

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

Morphologische und proliferationskinetische Unterschiede klarzelliger Leberherde in
diabetischen Wildtyp- und Carbohydrate responsive element-binding protein-knockout- Mäusen
nach Modifikation der intraportalen Pankreasinseltransplantation

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2022

vorgelegt von: Josephine Frohme

geb. am: 16. März 1992

in: Berlin

Dekan: Prof. Dr. Karlhans Endlich

1. Gutachterin: Frau Prof. Dr. Silvia Ribback

2. Gutachterin: Frau Prof. Dr. Beate Straub

Ort, Raum: Universitätsmedizin Greifswald, Station D2, Raum L02.00

Tag der Disputation: 22.12.2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	8
1.1. Das hepatozelluläre Karzinom	8
1.2. NAFLD – Pathogenese und karzinogenes Potenzial.....	10
1.3. Die Hepatokarzinogenese am Tiermodell	11
1.4. Der Transkriptionsfaktor ChREBP	15
1.5. Fragestellung	18
2. Material und Methoden	19
2.1. Versuchstiere	19
2.2. Versuchstiergruppen.....	19
2.2.1. Versuchstiergruppen der Modifikation der Pankreasinselisolation	19
2.2.2. Versuchstiergruppen der Inseltransplantation	20
2.3. Tierhaltung	21
2.4. Einstellen einer diabetischen Stoffwechsellage durch Streptozotocin	21
2.5. Isolation des Pankreasgewebes	22
2.5.1. Anästhesie der Spendertiere	22
2.5.2. Durchführung der Isolation	22
2.6. Modifikation des Verdaus des Pankreasgewebes.....	23
2.6.1. Geänderte Parameter	23
2.6.2. Durchführung des Verdaus des Pankreasgewebes	25
2.7. Pankreasinseltransplantation	26
2.7.1. Anästhesie	26
2.7.2. Transplantationssystem	27
2.7.3. Durchführung der Transplantation	27
2.8. Gabe des Proliferationsmarkers BrdU.....	29
2.9. Perfusion.....	29
2.10. Untersuchungen an frisch isolierten Pankreasinseln	30
2.10.1. Anfertigen der Kryostatschnitte	30
2.10.2. Vitalitätstests	31
2.10.2.1. Vitalitätstest mit p-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid.....	31
2.10.2.2. Trypanblau-Ausschlusstest.....	32
2.11. Immunhistochemische Reaktion	32

2.11.1.	Immunhistochemische Reaktion zum Nachweis von Insulin	32
2.11.2.	Immunhistochemische Reaktion mit BrdU	34
2.12.	Morphologische Untersuchungen	34
2.12.1.	Konventionelle Lichtmikroskopie	34
2.12.2.	Proliferationsaktivität	34
2.12.3.	Elektronenmikroskopie	35
2.13.	Methodik der Auswertung.....	35
2.13.1.	Auswertung der Modifikation der Inselisolation	35
2.13.2.	Statistische Auswertung	35
3.	Auswertung	37
3.1.	Modifikation der Inselisolation	37
3.1.1.	Auswahl der Zielparameter einer gelungenen Isolation.....	37
3.1.2.	Auswertung der Einwirkzeit und Enzymkonzentration:	38
3.1.2.1.	Einfluss „Einwirkzeit“ und „Enzymkonzentration“ auf das Kriterium Reinheit	38
3.1.2.2.	Einfluss „Einwirkzeit“ und „Enzymmenge“ auf das Kriterium Qualität.....	39
3.1.3.	Auswertung der Schnittdicke	40
3.1.3.1.	Einfluss der Schnittdicke auf das Kriterium Reinheit	41
3.1.3.2.	Einfluss der Schnittdicke auf das Kriterium Qualität.....	42
3.1.4.	Auswertung der Vitalitätstests	42
3.2.	Auswertung der Versuchsgruppen	44
3.2.1.	Auswertung der Morphologie der hellzelligeren hepatozellulären Areale	44
3.2.1.1.	Morphologie der hellzelligeren hepatozellulären Areale der transplantierten Wildtyp-Mäuse.....	44
3.2.1.2.	Morphologie der hellzelligeren hepatozellulären Areale der transplantierten ChREBP-KO Mäusen	47
3.2.1.3.	Morphologie der hellzelligeren hepatozellulären Areale der nicht- transplantierten ChREBP-KO-Mäuse	49
3.2.1.4.	Morphologie der hellzelligeren hepatozellulären Areale der nicht- transplantierten Wildtyp-Mäuse	51
3.2.2.	Frequenz der Herdentstehung.....	51
3.2.2.1.	Untersuchung der Frequenz der Herdentstehung der Wildtypmäuse.....	51
3.2.2.2.	Untersuchung der Frequenz der Herdentstehung der ChREBP-Knockout Mäuse	52
3.2.2.3.	Vergleich der Frequenz der Herdentstehung der ChREBP-Knockout- und Wildtypgruppen.....	52

3.2.3.	Proliferationskinetische Untersuchungen.....	53
3.2.3.1.	Proliferationsaktivität der klarzelligen Leberherde der Wildtypmäuse	53
3.2.3.2.	Vergleich der Proliferationsaktivität der klarzelligen Leberherde der Wildtypmäuse.....	54
3.2.3.3.	Proliferationsaktivität der klarzelligen Leberherde der transplantierten ChREBP-Knockout Mäuse	55
3.2.3.4.	Proliferationsaktivität der hellzelligen hepatozellulären Areale der nicht-transplantierten ChREBP-Knockout Mäuse.....	55
3.2.3.5.	Vergleich der Proliferationsaktivität der hellzelligen hepatozellulären Areale der ChREBP-Knockout Mäuse.....	56
3.2.3.6.	Vergleich der Proliferationsaktivität der klarzelligen Leberherde der transplantierten Wildtypmäuse und der transplantierten ChREBP-Knockout Mäuse	57
4.	Diskussion	59
4.1.	Modifikation der Inselisolation	59
4.2.	Die Frequenz der Herdentstehung bei Wildtyp-Mäusen – das Schicksal der transplantierten Inseln	59
4.3.	Unterschiede in der Herdfrequenz der Wildtyp- und ChREBP-Knockout-Mäuse	63
4.4.	Morphologie der hellzelligen Herde der transplantierten Wildtyp-Mäuse	64
4.5.	Charakterisierung der klarzelligen Leberherde der transplantierten Wildtyp Mäuse	65
4.6.	Bedeutung der durch Inseltransplantation induzierten CCF der Wildtypmäuse in der Hepatokarzinogenese	67
4.7.	Morphologie der klarzelligen Leberherde der transplantierten ChREBP-Knockout Mäuse	67
4.8.	Analyse der Spontanherde der diabetischen ChREBP-Knockout Mäuse ohne Inseltransplantation.....	69
4.9.	Die Rolle von ChREBP in der hormonell induzierten Hepatokarzinogenese.....	71
4.10.	Die Rolle von CHREBP in der Hepatokarzinogenese im Zuge der NASH.....	74
4.11.	Schlussfolgerung	76
5.	Zusammenfassung	77
6.	Literaturnachweis	77
7.	Eidesstaatliche Erklärung	90
8.	Lebenslauf	91
9.	Danksagung	92
10.	Anhang	93

Abkürzungsverzeichnis

ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
Acetyl-Coenzym A	Acetyl-CoA
ACL	ATP-Citrat-Lyase
AGE	Advanced Glycation Endproducts
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog
AMP-K	AMP-Kinase
BrdU	5-Bromo-2-desoxyurin
bzw.	beziehungsweise
CCF	clear cell foci
ChoRE	Carbohydrate Responsive Element
ChREBP	Carbohydrate response element-binding protein
DNL	<i>de-novo</i> -Lipogenese
EGFR	Epidermal growth factor Rezeptors
FAS	Fettsäure-Synthase
G6Pc	Glukose-6-Phosphatase
G6PD	Glukose-6-Phosphatdehydrogenase
GK	Glukokinase
Glu-6-P	Glukose-6-Phosphat
GLUT2	Glucosetransporter Typ 2
HBV	Hepatitis B Virus
HCA	hepatozelluläres Adenom
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF-1 α	Hypoxie-induzierbaren Faktor 1 α
HIF-1 β	Hypoxie-induzierten Faktor-1 β
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IL-1 β	Interleukin-1 β
IRS1	Insulinrezeptorsubstrat 1
KG	Körpergewicht

KO	Knockout
L-PK	Pyruvatkinase vom Lebertyp
LSAB	Labelled Streptavidin-Biotin-Methode
MAPK	mitogen activated protein kinase
ME	Malatenzym
min	Minute
mTOR	mammalian targets of rapamycin
MW	Mittelwert
N	Anzahl
NAFLD	Nicht-alkoholische Fettleberkrankheit
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
PAS	Periodic acid–Schiff
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PKA	Proteinkinase A
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PPP	Pentosephosphatweg
Raf-1	Rapidly accelerated fibrosarcoma 1
Ras	Rat sarcoma
ROS	sauerstoffreaktive Spezies
S.E.M.	standard error of mean
SLD1	Stearoyl-CoA-Desaturase 1
SREBP-1c	Sterol regulatory element-binding protein 1c
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
TGF α	Transforming growth factors α
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WT	Wildtyp
X5P	Xylulose-5-phosphat

1. Einleitung

1.1. Das hepatozelluläre Karzinom

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist die sechsthäufigste Tumorerkrankung, für 90% der primären Leberkrebserkrankungen weltweit verantwortlich und die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache [1]. Das HCC zeigt eine überaus heterogene geographische Inzidenz. Dies reflektiert die unterschiedliche Verbreitung von Risikofaktoren für die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms [2, 3]. Die wichtigsten bekannten Risikofaktoren für ein HCC lassen sich ihrer Ätiologie nach in 5 Gruppen unterteilen:

- viral, in Form einer chronischen Hepatitis B (HBV) und C (HCV) Infektion,
- toxisch, hier vor allem Alkohol und Aflatoxine,
- immunabhängig, primär biliäre Cholangitis und Autoimmunhepatitis
- metabolisch, Diabetes und nicht-alkoholische Fettlebererkrankungen [4]
- Speichererkrankungen, Hämochromatose, Morbus Wilson, Glykogenose Typ 1 [5].

In Nordamerika, Europa und Japan stellte bislang eine Infektion mit dem Hepatitis C-Virus den Hauptrisikofaktor zusammen mit Alkoholkonsum dar [2]. Mit dem Aufkommen zunehmender kurativer Behandlungsoptionen für Patienten mit einer HCV-Infektion wurde erwartet, dass die Inzidenz der Entwicklung eines HCC in westlichen Ländern abnimmt. In den entwickelten Ländern hat sich jedoch die Inzidenz des HCC in den letzten drei Jahrzehnten verdreifacht [6, 7]. Bis zu 50% der neu diagnostizierten Fälle von HCC treten bei "virusfreien" Patienten auf [8] von denen die meisten an Diabetes mellitus Typ 2, Adipositas oder an einer nicht-alkoholischen Fettleberkrankheit (NAFLD) leiden [9]. Die NAFLD ist dabei definiert als klinisch-pathologische Entität, die von der histologisch definierten nicht-entzündlich isolierten Steatose mit einem Vorhandensein von Lipidtröpfchen im Zytoplasma bei mehr als 5% der Hepatozyten, bis hin zur nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) reicht, die durch Steatose, entzündliche Veränderungen und Ballonierung von Hepatozyten gekennzeichnet ist [10]. Per Definition muss hierbei ein Fehlen eines übermäßigen Alkoholkonsums vorliegen (typischerweise definiert als <20 g pro Tag bei Frauen und <30 g pro Tag bei Männern) [10]. Eine Meta-Analyse, die Daten aus 45 Studien zusammenfasste, berichtete über eine geschätzte NAFLD-Prävalenz in der Weltbevölkerung von 25% mit einem stetigen Anstieg in den letzten zehn Jahren von 15% im Jahr 2005 auf 25% im Jahr 2015 [11]. Die NAFLD ist dabei stark assoziiert mit Merkmalen des metabolischen Syndroms, einschließlich Adipositas, Insulinresistenz oder Diabetes mellitus Typ

2 (T2DM) und Dyslipidämie. Sie gilt daher als hepatische Manifestation des metabolischen Syndrom [12].

Neue Erkenntnisse deuten darauf hin, dass bei einem signifikanten Anteil der Patienten mit NAFLD-assoziiertem HCC kein histologischer Nachweis einer Zirrhose vorliegt [13]. In einer von Kawada *et al.* [14] durchgeführten Studie von 1168 Patienten, wiesen 75% der Patienten mit NASH-assoziiertem HCC keine Zirrhose auf. Paradis *et al.* [15] analysierten 128 HCC-Patienten über einen Zeitraum von 12 Jahren und berichteten über eine signifikante Anzahl von Patienten mit NASH, die bei Fehlen einer Fibrose ein HCC entwickelten, im Vergleich zu HCC im Rahmen einer anderen zugrunde liegenden chronischen Lebererkrankung [15]. Die Tatsache, dass Fibrose und Zirrhose für die Entwicklung von HCC bei NASH-Patienten nicht notwendig sind, deutet darauf hin, dass Adipositas, Insulinresistenz und das proinflammatorische Milieu von NASH die Karzinogenese direkt vermitteln können [13]. Übereinstimmend dazu berichteten Schlesinger *et al.* im Jahr 2013 in einer großen Kohortenstudie mit über 360.000 Patienten, dass T2DM mit einer erhöhten Inzidenz von HCC assoziiert war [16]. Eine von El-Serag *et al.* durchgeführte Metaanalyse ergab, dass T2DM mit einem etwa 2,5-fach erhöhten Risiko für eine HCC-Entstehung assoziiert ist [17]. Angesichts der Tatsache, dass die Inzidenz sowohl des T2DM als auch des HCC weltweit rapide zunimmt, sind die oben genannten epidemiologischen Zusammenhänge von erheblicher klinischer Bedeutung. Es gibt einige Hinweise dafür, dass T2DM und HCC eng miteinander verbunden sind, und zwar aufgrund ihres pathophysiologischen Zusammenhangs mit Adipositas, beeinträchtigter Insulinsensitivität und der NAFLD [13, 14, 18, 19]. So konnte eine nationale Kohortenstudie in Taiwan eine lineare Beziehung zwischen dem Auftreten von HCC und HbA1c zeigen [20].

Die steigende Inzidenz von NAFLD/NASH hat in der Folge zu einem dramatischen Anstieg der NASH-bedingten HCC-Inzidenz geführt [21]. Unter den Patienten mit NAFLD oder NASH ist die Lebererkrankung die dritthäufigste Todesursache [22], während das HCC die Haupttodesursache in dieser Gruppe darstellt [23]. Da bei Patienten mit nicht-zirrhosischem HCC häufig keine zugrunde liegende Lebererkrankung bekannt ist, werden in den meisten Fällen keine sonografischen Kontrollen durchgeführt. Folglich findet man nicht-zirrhosische HCCs oft in einem fortgeschrittenen Stadium [24]. Obwohl die Mortalität im Zusammenhang mit den meisten Tumorentitäten in den letzten 40 Jahren stetig zurückgegangen ist, haben sowohl die Inzidenz als auch die Todesfälle aufgrund von HCC erheblich zugenommen [25]. Bislang ist allerdings die Pathophysiologie der Hepatokarzinogenese im Rahmen eines T2DM und der NASH noch nicht ausreichend verstanden.

1.2. NAFLD – Pathogenese und karzinogenes Potenzial

Die Mechanismen im Zusammenhang mit Adipositas, Diabetes mellitus, NAFLD und HCC, insbesondere bei fehlender Zirrhose, sind noch nicht eindeutig geklärt und hängen wahrscheinlich eher mit der Pathogenese der Grunderkrankung als mit der Fibrose allein zusammen [26], obgleich die Pathogenese der NAFLD im Zuge eines Typ 2 Diabetes ein kanzerogenes Potenzial nahelegt [21].

Die Insulinresistenz führt dabei zu einer erhöhten hepatischen *de-novo*-Lipogenese (DNL) und einer beeinträchtigten Hemmung der Fettgewebslipolyse, was einen erhöhten Fluss von Fettsäuren in die Leber zur Folge hat. Die hepatische *de-novo*-Lipogenese wird dabei auf Transkriptionsebene über die Aktivierung des *Sterol regulatory element-binding protein 1c* (SREBP-1c) durch Insulin und über die Aktivierung des auf Kohlenhydrate ansprechenden elementbindenden Proteins (ChREBP) durch Glukose reguliert [27]. Die Folge eines Hyperinsulinismus stellt u.a. die Induktion des SREBP-1c dar, das wiederum die Expression mehrerer lipogener Gene fördert [28]. Der Anstieg freier Fettsäuren in der Leber führt wiederum durch das übermäßige Angebot zur Akkumulation aktiver Zwischenprodukte [29]. Toxische Lipidmetabolite führen zur Aktivierung von Stresskinasen, zur Aktivierung von Zelltodrezeptor-Signalwegen und lösen eine Organellenfunktionsstörung aus, die zu einer fortschreitenden Zellschädigung führt [30]. Zudem übersättigt der Zufluss freier Fettsäuren in die Leber die Fähigkeit zur Fettsäure-oxidation und fördert so die Produktion von sauerstoffreaktiven Spezies (ROS) und oxidativem Stress [31]. Es ist bekannt, dass erhöhte ROS und oxidativer Stress die Entwicklung vieler Tumorarten, einschließlich HCC, fördern können [21, 32] und zu Zytotoxizität, DNA-Schäden sowie zur Aktivierung und Unterdrückung multipler Gene führen, die potenziell an der zellulären Proliferation und dem Zellwachstum beteiligt sind (z.B. p53, D-Cyclin und c-RAS), wodurch die hepatische Karzinogenese weiter gefördert wird [21, 32, 33].

In der Summe führt die Lipidakkumulation in der Leber zu Stress des endoplasmatischen Retikulums, oxidativem Stress, mitochondrialem Stress und beeinträchtigter Autophagie, was zu dem als Lipotoxizität bekannten Zustand führt [34]. Darüber hinaus führt eine Hyperinsulinämie zu einer erhöhten Produktion von *Insulin-like growth factor 1* (IGF-1), einem Hormon, das in der Lage ist, die hepatische Zellproliferation zu stimulieren und die zelluläre Apoptose in der Leber zu hemmen [35]. Bei der Hyperinsulinämie wirkt Insulins zudem weniger metabolisch und mehr mitogen [36]. Insulin verringert seine metabolische Aktivität durch Überaktivierung von mammalian targets of rapamycin (mTOR), das die Stoffwechselwege unterhalb der Insulinsignale abschwächt. Gleichzeitig induziert Insulin den Mitogen-aktivierten Kinase-Weg,

wodurch das Überleben der Zellen verbessert wird [36]. Die Aktivierung des v-akt murine thymoma viral oncogene homolog (AKT)/ mammalian targets of rapamycin (mTOR)-Signalweges wurde bei etwa 30-40% der HCC-Patienten berichtet [37].

Die Bestimmung des zurechenbaren Risikos jeder Komponente des metabolischen Syndroms bzw. der Risikofaktoren der NAFLD für das HCC erfordern weitere Studien, um die Hepatokarzinogenese in nicht zirrhotischen Lebern und insbesondere die Entstehung und Progression präneoplastischer Läsionen im Milieu einer NAFLD bis hin zu einem invasiven Tumor zu verstehen. Meine folgenden Untersuchungen im Tiermodell sollten zum Ziel haben, die bisher wenig verstandenen Zusammenhänge zwischen einem dereguliertem Insulin- und Glukosespiegel und der nachfolgenden Entwicklung eines HCC weiter aufzuklären.

1.3. Die Hepatokarzinogenese am Tiermodell

Um den Einfluss einer Hyperinsulinämie und Hyperglykämie auf die Morphologie und den Zellmetabolismus der Hepatozyten und ein karzinogenes Potential *in vivo* untersuchen zu können, wurde von F. Dombrowski ein Inseltransplantationsmodell in diabetischen Ratten entwickelt [38-41], welches auf dem klinisch zur Diabetestherapie genutzten Verfahren einer portal-embolischen Transplantation von Pankreasinseln basiert [42]. Hierbei wurden Streptozotocin-diabetischen [38, 39, 41] sowie anschließend ebenfalls autoimmun-diabetischen [43] Ratten Pankreasinseln über die Pfortader in den rechten Leberlappen transplantiert [44]. Deren körpereigene Inseln waren aufgrund des Zellgiftes Streptozotocin bzw. „eines spezifischen Knockouts“ deutlich vermindert, es folgte eine hyperglykämie Stoffwechsellage [43, 44]. Im Unterschied zur therapeutischen Inseltransplantation wurde bewusst nur eine geringe Zahl von Inseln transplantiert (450-1000 Inseln) [38, 41]. Trotz maximaler Insulinsekretion der transplantierten β -Zellen waren diese nicht in der Lage, die systemische hyperglykämie Stoffwechsellage vollständig zu kompensieren [38]. Im Abstromgebiet der Inseltransplantate, die in anschließenden Sektionen in den Pfortaderästen identifiziert werden konnten, bestand im Gegensatz zum systemischen Insulinmangel daher eine Stoffwechsellage mit lokalem Hyperinsulinismus bei systemischer Hyperglykämie, welcher der des Diabetes mellitus Typ 2 modellhaft entspricht [38, 44]. Als Folge konnten in den dazugehörigen Leberazini erhebliche morphologische, proliferationskinetische und metabolische Veränderungen nachgewiesen werden [38, 39, 43, 44] (siehe Abbildung 1). Diese Veränderungen zeigten neben einer erhöhten Mitose- und verringerten Apoptoserate eine zellmorphologische Klarzelligkeit, die auf eine Vermehrung der Fettvakuolen und eine exzessive Glykogenspeicherung zurückzuführen war [38, 40, 41] und daher glykogenotische- oder

klarzellige Foci (*clear cell foci*, CCF) genannt wurden [45] (siehe Abbildung 1). Nach 6 bis 24 Monaten zeigten diese CCF eine schrittweise abfolgende Progression zu hepatozellulären Adenomen und Karzinomen [38-41, 43, 44]. Eine genauere Klassifikation dieser präneoplastischen Läsionen in rodenten Hepatokarzinogenesemodellen wurden von Su und Bannasch vorgenommen. Diese konnten erstmals eine Hepatokarzinogenesesequenz von glykogenspeichernden Herden (CCF), basophilen Herden und gemischtzelligen präneoplastischen Läsionen zeigen [46, 47]. Diese stadienhafte Entwicklung war mit einer abnehmenden Glykogenspeicherung und starken Vermehrung des rauen endoplasmatischen Retikulums sowie des Lipidgehaltes verbunden [41] (siehe Abbildung 1).

Beim Menschen wurden klarzellige Herde sowohl in zirrhotischen [46] als auch in nicht-zirrhotischen Lebern [46, 48] beschrieben. Menschliche CCF zeigen sowohl morphologische, metabolische als auch molekulare Veränderungen, die denen der präneoplastischen CCF ähnlich sind, die in Hepatokarzinogenesemodellen der Ratte durch lokalen Hyperinsulinismus [41, 49], chemisch [50] oder viral [51] induziert wurden.

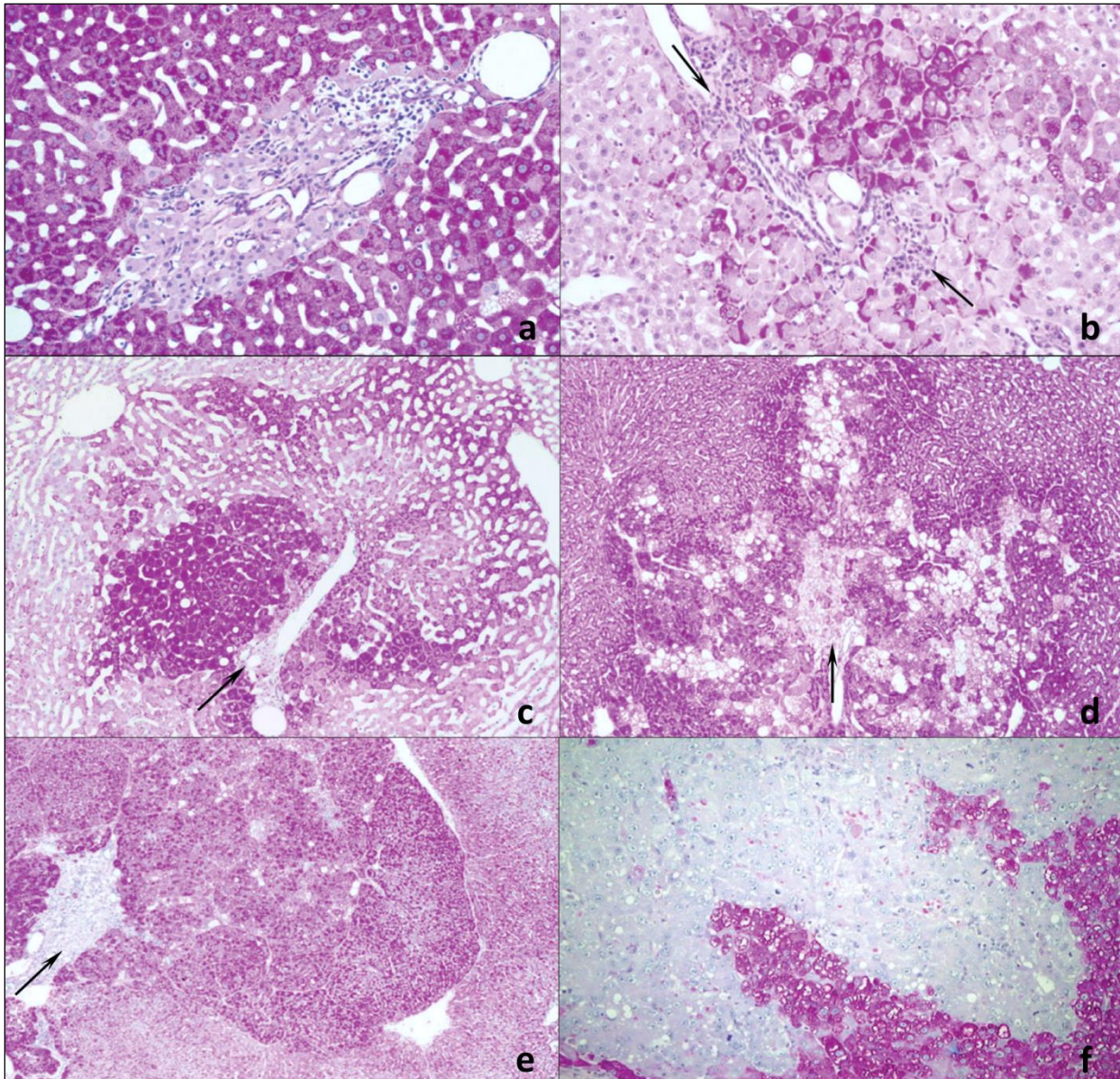


Abbildung 1: Histomorphologie von veränderten Leberazini und deren schrittweise Progression in hepatozelluläre Neoplasmen, sowie Kontrolllebern nach Pankreasinseltransplantation am Modelltier Ratte [43].

a normoglykämische Kontrollgruppe ohne hepatozelluläre Veränderungen stromabwärts der Inseln. **b** bis **f**, schrittweise Entwicklung zu einem HCC, **b** leicht fortgeschrittener CCF mit übermäßiger Glykogeneinlagerung, erkennbar durch die lila Färbung in der PAS Reaktion, **c** früher gemischtzelliger Fokus mit zunehmenden Bereichen der Glykogenverarmung, **d** fortgeschrittener gemischtzelliger Fokus, **e** frühes klarzelliges HCA mit expansivem Wachstum, **f** basophiles (glykogenarmes) HCC. Pfeile (**b-e**), Inseltransplantate, die zur jeweiligen Leberläsion gehören. **a** bis **f** PAS-Reaktion. Zu beachten ist der schrittweise Verlust von Glykogen, gezeigt durch verminderte Violett-färbung in der PAS Reaktion. Zeit nach der Transplantation und Länge des unteren Randes des Panels: **a**: 12 Monate, 1,1 mm; **b**: 7 Monate, 720 µm; **c**: 8 Monate, 1,5 mm; **d**: 7 Monate, 1,8 mm; **e**: 14 Monate, 2,2 mm; **f**: 18 Monate, 900 µm;

Auf metabolischer Ebene zeigte sich ein verändertes Expressionsmuster von Enzymen, die am Kohlenhydrat- und Fettsäurestoffwechsel beteiligt sind [38-40, 52]. Dieses umfasst die Hochregulierung von Schlüsselenzymen, die an der Glykolyse (Hexokinase, Glyceraldehyd-3-

Phosphatdehydrogenase und Pyruvatkinase), der *de-novo*-Lipidsynthese (Fettsäuresynthese), sowie dem Pentosephosphatweg (Glucose-6-Phosphatdehydrogenase) beteiligt sind. Die Aktivität der wichtigsten Enzyme der Gluconeogenese (Glucose-6-Phosphatase) und der Glycogenolyse (Glycogenphosphorylase) zeigten sich hingegen herabreguliert [43, 48, 52].

