Protective effect of a radical scavenger, MCI-186 on islet cell damages induced by oxidative stress*. *Transplant Proc*, 2005. **37**(8): p. 3457-8.
62. Ko, S.H., et al., *Inducible nitric oxide synthase-nitric oxide plays an important role in acute and severe hypoxic injury to pancreatic beta cells*. *Transplantation*, 2008. **85**(3): p. 323-30.
63. Li, C. and R.M. Jackson, *Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002. **282**(2): p. C227-41.
64. Carlsson, P.O., et al., *Chronically decreased oxygen tension in rat pancreatic islets transplanted under the kidney capsule*. *Transplantation*, 2000. **69**(5): p. 761-6.
65. Bennet, W., et al., *Isolated human islets trigger an instant blood mediated inflammatory reaction: implications for intraportal islet transplantation as a treatment for patients with type 1 diabetes*. *Ups J Med Sci*, 2000. **105**(2): p. 125-33.
66. Piemonti, L., L.G. Guidotti, and M. Battaglia, *Modulation of early inflammatory reactions to promote engraftment and function of transplanted pancreatic islets in autoimmune diabetes*. *Adv Exp Med Biol*, 2010. **654**: p. 725-47.
67. Merino, J.F., et al., *Improved outcome of islet transplantation in insulin-treated diabetic mice: effects on beta-cell mass and function*. *Diabetologia*, 1997. **40**(9): p. 1004-10.

68. Szkudelski, T., *The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas*. *Physiol Res*, 2001. **50**(6): p. 537-46.
69. Grant, C.W., et al., *Development of standardized insulin treatment protocols for spontaneous rodent models of type 1 diabetes*. *Comp Med*, 2012. **62**(5): p. 381-90.
70. Stammberger, I., et al., *Evaluation of the carcinogenic potential of insulin glargine (LANTUS) in rats and mice*. *Int J Toxicol*, 2002. **21**(3): p. 171-9.
71. Flecknell, P.A., *Chapter 6 - Anaesthesia of Common Laboratory Species: Special Considerations*, in *Laboratory Animal Anaesthesia (Third Edition)*, P.A. Flecknell, Editor. 2009, Academic Press: San Diego. p. 181-241.
72. Gray, D.W., et al., *The use of the dye neutral red as a specific, non-toxic, intravital stain of islets of Langerhans*. *Br J Exp Pathol*, 1983. **64**(5): p. 553-8.
73. Eldridge, S.R., et al., *Measurement of chemically induced cell proliferation in rodent liver and kidney: a comparison of 5-bromo-2'-deoxyuridine and [3H]thymidine administered by injection or osmotic pump*. *Carcinogenesis*, 1990. **11**(12): p. 2245-51.
74. LinShin Canada, I. *Linbit - product instructions (for diabetic mice only)*. 2000 [22.07.2022]; Available from: <http://www.linshincanada.com/linbit.html>.
75. Pei, H., et al., *Cardiac-derived adiponectin induced by long-term insulin treatment ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury in type 1 diabetic mice via AMPK signaling*. *Basic Res Cardiol*, 2013. **108**(1): p. 322.
76. Donath, M.Y. and J.A. Ehses, *Type 1, type 1.5, and type 2 diabetes: NOD the diabetes we thought it was*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(33): p. 12217-8.
77. Patockova, J., et al., *Oxidative stress in the brain tissue of laboratory mice with acute post insulin hypoglycemia*. *Physiol Res*, 2003. **52**(1): p. 131-5.
78. Auer, R.N., et al., *The distribution of hypoglycemic brain damage*. *Acta Neuropathol*, 1984. **64**(3): p. 177-91.
79. Chu, X., et al., *Rapidly raise blood sugar will aggravate brain damage after severe hypoglycemia in rats*. *Cell Biochem Biophys*, 2014. **69**(1): p. 131-9.
80. Calcutt, N.A., et al., *Therapies for hyperglycaemia-induced diabetic complications: from animal models to clinical trials*. *Nat Rev Drug Discov*, 2009. **8**(5): p. 417-29.
81. Flyvbjerg, A., et al., *The role of growth hormone, insulin-like growth factors (IGFs), and IGF-binding proteins in experimental diabetic kidney disease*. *Metabolism*, 1995. **44**(10 Suppl 4): p. 67-71.