Im humanen HCC wurde die Deregulierung der *de-novo*-Lipogenese und Glykolyse umfassend untersucht und als wichtiger pathogenetischer Mechanismus im Rahmen der experimentellen und menschlichen Hepatokarzinogenese anerkannt [53-57]. Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass die Konzentrationen verschiedener glykolytischer und lipogener Proteine direkt mit der biologischen Aggressivität des HCC und umgekehrt mit der Überlebensdauer der Patienten korreliert sind [53-57]. Eine Erklärung für einen entscheidenden Einfluss auf die Karzinogenese dieser metabolischen Veränderungen, ist die dadurch ausgelöste metabolische Reprogrammierung, die sich als eines der Hauptmerkmale von Tumorzellen etabliert hat [58, 59]. Tumorzellen nutzen, anders als normale Zellen, die Glykolyse für ihren Stoffwechselbedarf unabhängig von den Bedingungen der Sauerstoffversorgung, dieses Phänomen ist auch als "Warburg-Effekt" oder "aerobe Glykolyse" bekannt [60].

Auf molekularer Ebene zeigte sich sowohl im Tiermodell als auch in humanen HCC die Aktivierung der protoonkogenen Signalkaskade u.a. über den AKT/mTOR Signalweg, sowie eine Translokation des Insulinrezeptors und seine Heraufregulation, weiterhin eine Induktion von Insulinrezeptor Substrat [49, 54]. Die Aktivierung des AKT/mTOR-Signalweges scheint ein kritisches molekulares Ereignis der Tumorentstehung zu sein [36]. mTOR ist ein wichtiger Regulator des Zellwachstums, des Stoffwechsels und des Überlebens [36]. Dieser induziert insulinabhängig eine gesteigerte Glykolyse und Liponeogenese [49, 52, 54, 56]. Bei mehr als der Hälfte der untersuchten humanen HCC wurde eine Heraufregulierung des mTOR-Signalweges nachgewiesen [37]. Auch wurde gezeigt, dass mTOR-Inhibitoren das HCC-Zellwachstum wirksam hemmen [61]. Bei weiteren molekularen Untersuchungen der Zusammenhänge zwischen dem Diabetes mellitus und der Karzinogenese zeigte sich im Inseltransplantationsmodell der Ratte sowohl in präneoplastischen Herden als auch in hepatozellulären Karzinomen [56] eine Heraufregulation des *Carbohydrate response element-binding protein* (ChREBP), eines auf Glukose reagierenden Transkriptionsfaktors [62], der laut Studienlage etwa 50 % der hepatischen Lipogenese kontrollieren soll [63].

Um diese Erkenntnisse der molekularen Veränderungen im Zuge der Hepatokarzinogenese zu untermauern und zu erweitern wurde von Sonke und Lohr das Inseltransplantationsmodell der Streptozotocin-diabetischen Ratte auf die Maus übertragen [64]. Hierbei wurden Streptozotocin-diabetischen Wildtyp- und ChREBP Knockout-Mäusen eine niedrige Anzahl von Inseln (70

Inseln) in die Pfortader transplantiert. Es konnten ebenfalls erfolgreich *clear cell foci* nach einer und nach vier Wochen induziert werden, jedoch in einer erheblich geringeren Frequenz im Vergleich zur Induktion von CCF im Inseltransplantationsmodell der Ratte. Zudem wurde eine erhöhte Anzahl von Nekrosearealen der Leber der transplantierten Mäuse nachgewiesen [64]. In einer bereits veröffentlichten Publikation der Erkenntnisse meiner Doktorarbeit, sowie der Arbeit von Sonke und Lohr wurde in den induzierten CCF der Wildtyp-Mäuse ebenfalls eine Akt/mTOR-Überexpression sowie ein entscheidender Einfluss von ChREBP als wesentliche Komponente der AKT/mTOR-vermittelten Zellproliferation und des metabolischen Wechsels im Zuge der Hepatokarzinogenese nachgewiesen werden [65].

1.4. Der Transkriptionsfaktor ChREBP

Im Jahr 2001 entdeckte die Gruppe um K. Uyeda ein Protein, welches als der lang ersehnte auf Glukose reagierende Transkriptionsfaktor identifiziert wurde, das *Carbohydrate response element-binding protein* (ChREBP) [62]. ChREBP ist an schätzungsweise 50 % der durch Glucose aktivierten Transkriptionsprozesse in Leberzellen beteiligt [63].

An der Regulation von ChREBP sind verschiedene Mechanismen beteiligt, die auf Glukose abhängigen posttranslationalen Modifikationsprozessen, Translokationsprozessen vom Zytosol in den Nukleus und Genexpressionsprozessen beruhen [66]. Bei niedrigen Glukosekonzentrationen kommt es zu einer zweifachen Phosphorylierung von ChREBP [67], was zur Bindung von ChREBP an das Protein 14-3-3 und seiner Retention im Zytosol führt [67, 68], sowie die Bindung von ChREBP an Promotoren seiner Zielgene verhindert [67, 69]. Erhöhte Glukosekonzentrationen führen über die Synthese von Zwischenmetaboliten wie Xylulose-5-phosphat (X-5-P) zu einer Dephosphorylierung und Aktivierung von ChREBP [68, 70] und stimulieren dadurch die die Transkription der ChREBP- Zielgene [71] (siehe Abbildung 2). Posttranslationale Modifikationsprozesse im Nukleus, wie die Acetylierung über die Histonacetyltransferase, scheinen ebenfalls Einfluss auf die Aktivität von ChREBP und dessen Zielgenexpression zu nehmen [72]. Auf der Transkriptionsebene führen Regulationsmechanismen, wie beispielsweise über den nukleären Rezeptor Hepatozyten-Kernfaktor-4 α , zu einer glukoseabhängigen gesteigerten Transkription von ChREBP [73].

Nach den aufgeführten Modifikations-, Translokations- und Aktivierungsmechanismen bindet ChREBP an „Carbohydrate Responsive Element“ (ChoRE)-Motiven in den Promotoren seiner Zielgene, vermittelt dabei die transkriptionelle Wirkung von Glukose sowohl auf die glykolytische als auch auf die lipogene Genexpression [63]. ChREBP induziert dabei v.a. Gene von Enzymen, die direkt an der Glykolyse (L-PK) und Lipogenese (ACC, FAS) beteiligt sind,

sowie ergänzend Gene für Glucose-Transporter (GLUT2), für Enzyme zum Abbau von Fructose und für die Glycogen-Synthese [74].

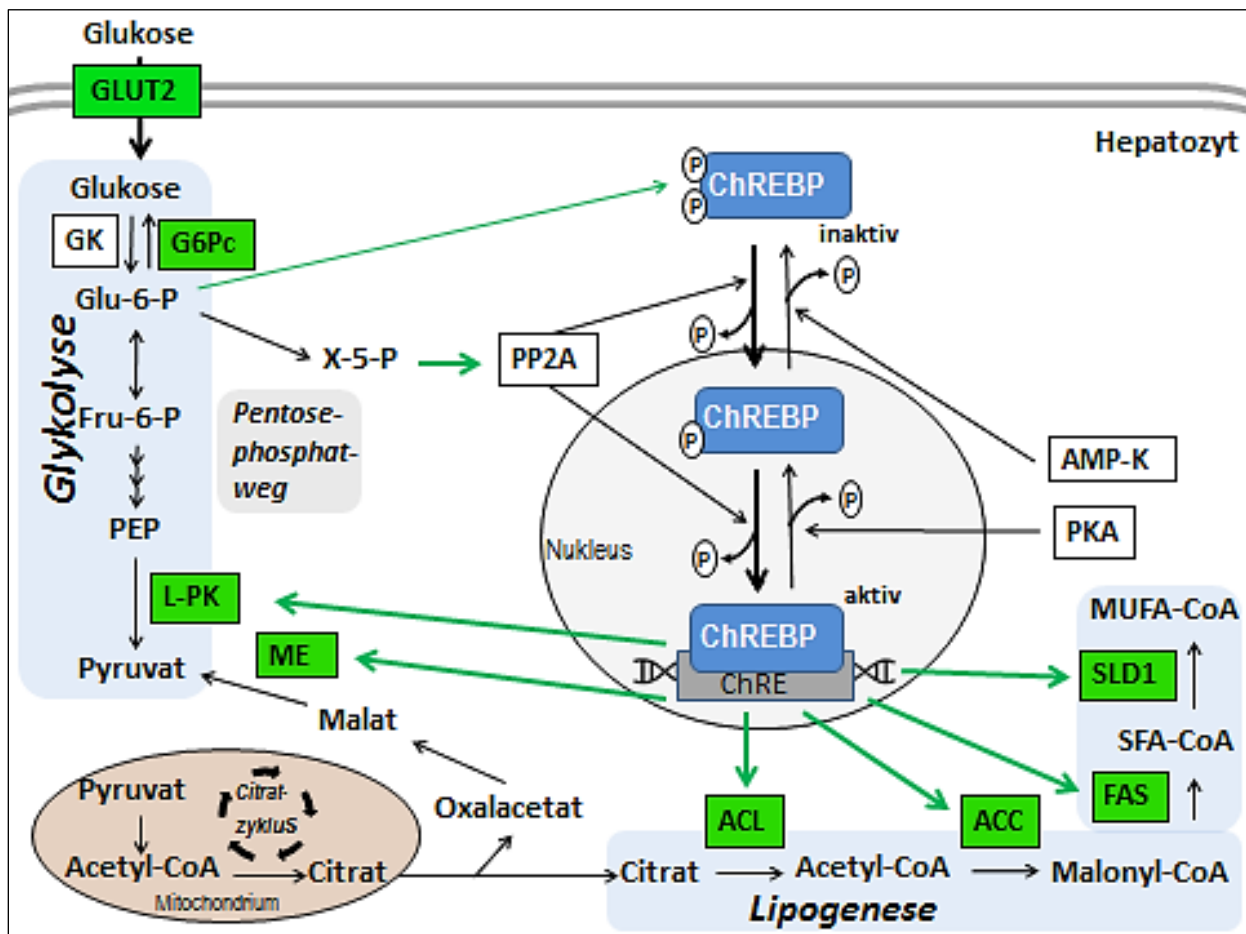


Abbildung 2: Regulation und Funktion von ChREBP

ChREBP wird glukoseabhängig durch die Proteinphosphatase 2A dephosphoryliert, in den Zellkern transloziert und aktiviert. Hier induziert es Enzyme der Lipogenese und Glykolyse. Weiterhin wird ChREBP durch Glu-6-P aktiviert.

X-5-P – Xylulose-5-Phosphat; Glu-6-P – Glukose-6-Phosphat; PP2A – Proteinphosphatase 2A; PKA – Proteinkinase A; GK – Glukokinase; G6Pc – Glukose-6-Phosphatase; L-PK – Pyruvatkinase vom Lebertyp; ACL – ATP-Citrat-Lyase; ACC – Acetyl-CoA-Carboxylase; FAS – Fettsäure-Synthase; SLD1 – Stearoyl-CoA-Desaturase 1; ME – Malatenzym; AMP-K – AMP-Kinase

Die Induktion von Enzymen des Pentosephosphatweges (PPP) und des Malatenzym, die das für die Fettsäure-Synthese notwendige NADPH + H⁺ liefern, sowie Enzymen des Citratzyklus, der zur Entstehung von Acetyl-CoA führt, dem Substrat für die Fettsäure-Synthese, unterstützen die Lipogenese auf weiteren Wegen [74].

In Tabelle 1 sind einige Beispiele von Zielgenen von ChREBP aufgelistet.

Stoffwechselweg	Beispiele für Zielgene
Glukoseaufnahme	<u>Glukosetransporter 2 - GLUT2</u> ; insulinunabhängige Glukoseaufnahme, Expression in Hepatozyten und Beta-Zellen des Pankreas [63]
Glykolyse	<u>Leberspezifische Pyruvatkinase</u> ¹ [3, 75] <u>Pyruvat-Dehydrogenase</u> - generiert Acetyl-CoA aus Pyruvat, verbindet Glycolyse und Citrat-Zyklus [76]
Lipogenese	<u>Acetyl-Coenzym A-Carboxylase</u> ² [75] <u>Fettsäure-Synthase (FAS)</u> ² [63] <u>Stearoyl-Coenzym A-Desaturase</u> ² - Synthese von einfach ungesättigten aus gesättigten Fettsäuren [7]
Pentosephosphatweg	<u>Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase</u> ² - Schlüsselenzym des oxidativen Teils des Pentosephosphatwegs [7] <u>Malat-Enzym</u> ² - generiert Pyruvat und NADPH + H ⁺ aus Malat und NADP ⁺ [74]
Gluconeogenese	<u>Glucose-6-phosphatase</u> [63]
Glycogen-Synthese	<u>Glycogen-Synthase 2</u> [74]

Tabelle 1: Auswahl einiger durch ChREBP regulierter Zielgene

¹ Für die Transkription von L-PK wird ChREBP alleiniger Aktivator angenommen [75]

² Diese Enzyme werden sowohl durch ChREBP als auch durch SREBP-1c reguliert. [7, 63, 74]

Für die maximale Induktion der meisten Gene für Enzyme der Lipogenese sowie vieler Gene für Enzyme der Glycolyse scheint ein Zusammenwirken des Glukose-abhängigen ChREBP und Insulin-abhängigen SREBP-1c nötig zu sein [77-79]. Einige Enzyme werden nur durch ChREBP, z. B. L-PK [80], oder nur durch SREBP-1c, z. B. GK [81], induziert. Interessanterweise induziert ChREBP auch die Expression eines Enzymes der Glukoneogenese, der Glucose-6-phosphatase (G6Pc). Damit induziert ChREBP sowohl glykolytische und glukoneogenetische Enzyme. Da Glukose-6- Phosphat selbst ChREBP aktiviert, lässt sich hierbei ein negativer Feedback Mechanismus vermuten, der eine Überaktivität von ChREBP verhindert [82].

1.5. Fragestellung

Das Modell der insulininduzierten Hepatokarzinogenese anhand einer intraportalen Inseltransplantation wurde bereits in der diabetischen Ratte etabliert. Langzeitexperimente anhand derer die Tumorentstehung über Adenom-Karzinom Sequenzen gezeigt wurde, konnten bereits am Tiermodell der Ratte durchgeführt werden. Die Übertragung dieses Modelles auf die diabetische Maus insbesondere bei ChREBP-Knockout Mäusen wurde von Sonke und Lohr begonnen, jedoch mit einem wesentlich geringeren Vorkommen der zu untersuchenden Herde [64]. Um eine Vergleichbarkeit der entstandenen Glykogenspeicherherde bezüglich ihrer Morphologie, ihres Metabolismus und ihrer Proliferationsaktivität bei ChREBP-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen zu erreichen, muss vor Durchführung von Langzeitexperimenten die Häufigkeit des Auftretens dieser Herde bei den Wildtypmäusen erhöht werden.

Auf dieser Grundlage war es das primäre Ziel meiner Doktorarbeit die Häufigkeit des Auftretens dieser Herde zu erhöhen. Dazu stellte ich die These auf, dass durch eine verbesserte Methodik der Isolation der Inseln der Reinheitsgrad dieser erhöht wird. Hierdurch kann das Volumen des Transplantats deutlich gesenkt werden und im Umkehrschluss die Anzahl der zu transplantierenden Inseln erhöht werden. Dabei sollen die zu transplantierenden Inseln vital und funktionsfähig trotz der veränderten Isolation bleiben

Die zweite These meiner Doktorarbeit besagt, dass durch eine höhere Anzahl transplanteder Inseln die Frequenz der klarzelligen Leberherde erhöht wird. Dabei wird angenommen, dass bei den diabetischen Wildtypmäusen nach Inseltransplantation durch einen lokalen Hyperinsulinismus hellzellige Leberherde entstehen, die durch glykogen- und lipidreiche Hepatozyten mit verstärkter Proliferationsaktivität charakterisiert sind. Hinsichtlich des zu untersuchenden Transkriptionsfaktors ChREBP postuliere ich, dass der intrahepatische Glykogengehalt der ChREBP-KO-Mäuse bei diabetischer Stoffwechsellage höher ist als bei den Wildtyp-Mäusen, da durch den Verlust von ChREBP das Gleichgewicht im intrahepatischen Glucose- und Lipidmetabolismus zugunsten der Glykogenbildung verschoben wird und somit zu einer Glykogenakkumulation und einem deutlich verringerten Lipidgehalt führt.

Hinsichtlich der Karzinogenese stelle ich die These auf, dass aufgrund des protoonkogenen Potentials von ChREBP klarzellige Herde der ChREBP-KO Mäuse eine niedrigere Proliferationsaktivität aufweisen. In diesem Rahmen überprüfe ich die zentrale Rolle von ChREBP in der Entstehung präneoplastischer Leberherde und seine protoonkogene Funktion in der Insulin induzierten Hepatokarzinogenese.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Die tierexperimentellen Untersuchungen dieser Doktorarbeit wurden durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern gemäß § 8 des Tierschutzgesetzes genehmigt (Aktenzeichen LALLF 7221.3-1-022/14).

Für die Versuche meiner Doktorarbeit wurden insgesamt 199 männliche Wildtyp-Mäuse vom Typ C57 Bl6/ J (WT), sowie männliche Tiere mit einem Gen-knockout von ChREBP (B6.129S6-*Mlxipl*^{tm1Kuy}/J/ChREBP-KO) verwendet. Zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Versuchstiergruppen wurde ein Alter von mindestens sechs Wochen festgelegt, die Tiere wogen zwischen 20- 25 g. Sie stammten von den Firmen Charles River Laboratories® Deutschland und Jackson Laboratories, Bar Harbour, USA und dann aus anschließender Eigenzucht.

2.2. Versuchstiergruppen

2.2.1. Versuchstiergruppen der Modifikation der Pankreasinselisololation

Im Rahmen der Modifikation der Isolation von Pankreasinseln wurde das Pankreas von insgesamt 110 Mäusen des Stammes C57Bl/6J verwendet und unter veränderten Parametern untersucht. Jeder veränderte Parameter wurde in fünf Versuchswiederholungen untersucht.

Die Auswertung der Modifikation der Inselisolation erfolgte anhand der folgender Kriterien: erstens „Reinheit“ der Inseln, d.h. dem makroskopischen Anteil an exokrinem Pankreas und zweitens „Qualität“ der Inseln, d.h. die makroskopische Form, Oberflächenbeschaffenheit und homogene Anfärbung. Pro Versuchsdurchlauf wurde das Pankreas von jeweils zwei Mäusen unter veränderten Parametern verwendet (siehe Tabelle 2). Geändert wurden die Parameter Einwirkzeit, Menge des verwendeten Enzyms und die Größe der anzugreifenden Gewebefragmente bzw. Schnittdicke, wie in Tabelle 2 festgehalten. Dabei wurden die Auswirkungen der Enzymmengen 2mg, 3mg und 3,75mg pro verwendetes Pankreas in unterschiedlichen Einwirkzeiten von 2 min, 5 min und 9 min untersucht. Nach Eruiierung einer optimalen Konstellation dieser Parameter wurde weiterhin der Parameter Schnittdicke des Pankreasgewebes von fein (Durchmesser kleiner als 0,5 mm), mittel (Durchmesser zwischen 0,5- 1mm) und grob (1- 2 mm) variiert.

Versuchsgruppen	Anzahl der Versuche	Kollagenase Menge	Einwirkzeit	Schnittdicke
Gruppe 1	5	3,75 mg	2 min	mittel
Gruppe 2	5	3,75 mg	5 min	mittel
Gruppe 3	5	3,75 mg	9 min	mittel
Gruppe 4	5	3 mg	2 min	mittel
Gruppe 5	5	3 mg	5 min	mittel
Gruppe 6	5	3 mg	9 min	mittel
Gruppe 7	5	2 mg	2 min	mittel
Gruppe 8	5	2 mg	5 min	mittel
Gruppe 9.1	5	2 mg	9 min	fein
Gruppe 9.2	5	2 mg	9 min	mittel
Gruppe 9.3	5	2 mg	9 min	grob

Tabelle 2: Versuchsgruppen der Modifikation der Pankreasinselisolation

2.2.2. Versuchstiergruppen der Inseltransplantation

Nach Modifikation der Isolation wurde insgesamt 66 diabetischen Mäusen eine Anzahl von 120 und 200 isolierten reinen Inseln transplantiert, jeweils diabetischen (Diabetesinduktion mittels Streptozotocin, siehe Abschnitt 2.4.) Mäusen des Stammes C57Bl/6J und ChREBP-Knockout. Eine und vier Wochen nach der Transplantation wurde das Experiment durch Tötung der Mäuse beendet und die Organe mittels einer Perfusion fixiert (siehe Abschnitt 2.9).

Da in den vorangegangenen Experimenten von Sonke und Lohr insbesondere in der Gruppe der Wildtypmäuse des Stammes C57Bl/6J eine geringe Herdfrequenz sowie ein vermindertes Anwachsen der transplantierten Inseln nach einer Woche aufgetreten ist, erfolgte im Zuge meiner Doktorarbeit eine Konzentration auf die Mäuse des Stammes C57Bl/6J und ebenfalls die Untersuchung nach einer Versuchszeit von einer Woche. Die Kontrollgruppen mit jeweils diabetischen Mäusen jedes Stammes wurden nicht transplantiert und ebenfalls nach vier Wochen perfundiert (siehe Tabelle 3).

Versuchsgruppe	Stamm	Anzahl N	Anzahl der transplantierten Inseln	Versuchsdauer
Hauptgruppe 1	C57Bl/6J	10	120	1 Woche
Hauptgruppe 2	C57Bl/6J	23	120	4 Wochen
Hauptgruppe 3	C57Bl/6J	5	200	1 Woche
Hauptgruppe 4	C57Bl/6J	6	200	4 Wochen
Hauptgruppe 5	ChREBP-Knockout	20	120	4 Wochen
Hauptgruppe 6	ChREBP-Knockout	2	200	1 Woche
Kontrollgruppe 1	C57Bl/6J	10	keine	4 Wochen
Kontrollgruppe 2	ChREBP-Knockout	13	keine	4 Wochen

Tabelle 3: Versuchstiergruppen der Inseltransplantation

2.3. Tierhaltung

Die Versuchstiere wurden in einem Makrolonkäfig Typ 3 (180 mm hoch mit Überfalldeckel, Tierstreu, Typ bedding S $\frac{3}{4}$ Faser Fichte/Tanne, rindenfrei, Ssniff®, Soest, Deutschland) gehalten. Eine Anreicherung der Tierhaltung fand in Form eines Maushäuschen aus Polycarbonat in rot-transparent von der Firma Bioscape® statt. Die Raumtemperatur betrug zwischen 23°C und 26°C, die Luftfeuchtigkeit zwischen 48 und 50 %. Die Tiere wurden unter Erhalt eines zwölfstündigen Tag- Nacht-Rhythmus gehalten. Als Nahrung erhielten die Versuchstiere Pelletfutter (Sniff®, Soest, Deutschland) und Leitungswasser. Nahrung und Wasser stand ihnen ad libitum zur Verfügung.

2.4. Einstellen einer diabetischen Stoffwechsellaage durch Streptozotocin

Eine Methode zur Generierung einer diabetischen Stoffwechsellaage im Tiermodell ist die Verwendung von Streptozotocin. Es wirkt spezifisch toxisch auf die beta-Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas [83]. Mindestens sechs Wochen alten Mäusen wurde Streptozotocin (180 mg/kg Körpergewicht) intraperitoneal injiziert. Die Blutzuckermessung mittels Messgerät (Accu-Chek®, Roche®, Berlin, Deutschland) erfolgte über die Schwanzspitze zu Versuchsbeginn, vor der Inseltransplantation (mindestens drei Tage nach Streptozotocin-Gabe) sowie am Versuchsende. Eine diabetische Stoffwechsellaage wurde ab einem Blutzuckerwert von über 16,7 mmol/l postuliert.

2.5. Isolation des Pankreasgewebes

2.5.1. Anästhesie der Spendertiere

Die Anästhesie der Spendertiere erfolgte mittels intraperitonealer Injektion (1 ml Spritze, BD® Plastipak, Kanülengröße: 26 G 3/8 0,45x10 mm, BD® microglance TM 3) eines Gemisches im Verhältnis 10:1 von Ketamin 10% (Ketanest®, 80- 100 mg/kg KG) und Xylazin 2% (Xylazel®, 10 mg/kg KG).