82. Jolival, C.G., et al., *Peripheral Neuropathy in Mouse Models of Diabetes*. *Curr Protoc Mouse Biol*, 2016. **6**(3): p. 223-255.
83. Reagan, L.P., A.M. Magarinos, and B.S. McEwen, *Neurological changes induced by stress in streptozotocin diabetic rats*. *Ann N Y Acad Sci*, 1999. **893**: p. 126-37.
84. Salgado, H.C., et al., *Arterial baroreceptors and experimental diabetes*. *Ann N Y Acad Sci*, 2001. **940**: p. 20-7.
85. Yu, D.Y., et al., *Pathogenesis and intervention strategies in diabetic retinopathy*. *Clin Exp Ophthalmol*, 2001. **29**(3): p. 164-6.
86. Whalen, B.J., J.P. Mordes, and A.A. Rossini, *The BB rat as a model of human insulin-dependent diabetes mellitus*. *Curr Protoc Immunol*, 2001. **Chapter 15**: p. Unit 15 3.
87. Nuernberger, V., et al., *Hormonally Induced Hepatocellular Carcinoma in Diabetic Wild Type and Carbohydrate Responsive Element Binding Protein Knockout Mice*. *Cells*, 2021. **10**(10).
88. Bosse, L., et al., *Characterisation of enzyme activities in liver parenchyma of diabetic ChREBP-KO mice*. *Z Gastroenterol*, 2020. **58**(01): p. 3.28.
89. Ausina, P., et al., *Insulin specifically regulates expression of liver and muscle phosphofructokinase isoforms*. *Biomed Pharmacother*, 2018. **103**: p. 228-233.
90. Dessì, S., et al., *Hexose monophosphate shunt and cholesterol synthesis in the diabetic and fasting states*. *Experimental and Molecular Pathology*, 1985. **43**(2): p. 177-186.
91. Miethke, H., et al., *Gluconeogenic-glycolytic capacities and metabolic zonation in liver of rats with streptozotocin, non-ketotic as compared to alloxan, ketotic diabetes*. *Histochemistry*, 1986. **85**(6): p. 483-9.
92. Müller-Esterl, W., *Citratzyklus – zentrale Drehscheibe des Metabolismus*, in *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler - Unter Mitarbeit von Ulrich Brandt, Oliver Anderka, Stefan Kerscher, Stefan Kieß und Katrin Ridinger*, W. Müller-Esterl, Editor. 2018, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 607-614.
93. Vijayakumar, A., et al., *Absence of Carbohydrate Response Element Binding Protein in Adipocytes Causes Systemic Insulin Resistance and Impairs Glucose Transport*. *Cell Rep*, 2017. **21**(4): p. 1021-1035.
94. Kahn, B.B., *Adipose Tissue, Inter-Organ Communication, and the Path to Type 2 Diabetes: The 2016 Banting Medal for Scientific Achievement Lecture*. *Diabetes*, 2019. **68**(1): p. 3-14.
95. Filhoulaud, G., et al., *Novel insights into ChREBP regulation and function*. *Trends Endocrinol Metab*, 2013. **24**(5): p. 257-68.

96. Linden, A.G., et al., *Interplay between ChREBP and SREBP-1c coordinates postprandial glycolysis and lipogenesis in livers of mice*. J Lipid Res, 2018. **59**(3): p. 475-487.
97. Postic, C., et al., *ChREBP, a transcriptional regulator of glucose and lipid metabolism*. Annu Rev Nutr, 2007. **27**: p. 179-92.
98. Ryder, J.W., M. Gilbert, and J.R. Zierath, *Skeletal muscle and insulin sensitivity: pathophysiological alterations*. Front Biosci, 2001. **6**: p. D154-63.
99. Ducluzeau, P.H., et al., *Regulation by insulin of gene expression in human skeletal muscle and adipose tissue. Evidence for specific defects in type 2 diabetes*. Diabetes, 2001. **50**(5): p. 1134-42.
100. Foretz, M., et al., *ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(5): p. 3760-8.
101. Girard, J., P. Ferre, and F. Foufelle, *Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes*. Annu Rev Nutr, 1997. **17**: p. 325-52.
102. Kim, J.B., et al., *Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1*. J Clin Invest, 1998. **101**(1): p. 1-9.
103. Osborne, T.F., *Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action*. J Biol Chem, 2000. **275**(42): p. 32379-82.
104. Towle, H.C., E.N. Kaytor, and H.M. Shih, *Regulation of the expression of lipogenic enzyme genes by carbohydrate*. Annu Rev Nutr, 1997. **17**: p. 405-33.
105. Lund, T., et al., *Sustained reversal of diabetes following islet transplantation to striated musculature in the rat*. J Surg Res, 2010. **160**(1): p. 145-54.
106. Saito, T., et al., *Reversal of diabetes by the creation of neo-islet tissues into a subcutaneous site using islet cell sheets*. Transplantation, 2011. **92**(11): p. 1231-6.
107. Tatarkiewicz, K., et al., *Reversal of hyperglycemia in mice after subcutaneous transplantation of macroencapsulated islets*. Transplantation, 1999. **67**(5): p. 665-71.
108. Biarnes, M., et al., *Beta-cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia*. Diabetes, 2002. **51**(1): p. 66-72.
109. Lee, N., et al., *Magnetosome-like ferrimagnetic iron oxide nanocubes for highly sensitive MRI of single cells and transplanted pancreatic islets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(7): p. 2662-7.

110. Chhabra, P., et al., *Adenosine A(2A) agonist administration improves islet transplant outcome: Evidence for the role of innate immunity in islet graft rejection*. Cell Transplant, 2010. **19**(5): p. 597-612.
111. Dombrowski, F., et al., *Cocarcinogenic effects of islet hormones and N-nitrosomorpholine in hepatocarcinogenesis after intrahepatic transplantation of pancreatic islets in streptozotocin-diabetic rats*. Cancer Res, 2005. **65**(15): p. 7013-22.
112. Bollen, M., S. Keppens, and W. Stalmans, *Specific features of glycogen metabolism in the liver*. Biochem J, 1998. **336 (Pt 1)**: p. 19-31.
113. Eberle, D., et al., *SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis*. Biochimie, 2004. **86**(11): p. 839-48.
114. Haeusler, R.A., et al., *Integrated control of hepatic lipogenesis versus glucose production requires FoxO transcription factors*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5190.
115. Horton, J.D., J.L. Goldstein, and M.S. Brown, *SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver*. J Clin Invest, 2002. **109**(9): p. 1125-31.
116. Petersen, M.C. and G.I. Shulman, *Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance*. Physiol Rev, 2018. **98**(4): p. 2133-2223.
117. Avruch, J., *MAP kinase pathways: the first twenty years*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(8): p. 1150-60.
118. De Meyts, P., *The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network*, in *Endotext*, K.R. Feingold, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
119. Ray, L.B. and T.W. Sturgill, *Insulin-stimulated microtubule associated protein kinase is detectable by analytical gel chromatography as a 35-kDa protein in myocytes, adipocytes, and hepatocytes*. Arch Biochem Biophys, 1988. **262**(1): p. 307-13.
120. Taniguchi, C.M., B. Emanuelli, and C.R. Kahn, *Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(2): p. 85-96.
121. Cohen, P. and S. Frame, *The renaissance of GSK3*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(10): p. 769-76.
122. Wang, H., G. Kouri, and C.B. Wollheim, *ER stress and SREBP-1 activation are implicated in beta-cell glucolipotoxicity*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 17): p. 3905-15.