Nach Sicherstellung einer erfolgreichen Anästhesie mittels Schmerzreizung der Hinterpfote wurde mit der Isolation begonnen. Während der gesamten Sedierung erfolgte die Atmung der Tiere selbstständig.

2.5.2. Durchführung der Isolation

Nach Einleitung der oben beschriebenen Narkose wurde zunächst eine Rasur der ventralen Bauchwand mittels elektrischem Rasiergerät (Aesculap Elektra II GH 204) sowie eine Desinfektion mittels 70%-igen Alkohol vorgenommen. Es folgte die Fixierung der Versuchstiere in Rückenlage an den Extremitäten auf einem Operationstisch. Der Bauchraum wurde mit einem ca. 2 cm großen sagittalen Schnitt entlang der Linea alba und zwei an den Enden des mittleren Schnittes befindlichen transversalen Schnitten mittels chirurgischer Pinzette, gebogener Schere und Skalpell eröffnet. Es folgte nach seitlicher Verlagerung des Darmkonvoluts die Präparation der Aorta abdominalis bzw. der Bifurcatio aortae (siehe Abbildung 3, a) unter dem Stereomikroskop. In diese wurde mithilfe eines Venenpunktionsbesteckes (Venofix®, 25G, 0,5 x 15 mm, L: 30 cm, Braun) ca. 60 ml einer Neutralrot-Lösung in einer Zeitspanne von ca. 5- 10 Min. injiziert (Roth®, Karlsruhe, Deutschland, 50 mg Neutralrot auf 500 ml NaCl 0,9%, pH 6,8 - 8), um die Inselzellen des Pankreas anzufärben (siehe Abbildung 3, b). Bei makroskopisch sichtbarer Leberstauung wurde nach einer Injektion von ca. 5 ml Neutralrot-Lösung die Vena cava inferior im Spatium subhepaticum angeschnitten, um so den Blutkreislauf gezielt zu eröffnen und keine unkontrollierte Schädigung des Gewebes aufgrund einer Hypervolämie herbeizuführen (siehe Abbildung 3, c).

Nachdem das Pankreas rot/violett angefärbt war, wurde es entlang der Milz, Curvatura major gastricae, Pars descendens duodeni und des Darmkonvolutes mittels Pinzette frei präpariert (Siehe Abbildung 5, a). Das Gewebe wurde bis zu 2 h in auf Eis gekühlter, ca. 5- 8 °C temperierter Hanks- Lösung (Hanks' Balanced Salt Solution, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland, ohne NaHCO₃ mit Phenolrot, 10 %, pH 7,2), aufbewahrt (siehe Abbildung 3, d). Anschließend erfolgte der Verdau.

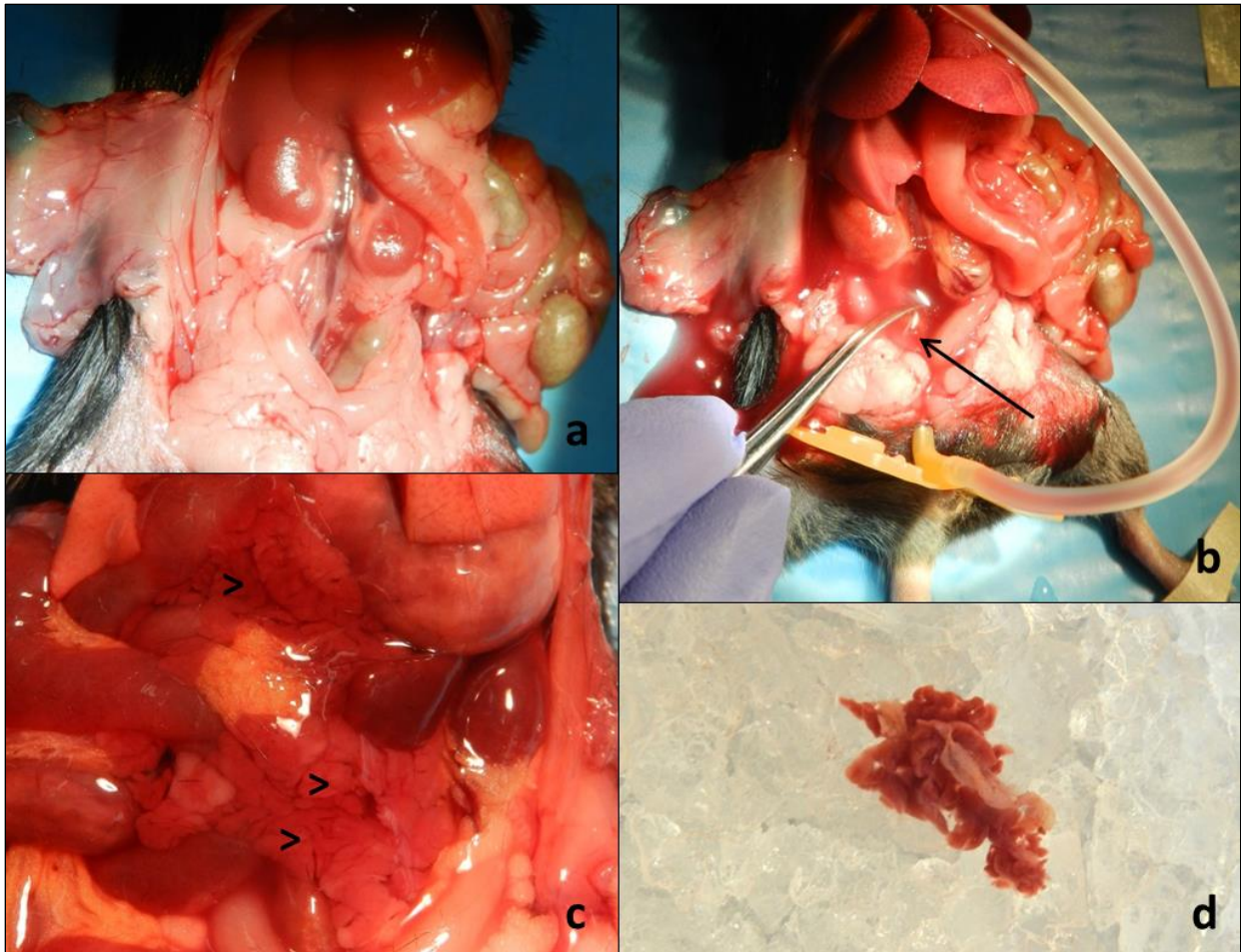


Abbildung 3: Anfärben des Pankreasgewebes

a Präparation der Aorta abdominalis, Blick auf den eröffneten Situs. **b** Gabe der Neutralrotlösung. Die Punktionsschere befindet sich in der Aorta abdominalis (siehe Pfeilmarkierung). Die Vena cava inferior wurde nach sichtbarer Leberstauung angeschnitten, sodass ein offener Blutkreislauf entstand. **c** Rot angefarbtes Pankreasgewebe (siehe Pfeilspitzen), Blick auf eröffneten Situs. **d** Entnommenes Pankreasgewebe auf Eis gekühlt.

2.6. Modifikation des Verdaus des Pankreasgewebes

2.6.1. Geänderte Parameter

Um das primäre Ziel meiner Doktorarbeit zu erreichen, die Erhöhung der Herzfrequenz, sollte die zu transplantierende Inselanzahl erhöht werden. Hierzu musste das zu transplantierende Volumen gesenkt werden, um mögliche ischämische Nekrosen nach thromboembolischen Verschlüssen durch das Transplantat zu vermeiden. Es erfolgte eine Modifikation des Verdaus des Pankreasgewebes wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben mit den primären Kriterien erstens „Reinheit“ und zweitens „Qualität“ der Inseln. Es wurden Pankreata von insgesamt 110 Mäusen wie in Abschnitt 2.5. geschildert isoliert. Pro Versuchsdurchlauf wurde nun das Pankreas von

jeweils zwei Mäusen unter veränderten Parametern verwendet (siehe Tabelle 2). Das Schlüsselement eines erfolgreichen Verdaus war die enzymatische Aufspaltung des mit den Inseln verbundenen exokrinen Pankreasgewebes und Bindegewebes. Diese wiederum ist abhängig von dem verwendeten Enzym, dessen Konzentration, Einwirkzeit, Umgebungstemperatur, der Größe der Gewebefragmente, der Substratkonzentration, dem pH-Wert und eventueller kompetitiver, nichtkompetitiver oder allosterischer Effekte.

Es wurde das Enzym Collagenase NB 8 (NB 8, Clostridium histolyticum, SERVA®) verwendet. Dieses proteolytische Enzym ist eine Komposition aus Kollagenase Klasse 1 und 2, neutraler Protease, Clostripain und zeigt zudem Trypsin-ähnliche Aktivitäten und spaltet Peptidbindungen in der Triplehelixstruktur der Kollagene Typ 1, 2, 3 und 4. Durch die unterschiedliche Kollagenzusammensetzung des endokrinen und exokrinen Anteils des Pankreasgewebes konnte das exokrine Gewebe zersetzt werden, während der endokrine Anteil weitestgehend intakt blieb [84]. Die optimale Umgebungstemperatur des Enzyms von 37,5° C sowie der pH-Wert von 7,2 wurden beibehalten. Geändert wurden die Parameter Einwirkzeit, Menge des verwendeten Enzyms und die Größe der anzugreifenden Gewebefragmente bzw. Schnittdicke, wie in Tabelle 2 festgehalten. Dabei wurden in jeweils fünf Versuchsdurchläufen die Auswirkungen der Enzymkonzentrationen 2mg, 3mg und 3,75mg pro verwendetes Pankreas in unterschiedlichen Einwirkzeiten von 2 min, 5 min und 9 min untersucht. Nach Eruiierung einer optimalen Konstellation dieser Parameter wurde weiterhin der Parameter Schnittdicke des Pankreasgewebes von *fein* (Durchmesser kleiner als 0,5 mm), *mittel* (Durchmesser zwischen 0,5-1mm) und *grob* (1- 2 mm) variiert (Siehe Abbildung 4).

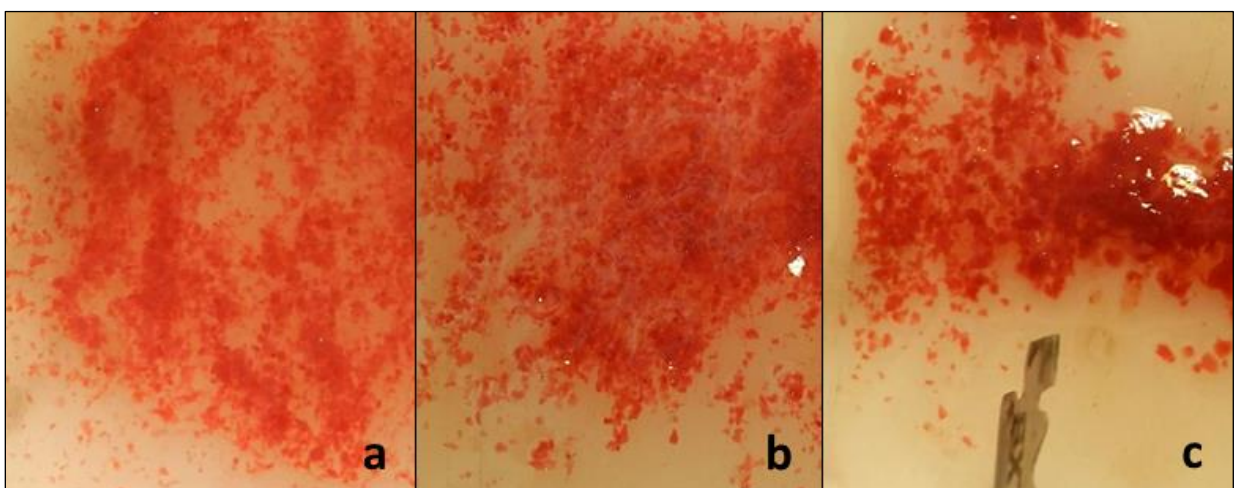


Abbildung 4: Schnittstücken des Pankreasgewebes

Mittels Rasierklinge wurde das Pankreasgewebe in unterschiedlich große Gewebestücke zerschnitten. Die Schnittstücken wurde hierbei unterteilt **a** fein (kleiner als 0,5 mm), **b** mittel (0,5mm- 1mm), **c** grob (1mm-2mm)

2.6.2. Durchführung des Verdaus des Pankreasgewebes

Das gekühlte Pankreasgewebe mehrerer Spendermäuse wurde mechanisch mittels zweier Rasierklingen (Blades, croma®) zerschnitten, sodass die bindegewebigen Fasern durchtrennt wurden, anschließend vom Schneidbrett aufgenommen und nochmals in gekühlte Hanks' Balanced Salt Solution gegeben (siehe Abbildung 5, c). Nach Absinken der Gewebemasse wurde die überschüssige Hanks-Lösung abpipettiert, um eine uneinheitliche Zeitspanne zum Erreichen des Temperaturoptimums des Enzyms im Gemisch zu verhindern. Das Gewebe wurde in ein auf 37,5°C erwärmtes Gemisch aus Collagenase NB8, bovines Serumalbumin (Albumin bovin, SERVA®, Heidelberg, Deutschland) und 1,2 ml Hanks-Lösung in einen 25 ml großen Erlenmeyerkolben gegeben. Hinzu wurde ein 1 cm großer Magnetprüher gegeben, der mittels elektrischer magnetischer Drehung (Variomag Mono, H+P Labortechnik-AG) mit einer Geschwindigkeit von ca. 100/min eine gute Durchmischung der Reagenzien gewährleisten sollte. Der Erlenmeyerkolben wurde daraufhin in einen Inkubationsschrank bei konstanten 37,5 °C für die jeweils unterschiedlichen Inkubationszeiten gestellt. Es wurden dazu Versuche mit einer variierenden Zeitspanne von zwei bis neun Minuten durchgeführt, wie in Tabelle 2 festgehalten. Die Konzentration des Serumalbumins wurde während des gesamten Versuches konstant bei 1 mg pro gewonnenes Pankreasgewebe gehalten. Es diente der Blockierung endogener Proteasen [85]. Somit konnte ein unkontrollierter Verdau durch freigesetzte Proteasen des exokrinen Pankreas reduziert werden.

Anschließend wurde die Suspension sofort in mit ca. 7°C kalter Hanks' Balanced Salt Solution gefüllte Reagenzgläser gegeben, um den enzymatischen Zersetzungsprozess abrupt und gezielt zu beenden. Auch die Anzahl der verwendeten Reagenzgläser wurde von vier auf sechs Stück erhöht, um eine veränderte Restaktivität des Enzyms bei einer ungleichmäßigen Abkühlung bei verschiedenen großen Volumina zu vermeiden. Das verdaute Gewebe wurde nun viermalig mit kalter Hanks' Balanced Salt Solution mit einer Absenkungszeit von acht Minuten zwischen zwei Spülvorgängen gespült. Unter einem Stereomikroskop (Leica S6E) und einer Lichtquelle (Leica KL2500 LCD) wurden die angefärbten und enzymatisch vom exokrinen Anteil gelösten Inseln mittels einer durch Hitze gebogenen Glaspipette (Disposable Glass pasteur Pipetts, 150 mm, We Enable Science®) und einem micro-classic Saugsystem (Brand®) aus einer Petrischale aufgenommen (siehe Abbildung 5, b, d und e), gezählt und zunächst in ein auf ca. 7°C gekühltes Eppendorfgefäß gegeben. Die gepickten Inseln wurden mit einer Verlängerungsleitung (35 x 300 mm) und einer 1 ml-Spritze, worin sich bereits 0,05 ml Hanks' Balanced Salt Solution befanden, aus dem Eppendorfgefäß auf ein resultierendes Flüssigkeitsvolumen von 0,1 ml aufgezogen (siehe Abbildung 6).

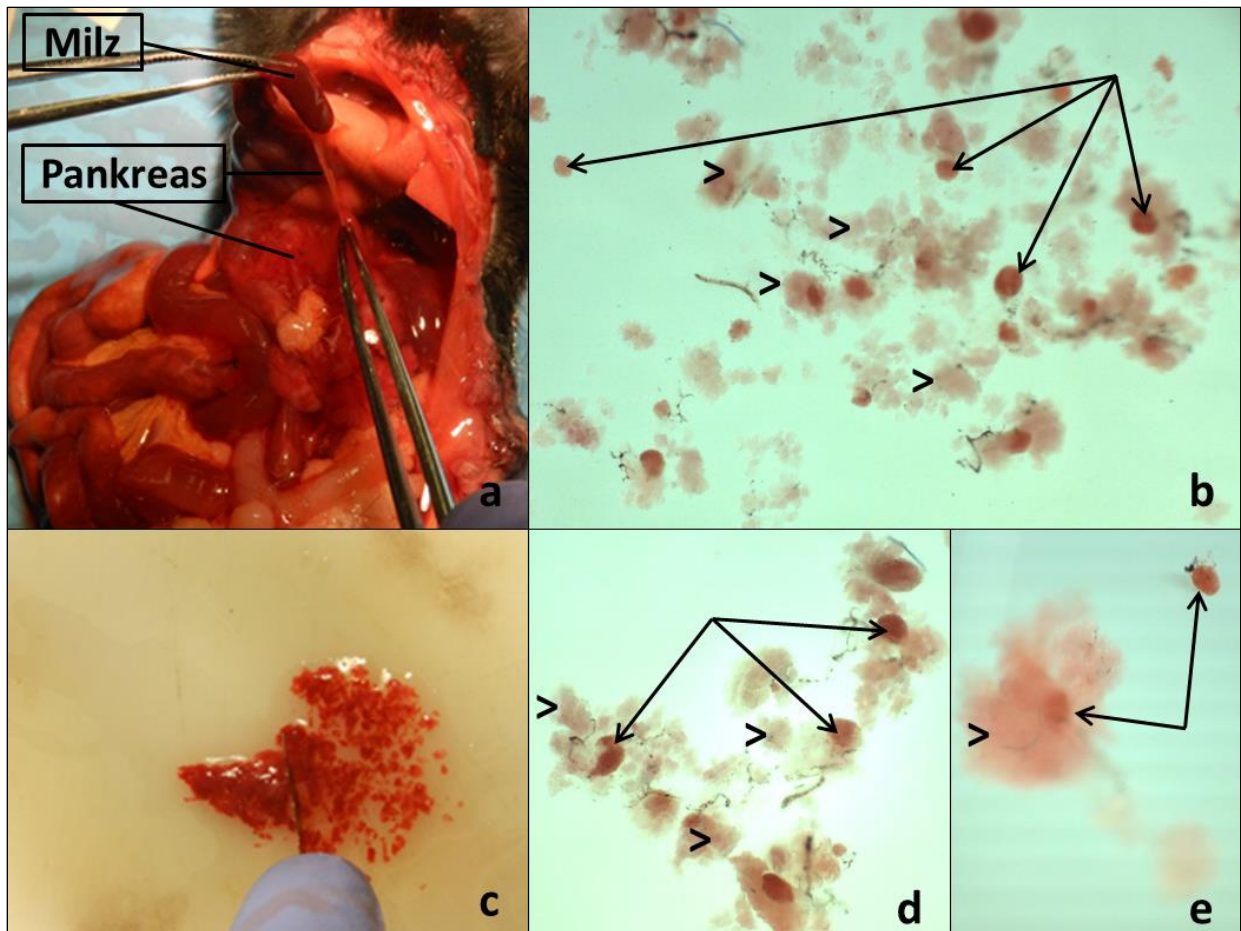


Abbildung 5: Durchführung des Verdaus sowie bereits verdaute Inseln unter dem Stereomikroskop
 a Mit Neutralrot angefärbtes Pankreasgewebe wird mittels stumpfer Pinzette vom umgebenden Gewebe entfernt, c Zerschnitt des Pankreasgewebes mittels Rasierklinge, b, d, e Inseln unter dem Stereomikroskop nach erfolgtem Verdau, Pfeilmarkierung: Pankreasinsel, Pfeilspitze: exokrines Pankreasgewebe; b 35-fache Vergrößerung, d und e 40-fache Vergrößerung

2.7. Pankreasinseltransplantation

2.7.1. Anästhesie

Die diabetischen Empfängertiere wurden mittels intraperitonealer Injektion (1 ml Spritze, BD® Plastipak, Kanülengröße: 26 G 3/8 0,45x10 mm, BD® microglance TM 3) eines Gemisches aus Ketamin 10% (Ketanest®, 80- 100 mg/kg KG) und Xylazin 2% (Xylazel®, 10 mg/kg KG) im Verhältnis 10:1 narkotisiert. Nach Sicherstellung einer erfolgreichen Anästhesie mittels Schmerzreizung der Hinterpfote wurde mit der Transplantation begonnen. Während der gesamten Narkose erfolgte die Atmung der Tiere selbstständig.

2.7.2. Transplantationssystem

Das Transplantationssystem wurde aus vorigen Experimenten von Sonke und Lohr übernommen [64]. Es bestand aus einer Metallkanüle (26G 0,45x 23 mm Größe; BDmikroglance®), einer 1 ml Spritze (BD Plastipak®) und einem Verbindungsschlauch (300 mm Länge und 2,35 mm Durchmesser, PUR PVC frei, Braun®). Der Verbindungsschlauch fasste nach Entlüftung ein maximales Volumen von 0,1 ml. Die Pankreasinseln wurden unter Sicht in das Schlauchsystem aspiriert (Abbildung 6, a). Abschließend wurde das Transplantationssystem mit der oben genannten Metallkanüle verschlossen und mit Sekundenkleber (UHU®) verdichtet (siehe Abbildung 6, b). In den jeweiligen Versuchsgruppen wurden jeweils ca. 120 Inseln und 200 Inseln in 0,1 ml Hanks-Lösung maximal 10 min. im Transplantationssystem aufbewahrt (siehe Abbildung 6, c).

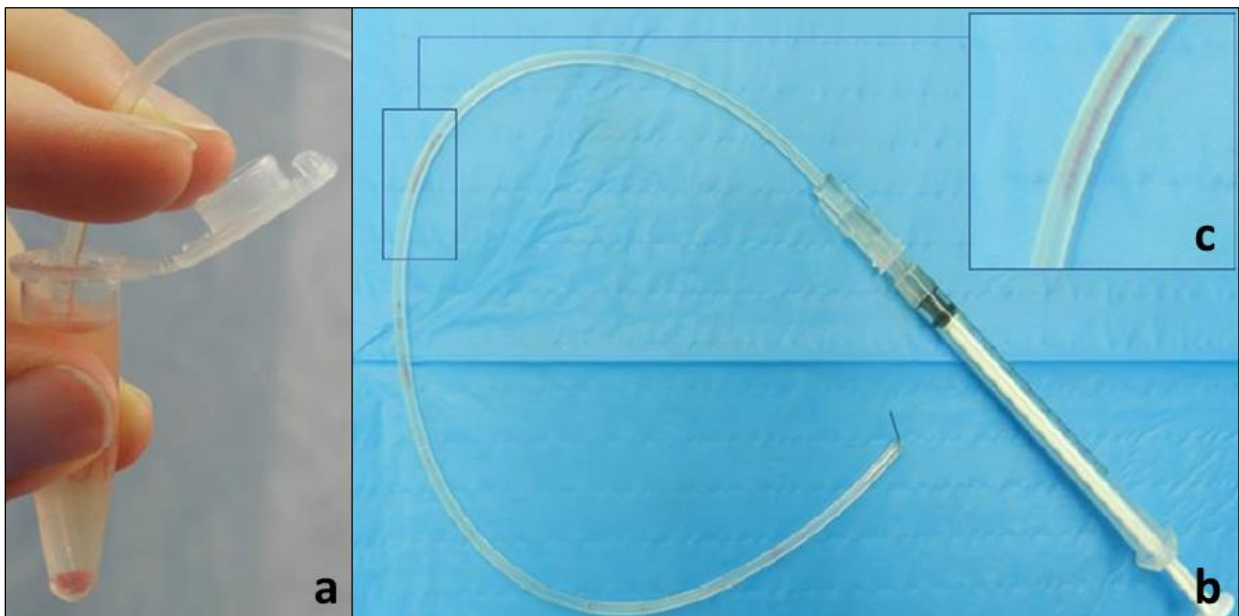


Abbildung 6: Transplantationssystem [64]

a Gesammelte und gefärbte Pankreasinseln am Boden des Eppendorfgefäßes werden in das Transplantationssystem aufgenommen, **b** Vollständiges Transplantationssystem mit Pankreasinseln im mittleren Teil des Schlauchsystems, **c** Vergrößerte Darstellung der Pankreasinseln im Schlauchsystem

2.7.3. Durchführung der Transplantation

Um sowohl einen Fremdkörperreiz als auch Infektionen zu vermeiden, wurde die Bauchhaut rasiert und mit 70%igem Ethanol benetzt. Anschließend wurde der Bauchraum schichtweise eröffnet. Zunächst erfolgte ein sagittaler ca. 2 cm langer Hautschnitt entlang der Linea alba mittels 10er Skalpell (Feather®). Das Peritoneum wurde mittels Pinzetten angehoben und bei ebenfalls sagittaler Schnittführung mit einer Schere durchtrennt. Ein zugeschnittenes

Operationstuch bedeckte die rasierte Bauchhaut mit Aussparung des Hautschnittes. Das Darmkonvolut wurde stumpf mittels kleiner gebogener Pinzette und mit warmer Natriumchloridlösung befeuchteter Mullkompressen aus dem Bauchraum exkorporiert und auf dem Operationstuch gelagert. Es wurde während der gesamten Transplantation darauf geachtet, den Darm mittels auf 37,5 °C gewärmter 0,9 %-iger Natriumchlorid-Lösung warm und feucht zu halten. Die Vena portae lag nach stumpfer Präparation frei und gut einsehbar vor dem Ligamentum hepatoduodenale (siehe Abbildung 7, a). Unter einem Operations-Stereomikroskop (LEICA M 651) erfolgte die intraportale Transplantation der Pankreasinseln durch eine Punktion der Vena portae und vorsichtigen Injektion der in Hanks-Lösung aufbewahrten Inseln (siehe Abbildung 7, b). Die Kanüle wurde unter Sicht aus dem Gefäß gezogen und eine Hämostase durch 5- 15 minütige Kompression des Gefäßdefekts mit Hilfe einer mit Autoklavierband umwickelten Impföse (DIN EN ISO 13485, nerbe plus®) herbeigeführt (siehe Abbildung 7, c). Anschließend wurde das Darmkonvolut wieder in den Bauchraum stumpf verlagert. Der Verschluss des Bauchraumes erfolgte mehrschichtig. Das Peritoneum wurde mit einer fortführenden Naht (4/0 USP DR, nicht resorbierbarer, geflochtener und beschichteter schwarzer Naturseidefaden, 70 cm, Catgut®), die Haut mittels einer transkutanen Klammernaht (7,5 x 1,75 mm Größe, MICHEL, Braun®) verschlossen. Anschließend wurde die Wunde wiederum mit 70 %-igem Ethanol desinfiziert. Die Empfängertiere verblieben bis zum Erwachen aus der Narkose unter Beobachtung und in ruhiger Umgebung unter einer Wärmelampe in Makrolon Typ 3 Käfigen. Die Dauer der Transplantation von Beginn des Hautschnittes bis Ende der Klammernaht betrug im Durchschnitt 25 Minuten bis maximal 50 Minuten.