I. Anhang

A. Versuchstiere und Haltung

C57BL/6J-Mäuse	Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH
ChREBP Knockout-Mäuse	The Jackson Laboratory, Bar Harbour, USA
Makrolon-Käfige Typ 3	Höhe 15 cm, Laufbodenfläche 830 cm ² , Zoonlab GmbH, Castrop-Rauxel, Deutschland
Makrolon-Käfige Typ 2	Höhe 14 mm, Laufbodenfläche 360 cm ² , Zoonlab GmbH, Castrop-Rauxel, Deutschland
Tiereinstreu	Typ bedding Grad 5, Faser/ Fibre, Sniff®, Soest, Deutschland
Polycarbonat Maus-Häuschen	Zoonlab GmbH, Castrop-Rauxel, Deutschland
pelletiertes Futter	10 mm Pellets, Zucht- und Haltungsfutter, Sniff®, Soest, Deutschland
Lochzange	Lochung für 2 mm Durchmesser, Zoonlab GmbH, Castrop-Rauxel, Deutschland

B. Materialien

25 ml Erlenmeyerkolben	narrow neck, Simax®, Kavalierglass a.s., Prag, Tschechische Republik
Autoklavierband	Steam 1052, Kartell S.p.A. – Labware Division, Noviglio, Italien
Bulldog-Klemme	stark gebogen, Medicon eG, Tuttlingen, Deutschland
Filter	Whatman™, folded filters 597 1/2, Diameter 240 mm, GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Deutschland
Filterpapier	Tissue-Tek® II Biopsietaschen, Vogel GmbH + Co. KG, Gießen, Deutschland

Gazetupfer	unsteril, 20 x 20 cm, Fuhrmann GmbH, Much, Deutschland
Glas Pasteurpipette	Kapazität 2 ml, Länge 150 mm, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Impföse	Impföse/Nadel, 1 µl, Ø 4 x 200 mm, nerbe plus GmbH & Co. KG, Winsen/Luhe, Deutschland
Infusionsbesteck	Intrafix® Primeline, 180 cm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Innenröhrchen	57 x 16 mm mit Schraubverschluss, Engelbrecht GmbH, Edermünde, Deutschland
Kanüle, 23 G	BD Microlance 3™ sterile Kanüle, 23G 1" – Nr. 16, 0,6 mm Außendurchmesser, 25 mm Länge
Kanüle, 26 G	BD Microlance 3™ sterile Kanüle, 26G 3/8" 0,45 mm Außendurchmesser, 10 mm Länge, Becton, Dickinson and Company Limited, Drogheda, Co. Louth, Irland
Kryoröhrchen	Cryo.S™, 2 ml, mit Aussengewinde, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Kunststoffschraubdosen	20 ml, Süsse Labortechnik GmbH & Co. KG, Gudensberg, Deutschland
Mullkompressen	unsteril, Fuhrmann®, Fuhrmann GmbH, Much, Deutschland
Nahtmaterial	Nadel-Faden-Kombination, USP 4/0, EP 1,5, Fadenlänge 45 cm, Polyvinylidenfluorid, monofil, blau, nicht resorbierbar, Marilon®, Catgut GmbH, Markneukirchen, Deutschland
Parafilm	Parafilm® M, 4 in. x 125 ft., Pechiney Plastic Packaging, Wisconsin, USA
Pinzette, stumpf	Bochem 18/10, anatomische Pinzette, Bochem Instrumente GmbH, Weilburg, Deutschland
Pinzette, spitz	HSC_552-11, anatomische Pinzette, Karl Hammacher GmbH, Solingen, Deutschland

Pinzette, gebogen	AU 1030, anatomische Pinzette, Asanus® Medizintechnik, Neuhausen ob Eck, Deutschland
Rasierklinge	Croma Diamant, Feintechnik GmbH Eisfeld, Eisfeld, Deutschland
Reaktionsgefäß	Eppendorf Tubes®, 1,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Saughilfe, groß	Bohrungsdurchmesser 6 mm, Volumen 30 ml, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Saughilfe, klein	Bohrungsdurchmesser 6 mm, Volumen 5 ml, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Schere, gebogen	Bochem, Typ 3, Bochem Instrumente GmbH, Weilburg, Deutschland
Schere, gerade	Aesculap BC060R, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Skalpell	Präzisa plus, No. 10, P. J. Dahlhausen & Co. GmbH, Köln, Deutschland
Spritze, 1 ml	BD® Plastipak™ sterile Spritze mit Luer-Ansatz, Becton Dickinson S.A., Madrid, Spanien
Spritzen	2 ml, 5 ml und 20 ml, BD Discardit™ II sterile Spritze mit Luer-Ansatz, Becton Dickinson S.A., Madrid, Spanien
steriles Abdecktuch	Steri-Drape™, 100 cm x 150 cm, 3M Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland
Venenpunktionsbesteck	Venofix® A, 0,5 x 15 mm, 30 cm Schlauchlänge, G 25, Luer Lock, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Venenverweilkatheter	BD Insyte-N™ Autoguard™ Sicherheitsvenenverweilkatheter mit Flügeln 24 G, BD Vialon™, 0,7 mm Außendurchmesser, 14 mm Katheterlänge, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

Verbindungsschlauch	ProSet Verbindungsleitung mit Luer-Ansatz, 0,5 x 2,35 mm Durchmesser, 30 cm Länge, Polyurethan, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Verlängerungsleitung	ProSet Verbindungsleitung mit Luer-Lock-Anschluss, PVC-frei, 0,5 x 2,35 300 mm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Wundklammern	Michel, 7,5 x 1,75 mm, Aesculap®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Zentrifugengläser	Volumen 15 ml, Höhe 113 mm, Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

C. Geräte

Blutzuckermessgerät	Accu-Chek® Performa, Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
Blutzucker-Messtreifen	Accu-Chek® Inform II, Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
Foto-Mikroskop	Leica-Leitz DMRB, Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland; mit Kamera: Nikon Digital Sight DS-Fi1, Nikon Corporation, Tokio, Japan
Heizmatte	Terra Mat 20, Größe 42 x 28 cm, Leistung 20 Watt, Happet Sp. z o.o., Posen, Polen
Laborwaage	Kern 440-45N Kompakt-Laborwaage, Kern und Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Laborzentrifuge	Centrifuge 5415 D, Max. Drehzahl 13200/min, Eppendorf – Netheler – Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer	Variomag® Mono Direct, Drehzahl 130 – 1000/min, H + P Labortechnik AG, Oberschleißheim, Deutschland
Magnetstäbchen	Rotilabo®, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Makroskop	Leica M420, mit Mikroskopkamera DFC295, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Schweiz
Operationsmikroskop	mit Tischstativ, Leica M651 MSD, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Schweiz
pH-Electrode	Sentix®, WTW, Weilheim, Deutschland
pH-Messgerät	inoLab® pH 720, WTW, Weilheim, Deutschland
Pipette	Eppendorf Research® 10 - 100 µl, Eppendorf AG, Hamburg Deutschland
Pipettenspitzen	epT.I.P.S.® Standard, Eppendorf Quality™, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	Brand® pipette controller micro-classic, Brand GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland
Rasiergerät	Aesculap® Elektra® II GH204, Aesculap Suhl GmbH, Suhl, Deutschland
Stereomikroskope	Leica S6 E und MZ6, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Vortex Schüttler	VM-300 Vortex Mixer 7-2020, Neolab®, Heidelberg, Deutschland
Wärmeschrank	Heraeus Function Line Brutschrank, Thermo Electron corporation, Massachusetts, Vereinigte Staaten

D. Chemikalien

2-Methylbutan	≥ 99 %, zur Synthese, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Acetylsalicylsäure	Aspirin®, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Albumin	bovine cryst. lyophil., Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Aqua dest.	Ampuwa® Spüllösung, Plastipur®, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland

BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridine, Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland
BrdU Antikörper	Monoclonal Mouse Anti-Bromodeoxyuridine Clone Bu20a, Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Cacodylatpuffer	Cacodylsäure Natriumsalz x 3 H ₂ O, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland; pH 7,4 mit HCl
Chloralhydrat	C-IV, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
DAB	Liquid DAB + Substrate Chromogen System, K3468, Dako North America Inc., Kalifornien, USA
Dextran	FP 40 reinst, PH. Eur., Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Diethylether	ROTIPURAN® ≥99,5 %, p.a., stabilisiert, Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Dihydrat, EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eisessig	Essigsäure 100% wasserfrei zur Analyse Emsure®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eosin G	gelblich, C.I. 45380, Certistain®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Rotipuran® ≥99,8 %, p.a., Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd-Lösung	4,5 % gepuffert mit Saccharose, Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Formamid	deionisiert ≥99,5 %, BioScience-Grade, RNase/DNase-frei, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glutardialdehyd	25 %, für die Elektronenmikroskopie, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	85 %, EMPROVE®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Hämatoxylin	krist. C.I.75290, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hanks' Balanced Salt Solution	10x, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Insulinstick	LinBits, Linshin Canada, Inc., Scarborough, Canada
Insulinstick Trokar	LinBits, Linshin Canada, Inc., Scarborough, Canada
Kalialaun	Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat zur Analyse EMSURE® ACS, Reag. Ph Eur, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ketamin	Ketamin 100 mg/ml, Selectavet Dr. Otto Fischer GmbH, Weyarn-Holzolling, Deutschland
Kollagenase	Collagenase NB 8 Broad Range from Clostridium hystolyticum, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
LSAB2 System-HRP	K0675, Dako North America Inc., Kalifornien, USA
m-Cresol	99%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Natriumchlorid	≥99,5 %, p.a., ACS, ISO, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid, 0,9 %	NaCl 0,9 % Spüllösung, Ecotainer®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland;
Isotone	
Natriumchloridlösung 0,9 %	Braun Injektionslösung, Mini-Plasco® connect, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Natriumcitrat	tri-Natriumcitrat-Dihydrat zur Analyse EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	NaH ₂ PO ₄ , Monohydrat, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Natriummetabisulfit	EMSURE® ACS, Reag. Ph Eur, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumiodat	zur Analyse EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Neutralrot	Neutralrot, C.I. 50040, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Osmiumtetroxid	≥99,95 % p.a., Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd	reinst, DAC, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Perjodsäure	≥99 %, p.a., Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Peroxidase Block	Novocastra™, Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, Vereinigtes Königreich
Phenol	BioXtra, ≥ 99,5 % (GC), Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Procain-HCl	Procainhydrochlorid, Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland
Protaphane® FlexPen®	Insulin human, 100 Internationale Einheiten/ ml, Novo Nordisk Pharma GmbH, Mainz, Deutschland
Protaphane® Penfill®	Novo Nordisk Pharma GmbH, Mainz, Deutschland
Proteinase	bacterial - Type XXIV, 7.0 - 14.0 units/ mg solid, lyophilized powder, Sigma-Aldrich®, Missouri, USA
Ringerlösung	Ecotainer®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Roti®Histokitt	synthetisches Einschlussmittel, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	1N Titrisol®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Schiff Reagenz	Dr. K. Hollborn & Söhne GmbH & Co KG, Leipzig, Deutschland
Schweineserum	Swine Serum (Normal), Dako North America Inc., Kalifornien, USA

Streptozotocin	Streptozocin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Sudanrot	Sudan(IV)-Farbstofflösung, Dr. K. Hollborn & Söhne GmbH & Co. KG, Leipzig, Deutschland
TRIS-Base	Trizma® Base BioUltra, for molecular biology, ≥99,8%, Sigma-Aldrich Co., Missouri, USA
TRIS-HCl	Trizma® hydrochloride reagent grade ≥99,0%, crystalline, Sigma-Aldrich Co., Missouri, USA
Tween	Dako Tween 20, Dako North America Inc., Kalifornien, USA
Xylazin	Xylasel 20 mg/ml, Selectavet Dr. Otto Fischer GmbH, Weyarn-Holzolling, Deutschland
Zinkchlorid	ZnCl ₂ , zur Analyse EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Zitronensäure	Monohydrat zur Analyse EMSURE®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Zitronensäure-Monohydrat	Z.A., Chemsolute®, Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland

E. Ergänzende Tabellen

Verdünnungsmedium pH 7,3	
Reagenz	Konzentration [mmol/l]
Glycerin	200
NaH ₂ PO ₄	1,35
Phenol	6,3
m-Cresol	13,8
ZnCl ₂	0,1

Tabelle 5: Zusammensetzung des Verdünnungsmediums für NPH-Insulin. NaH₂PO₄ Natriumdihydrogenphosphat, ZnCl₂ Zinkchlorid.