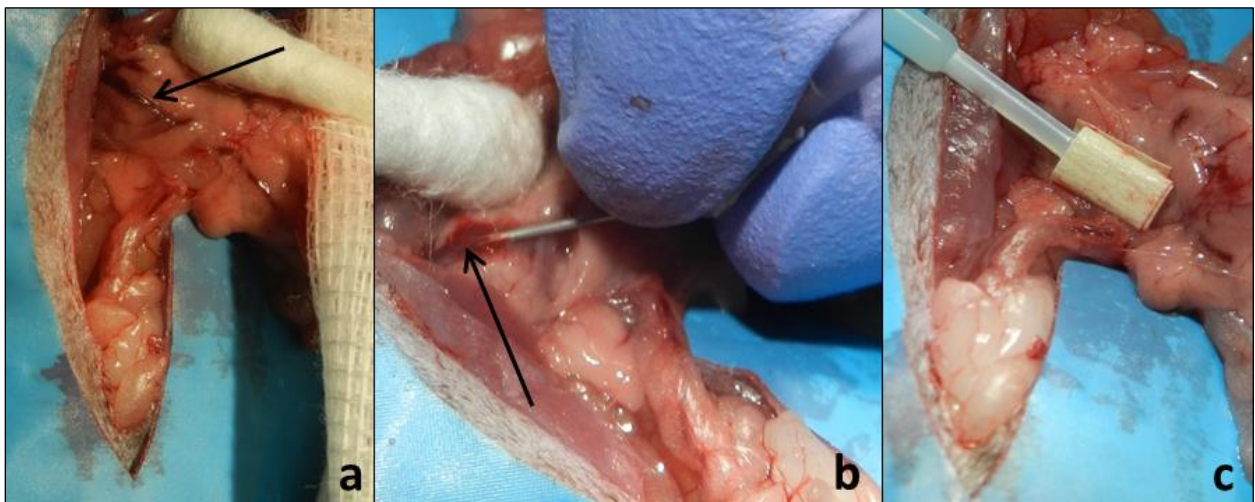


Abbildung 7: Transplantation der Inseln [64]

a freiliegende Vena portae nach Exkorporation des Darmkonvoluts (siehe Pfeilmarkierung) **b** Punktion der Vena portae vor dem Ligamentum hepatoduodenale (siehe Pfeilmarkierung) **c** Blutstillung am Gefäßdefekt.

2.8. Gabe des Proliferationsmarkers BrdU

Zur Detektion der Proliferationsaktivität im hepatischen Gewebe der Versuchsmäuse wurde der Proliferationsmarker 5-Bromo-2-desoxyuridin (BrdU), ein Thymidinanalogon, verwendet. Die Verabreichung des 5-Bromo-2-desoxyuridins erfolgte sowohl bei den Kontroll- als auch bei den Versuchstieren zum einen mit osmotischen Minipumpen (Firma ALZET, Charles River Laboratories®, Sulzfeld, Deutschland) kontinuierlich eine Woche lang subkutan, zum anderen wurden einem Teil der Tiere dreimalig BrdU (Gesamtdosis 6 mg/Tag) 24, 12 Stunden subkutan und eine Stunde intraperitoneal vor der Tötung verabreicht. Die osmotischen Minipumpen hatten ein Fassungsvermögen von 200µl und den Tieren wurde BrdU kontinuierlich eine Woche lang subkutan mit einer Dosis von 0,6 mg/Tag (11). Die Implantation der Pumpen erfolgte während einer Äthernarkose subkutan zwischen die Schulterblätter mittels einer ca. 0,5 cm langen Inzision der Haut, die hiernach durch eine Klammernaht verschlossen wurde.

2.9. Perfusion

Die Perfusion der Organe nach dem festgelegten Beobachtungszeitraum erfolgte stufenweise mit einer Spüllösung (Zusammensetzung siehe Anhang, Tabelle 5) und anschließender Fixierlösung (Zusammensetzung siehe Anhang, Tabelle 6). Die Mäuse wurden mittels intraperitonealer Injektion (1 ml Spritze, BD® Plastipak, Kanülengröße: 26 G 3/8 0,45x10 mm, BD® microglance TM 3) eines Gemisches aus Ketamin 10% (Ketanest®, 80- 100 mg/kg KG) und Xylazin 2% (Xylazel®, 10 mg/kg KG) im Verhältnis 10:1 narkotisiert. Es folgte die Präparation der Aorta abdominalis bzw. der Bifurcatio aortae wie in Abschnitt 2.5.2. beschrieben. Unter einem Operations-Stereomikroskop (LEICA M 651) wurde die Punktion der Aorta abdominalis im Bereich der Bifurcatio aortae unter Verwendung einer 24 GA 0,56 IN Flexüle (14 mm Länge, 0,7 mm Durchmesser, BD-Insyte-N®) durchgeführt. Bei erfolgreicher Punktion der Aorta abdominalis konnte arterielles Vollblut in einem Eppendorf- Röhrchen mit gerinnungshemmendem Granulat entnommen werden, welches 10 min bei 5000 Umdrehungen pro Minuten zentrifugiert und davon ausgehend Serum in einem 1 ml Kryoröhrchen abpipettiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren wurde. Nun wurden ca. 30 ml Spüllösung über die Kanüle infundiert. Es ist darauf geachtet worden, dass die Spülung der Organe bei noch vorhandenem Kreislauf bzw. Herzschlag erfolgte, um eine schockursächliche periphere Vasokonstriktion der Gefäße insbesondere der Arteriolen zu vermeiden. So konnten einerseits eine gleichmäßige Spülung und folgende Fixierung gewährleistet werden. Bei einer makroskopisch sichtbaren Leberstauung wurde die Vena cava inferior im Spatium subhepaticum angeschnitten und der Blutkreislauf kontrolliert geöffnet. Nach einer 5- minütigen Spülung

wurden die linke Niere, bei einigen Tieren der Mittellappen der Leber sowie ein Teil des Pankreas nach Abklemmen der versorgenden Blutgefäße entfernt. Zwei bis drei mm breite Leberschnitte sowie jeweils die Hälfte von Niere und Pankreas wurden über Stickstoff gekühltes Methylbutan eingefroren und bei -80°C gelagert. Weiterhin wurden von allen drei Organen 2- 3 mm durchmessende Gewebestücke in Osmiumtetroxid für die spätere Einbettung in Epoxidharz fixiert (siehe Abschnitt 2.12.3.).

Nach erfolgter Spülung wurde die Perfusionsfixation mittels ca. 30 ml Fixierlösung angeschlossen. Nach vollständiger Fixation der Organe wurden diese präpariert und entnommen. Die Leber wurde dabei für mindestens 24 h, zusammen mit der zusätzlich entnommenen rechten Niere und eines Teils des Dünndarms, in eine 3%-ige Paraformaldehydlösung überführt. Es wurden außerdem Milz, Lunge, Herz, Hoden und Pankreasgewebe entnommen und in einer 4,5%-igen Formaldehydlösung nachfixiert (Zusammensetzung siehe Anhang, Tabelle 7). Die Leber wurde anschließend in ca. 1- 2 mm dicke Streifen zugeschnitten, wobei hierbei besonders auf bereits makroskopisch sichtbare Herde geachtet wurde. Diese wurden gesondert neben makroskopisch unauffälligem Leber- und Nierengewebe in Glutaraldehyd fixiert und für elektronenmikroskopische Untersuchungen in Epoxidharz eingebettet (siehe Abschnitt 2.12.3.). Das restliche Gewebe wurde in Paraffin eingebettet und nach Anfertigung von 1-2 µm dicken Paraffinserienschnitten untersucht.

2.10. Untersuchungen an frisch isolierten Pankreasinseln

Um die gepickten Inseln zusätzlich auf Reinheit und Vitalität zu überprüfen, wurden Kryostatschnitte hergestellt. Hierzu diente eine Nierenhälfte einer Spendermaus als Auflage. Es wurden die auf einen möglichst kleinen Abschnitt des Schlauches konzentrierten Inseln in eine zuvor präparierte ca. 5 mm durchmessende Nierenmulde transferiert. Nach gelungenem Transfer wurde die Nierenhälfte mit den darin befindlichen Inseln über Methylbutan eingefroren und bei ca. - 80 °C gelagert.

2.10.1. Anfertigen der Kryostatschnitte

Die Nierenhälfte wurde bei - 16 °C mit einer Schnittdicke von 12 µm geschnitten und gestuft mit einer Stufendicke von ca. 50 µm. Es wurden zunächst pro Stufe eine Hämatoxilin/Eosinfärbungen- (HE-) Färbung sowie 5 ungefärbte Serienschnitte hergestellt, an welchen die nachfolgend beschriebenen Vitalitätstests und die immunhistochemischen Reaktionen durchgeführt wurden.

2.10.2. Vitalitätstests

Um zu überprüfen, ob die gepickten und verdauten Inseln nach der Isolation und unmittelbar vor der Transplantation noch vital waren, führte ich sowohl den Vitalitätstest mit p-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid als auch den Trypanblau-Ausschlusstest an Kryostatschnitten durch.

2.10.2.1. Vitalitätstest mit p-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid

Prinzip

Der Vitalitätstest mit p-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid dient der Überprüfung der Stoffwechselaktivität der Mitochondrien [86].

P-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid ist ein Di-Tetrazoliumsalz, es stellt ein Oxidationsmittel dar und wird unter physiologischen Bedingungen enzymatisch zunächst zum gelblich gefärbten Mono-Formazan, anschließend zu einem tief dunkelblau gefärbten Di-Formazan reduziert. Die erfolgte Reduktion weist durch einen Farbumschlag Dehydrogenierungsreaktionen im Stoffwechsel histochemisch nach. Da pyridinnukleotidabhängige Dehydrogenasen nicht dazu befähigt sind, den Wasserstoff ihres Substrates ($\text{NADH} + \text{H}^+$) direkt auf das Tetrazoliumsalz zu übertragen, muss die Reaktion durch die Enzyme der Atmungskette erfolgen [86]. Diese Reduktion wird dabei von der NADH-Oxidase und der Succinat-Dehydrogenase durchgeführt. Bei vorhandenem Farbumschlag wird von einer Stoffwechselaktivität der Mitochondrien und somit von einer vorhandenen Vitalität ausgegangen [86] (Chemikalien siehe Anhang, Tabellen 8 und 9).

Durchführung

Der Vitalitätstest mit p-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid wurde an 12 μm dicken Kryostatschnitten durchgeführt.

1. Schnitte eine Stunde lufttrocknen lassen
2. 1 ml NADH-Stammlösung mit 2 mg $\text{NADH} + \text{Na}_2$ vermischen
3. Suspension auf die Objektträger geben
4. 45 min. bei 37 °C abgedunkelt einwirken lassen
5. kurz in Aqua dest. spülen
6. 5 min. in 4 %-ig gepufferten Formalin nachfixieren
7. kurz in Aqua dest. spülen
8. Schnitt mit CC/Mount, tissue mounting medium, bedecken
9. auf einer Heizplatte trocknen lassen

10. kurz in Xylol spülen
11. Eindecken mit Roti-Histokitt

2.10.2.2. Trypanblau-Ausschlusstest

Prinzip

Der Trypanblau-Ausschlusstest dient der Überprüfung der Durchlässigkeit einer Zellmembran. Der verwendete Farbstoff Trypanblau kann keine intakten Zellmembranen durchdringen, reichert sich in diesen Zellen also nicht an. Bei einem Membrandefekt gelangt er in die Zellen, welche sich anschließend unter dem Mikroskop tief lila darstellen. Eine nicht bzw. eine kaum vorhandene intrazelluläre Anreicherung des Trypanblau-Farbstoffes belegt eine vorhandene Vitalität [87].

Durchführung

Ich vermischte 20 µl einer Suspension aus Inseln in Hanks' Balanced Salt Solution mit 20 µl Trypanblaulösung (Chemikalien siehe Anhang, Tabellen 10 und 11). Das Gemisch wurde 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und unter einem Lichtmikroskop begutachtet.

Materialien:

Neubauer- Zählkammer

Mikroskop

2.11. Immunhistochemische Reaktion

2.11.1. Immunhistochemische Reaktion zum Nachweis von Insulin

Prinzip

Um die β -Zellen in den isolierten Inseln nachzuweisen, führte ich die immunhistochemische Nachweisreaktion durch.

Die immunhistochemische Reaktion beruhte auf der „Labelled Streptavidin-Biotin-Methode“ (LSAB), einer Dreistufen-Komplexmethode. Hierbei wird die sehr starke Affinität des Vitamins Biotin zu dem Glycoprotein Avidin bzw. dessen gentechnisch hergestellter Variante Streptavidin genutzt (Durchführung siehe Anhang, Protokoll 1). Das Antigen stellte Insulin dar, welches sich intravesikulär in den β -Zellen der isolierten Inseln befand. Der Primärantikörper bzw. dessen

Fab-Fragment war gegen ein Epitop des Insulins gerichtet. Ein sekundärer mit Biotin konjugierter Brückenantikörper band spezifisch an den Primärantikörper. Ein enzymmarkierter Komplexantikörper, 4+ Streptavidin AP Label, band an das Biotin des Brückenantikörpers. Es entstand ein enzymkonjugierter Antikörper-Antigenkomplex. Die alkalische Phosphatase hydrolysiert Phosphorsäureesterbindungen unter Bildung eines intermediären Enzym-Substrat Komplexes. Der hinzugegebene Farbstoff, Vulcan fast red chromogen, reagiert mit dem Enzym. Zunächst entsteht ein Enzym-Chromogenkomplex, der noch farblos ist. Nach erfolgter Hydrolyse wird ein fuchsinroter Niederschlag produziert [88]. Dieser sichtbare Farbstoff gilt als Indikator für das zu untersuchende Epitop bzw. in meiner Arbeit für das intravesikuläre Insulin.

Blockierungen – Vermeidung unspezifischer Färbungen

Der indirekte Nachweis von Primärantikörpern auf Mausgewebe wird oft durch hohe unspezifische Hintergrundfärbung erschwert. Das Hauptproblem ist, dass der Anti-Maus Sekundärantikörper bei indirekten Nachweismethoden nicht zwischen endogenen Immunglobulinen im Proben Gewebe und dem Primärantikörper zu unterscheiden vermag. Um dieses Problem zu lösen, wurden noch vor dem Aufbringen des Primärantikörpers Blockierungsschritte mittels Peroxidase Block vorgenommen. Der Rodent block M blockierte das endogene mausspezifische Immunglobulin G, sowie unspezifische Hintergründe des Gewebes und Erythrozyten direkt [89], womit zum einen eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers verhindert wurde und zum anderen weitere nicht zielführende Farbreaktionen vermieden wurden. Um eine unspezifische Bindung des Komplexantikörpers mit dem endogen vorkommenden Biotins und so unspezifische Hintergrundfärbungen zu vermeiden, wurde das mit hoher Affinität an das endogene Biotin bindende Avidin verwendet. Nach anschließender Auftragung des Biotins auf das Präparat wurden die noch vorhandenen Bindungsstellen des zuvor gegebenen Avidins besetzt, die sonst zu Kreuzreaktionen führen könnten [89].

Verhinderung enzymatischer Reaktionen

Ein weiterer möglicher Sensitivitätsverlust könnte durch unspezifische enzymatische Reaktionen erfolgen. Um diese zu minimieren wurde 5 %-iges fetales Kälberserum auf das Gewebe gebracht. Dabei bewirkt das zu 40- 50 % im fetalen Kälberserum vorkommende α 1-Globulin Fetuin eine Trypsin Inhibition durch eine irreversible Bindung an das Enzym [90]. Unspezifische enzymatische Reaktionen konnten so minimiert werden.

2.11.2. Immunhistochemische Reaktion mit BrdU

Die BrdU-Markierung erfolgte an den Leberserienschnitten von allen Tieren mittels manueller immunhistochemischer Reaktion. Durch die immunhistochemische Reaktion mittels eines gegen BrdU gerichteten Antikörpers ist es möglich die Proliferationsaktivität der Zellen darzustellen, bei denen in dem Zeitraum der BrdU-Applikation eine Zellteilung (Einbau des BrdU während der S-Phase des Zellzyklus) erfolgt ist [91]. Dies erfolgte mit dem monoklonalen BrdU-Antikörper (DAKO) in einem Verdünnungsverhältnis 1/100 (Durchführung siehe Anhang, Protokoll 2).

2.12. Morphologische Untersuchungen

2.12.1. Konventionelle Lichtmikroskopie

Das in Paraffin eingebettete Lebergewebe wurde lichtmikroskopisch anhand von 1-2 µm dicken Paraffinserienschnitten untersucht. Hiervon wurden HE-Färbungen und PAS-Reaktionen jeweils derselben Schnittserie angefertigt. Die histologische Untersuchung erfolgte mit dem Mikroskop Leica Typ 301-371.010 in 40- bis 400- facher Vergrößerung. Die Identifikation klarzelliger hepatozellulärer Herde in der HE- Färbung erfolgte anhand eines hellen und verbreiterten Zytoplasmas. In der PAS-Reaktion wiesen diese Hepatozyten eine kräftige blau-lila Färbung auf, was einer deutlich erhöhten Glykogenspeicherung entspricht, was in vorigen Veröffentlichungen unserer Arbeitsgruppe elektronenmikroskopisch nachgewiesen wurde [65]. Weiterhin wurde lichtmikroskopisch in einigen Serienschnitten korrespondierend zu den klarzelligen hepatozellulären Herden das Vorkommen von angewachsenen Pankreasinseln innerhalb der Pfortaderäste gezeigt.

2.12.2. Proliferationsaktivität

Die Proliferationsaktivität wurde anhand des BrdU-Labeling-Index bestimmt. Der BrdU-Labeling-Index gibt den Anteil der BrdU-positiven Hepatozytenkerne pro 100 Hepatozytenkerne in Prozent an. In meiner Arbeit wurde der BrdU-Labeling-Index an Lebergewebe von den Versuchs- und Kontrollgruppen bestimmt, um interindividuelle und intraindividuelle Unterschiede der Proliferationsaktivität nachzuweisen. Hierzu wurde der Anteil der BrdU-positiven Hepatozytenkerne sowohl in den klarzelligen hepatozellulären Herden (Zellkerne aller Herde) der transplantierten Versuchsgruppen als auch im extrafokalen Lebergewebe (2000 Zellkerne) bestimmt. Es wurden des Weiteren 2000 Hepatozytenkerne von unverändertem hepatozellulären Gewebe der Kontrollgruppen untersucht. Die Bestimmung des BrdU-Labeling-

Index erfolgte durch eine nicht-automatisierte, visuelle Auszählung mithilfe des Mikroskops und einer Kamera (Leica Typ 301-371.010, Kamera: Nikon Digital Slight DS-Fi1) mit dem Programm NIS-Elements BR 3.2 und mit Hilfe eines Gitterrasters in 200-facher Vergrößerung.

2.12.3. Elektronenmikroskopie

Zur weiteren morphologischen Untersuchung wurden in meiner Arbeit von einzelnen klarzelligen hepatozellulären Herden und isolierten Inseln elektronenmikroskopische Untersuchungen mit einem Transmissionselektronenmikroskop (Libra 120, Firma Zeiss). Nach Glutaraldehydfixierung erfolgte eine Eponeinbettung des zu untersuchenden Gewebes, anschließend erfolgte die Anfertigung von Ultradünnschnitten, Kontrastierung mittels Uranylacetat und Bleicitrat (zur Durchführung siehe Protokoll 3).

2.13. Methodik der Auswertung

2.13.1. Auswertung der Modifikation der Inselisolation

Die Auswertung der Modifikation der Inselisolation erfolgte anhand der Kriterien „Reinheit“ und „Qualität“.

Die „Reinheit“ wurde nach dem Kollagenaseverdau anhand des prozentualen Anteils exokrinen Parenchyms am Pankreasgewebe makroskopisch semiquantitativ bestimmt. Das Ziel einer reinen Insel wurde bei einem Prozentsatz von 0- 20% exokrinen Pankreasanteils festgelegt.

Die „Qualität“ der Inseln wurde makroskopisch anhand der Form, Oberflächenbeschaffenheit und homogenen Anfärbung gemessen. Dabei wurden 2 Endpunkte festgehalten. „Qualität 1“ beschreibt dabei eine runde, oberflächlich glatte und homogen angefärbte Insel, „Qualität 2“ beschreibt Abweichungen von dieser Makroskopie, beispielsweise in Form von oberflächlich aufgefaserten, unregelmäßig angefärbten Inseln. Anschließend wurden die oben genannten Vitalitätstests an reinen Inseln der „Qualität 1“ durchgeführt.

2.13.2. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Unterschiede des Auftretens von klarzelligen hepatozellulären Herden nach einer und nach vier Wochen, zwischen den Wildtyp- und ChREBP-KO-Mäusen sowie nach Transplantation von 120 und 200 Inseln erfolgte mit dem Chi-Quadrat-Test. Die Unterschiede wurden als signifikant gewertet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ betrug.

Die statistische Auswertung der Proliferationsaktivität erfolgte anhand des BrdU-Labeling-Index', dessen Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes bzw. S.E.M. (standard error of mean).

Hierbei erfolgte sowohl ein intraindividueller Vergleich zwischen der Proliferationsaktivität der klarzelligen Hepatozytenherde und dem extrafokalen unveränderten Lebergewebe als auch ein interindividueller Vergleich zwischen der Proliferationsaktivität der klarzelligen Herde von den diabetischen inseltransplantierten Wildtyp- und ChREBP-KO- Mäusen sowie zwischen dem Lebergewebe der miteinander korrespondierenden nicht-diabetischen inseltransplantierten, diabetischen und nichtdiabetischen Wildtyp und ChREBP-KO Gruppen mittels Wilcoxon – Rangsummentest und Mann-Whitney-U Test. Unterschiede wurden als signifikant gewertet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ betrug.

Die statistische Auswertung der Reinheit und Qualität erfolgte mithilfe des GraphPad-Programms. Die statistische Auswertung der Parameters Reinheit erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test, die des Parameters Qualität mit dem Fischer's-exact-Test. Die Unterschiede wurden als signifikant gewertet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ betrug.

3. Auswertung

3.1. Modifikation der Inselisolation

3.1.1. Auswahl der Zielparameter einer gelungenen Isolation

Die Auswertung der Modifikation der Inselisolation erfolgte anhand der Kriterien „Reinheit“, d.h. dem makroskopischen Anteil an exokrinem Pankreas, und „Qualität“.

Die „Reinheit“ wurde anhand des Anteils an exokrinem Pankreasgewebe, welches die Insel umgibt, makroskopisch bestimmt und in Prozenten festgehalten (siehe Abbildung 8). Das Ziel einer reinen Insel wurde bei einem Prozentsatz von 0- 20 Vol. % exokrinem Pankreasanteil erreicht.

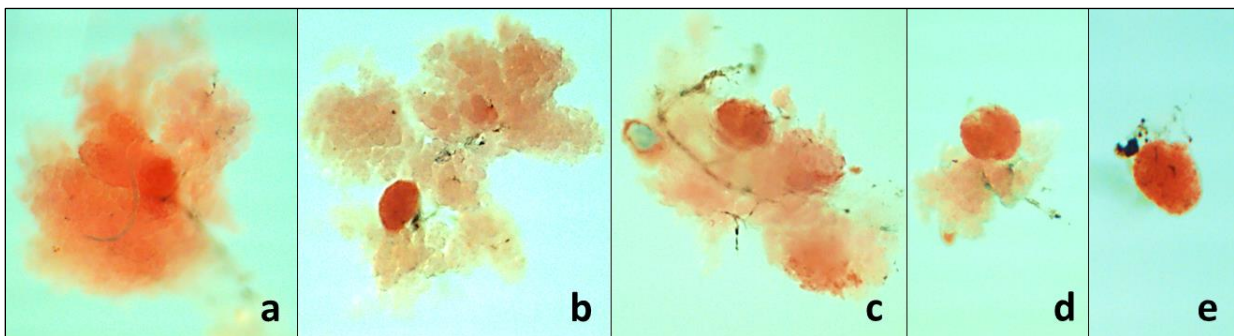


Abbildung 8: Unterschiede im Parameter „Reinheit“

Darstellung mittels Stereomikroskop verschiedener Anteile an exokrinem Pankreasgewebe am Transplantat mit abnehmender Abfolge; **a** über 85 Vol. % des Transplantats mit exokrinem Pankreasgewebe, **b** Transplantat über 80 Vol. % exokrinem Pankreasgewebe, **c** Transplantat mit 60 Vol. % exokrinem Pankreasgewebe, **d** Transplantat mit 20 Vol. % umgebendem exokrinen Pankreasgewebe, **e** Insel ohne umgebendes exokrines Pankreasgewebe; Vergrößerungen mittels Stereomikroskop: **a-e**: 45-fache Vergrößerung

Die „Qualität“ der Inseln wurde makroskopisch anhand der Form, Beschaffenheit und homogenen Anfärbung bestimmt. Dabei wurden 2 Endpunkte festgehalten. „Qualität 1“ beschreibt dabei eine runde, homogen beschaffene und angefärbte Insel (siehe Abbildung 9, a), „Qualität 2“ beschreibt Abweichungen von dieser Makroskopie, beispielsweise in Form von flockig wirkenden, unregelmäßig angefärbten Inseln (siehe Abbildung 9, b). Anschließend wurden zur Überprüfung des Kriteriums „Qualität“ Vitalitätstests an reinen Inseln der „Qualität 1“ durchgeführt.