Spüllösung, 1 Liter - Ansatz	
Reagenz	Menge [g]
Dextran	40
Procain-HCl	5
<i>in Ringerlösung auflösen und auf 1 Liter auffüllen</i>	

Tabelle 6: Ansatz Spüllösung für 1 Liter. HCL Salzsäure.

Perfusionsfixationslösung, 1 Liter - Ansatz	
Reagenz	Menge [g]
Dextran	40
Paraformaldehyd	30
NaH ₂ PO ₄	2,65
Na ₂ HPO ₄	13,9
<i>mit A. dest. bei 70 °C auflösen und auf 1 Liter auffüllen</i>	

Tabelle 7: Ansatz Perfusionsfixationslösung für 1 Liter. NaH₂PO₄ Natriumdihydrogenphosphat, Na₂HPO₄ Dinatriumhydrogenphosphat.

2 % Osmium - Fixierungslösung	
Reagenz	Menge [ml]
4 % Osmiumtetroxid	1
0,2 mol Na-Cacodylatpuffer (pH 7,4)	1
<i>kurz vor Gebrauch mischen</i>	

Tabelle 8: Ansatz 2 % Osmium – Fixierungslösung. Na Natrium.

Nachfixierungslösung, 1 Liter - Ansatz	
Reagenz	Menge [g]
Paraformaldehyd	30
NaH ₂ PO ₄	2,65
Na ₂ HPO ₄	13,9
<i>mit A. dest. bei 70 °C auflösen, abkühlen und auf 1 Liter auffüllen</i>	

Tabelle 9: Ansatz Nachfixierungslösung für 1 Liter. NaH₂PO₄ Natriumdihydrogenphosphat, Na₂HPO₄ Dinatriumhydrogenphosphat.

2,5 % Glutaraldehydfixierungslösung	
Reagenz	Menge [ml]
25 % Glutaraldehyd	0,5
0,1 mol Na-Phosphatpuffer (pH 7,4)	5
<i>kurz vor Gebrauch mischen</i>	

Tabelle 10: Ansatz 2,5 % Glutaraldehydfixierungslösung. Na Natrium.

Hämatoxylin - Eosin - Färbung	
Ablauf / Reagenzien	Zeit
<i>Objektträger Entparaffinieren in Xylol und absteigender Alkoholreihe → A. dest.</i>	
Hämalaun (siehe Tabelle 12)	10 min
<i>Spülen in warmen Leitungswasser (ca. 5 min)</i>	
Eosin (siehe Tabelle 13)	3 min
<i>Aufsteigende Alkoholreihe → Xylol → Eindecken</i>	

Tabelle 11: Färbeprotokoll Übersichtsfärbung Hämatoxylin - Eosin – Färbung.

Hämalaun	
Reagenz	Menge
Hämatoxylin	1 g
Natriumjodat	0,2 g
Kalialaun	50 g
Chloralhydrat	50 g
Zitronensäure-Monohydrat	1 g
<i>Auf 1000 ml mit A. dest. auffüllen und aufkochen</i>	

Tabelle 12: Ansatz Hämalaun für Hämatoxylin - Eosin - Färbung (HE).

Eosin	
Reagenz	Menge
96 % Alkohol	750 ml
A. dest.	250 ml
Eosin G	1,5 g
<i>Vor Gebrauch der Lösung einige Tropfen Eisessig hinzugeben</i>	

Tabelle 13: Ansatz Eosin für Hämatoxylin - Eosin - Färbung (HE).