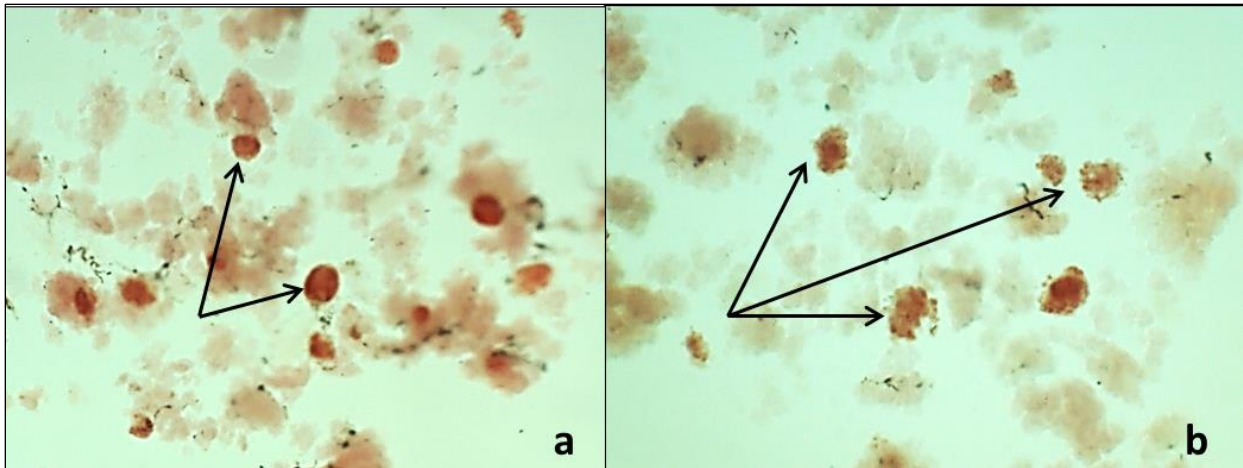


Abbildung 9: Unterschiede im Kriterium „Qualität“

Bilder am Stereomikroskop von bereits isolierten Inseln **a** „Qualität 1“ erkennbar an einer runden Form, einer homogen beschaffenen und angefärbten Insel, Versuchsp parameter: Enzymmenge 2 mg, Einwirkzeit 9 min; 35- fache Vergrößerung **b** „Qualität 2“ erkennbar an einer flockig wirkenden Oberflächenstruktur und einer inhomogenen Anfärbung, Versuchsp parameter: Enzymmenge 3,75 mg, Einwirkzeit 9 min; 35- fache Vergrößerung

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des GraphPad-Programms. Die statistische Auswertung des Parameters Reinheit erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test, die des Parameters Qualität mit dem Fischer´s-exact-Test.

3.1.2. Auswertung der Einwirkzeit und Enzymkonzentration:

3.1.2.1. Einfluss „Einwirkzeit“ und „Enzymkonzentration“ auf das Kriterium Reinheit

Zunächst erfolgte die Untersuchung der einfachen Effekte der Einwirkzeit und der Enzymkonzentration auf das Kriterium Reinheit mittels Korrelation. Mittels der Spearman-Rho Korrelation konnte gezeigt werden, dass je länger die Einwirkzeit des Enzymes war, desto höher war der Reinheitsgrad. Ein Kruskal-Wallis-Test bestätigte, dass sich die „Reinheit“ der Inseln durch die Einwirkzeiten des Enzymes und die Enzymkonzentration unterschieden (Kruskal-Wallis Statistik=38,41, $p < 0,05$).

Anschließend durchgeführte Post-hoc-Tests (Dunn-Bonferroni-Tests) zeigten, dass sich die Gruppen der Einwirkzeiten nach 9 min im Vergleich zu den Einwirkzeiten nach 2 min signifikant ($p < 0,05$) voneinander unterschieden.

Mithilfe der Effektstärke nach Pearson ($r > 0,5$ bzw. $r > 0,3$), konnte gefolgert werden, dass die höhere Einwirkzeit von 9 min unabhängig von der Enzymmenge den gewünschten Effekt der „Reinheit“ bewirkte.

Kein signifikanter Unterschied bestand zwischen den verschiedenen Enzymmengen 2 mg, 3 mg und 3,75 mg bzw. zur Einwirkzeit von 5 min ($p > 0,05$).

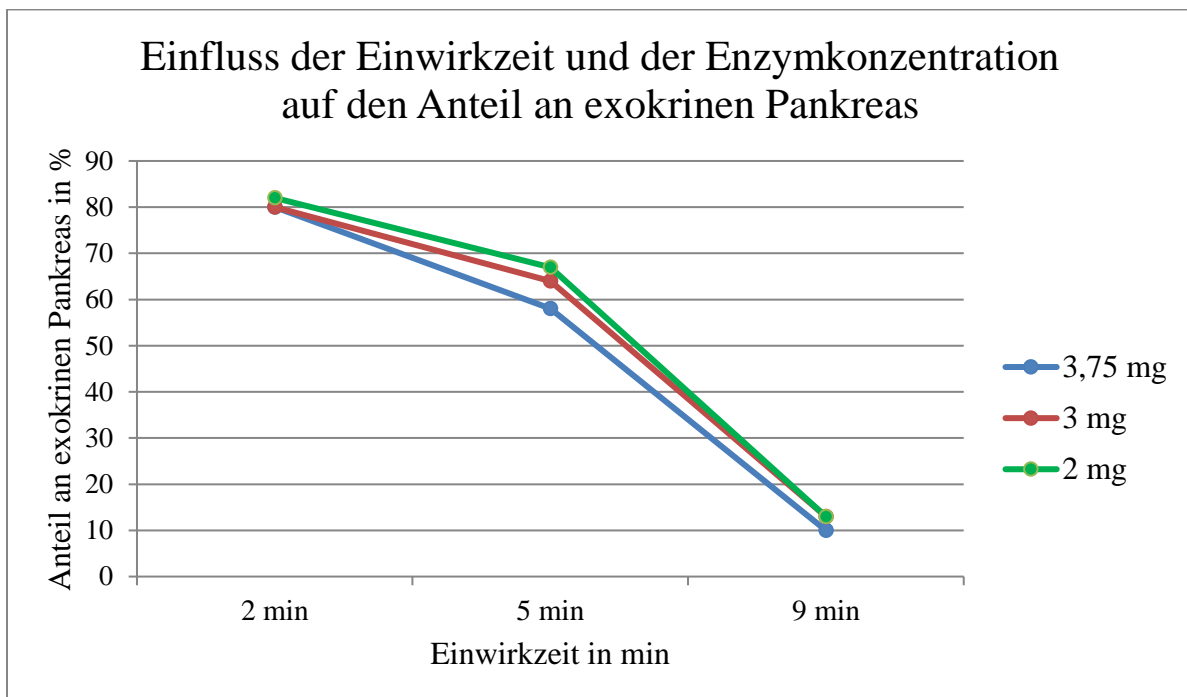


Diagramm 1: Graphische Darstellung des Einflusses der Einwirkzeit und der Enzymkonzentration auf den Anteil an exokrinen Pankreas in %

Untersucht wurde der Einfluss der kombinierten Parameter Einwirkzeit (2 min, 5 min, 9 min) und Enzymkonzentration (2 mg/Pankreas, 3 mg/Pankreas, 3,75 mg/Pankreas). Der Parameter Einwirkzeit 9 min zeigte unabhängig von der Enzymkonzentration einen signifikant niedrigeren Anteil an exokrinen Pankreas ($p < 0,05$).

3.1.2.2. Einfluss „Einwirkzeit“ und „Enzymmenge“ auf das Kriterium Qualität

Nach Evaluation der geeigneten Einwirkzeit von 9 min sollte nun die geeignetste Enzymmenge bestimmt werden. Hierbei wurde nun zusätzlich das Kriterium der „Qualität“ untersucht anhand der makroskopischen Parameter Form, Beschaffenheit und homogener Anfärbung (siehe Abbildung 9).

Ein signifikanter Unterschied in der „Qualität“ bei einer Einwirkzeit von 9 min konnte mittels Mann-Whitney-U-Test zwischen den Gruppen der Enzymkonzentration 2 mg/Pankreas und 3,75 mg/Pankreas ($p=0,0476$) gezeigt werden, wobei die Gruppe 2 mg signifikant mehr Inseln der „Qualität 1“ erreichte. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der „Qualität“ zwischen den Gruppen der Konzentrationen 3 mg/Pankreas und 3,75 mg/Pankreas ($p=1,0$), sowie zwischen den Gruppen 2 mg zu 3 mg ($p=0,21$), jedoch eine Tendenz beider Gruppen 3 mg/Pankreas und 3,75 mg/Pankreas in Richtung der „Qualität 2“ (siehe Diagramm 2).

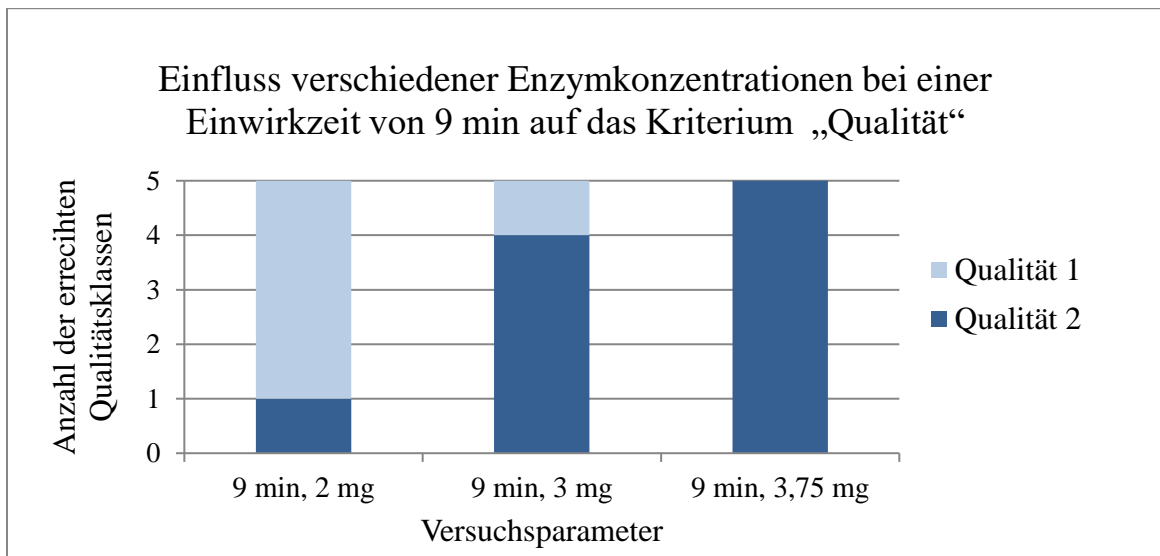


Diagramm 2: Darstellung des Einfluss der verschiedenen Enzymkonzentrationen bei einer Einwirkzeit von 9 min auf das Kriterium „Qualität“

Die optimale Konstellation aus Einwirkzeit und Enzymmenge konnte somit eruiert werden. Die Einwirkzeit von 9 min zeigte eine signifikante Steigerung der „Reinheit“. Eine Enzymkonzentration von 2 mg/Pankreas konnte die „Qualität 1“ signifikant erreichen.

3.1.3. Auswertung der Schnittdicke

Um einen möglichen Einfluss der Schnittdicke der Pankreas zu untersuchen wurden in der Gruppe der 9 min Einwirkzeit und 2mg/Pankreas Enzymkonzentration drei unterschiedliche Schnittdicken hinsichtlich der Parameter „Reinheit“ und „Qualität“ untersucht. Dies waren die Schnittdicken *fein* (kleiner als 0,5 mm), Schnittdicke *mittel* (0,5mm- 1mm) und *grob* (1mm- 2mm).

3.1.3.1. Einfluss der Schnittdicke auf das Kriterium Reinheit

Hinsichtlich des Kriteriums „Reinheit“ bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen der Schnittdicken *grob* zu *fein* und *grob* zu *mittel*, wobei *grob* den größten Anteil an exokrinem Pankreas bis zu 30% aufwies. Die Schnittdicken *fein* zu *mittel* wiesen keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der „Reinheit“ untereinander auf (siehe Diagramm 3).

Der Anteil an exokrinem Pankreas betrug im Median in der Gruppe der Schnittdicke *fein* 5% ($5\% \pm 1,58\%$, MW \pm S.E.M., N=5), in der Gruppe der Schnittdicke *mittel* 13% ($13\% \pm 2,55\%$, MW \pm S.E.M., N=5) und in der Gruppe der Schnittdicke *grob* 24% ($24\% \pm 4,0\%$, MW \pm S.E.M., N=5).

Ein Kruskal-Wallis-Test bestätigte, dass sich die „Reinheit“ der Inseln durch die Schnittdicke signifikant unterschied (Kruskal-Wallis Statistik=9,162, $p=0,0036$). Anschließend durchgeführte Post-hoc-Tests (Dunn-Bonferroni-Tests) zeigten, dass sich die Gruppen der Schnittdicken *fein* und *grob* ($p=0,0075$) signifikant unterschieden, wobei die Schnittdicke *fein* signifikant eine höhere „Reinheit“ ergab. Die Effektstärke nach Pearson zeigte hierbei eine starke Effektstärke für die Schnittdicke *fein* ($r=0,51$). Kein signifikanter Unterschied konnte zwischen Schnittdicken *fein* und *mittel* ($p=0,31$) und zwischen den Schnittdicken *mittel* und *grob* ($p=0,48$) gezeigt werden.

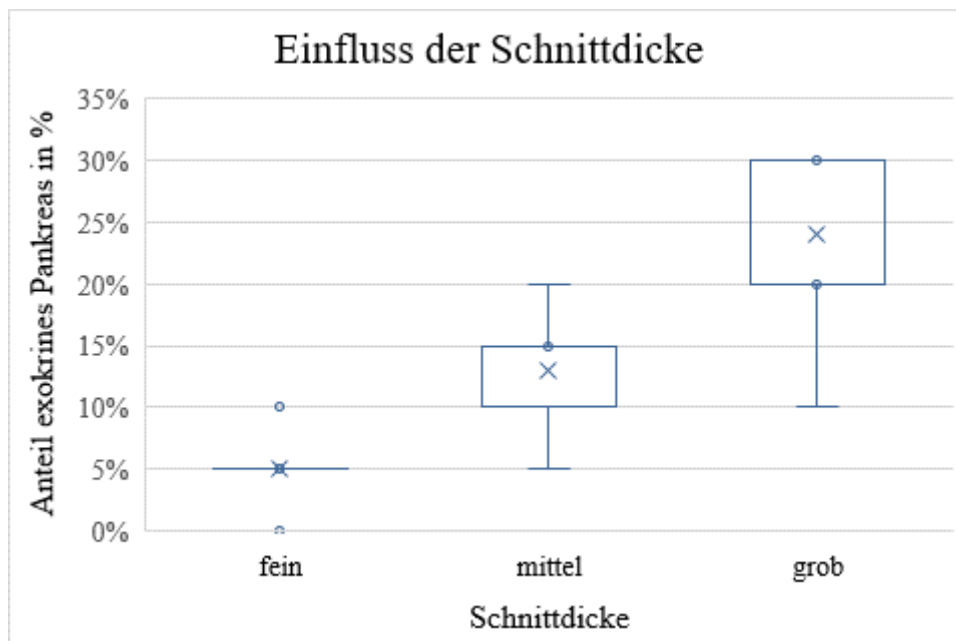


Diagramm 3: Darstellung mittels Boxplot-Diagramm des Einflusses der Schnittdicke auf den Anteil an exokrinem Pankreas unter den Versuchsparametern, 2 mg/Pankreas Enzymkonzentration und 9 min Einwirkzeit

3.1.3.2. Einfluss der Schnittdicke auf das Kriterium Qualität

Der Fischer's exact Test zeigte einen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Kriteriums „Qualität“ zwischen den Gruppen Schnittdicke *fein* und Schnittdicke *grob* ($p=0,0476$), wobei die Schnittdicke *fein* signifikant mehr Inseln der „Qualität 2“ ergab. Die Schnittdicke *grob* hatte zu 100% die „Qualität 1“ zur Folge. Die Schnittdicke *mittel* zeigte mit 80% ein tendenziell häufigeres Auftreten der „Qualität 1“ als die Schnittdicke *fein* mit 20%, jedoch keine Signifikanz bei $N=5$ ($p=0,206$) (siehe Diagramm 4).

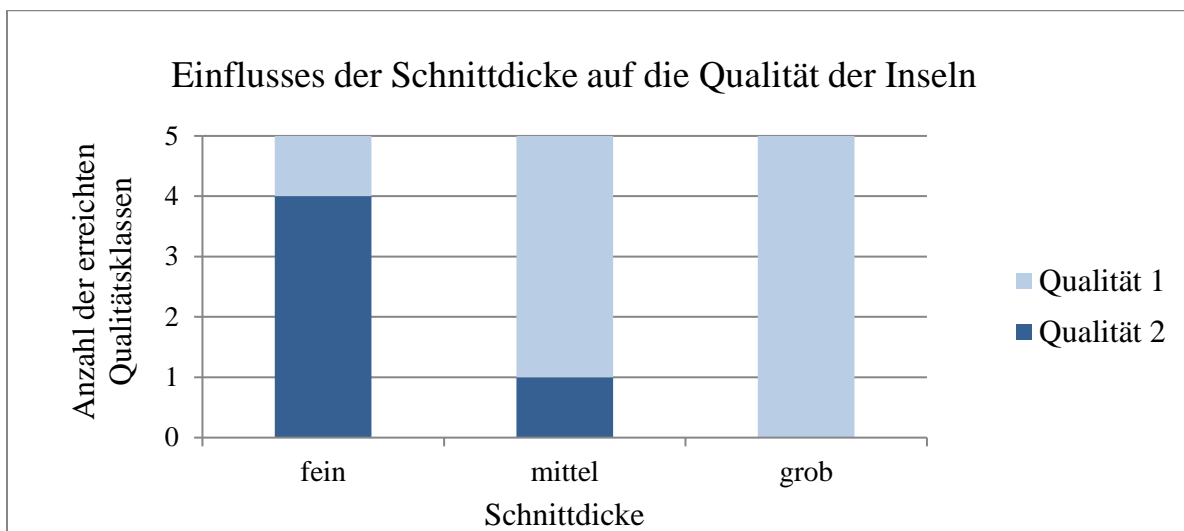


Diagramm 4: Darstellung des Einflusses der Schnittdicke auf die Qualität der Inseln

Da das Ziel reiner Inseln nur in den Gruppen der Schnittdicken *fein* und *mittel* erzielt wurde, konnte die Schnittdicke *grob* ausgeschlossen werden. Die Schnittdicke *mittel* zeigte eine tendenziell bessere Qualität als die Schnittdicke *fein* und konnte somit als optimale Schnittdicke eruiert werden.

3.1.4. Auswertung der Vitalitätstests

Die Vitalitätstests wurden an Inseln durchgeführt die mit den Parametern Einwirkzeit von 9 min, Enzymkonzentration von 2 mg/Pankreas und Schnittdicke *mittel* mit einem Durchmesser von 0,5-1mm isoliert wurden. Die isolierten Inseln wiesen dabei einen Anteil an exokrinem Pankreas von 0-20% auf und eine „Qualität 1“.

Der Trypanblau-Ausschlusstest zeigte eine vollständige Integrität und fehlende Durchlässigkeit der Zellmembran (siehe Abbildung 10).

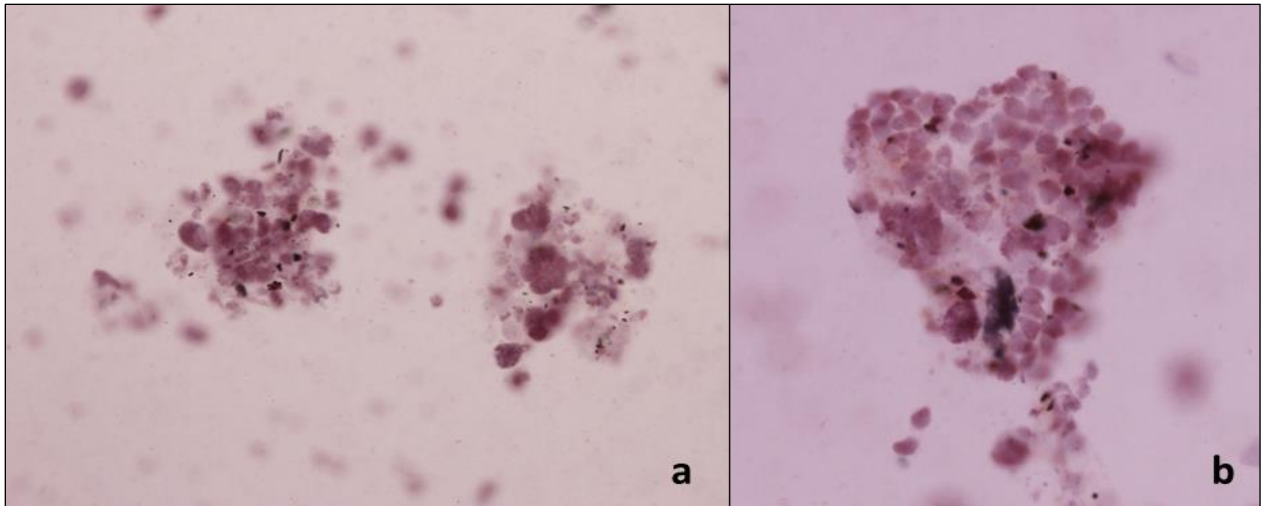


Abbildung 10: Trypanblau-Ausschlusstest

Bei vollständiger Zellintegrität und fehlenden Zellmembrandurchlässigkeit kam es in den isolierten Inseln zu einer fehlenden blauen Anfärbung der Inseln. Die rötliche Anfärbung der Inseln stellt die Anfärbung durch die Neutralrotlösung bei der Isolation dar. **a** Übersicht 100-fache Vergrößerung, **b** 200 fache Vergrößerung

Mithilfe der angefertigten Kryostatschnitte konnten die isolierten Inseln mittels HE-Färbung detektiert und anschließend der Vitalitätstest mit p-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid sowie die immunhistochemische Reaktion zum Nachweis des intravesikulär gelegenen Insulins durchgeführt werden.

Der Vitalitätstest mit p-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid zeigte eine funktionierende Stoffwechselaktivität der Mitochondrien der Inseln (siehe Abbildung 11, b und e). Die immunhistochemische Reaktion zum Nachweis des intravesikulär gelegenen Insulins fiel positiv aus (siehe Abbildung 11, c und f). Somit konnte ich die Identität der in den isolierten Inseln vermuteten β -Zellen mit erhaltenem Insulinspeicher nachweisen.

Mithilfe der Vitalitätstests konnte ich zeigen, dass die isolierten Inseln mit einem maximalen Anteil an exokrinem Pankreas von 0-20% und der Qualität 1 eine funktionierende Stoffwechselaktivität, eine Zellmembranintegrität und ein vorhandenes Insulinspeicherverhalten aufwiesen.

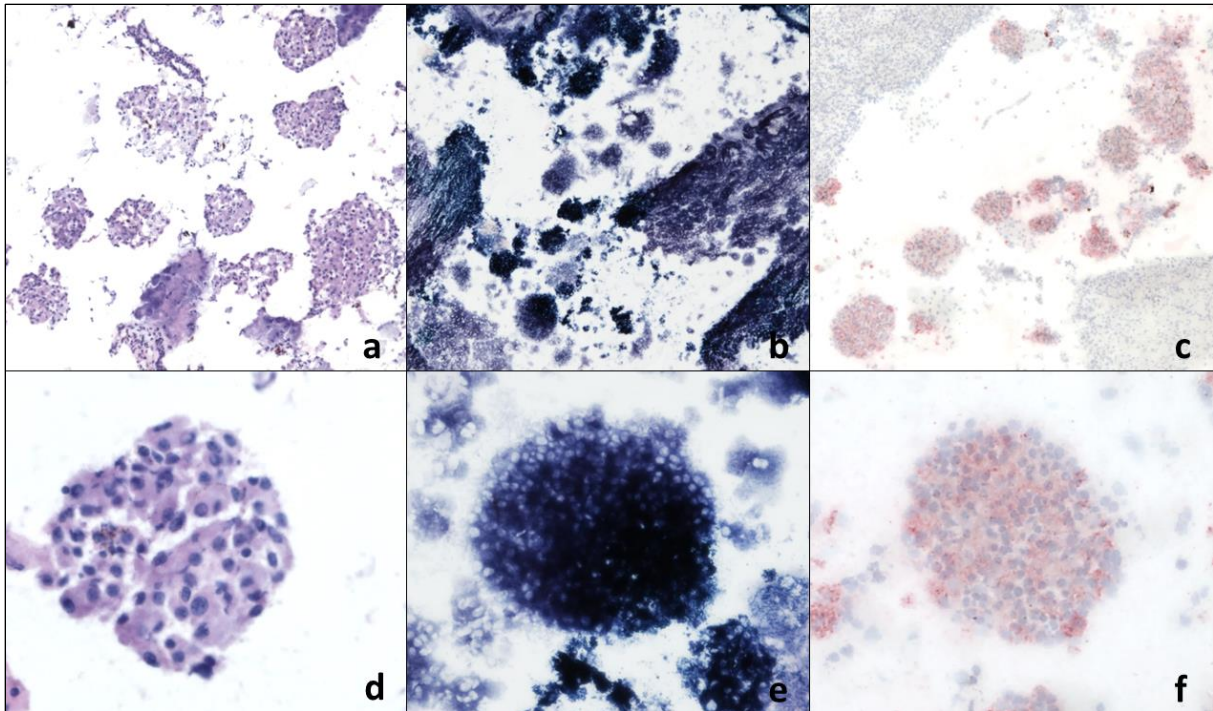


Abbildung 11: Untersuchungen an Kryostatschnitten

Mittels HE Färbung wurden an den angefertigten Kryostatschnitten Inseln detektiert (**a** Übersicht, **d** Vergrößerung). Anschließend wurde hieran der Vitalitätstest mit p-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid durchgeführt. Durch den Farbumschlag der Inseln in ein tiefes Dunkelblau konnte eine Stoffwechselaktivität der Mitochondrien nachgewiesen werden (**b** Übersicht, **e** Vergrößerung). Anschließend immunhistochemische Reaktionen gegen das Antigen Insulin zeigten eine rote Anfärbung und damit einen positiven Nachweis intravesikulär gelegenen Insulins (**c** Übersicht, **f** Vergrößerung). Länge der unteren Bildkante: a, b, c: 1 mm; d, e, f: 0,25 mm

3.2. Auswertung der Versuchsgruppen

3.2.1. Auswertung der Morphologie der hellzelligen hepatozellulären Areale

3.2.1.1. Morphologie der hellzelligen hepatozellulären Areale der transplantierten Wildtyp-Mäuse

Bereits eine Woche nach Transplantation sowohl von 120 Inseln als auch 200 Inseln waren makroskopisch blass weiße Areale auf der Leberoberfläche sichtbar (siehe Abbildung 12, a). Diese entsprachen lichtmikroskopisch den relativ scharf begrenzten und unbekapselten klassischen klarzelligen Leberherden (*clear cell foci*, CCF) die bereits aus Vorexperimenten bekannt waren, innerhalb eines Leberazinus, radiär um die Periportalfelder im Abflussgebiet der Inseltransplantate verteilt. Die Zellmorphologie der Hepatozyten innerhalb der *clear cell foci* war in der H&E Färbung durch ein helles klares Zytoplasma gekennzeichnet (siehe Abbildung 12, e

und g), welches in der PAS Reaktion lila gefärbten Arealen als Zeichen einer erhöhten Glykogenspeicherung (siehe Abbildung 12, f und i) sowie zugleich Arealen mit erhöhter Lipidspeicherung in der Sudanrot-Färbung entsprachen (siehe Abbildung 12 c). Die Zellkerne der Hepatozyten zeigten sich leichtgradig vergrößert mit vergrößertem Kernchromatin. Im Vergleich wies das umgebende extrafokale Gewebe ein glykogen- und lipidärmeres Zytoplasma auf. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der *clear cell foci* bestätigten eine erhöhte Glykogenspeicherung in Form von einem erhöhten Aufkommen von α -Partikeln sowie Lipidtröpfchen im Zytoplasma im Vergleich zu extrafokalen Hepatozyten (siehe Abbildung 12 d). Vier Wochen nach der Transplantation von 120 Inseln dehnten sich die *clear cell foci* ohne Störung der Gewebearchitektur auf mehrere Leberazini aus.

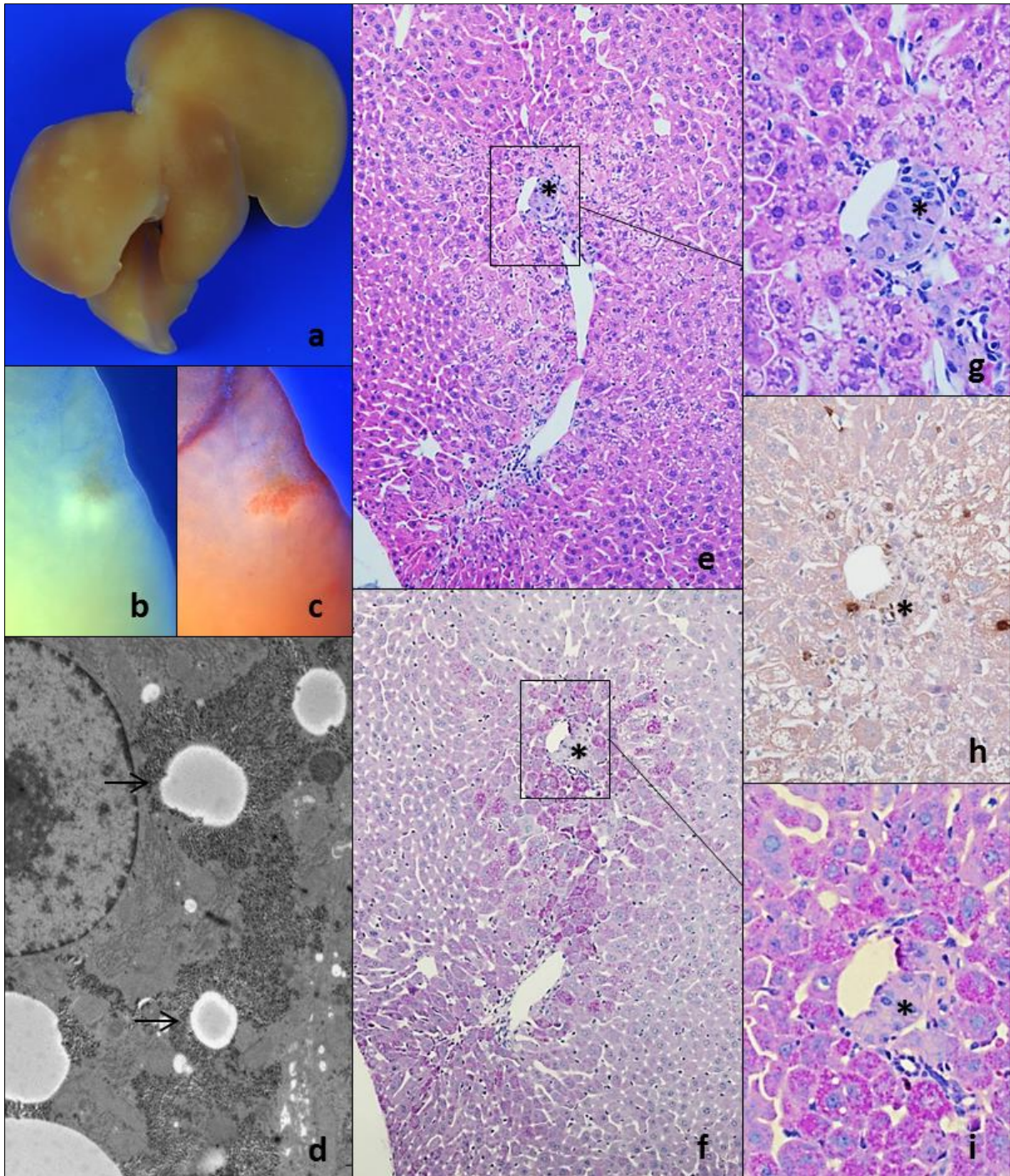


Abbildung 12: Darstellung klarzelliger hepatozellulärer Herde der diabetischen Wildtypmäuse, vier Wochen nach Transplantation von 120 Inseln

a Makroskopisch sind auf der Oberfläche der Leber blass-weiße, relativ scharf begrenzte Areale erkennbar **b-c** Stereomikroskopische Bilder. Die blass-weißen Areale zeigen in der Sudanrotfärbung (**c**) eine verstärkte Anfärbung aufgrund einer erhöhten Fettspeicherung. **e-i** Lichtmikroskopische Bilder, die makroskopisch blass-weißen Areale entsprechen lichtmikroskopisch periportal gelegenen, im Abflussgebiet einer transplantierten Insel (*) gelegenen, hepatozellulären Arealen mit erhöhter intrazellulärer Lipid- und Glykogenspeicherung, (**e, g** HE-Färbung), In der PAS Reaktion (**f, i**) zeigte sich eine verstärkte lila Anfärbung als Zeichen einer erhöhter Glykogenspeicherung. Die hellzelligen Areale zeigen in der BrdU-Darstellung (**h**) eine erhöhte Proliferationsaktivität. **d** Elektronenmikroskopisches Bild. Elektronenmikroskopisch konnte intrazellulär vermehrt Glykogen als α -Partikel sowie Lipidtröpfchen (Pfeilmarkierung) nachgewiesen werden. Länge der Bildunterkanten: a: 15 mm; b, c: 3mm; d: 0,15 μ m; e und f: 2mm, g-i: 0,3 mm

3.2.1.2. Morphologie der hellzelligen hepatozellulären Areale der transplantierten ChREBP-KO Mäusen

Die Lebern der diabetischen ChREBP-Knockout Mäuse zeigten ebenfalls vier Wochen nach Transplantation von 120 Inseln makroskopisch mehrere blass weiße Areale (siehe Abbildung 13, a). Lichtmikroskopisch unterschieden sich diese Herde dennoch deutlich von denen der transplantierten Wildtypmäuse. Sie befanden sich zwar auch v.a. in den Leberazini im periportalen Bereich des Abstromgebietes der transplantierten Inseln (siehe Abbildung 13, e-i), zeigten sich jedoch im Unterschied zu den CCF der Wildtypmäuse häufig multipel und ausgedehnter. Die Zellmorphologie der Hepatozyten innerhalb der CCF war durch ein balloniertes vergrößertes in der HE-Färbung helles Zytoplasma geprägt (siehe Abbildung 13, g), welches sich in der PAS-Reaktion als Ort einer massiv erhöhten Glykogenspeicherung (siehe Abbildung 13, f und i) mit fehlendem Nachweis von Lipiden in der Sudanrotfärbung zeigte (siehe Abbildung 13, b). Die Zellkerne erschienen im Vergleich zu den Zellkernen der extrafokalen Hepatozyten nicht vergrößert mit unverändertem Kernchromatin. Die extrafokalen Hepatozyten zeigten im Gegensatz zu den extrafokalen Hepatozyten der Wildtypmäuse in der PAS-Reaktion weiterhin eine Glykogenspeicherung. Zudem fiel innerhalb der CCF der ChREBP-Knockoutmäuse im Unterschied zu den CCF der Wildtypmäuse häufig ein begleitendes leukozytäres Entzündungsinfiltrat auf.

Elektronenmikroskopisch wiesen die CCF der ChREBP-Knockout Mäuse eine stark erhöhte Glykogenspeicherung auf, die vorwiegend aus freien Glykogen- α -Partikeln bestanden und u.a. in Vesikeln und Vakuolen voneinander getrennt waren. Die anderen Zellorganellen wirkten an die äußeren Zellgrenzen verdrängt. Lipidtröpfchen konnten elektronenmikroskopisch kaum nachgewiesen werden (siehe Abbildung 13, d).

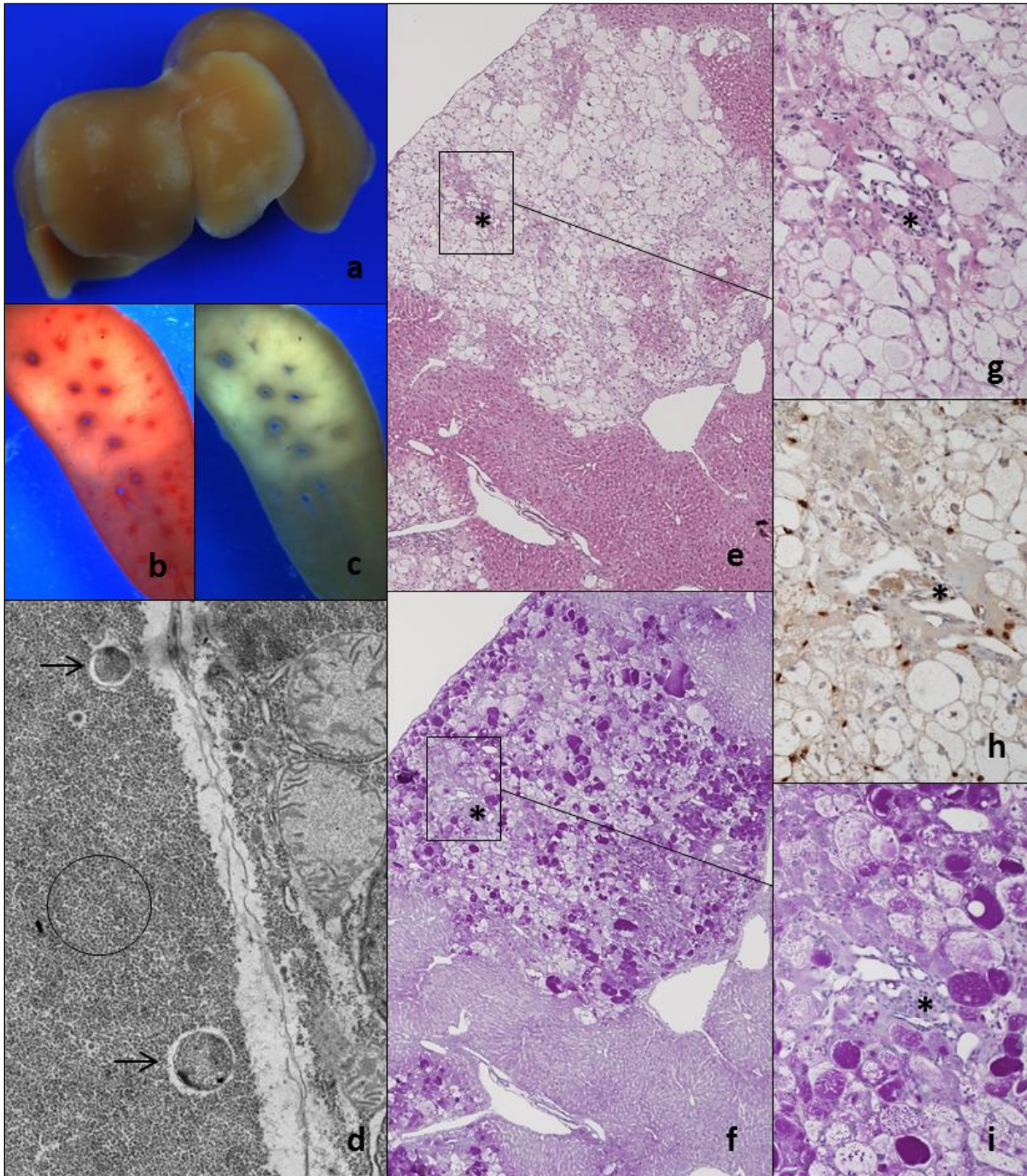


Abbildung 13: Klarzellige Leberherde der diabetischen ChREBP-Knockout Mäuse vier Wochen nach Transplantation von 120 Inseln

a Makroskopisches Bild einer Leber. Die weißen Areale zeigen sich multipel und ausgedehnt **b - c** Stereomikroskopische Bilder von **a**. In der Sudanrotfärbung (**b**) kommt es im Bereich der Glykogenspeicherherde zu einer fehlenden Anfärbung aufgrund einer fehlenden Fettspeicherung. **d** Elektronenmikroskopisches Bild. Die Herde weisen eine enorme Glykogenakkumulation in Form von α -Partikeln (Kreismarkierung) mit einzelnen autophagen Vakuolen (Pfeil) auf, Lipidtropfen fehlen. **e-i** Lichtmikroskopische Bilder. **e, g** HE-Färbung. **f, i** PAS Reaktion. Im Abflussgebiet einer transplantierten Insel (*) weisen die Herde ballionierte Hepatozyten mit erhöhter intrazellulärer Glykogenspeicherung bei fehlender Fettspeicherung. **h** BrdU-Färbung. Die Leberherde zeigen im Vergleich zum Normalgewebe eine erhöhte Proliferationsaktivität. Länge der Bildunterkanten: **a**: 15 mm; **b, c**: 3mm; **d**: 0,15 μ m; **e** und **f**: 2mm, **g-i**: 0,3 mm

3.2.1.3. Morphologie der hellzelligen hepatozellulären Areale der nicht-transplantierten ChREBP-KO-Mäuse

Die Lebern der diabetischen ChREBP-Knockout Mäuse ohne Transplantation zeigten sich makroskopisch oft geschwollen mit einzelnen nicht mehr klar abgrenzbaren blass weißen Läsionen (siehe Abbildung 14, a). Lichtmikroskopisch ähnelten diese hellzelligen hepatozellulären Areale anhand der Zellmorphologie den CCF der transplantierten diabetischen ChREBP-Knockout Mäusen. Die Hepatozyten stellten sich balloniert und vergrößert dar mit in der HE-Färbung hellem Zytoplasma, welches in der PAS-Reaktion einem enormen Glykogengehalt entsprach. Die Zellkerne wirkten im Vergleich zum extrafokalen Gewebe leicht größer mit vergrößertem Kernchromatin. Die Veränderungen waren vorwiegend in den Azinuszonen 2 und 3 und zudem deutlich diffuser auf mehrere Leberazini verteilt (siehe Abbildung 14, e-i). Elektronenmikroskopisch zeigten die hellzelligen Areale ebenfalls eine enorme Glykogenspeicherung bestehend aus Glykogen- α -Partikeln ohne Nachweis von Lipidtröpfchen (siehe Abbildung 14, d).

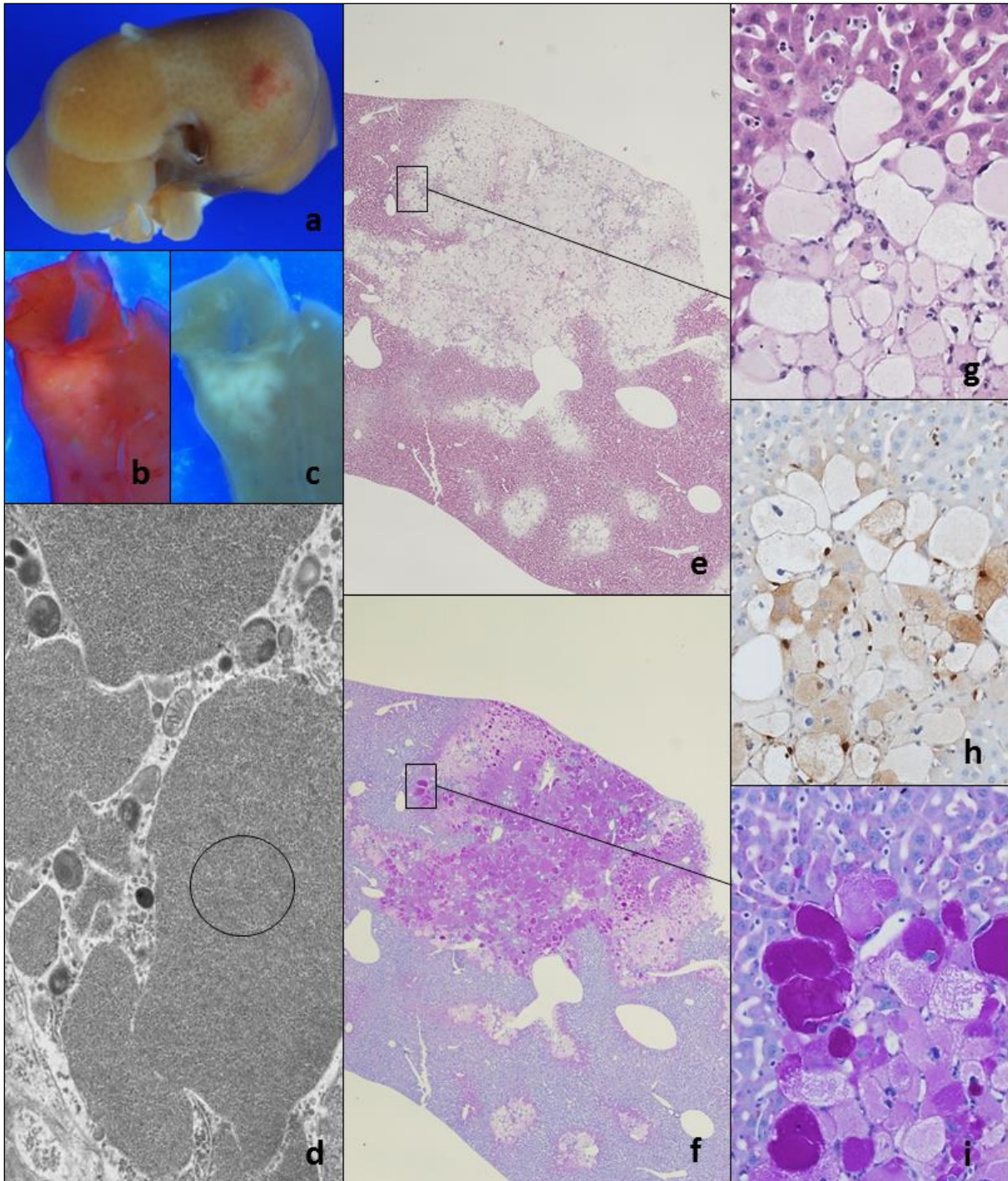


Abbildung 14: Hellzellige hepatozelluläre Veränderungen der nicht-transplantierten ChREBP Knockout Mäuse vier Wochen nach Streptozotocin-induziertem Diabetes.

a Makroskopisches Bild einer Leber. Die Leber wirkt geschwollen mit einzelnen nicht klar abgrenzbaren weißen Arealen. **b - c** Stereomikroskopische Bilder von **a**. In der Sudanrotfärbung (**b**) kommt es im Bereich der Glykogenspeicherherde zu einer fehlenden Anfärbung **d** Elektronenmikroskopisches Bild. Die Herde weisen eine enorme Glykogenakkumulation in Form von α -Partikeln (Kreismarkierung) auf, Lipidtropfen finden sich nicht. **e-i** Lichtmikroskopische Bilder. **e, g** H&E Färbung. **f, i** PAS Reaktion. Die hellzelligen hepatozellulären Areale entsprechen ballonierten Hepatozyten mit einem hellen Zytoplasma in der HE-Färbung, als Zeichen einer enormen Glykogenspeicherung in der PAS Reaktion gezeigt. **h** BrdU-Färbung. Die hellzelligen Areale zeigen im Vergleich zum Normalgewebe eine erhöhte Proliferationsaktivität. Länge der Bildunterkanten: **a**: 15 mm; **b, c**: 3mm; **d**: 0,2 μ m; **e** und **f**: 2mm, **g-i**: 0,3 mm

3.2.1.4. Morphologie der hellzelligen hepatozellulären Areale der nicht-transplantierten Wildtyp-Mäuse

Die Leber der diabetischen nicht-transplantierten Wildtypmäuse zeigten makroskopisch keine Auffälligkeiten. Lichtmikroskopisch stellte sich in der HE-Färbung unverändertes hepatozelluläres Gewebe dar mit in der PAS-Reaktion normalem Glykogengehalt.

Der eine kleine Spontanherd dieser Gruppe bei einer von 10 Mäusen wies in der HE-Färbung ein helles klares Zytoplasma mit vereinzelt Lipidtröpfchen und in der PAS-Reaktion einen leichtgradig gesteigerten Glykogengehalt (nicht abgebildet).

3.2.2. Frequenz der Herdentstehung

3.2.2.1. Untersuchung der Frequenz der Herdentstehung der Wildtypmäuse

Eine Woche nach Transplantation von 120 Inseln konnten in 60% der Wildtyp-Mäuse klarzellige Leberherde (*clear cell foci*; CCF) nachgewiesen werden (N=6 von 10). Nach Transplantation von 200 Inseln wiesen nach einer Woche 80% der Versuchsmäuse CCF auf (N=4 von 5). Ein signifikanter Unterschied konnte nicht gezeigt werden ($p=0,60$), wohl aber eine Tendenz zu einer vermehrten Induktion von CCF bei erhöhter Inselzahl.

Nach vier Wochen sank tendenziell die Herdfrequenz. Nach Transplantation von 120 Inseln konnten nach 4 Wochen bei 30,4 % der Mäuse (N=7 von 23) CCF nachgewiesen werden, nach Transplantation von 200 Inseln in 16,6% (N=1 von 6). Ein signifikanter Unterschied der Versuchsgruppen 4 Wochen nach Transplantation von 120 Inseln und 200 Inseln bestand nicht ($p=0,642$). Ebenso zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Herdfrequenz eine Woche nach Transplantation im Vergleich zu vier Wochen nach Transplantation sowohl bei Verwendung von 120 Inseln ($p=0,139$) als auch von 200 Inseln ($p=0,08$).

Eine Kontrollgruppe von diabetischen Wildtypmäusen ohne Inseltransplantation wies nach vier Wochen in 10% (N=1 von 10) spontane hellzellige hepatozelluläre Veränderungen auf. Hierbei zeigte sich lediglich ein signifikanter Unterschied in der Herdentstehung zur Gruppe eine Gruppe nach Transplantation von 120 Inseln ($p=0,029$) sowie eine Woche nach Transplantation von 200 Inseln ($p=0,017$). Die Herdfrequenz der Versuchsgruppen vier Wochen nach Transplantation von 120 Inseln ($p=0,38$) sowie die Versuchsgruppe vier Wochen nach Transplantation von 200 Inseln ($p=0,99$) zeigte sich nicht signifikant gesteigert im Vergleich zur Kontrollgruppe.

3.2.2.2. Untersuchung der Frequenz der Herdentstehung der ChREBP-Knockout Mäuse

Vier Wochen nach Transplantation von 120 Inseln konnten in 80% der ChREBP-KO-Mäuse CCF nachgewiesen werden (N=16 von 20). Eine Kontrollgruppe ohne Transplantation zeigte nach vier Wochen nach Induktion einer systemischen Hyperglykämie in 76,90% (N=10 von 13) spontane CCF. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchs- und Kontrolltieren konnte hier nicht gezeigt werden ($p=0,99$).

3.2.2.3. Vergleich der Frequenz der Herdentstehung der ChREBP-Knockout- und Wildtypgruppen

Anschließend erfolgten multivariate Untersuchungen. Hierbei war das binomial logistische Regressionsmodell statistisch signifikant, $p < 0,001$, mit einer guten Varianzaufklärung von Nagelkerkes $R^2 = 0,318$. Unabhängig von dem Faktor Transplantation und Versuchsdauer (eine oder vier Wochen) zeigte der Typus (ChREBP Knockout oder Wildtypmaus) einen (hoch-) signifikanten Effekt. Die ChREBP-KO-Mäuse wiesen dabei eine deutlich höhere Wahrscheinlichkeit eines Herdes auf ($p=0,001$).

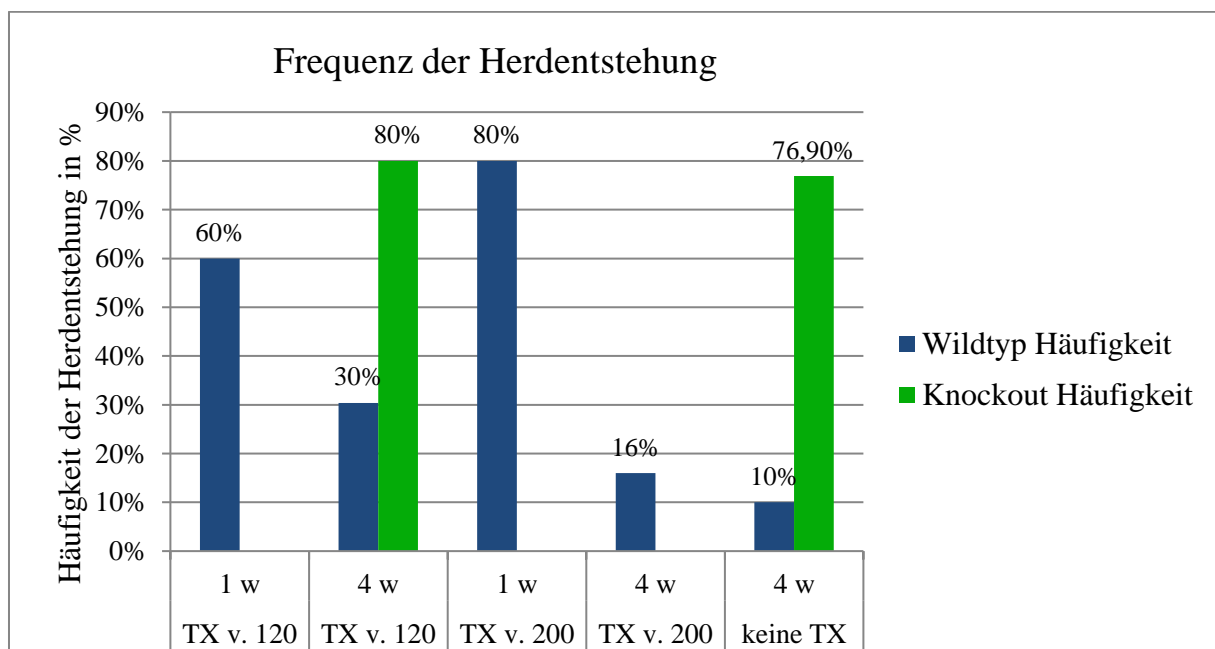


Diagramm 5: Darstellung der Herdfrequenz pro Versuchsgruppe angegeben in %

Untersuchung mittels multivariater Untersuchungen. Unabhängig vom Faktor Transplantation und Versuchsdauer wies nur der Faktor Typus, Wildtyp- oder ChREBP-Knockout Maus, einen hochsignifikanten Effekt auf. TX=Transplantation; v.=von 120 oder 200 Inseln; w=Wochen

3.2.3. Proliferationskinetische Untersuchungen

Die Darstellung der proliferationskinetischen Unterschiede nach 3-maliger BrdU-Injektion erfolgte in den Versuchsgruppen mit einer Beobachtungsdauer von einer Woche nach Transplantation von 120 und 200 Inseln und nach vier Wochen nach einer Transplantation von 200 Inseln. Die Versuchsgruppen mit einer Beobachtungsdauer von vier Wochen nach Transplantation von 120 Inseln wurden proliferationskinetisch zusätzlich mit einwöchiger BrdU-Applikation untersucht.