Periodsäure - Schiff (PAS) - Reaktion	
Ablauf / Reagenzien	Zeit
<i>Objektträger Entparaffinieren in Xylol und absteigender Alkoholreihe → A. dest.</i>	
1 % Periodsäure	10 min
A. dest.	<i>Spülen</i>
Schiff-Reagenz	10 bis 20 min
<i>Wässern in Leitungswasser</i>	10 min
SO ₂ -Wasser (siehe Tabelle 15)	10 min
A. dest.	<i>Spülen</i>
Hämalaun (siehe Tabelle 12)	5 min
<i>Spülen im warmen Leitungswasser (ca. 5 min)</i>	
<i>Aufsteigende Alkoholreihe → Xylol → Eindecken</i>	

Tabelle 14: Färbeprotokoll Periodsäure - Schiff - Reaktion (PAS). SO₂ Schwefeldioxid.

Schwefeldioxid (SO₂) - Wasser

Reagenz	Menge [ml]
Leitungswasser	800
Natriummetabisulfit	40
1n HCl	40

Tabelle 15: Ansatz SO₂-Wasser für Periodsäure - Schiff (PAS) – Reaktion. HCl Salzsäure.

Protokoll BrdU/Eosin-Immunfärbung

Ablauf / Reagenzien		Zeit
Tag 1	3 x Xylol	Je 5 min
	Absteigende Alkoholreihe (99 %, 96 %, 70 %)	Je 3 min
	Citratpuffer pH 6 (Zusammensetzung siehe Tabelle 17)	3 min im Schnellkochtopf unter Druck
	Schnelles Abkühlen des Schnellkochtopfes unter fließend Wasser	
	Abkühlen im Citratpuffer	20 min
	Spülen in A. dest. auf Schüttler	5 min
	0,075 % Proteinase im Wasserbad bei 37 °C	10 min
	Spülen in A. dest. auf Schüttler	5 min
	95 % Formamid im Wasserbad bei 70 °C	60 min
	Spülen in A. dest. auf Schüttler	5 min
	Spülen in Tris-Puffer auf Schüttler (Zusammensetzung siehe Tabelle 18)	5 min
	Peroxidase Block	30 min
	Spülen in Tris-Puffer	5 min
	Schweineserum 1:5 mit Tris-Puffer	10 min
	BrdU-Antikörper 1:50	Über Nacht im Kühlschrank
Tag 2	Spülen in Tris-Puffer	5 min
	Biotinylated LINK (LSAB2 System-HRP)	30 min
	Spülen in Tris-Puffer	5 min
	Streptavidin-HRP (LSAB2 System-HRP)	30 min
	Spülen in Tris-Puffer	5 min
	DAB	15 min
	Spülen in A. dest. auf Schüttler	5 min
	Hämalaun (Ansatz siehe Tabelle 12)	1 min
	Warmes Leitungswasser	5 min
	Eosin (siehe Tabelle 13)	7 sek
Aufsteigende Alkoholreihe (zügig), Xylol, Eindecken		

Tabelle 16: Färbeprotokoll BrdU/Eosin – Immunfärbung. BrdU Bromdesoxyuridin.

Citratpuffer pH 6	
Reagenz	Menge
0,1 M Zitronensäure (= Lösung A)	18 ml
0,1 M Natriumcitrat (= Lösung B)	82 ml
Auf 1000 ml mit A. dest. auffüllen, pH 6 mit Lösung A und Lösung B einstellen	

Tabelle 17: Ansatz Citratpuffer pH 6 für BrdU/Eosin – Immunfärbung. BrdU Bromdesoxyuridin.

TRIS - HCL - Puffer (Stammlösung)	
Reagenz	Menge
TRIS - Base	9 g
TRIS - HCl	68,5 g
Natriumchlorid	87,8 g
Auf 1000 ml mit A. dest. auffüllen, pH 7,4 - 7,6 mit HCl bzw. NaOH einstellen	
Gebrauchslösung:	Stammlösung 1:10 verdünnen, pH kontrollieren, 0,02 % Tween hinzufügen

Tabelle 18: Ansatz Tris - Puffer für BrdU/Eosin – Immunfärbung. HCl Salzsäure, NaOH Natriumhydroxid, BrdU Bromdesoxyuridin.