3.2.3.1. Proliferationsaktivität der klarzelligen Leberherde der Wildtypmäuse

Sämtliche induzierten CCF der diabetischen Wildtypmäuse nach Inseltransplantation zeigten eine signifikant höhere Proliferationsaktivität im Vergleich zum extrafokalen hepatozellulären Gewebe (siehe Diagramm 6). Die Proliferationsaktivität der CCF war eine Woche nach Transplantation von 120 Inseln ($3,69\% \pm 0,63\%$; MW \pm S.E.M.; N=6 nach 3-maliger BrdU-Gabe) signifikant im Vergleich zum extrafokalen hepatozellulären Gewebe ($0,71\% \pm 0,14\%$, MW \pm S.E.M.; N=6 nach 3-maliger BrdU-Gabe) gesteigert ($p=0,028$). Nach Transplantation von 200 Inseln zeigte sich die Proliferationsaktivität nach einer Woche im Bereich der CCF ($4,3\% \pm 0,21\%$, MW \pm S.E.M.; N=4 nach 3-maliger BrdU-Gabe) ebenfalls signifikant gesteigert im Vergleich zum extrafokalen Gewebe ($0,7\% \pm 0,07\%$, MW \pm S.E.M.; N=4 nach 3-maliger BrdU-Gabe) ($p=0,027$).

Vier Wochen nach Transplantation von 120 Inseln zeigte sich die Proliferationsaktivität im Bereich der CCF ($4,1\% \pm 1,12\%$, MW \pm S.E.M.; N=4 nach 3-maliger BrdU-Gabe) signifikant gesteigert im Vergleich zum extrafokalem Gewebe ($0,9\% \pm 0,27\%$ MW \pm S.E.M.; N=4 nach 3-maliger BrdU-Gabe) ($p=0,032$). Nach einwöchiger Applikation von BrdU in Form einer osmotischen Minipumpe zeigte sich ebenfalls eine signifikante Steigerung der Proliferationsaktivität im Bereich der CCF ($13,33\% \pm 0,22\%$, MW \pm S.E.M.; N=3 nach einwöchiger BrdU-Applikation) im Vergleich zum extrafokalen Gewebe ($1,84\% \pm 0,05\%$, MW \pm S.E.M.; N=3 nach einwöchiger BrdU-Applikation) ($p=0,009$). Vier Wochen nach Transplantation von 200 Inseln konnte bei nur einem Herd keine Signifikanz des Proliferationsverhaltens der CCF im Vergleich zum extrafokalen Gewebe gezeigt werden.

Die Proliferationsaktivität des hepatozellulären Gewebes der Kontrollgruppe ohne Transplantation ($0,52 \pm 0,14$ MW \pm S.E.M.; N=5 nach 3-maliger BrdU-Gabe und $1,75 \pm 0,16$ MW \pm S.E.M.; N=5 nach einwöchiger BrdU-Applikation) zeigte keinen signifikanten Unterschied zum extrafokalen Gewebe sämtlicher Versuchsgruppen ($p>0,05$).

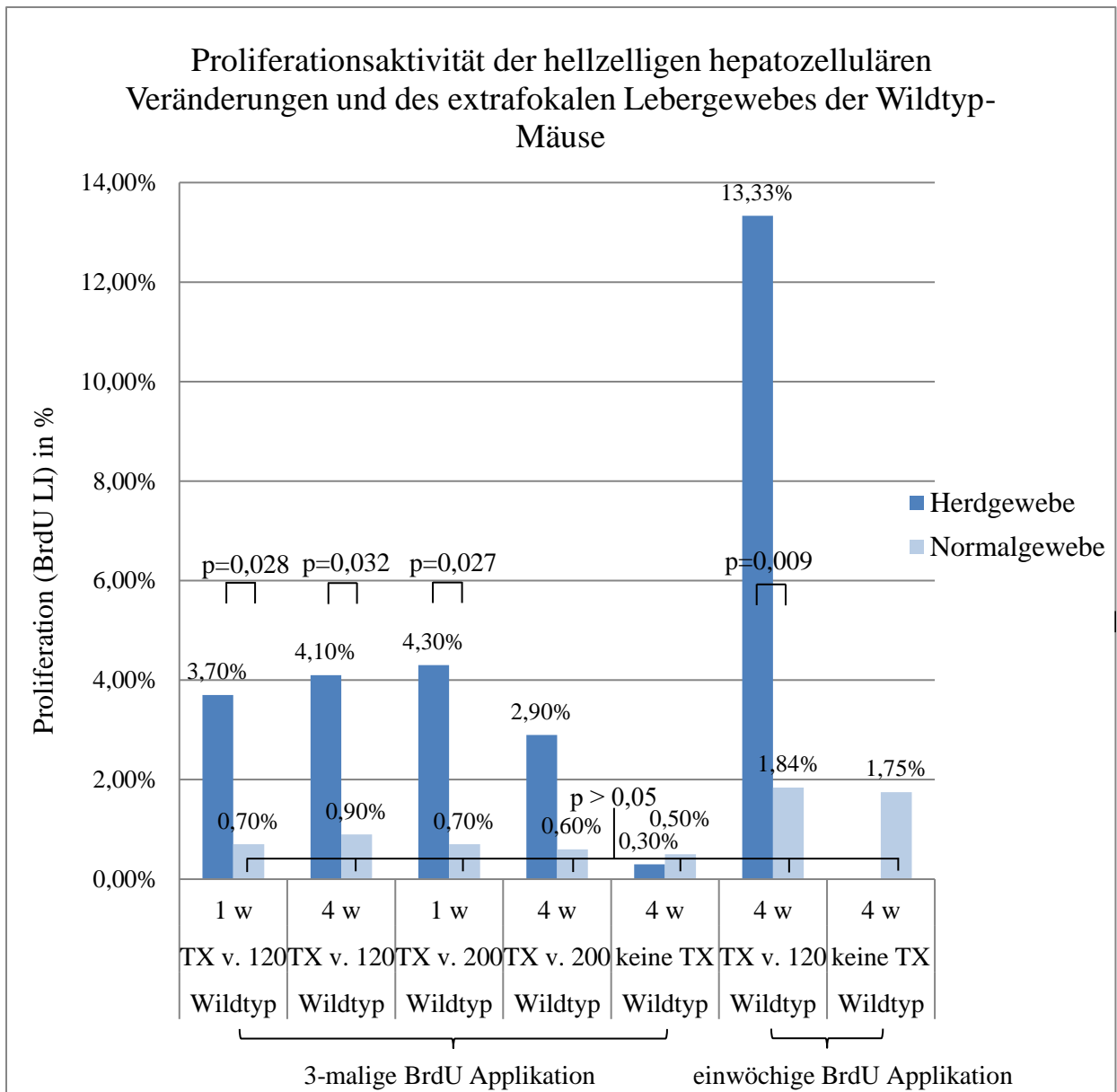


Diagramm 6: Vergleichende Darstellung der Proliferationsaktivität der der hellzelligen hepatozellulären Areale und des extrafokalen Lebergewebes von diabetischen Wildtyp-Mäusen mit und ohne Inseltransplantation in Prozent nach einer und nach vier Wochen.

Auswertung mittels Wilcoxon – Rangsummentest und Mann-Whitney-U Test, als signifikant gewertete p-Werte ($p < 0,05$).

3.2.3.2. Vergleich der Proliferationsaktivität der klarzelligen Leberherde der Wildtypmäuse

Die CCF eine Woche nach Transplantation von 120 Inseln im Vergleich zur Transplantation von 200 Inseln der diabetischen Wildtypmäuse unterschieden sich proliferationskinetisch nicht signifikant untereinander ($p=0,394$). Auch das extrafokale Lebergewebe unterschied sich

proliferationskinetisch zwischen diesen beiden Gruppen nicht signifikant ($p=0,831$). Vier Wochen nach Transplantation von 120 Inseln zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Proliferationsaktivität der CCF weder im Vergleich zur Gruppe eine Woche nach Transplantation von 120 Inseln ($p=0,116$) noch zur Gruppe eine Woche nach Transplantation von 200 Inseln ($p=0,157$). Ein signifikanter Unterschied der Proliferationsaktivität zur Gruppe vier Wochen nach Transplantation von 200 Inseln konnte bei $N=1$ nicht gezeigt werden.

3.2.3.3. Proliferationsaktivität der klarzelligen Leberherde der transplantierten ChREBP-Knockout Mäuse

Die Proliferationsaktivität der CCF der ChREBP-Knockout Mäuse war vier Wochen nach Transplantation von 120 Inseln ($3,25\% \pm 0,18\%$, MW \pm S.E.M.; $N=7$ nach 3-maliger BrdU-Gabe) signifikant im Vergleich zum extrafokalen hepatozellulären Gewebe ($0,94\% \pm 0,12\%$, MW \pm S.E.M.; $N=7$ nach 3-maliger BrdU-Gabe) gesteigert ($p=0,0156$). Nach einwöchiger Applikation von BrdU in Form einer osmotischen Minipumpe zeigte sich ebenfalls eine signifikante Steigerung der Proliferationsaktivität im Bereich der CCF ($10,42\% \pm 0,46\%$, MW \pm S.E.M.; $N=5$ nach einwöchiger BrdU-Applikation) im Vergleich zum extrafokalen Gewebe ($1,37\% \pm 0,17\%$ MW \pm S.E.M.; $N=5$ nach einwöchiger BrdU-Applikation) ($p=0,0079$).

3.2.3.4. Proliferationsaktivität der hellzelligen hepatozellulären Areale der nicht-transplantierten ChREBP-Knockout Mäuse

Interessanterweise zeigten die spontanen hellzelligen hepatozellulären Veränderungen der ChREBP-Knockout Mäuse vier Wochen nach Streptozotocin induziertem Diabetes ohne Transplantation eine signifikant erhöhte Proliferationsaktivität ($2,86\% \pm 0,65\%$, MW \pm S.E.M.; $N=7$ nach 3-maliger BrdU-Gabe bzw. $9,65\% \pm 0,67\%$, MW \pm S.E.M.; $N=6$ nach einwöchiger BrdU-Gabe) im Vergleich zum extrafokalen Lebergewebe ($0,83\% \pm 0,32\%$, MW \pm S.E.M.; $N=7$ nach 3-maliger BrdU-Gabe bzw. $1,53\% \pm 0,18\%$ MW \pm S.E.M.; $N=6$ nach einwöchiger BrdU-Gabe) sowohl nach 3-maliger BrdU-Gabe ($p=0,031$) als auch nach einwöchiger BrdU-Gabe ($p=0,004$).

3.2.3.5. Vergleich der Proliferationsaktivität der hellzelligen hepatozellulären Areale der ChREBP-Knockout Mäuse

Die Proliferationsaktivität der CCF der transplantierten ChREBP-Knockout Mäuse zeigte sich im Vergleich zu den hellzelligen hepatozellulären Arealen der nicht-transplantierten ChREBP Knockout Mäusen nicht signifikant gesteigert, weder nach 3-maliger BrdU-Applikation ($p=0,609$) noch nach einwöchiger BrdU-Applikation ($p=0,151$).

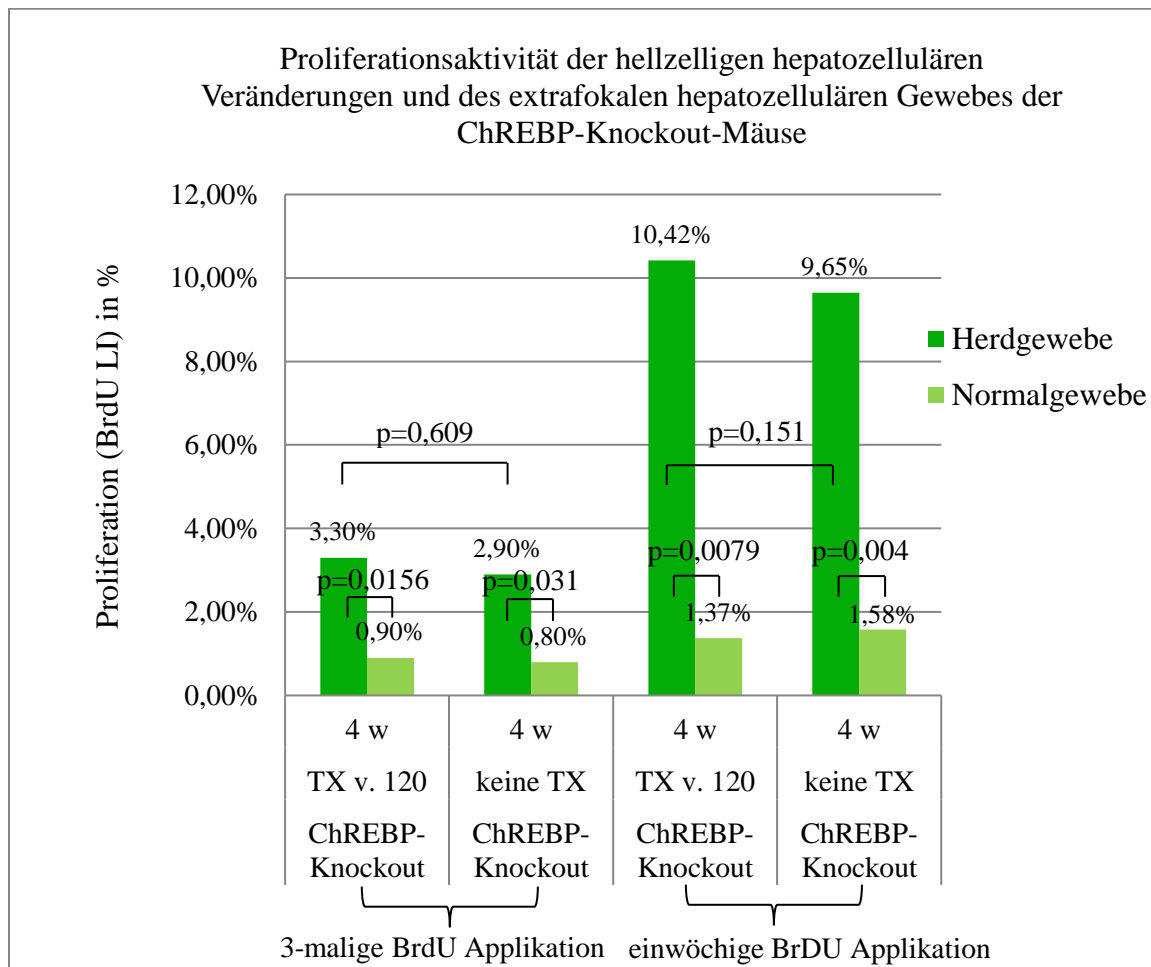


Diagramm 7: Vergleichende Darstellung der Proliferationsaktivität der hellzelligen hepatozellulären Areale der diabetischen ChREBP-Knockout Mäuse mit und ohne Inseltransplantation in Prozent nach vier Wochen.

Auswertung mittels Wilcoxon – Rangsummentest und Mann-Whitney-U Test, als signifikant gewertete p-Werte ($p < 0,05$). Die Proliferationsaktivität des Herdgewebes zeigt sich signifikant gesteigert im Vergleich zum Normalgewebe (intraindividuellem Unterschied). Die Proliferationsunterschiede der Herdgewebe der transplantierten und der nicht-transplantierten ChREBP-Knockout Mäuse zeigten keinen signifikanten Unterschied (interindividueller Unterschied).

3.2.3.6. Vergleich der Proliferationsaktivität der klarzelligen Leberherde der transplantierten Wildtypmäuse und der transplantierten ChREBP-Knockout Mäuse

Die Proliferationsaktivität der CCF der Wildtypmäuse eine Woche nach Transplantation von 120 Inseln zeigte im Vergleich zu den CCF der ChREBP-Knockout Mäuse vier Wochen nach Transplantation von 120 Inseln keinen signifikanten Unterschied ($p=0,83$). Hingegen war die Proliferationsaktivität der CCF der Wildtypmäuse eine Woche nach Transplantation von 200 Inseln im Vergleich zu den CCF der ChREBP-Knockout Mäuse vier Wochen nach Transplantation von 120 Inseln signifikant erhöht ($p=0,018$).

Bei $N=1$ konnte hinsichtlich der Proliferationsaktivität der CCF der Gruppe der Wildtypmäuse vier Wochen nach Transplantation von 200 Inseln im Vergleich zur transplantierten ChREBP Knockout Gruppe kein signifikanter Unterschied gezeigt werden.

Nach einwöchiger BrdU-Applikation zeigte sich eine signifikant höhere Proliferationsaktivität ($p=0,036$) der CCF der Wildtyp-Mäuse vier Wochen nach Transplantation von 120 Inseln ($13,33\% \pm 0,22\%$ MW \pm S.E.M.; $N=3$ nach einwöchiger BrdU-Applikation) im Vergleich zur Proliferationsaktivität der ChREBP-Knockout Mäuse ($10,42\% \pm 0,46\%$ MW \pm S.E.M.; $N=5$ nach einwöchiger BrdU-Applikation) vier Wochen nach Transplantation von 120 Inseln. Nach 3-maliger BrdU-Gabe war die Proliferationsaktivität der CCF der Wildtyp-Mäuse Applikation ($4,1\% \pm 1,12\%$ MW \pm S.E.M.; $N=4$ nach 3-maliger BrdU-Gabe) nicht signifikant im Vergleich zu den Arealen der transplantierten ChREBP-Knockout Mäuse ($3,25\% \pm 0,18\%$, MW \pm S.E.M.; $N=7$ nach 3-maliger BrdU-Gabe) verändert ($p=0,218$).

Das extrafokale Lebergewebe unterschied sich weder nach 3-maliger BrdU Applikation noch nach einwöchiger BrdU Applikation zwischen den verschiedenen Gruppen ($p > 0,05$).

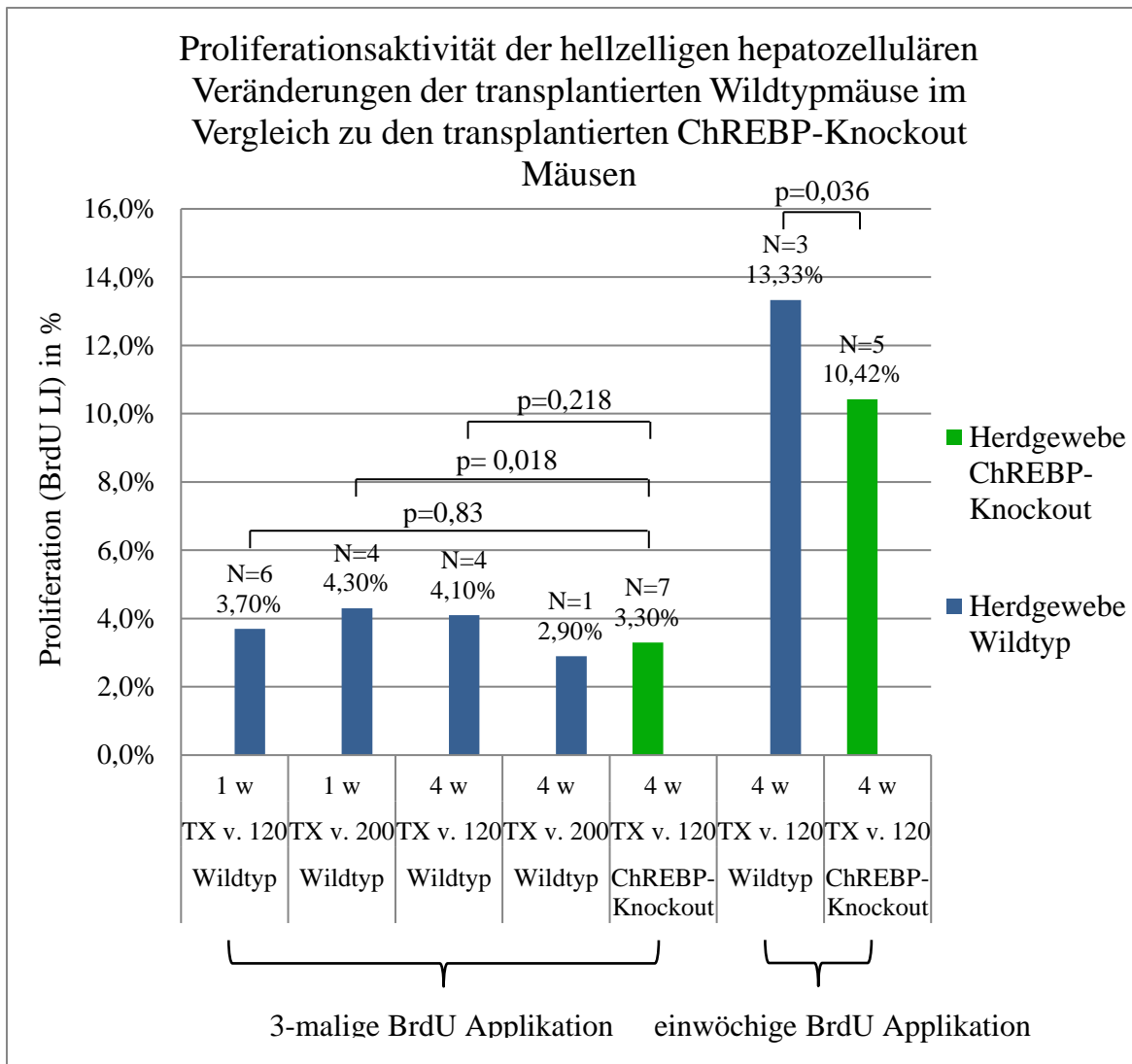


Diagramm 8: Vergleichende Darstellung der Proliferationsaktivität der hellzelligen hepatozellulären Areale der transplantierten ChREBP-Knockout und Wildtypmäuse in Prozent

Auswertung mittels Mann-Whitney-U Test, als signifikant gewertete p-Werte ($p < 0,05$). Eine signifikant erhöhte Proliferationsaktivität der hellzelligen hepatozellulären Areale zeigte die Gruppe der Wildtypmäuse eine Woche nach Transplantation von 200 Inseln im Vergleich zu den ChREBP-Knockoutmäusen vier Wochen nach Transplantation von 120 Inseln nach 3-maliger BrdU Applikation. Weiterhin zeigte sich die Proliferationsaktivität des Herdgewebes der Wildtypmäuse vier Wochen nach Transplantation von 120 Inseln signifikant gesteigert im Vergleich zum Herdgewebe der ChREBP-Knockout Mäuse vier Wochen nach Transplantation von 120 Inseln nach einwöchiger BrdU Applikation.

4. Diskussion

4.1. Modifikation der Inselisolation

Das Ziel reine, vitale Inseln zu isolieren konnte durch meine Modifikationen erreicht werden. Die veränderten Parameter Einwirkzeit, Enzymkonzentration und Schnittdicke hatten jeder für sich einen entscheidenden Einfluss auf die Kriterien Reinheit und Qualität der isolierten Inseln. Nach der Auswertung jedes Parameters und dessen Einfluss konnte die optimale Kombination von einer Einwirkzeit von 9 min., einer Enzymkonzentration von 2 mg/Pankreas und einer Schnittdicke *mittel* von 0,5-1 mm eruiert werden, um möglichst reine Inseln mit hoher Qualität zu isolieren. Hierdurch konnte die Anzahl der Inseln auf 120 und 200 Stück gesteigert werden ohne das Volumen des Transplantats im Vergleich zu den Vorexperimenten von Sonke und Lohr zu vergrößern. Die immunhistochemische Reaktion bewies das überwiegende Vorhandensein von Insulin-positiven β -Zellen in den Inseln. Die Vitalitätsnachweise der qualitativ hochwertigen Inseln bewiesen, dass ich vitale Inseln mit intaktem Insulinspeicherverhalten transplantierte und die Isolation selbst zu keinem Vitalitätsverlust der Inseln führte [86, 87, 89].

Die transplantierten Mäuse von Sonke und Lohr wiesen noch zahlreiche Lebernekrosen auf [64], die transplantierten Mäuse meiner Gruppen wiesen keine Lebernekrosen selbst bei Verdopplung der Inselzahl auf. Die Nekrosen entstanden bei Sonke und Lohr wohl aufgrund thrombotischer Gefäßverschlüsse des Transplantats [64, 92]. Erst durch die Verminderung des transplantierten Volumens bzw. des exokrinen Pankreasanteils konnte die Inselzahl erhöht werden, um das Ziel einer höheren Herdfrequenz zu erreichen.

4.2. Die Frequenz der Herdentstehung bei Wildtyp-Mäusen – das Schicksal der transplantierten Inseln

Das zentrale Ziel dieser Doktorarbeit war es die Herdfrequenz nach Inseltransplantation zu erhöhen. Dies sollte durch die Verwendung einer höheren Inselanzahl erreicht werden.

Die Herdfrequenz der Wildtypmäuse von 60% nach Transplantation von 120 Inseln nach einer Woche im Rahmen der Experimente meiner Doktorarbeit unterschied sich nicht signifikant von der Frequenz von Sonke und Lohr [64] nach Transplantation von 70 Inseln (66%). Durch das verminderte Transplantatvolumen konnte ich in meinen Folgeexperimenten die Inselzahl nochmals erhöhen. Hierdurch konnte ich nach Transplantation von 200 Inseln eine höhere Herdfrequenz erreichen (80%). Ein signifikanter Unterschied konnte zwar nicht gezeigt werden, wohl aber eine Tendenz zu einem erhöhten Vorkommen von klarzelligen Leberherden nach

erhöhter Inselzahl. In der Wildtyp-Kontrollgruppe „diabetisch ohne Transplantation“ konnte ich aufgrund des Fehlens von CCF zeigen, dass die induzierten Leberherde nicht allein aufgrund einer Hyperglykämie entstanden, sondern aufgrund eines Zusammenspiels einer Hyperglykämie und Hyperinsulinämie.

Nach vier Wochen sank jedoch die Herdfrequenz deutlich auf 35% nach Transplantation von 120 Inseln und 16,6% nach Transplantation von 200 Inseln ab.

In der Literatur sind einige Faktoren beschrieben, die eine zunehmende Dysfunktion des Inseltransplantats und somit die fehlende Induktion von klarzelligen Leberherden bzw. das Absinken der Herdfrequenz vier Wochen nach Transplantation erklären könnten. Hierbei kann zwischen einem frühen, d.h. nach wenigen Tagen, und einem späten, d.h. nach einigen Wochen, Transplantatverlust unterschieden werden. Biarnes *et al* konnten an Streptocotozin diabetischen Mäusen des Stammes C57BL/6 zeigen, dass selbst unter optimalen Bedingungen ca. 60% des transplantierten Inselgewebes drei Tage nach der syngenesischen Transplantation verloren ging [93]. Ebenso konnte die Gruppe um Jirak durch die Verwendung von Magnetresonanztomographien einen signifikanten Verlust transplantierte Inseln am Mausmodell innerhalb der ersten post-Transplantationswoche bildmorphologisch nachvollziehen [94]. Zudem konnte an humanen Pankreasinseln *in vitro* nach intraportaler Transplantation gezeigt werden, dass innerhalb von 15 Minuten nach Transplantation eine Freisetzung von C-Peptid und ein Anstieg der Gerinnungsparameter auftritt [95], was auf eine frühe Schädigung der Inselzellen hindeutet. Viele dieser frühen Transplantatverluste sind nicht allein auf das Auftreten klassischer Mechanismen der allogenen spezifischen Immunabwehr zurückzuführen, da diese die Diskrepanz zwischen den Überlebensraten nach Transplantation des gesamten Pankreas (wo frühe Transplantatverluste selten auftreten) gegenüber Insel-Allografts nicht erklären [96]. Zudem treten diese frühen Transplantatverluste auch bei syngenesischen Inseltransplantaten auf [93], was darauf hindeutet, dass zusätzliche Mechanismen zu solchen Phänomenen beitragen könnten.

Als mögliche Ursachen des initialen Transplantatverlustes wurden eine primäre mechanische Beschädigung während der Isolation der Pankreasinseln, eine sofortige blutvermittelte Entzündungsreaktion, eine gestörte Vaskularisation der Inseltransplantate sowie eine Hypoxie der transplantierten Inseln vermutet [93].

Eine primäre Beschädigung der Inseln durch den Isolationsprozess konnte durch die Vitalitätstests und immunhistochemischen Reaktionen im Rahmen meiner Doktorarbeit weitestgehend ausgeschlossen werden. Die immunhistochemische Reaktion bewies das

Vorhandensein von β -Zellen in den Inseln. Die positiven Vitalitätsnachweise der qualitativ hochwertigen Inseln bewiesen, dass ich vitale Inseln mit intaktem Insulinspeicherverhalten transplantierte und die Isolation selbst zu keinem Vitalitätsverlust der Inseln führte.

Als eine weitere Erklärung des initialen Transplantatverlustes wurde eine sofortige blutvermittelte Entzündungsreaktion vorgeschlagen [95]. Nach intraportaler Inseltransplantation sezernieren die residenten Makrophagen (Kupfferzellen) Zytokine, Stickstoffmonoxid und freie Radikale, die für die Inseln direkt toxisch sind [97]. Während der frühen Entzündungsreaktion tragen Makrophagen und Neutrophile zur Sekretion von IL-1 β [98] und TNF- α [99] bei, was zur Freisetzung toxischer Spezies führt und eine Dysfunktion der Inselzellen induziert [100, 101]. Dieser Prozess könnte eine Teilerklärung für den initialen Transplantatverlust im Rahmen meiner Doktorarbeit darstellen.

Eine weitere Erklärung für ein Transplantatversagen über die ersten Tage hinaus könnte eine gestörte Vaskularisation der transplantierten Inseln darstellen, die zu einer hypoxie-induzierten Apoptose führen würde. Pankreasinseln haben normalerweise eine reiche Blutversorgung. Nach Isolation durch eine Kollagenasenverdauung, wie sie im Rahmen meiner Doktorarbeit stattfand, und hierdurch Zerstörung der kapillären Struktur ist die Nährstoffversorgung der Inseln abhängig von Diffusion aus der Inselperipherie [102]. In den ersten Wochen nach der Transplantation werden die Pankreasinseln dabei nur durch den portalen venösen Blut versorgt [103]. VEGF wird innerhalb von 24- 48 Stunden nach der Transplantation hochreguliert [104]. Die Perfusion der transplantierten Pankreasinseln erfolgt erst, nachdem der Prozess der Angiogenese neuer spendereigener Kapillaren abgeschlossen ist [105]. Die Angiogenese ist hierbei nach 10- 14 Tagen bereits weit fortgeschritten [106, 107].

Die insulinproduzierenden β - Zellen, die für die Induktion der CCF im Rahmen meiner Doktorarbeit essentiell sind, liegen in höheren Konzentrationen im Zentrum der Pankreasinseln vor. Sie können aufgrund der begrenzten Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen ein erhöhtes Risiko der Hypoxie aufweisen [108]. Die resultierende Hypoxie zwingt die β -Zellen zum Übergang in die anaerobe Glykolyse, wodurch ihre Fähigkeit, auf hohe Glukosekonzentrationen zu reagieren, verringert wird. Längere Hypoxie wirkt sich dauerhaft schädlich auf β -Zellen über die vom Hypoxie-induzierbaren Faktor 1 α (HIF-1 α) abhängigen und unabhängigen Signalwege aus, was zu Stress des endoplasmatischen Retikulums führt, gefolgt von Apoptose über den mitochondrialen Zelltodweg [109, 110]. Die durch eine gestörte Blutversorgung durch den Kollagenaseverdau im Rahmen meiner Doktorarbeit resultierende Hypoxie der Inseln kann zum

initialen Transplantatverlust beigetragen haben und damit eine Erklärung für eine nicht 100%ige Herdfrequenz nach einer Woche sein.

Eine weitere Einflussgröße, die das Transplantatüberleben negativ beeinflussen könnte, ist die chronische Hyperglykämie, derer die transplantierten Inseln ausgesetzt waren.

Eine regelmäßige physiologische Stimulation durch Glukose spielt eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der β -Zelldifferenzierung. Im Gegensatz dazu übt eine verlängerte oder wiederholte Exposition gegenüber erhöhten Glukosekonzentrationen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* schädliche oder toxische Wirkungen auf den β -Zell-Phänotyp aus, ein Konzept, das als Glukotoxizität bezeichnet wird [111].

Mehrere Studien am Mausmodell zeigen hierbei einen positiven Einfluss einer kurzzeitigen Hyperglykämie auf das Transplantatüberleben, eine chronische Hyperglykämie führt jedoch nach 14- 30 Tagen zu einem erhöhten Transplantatverlust [93, 112]. Biarnés *et al.* untersuchten an normoglykämischen und an hyperglykämischen Mäusen des Stammes C57BL/6 die Auswirkung einer hyperglykämischen Stoffwechsellage nach Inseltransplantation. Sie konnten zeigen, dass die β -Zellapoptose und der β -Zellmassenverlust in den ersten Tagen nach Transplantation sowohl in normoglykämischen, als auch in hyperglykämischen Empfängern ähnlich erhöht, was darauf hindeutet, dass die anfängliche β -Zellzerstörung nach der Transplantation nicht von den Stoffwechselbedingungen der Empfänger abhängt [93]. Nach 10 Tagen war in beiden Gruppen die β -Zellapoptose erhöht, die β -Zellmasse nahm jedoch in den hyperglykämischen Empfängern zu im Unterschied zu den normoglykämischen Empfängern, was darauf hindeutet, dass die Unterschiede in der β -Zellmasse auf die β -Zellhypertrophie und -Hyperplasie von Inseln zurückzuführen sind [93, 112]. Nach 30 Tagen war die β -Zellapoptose in hyperglykämischen Empfängern signifikant höher als in normoglykämischen Empfängern [93]. Diese Apoptose konnte durch die begrenzte β -Zell-Replikation von Inseln nicht ausgeglichen werden und führte zu einer Verringerung der β -Zellmasse [113, 114]. Die chronische Hyperglykämie kann ihre schädlichen Auswirkungen dabei entweder direkt (Glukotoxizität) [115] oder indirekt durch die Erhöhung von Fettsäuren (Glukolipotoxizität) [116] ausüben. Durch die durch eine chronische Hyperglykämie verstärkte Lipogenese kommt es zu einer intrazellulären Lipidakkumulation [117] und so zu einem erhöhten oxidativen Stress [118, 119]. In der Folge kommt es zu einer verminderten Insulin-Genexpression und -sekretion [120] sowie zu einer erhöhten Apoptoserate [119]. Eine direkte schädliche Wirkung der chronischen Hyperglykämie könnte u.a. in der Bildung fortgeschrittener Glykierungsendprodukte [121] und der erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies durch die Glykierungsreaktion [122] bestehen. Weiterhin erhöht eine chronische Hyperglykämie den Sauerstoffverbrauch der Inseln [110] und verzögert

die Revaskularisierung von Inseltransplantaten [123]. Die Transkriptionsfaktoren SREBP-1c [124] und ChREBP [125] scheinen hierbei auf molekularer Ebene die Auswirkungen der Glukotoxizität zu vermitteln. Die chronische Hyperglykämie, die in meinen Experimenten erwünscht war, mit ihren negativen Auswirkungen, könnte den Herdverlust nach vier Wochen im Vergleich nach einer Woche nach Transplantation erklären.

Insgesamt scheinen in der Summe eine sofortige allogene unspezifische Entzündungsreaktion, sowie eine Hypoxie den initialen Transplantatverlust zu verursachen. Kurzfristig scheint eine Hyperglykämie induzierte β -Zellhyperplasie den anfänglichen Transplantatverlust auszugleichen. Langfristig führt eine chronische Hyperglykämie zu den beschriebenen negativen Folgen, welche gepaart mit einem erhöhten Sauerstoffverbrauch und einer gestörten bzw. verzögerten Revaskularisation, zu einem weiteren Transplantatverlust vier Wochen nach Transplantation führen.

Um diesen β -Zellverlust auszugleichen, könnte eine noch höhere Anzahl an Inseln transplantiert werden. Durch die im Rahmen meiner Doktorarbeit verbesserten Isolationsprozesse, konnte das zu transplantierende Volumen drastisch gesenkt werden, und hierbei embolisch induzierte Nekrosen vollständig beseitigt werden. Durch diesen modifizierten Isolationsprozess könnte eine weitere Erhöhung der Inselzahl erfolgen.

4.3. Unterschiede in der Herdfrequenz der Wildtyp- und ChREBP-Knockout-Mäuse

Vier Wochen nach Transplantation von 120 Inseln zeigte die ChREBP-Knockout Gruppe eine signifikant höhere Herdfrequenz (80%) als die transplantierte Wildtypgruppe (35%). Die durch ChREBP vermittelte Glukotoxizität könnte eine Erklärung für den signifikanten Unterschied in der Herdfrequenz darstellen [125]. Wie in Hepatozyten wird ChREBP auch in Pankreasinseln und β -Zelllinien glukoseabhängig exprimiert [126, 127]. ChREBP reguliert mehrere nachgeschaltete Effektorgene und wurde bereits in mehreren Studien als Vermittler der β -Zell-Glukotoxizität u.a. über die Aktivierung der Transkription entscheidender Enzyme der Lipogenese vorgestellt, das in β -Zelldysfunktion und Apoptose gipfelt [125].

Da Silva Xavier *et al.* berichteten, dass ChREBP direkt an den FAS-Promotor in β -Zellen bindet und der ChREBP-Knockout eine Reduktion der intrazellulären Fettsäureakkumulation bewirkt und die glukosestimulierte Insulinsekretion potenziert [127]. Noordeen *et al.* zeigten, dass ChREBP auch zur β -Zelldysfunktion beitragen kann, indem es die mRNA-Expression des Hypoxie-induzierten Faktor-1 β (HIF-1 β) unterdrückt, welcher zur Anpassung der Zelle an eine

mangelnde Sauerstoffversorgung notwendig ist [128]. Weiterhin zeigen ChREBP-überexprimierte Zellen eine erhöhte Caspase-abhängige Apoptose und oxidativen Stress. Eine Lipidüberladung in pankreatischen β -Zellen könnte diese Phänomene teilweise erklären [129].

Zusammengenommen scheint das aktivierte ChREBP als ein Mediator der Glukotoxizität zu agieren, indem es nachgeschaltete Zielgene, u.a. FAS hochreguliert, was zu Lipidakkumulation, erhöhtem oxidativen Stress, stimulierter Caspase-Aktivität und Apoptose führt. Weiterhin wird die Insulin-Gen-Transkription herunterreguliert, wodurch es zu einer beeinträchtigten Insulinsekretion kommt [125].

Die durch ChREBP verstärkte Glukotoxizität könnte eine verstärkte Apoptose der transplantierten Inseln in den Wildtyp-Mäusen hervorgerufen haben und hierdurch eine verminderte Herdfrequenz bei transplantierten Wildtypmäusen im Vergleich zu transplantierten ChREBP-Knockout Mäusen erklären. Der ChREBP-Knockout könnte die transplantierten Inseln vor intrazellulärer Fettakkumulation, oxidativen Stress und erhöhter Apoptose geschützt haben und hierdurch zu einer höheren Induktion hellzelliger hepatozellulärer Veränderungen geführt haben.

4.4. Morphologie der hellzelligen Herde der transplantierten Wildtyp-Mäuse

Sowohl eine als auch vier Wochen nach Inseltransplantation entstanden makroskopisch sichtbare weiße Areale auf der Leberoberfläche, die lichtmikroskopisch hepatozellulären Arealen mit erhöhter Lipid- und Glykogenspeicherung entsprachen (siehe Abbildung 12). Diese relativ scharf begrenzten und unbekapselten Areale entsprachen sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch den klassischen *clear cell foci*, die bereits im Hepatokarzinogenese Modell der Ratte induziert werden konnten [41] und in Vorexperimenten am Mausmodell nachvollzogen werden konnten [64] (siehe Abbildung 15, a und c). Diese Veränderungen entsprachen morphologisch ebenfalls den hellzelligen präneoplastischen Herden, die in menschlichen zirrhotischen [46] und nicht-zirrhotischen Lebern [46, 48] beschrieben wurden (siehe Abbildung 15 b). Kontrollgruppen der Streptozotocin-induzierten diabetischen Wildtyp Mäuse ohne Transplantation wiesen keine signifikante Herdentstehung auf. Diese morphologischen Veränderungen der transplantierten Wildtypmäuse waren somit auf die Stoffwechselbedingungen einer systemischen Hyperglykämie und lokalen Hyperinsulinämie zurückzuführen.

4.5. Charakterisierung der klarzelligen Leberherde der transplantierten Wildtyp Mäuse

Zusätzlich zu den beschriebenen morphologischen Ähnlichkeiten der induzierten klarzelligen Leberherde der Wildtyp- Mäuse zeigte eine bereits veröffentlichte Publikation der Erkenntnisse meiner Doktorarbeit, sowie der Arbeit von Sonke und Lohr eine Übereinstimmung in metabolischen Veränderungen dieser Herde [65] wie sie auch im Pankreasinseltransplantationsmodell bzw. der hormonell induzierten Hepatokarzinogenese der diabetischen Ratte [54, 56] und in präneoplastischen humanen CCF [48] gefunden wurden (Abbildung 15, d). Es fand sich eine Hochregulierung von Schlüsselenzymen, die an der Glykolyse beteiligt sind (Hexokinase, Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase und Pyruvatkinase), der *de-novo*-Lipidsynthese (Fettsäuresynthase) und dem Pentosephosphatweg (Glucose-6-Phosphatdehydrogenase), während die Aktivität der wichtigsten Enzyme der Gluconeogenese (Glucose-6-Phosphatase), der Glycogenolyse (Glycogenphosphorylase) und der Adenylatcyclase herunterreguliert waren [38, 40, 52] (siehe Abbildung 15, d). Diese morphologischen und enzymatischen Veränderungen sind dabei den typischen Insulinwirkungen auf Hepatozyten sehr ähnlich [45].

Auf molekularer Ebene zeigte sich in ergänzenden immunhistochemischen Untersuchungen der induzierten hellzelligen Areale der Wildtyp-Mäuse eine Überexpression des Epidermal growth factor Rezeptors (EGFR), des Transforming growth factors α (TGF α) und der protoonkogenen Kaskaden von Ras/Raf-1 und Akt/mTOR [65]. Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen früherer Studien des Pankreasinseltransplantationsmodell der Ratte überein [56]. Am Tiermodell Ratte konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es zu einer zytoplasmatischen Translokation und Hochregulierung des Insulinrezeptors sowie zur Induktion von IRS1 und Raf-1 kam [41] (siehe Abbildung 15, d).

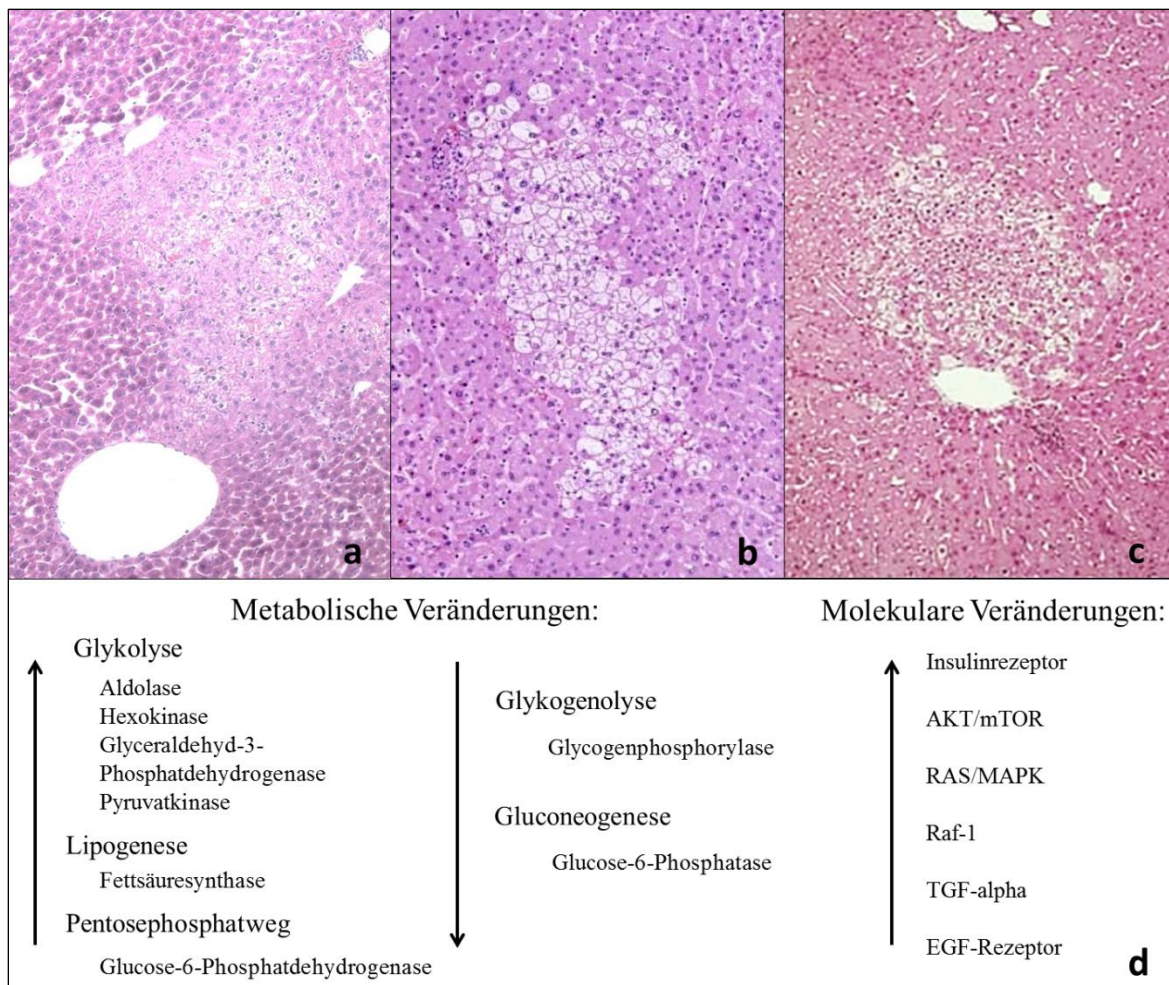


Abbildung 15: Vergleichende Darstellung der CCF von Maus, Ratte [13] und Mensch [48]

a HE Bild eines CCF nach intraportaler Pankreasinseltransplantation einer Wildtypmaus im Rahmen meiner Doktorarbeit **b** HE Bild CCF beim Menschen [48] **c** HE Bild CCF bei der Ratte nach N-Nitrosomorpholin-Gabe [13] **d** Darstellung der metabolischen und molekularen Veränderungen, die gemeinsam in den CCF der transplantierten, der Ratte und des Menschen auftreten [65].

Die nach Inseltransplantation induzierten klarzelliger Leberherde der Wildtypmäuse zeigten zusammenfassend Übereinstimmungen in der Morphologie, des Metabolismus, sowie der molekularen Alterationen der klassischen CCF. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass die entstandenen hellzelliger Herde ebenso als klassische präneoplastische CCF des Pankreasinseltransplantationsmodells der Ratte sowie der beschriebenen menschlichen CCF einzustufen sind.

4.6. Bedeutung der durch Inseltransplantation induzierten CCF der Wildtypmäuse in der Hepatokarzinogenese

In Übereinstimmung mit den Daten von Sonke und Lohr zeigten die induzierten CCF der Wildtypmäuse eine etwa Vierfach gesteigerte Proliferationsaktivität im Vergleich zum extrafokalen Gewebe. Diese Ergebnisse stimmen ebenfalls mit den Ergebnissen des Pankreasinseltransplantationsmodells der Ratte und den Ergebnissen an humanen CCF überein [38, 56].

Immunhistochemische Reaktionen konnten auf molekularer Ebene eine Überexpression des EGFR, des TGF α und der protoonkogenen Kaskaden von Ras/Raf1 und Akt/mTOR zeigen [65]. Die Akt/mTOR-Signalkaskade ist ein Haupteffektor der Insulinkaskade [130] und scheint in der Entwicklung der CCF eine zentrale Rolle zu spielen [56]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von AKT in der Lage ist, sowohl die Entwicklung eines HCC in der Maus zu induzieren [54] als auch die Hepatokarzinogenese in Zusammenarbeit mit dem Ras/MAPK-Signalweg rasch zu beschleunigen [131]. Am Rattenmodell konnte nachvollzogen werden, dass die Aktivierung des Insulinsignals einen starken Induktor der AKT/mTOR Kaskade darstellt, was durch eine erhöhte Synthese von Fettsäuren, Cholesterin und Triglyceriden, einer Induktion der Glycolyse und der Abnahme der Fettsäureoxidation und Gluconeogenese bei präneoplastischen und neoplastischen Leberläsionen der Ratte begleitet wird [56]. Die Aktivierung der AKT/mTOR-Kaskade und die Veränderungen des Glukose- und Lipidstoffwechsels in CCF und HCC von Menschen und Ratten wurden zudem begleitet von einer Hochregulierung von ChREBP [48, 56]. Die CCF der Wildtypmäuse meiner Doktorarbeit zeigten somit zusammenfassend eine erhöhte Proliferationsaktivität sowie eine Aktivierungen protoonkogener Signalwege, die bereits in tierexperimentellen Hepatokarzinogenesemodellen und beim menschlichen HCC nachvollzogen werden konnten.

Daher ist anzunehmen, dass die CCF der Wildtypmäuse meiner Doktorarbeit wie die klassischen CCF der Ratte als präneoplastische Läsionen zu werten sind. In Folgeexperimenten, die auf den im Rahmen meiner Doktorarbeit entwickelten Isolationsprozessen der Inseln beruhten, konnte nach 6 Monaten in transplantierten diabetischen Wildtypmäusen eine Adenomsequenz bereits nachvollzogen werden [132].

4.7. Morphologie der klarzelligen Leberherde der transplantierten ChREBP- Knockout Mäuse

Vier Wochen nach Inseltransplantation konnten bei diabetischen ChREBP-Knockout Mäusen ebenfalls klarzellige Leberherde detektiert werden. Diese unterschieden sich jedoch

morphologisch und metabolisch durch Zeichen einer enormen Glykogenakkumulation und proliferationskinetisch von den CCF der Wildtyp-Mäusen (siehe Abbildung 13). Eine enorme Glykogenakkumulation in nicht-diabetischen ChREBP-Knockout Mäusen wurde bereits in früheren Studien beschrieben [7, 63]. Erklärungen hierfür liegen in einer veränderten enzymatischen Aktivität entscheidender Stoffwechselwege der ChREBP-Knockout Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen (siehe Abbildung 16). Wie im Punkt 1.4. der Einleitung beschrieben ist für die Expression der L-Pyruvatkinase ChREBP obligat [80]. Eine verminderte Expression der L-Pyruvatkinase bei ChREBP-defizienten Mäusen führt zu einer geringeren glykolytischen Aktivität und folglich zu einem höheren Gehalt an Glucose-6-phosphat, was letztlich zu einer erhöhten Glykogensynthese führt [7]. Bei gleichzeitiger Hyperglykämie kommt es entsprechend zu einem erhöhten Zufluss von Glukose. Die L-Pyruvatkinase sorgt für die Entstehung von Pyruvat, das zu Acetyl-CoA abgebaut wird, dem Ausgangssubstrat für die Lipogenese [133]. Durch die gehemmte Glykolyse kommt es zu einer verminderten Produktion von Acetyl-CoA. Dieses wiederum ist für die Fettsäuresynthese unabdingbar. Durch die gleichzeitig bestehende verminderte Expression der Acetyl-CoA-Carboxylase, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der Fettsäuresynthese, kommt diese annähernd zum Erliegen. Übereinstimmend damit konnte in der Leber von nicht-diabetischen ChREBP-KO Mäusen eine verminderte Expression lipogener Enzym-mRNA Spiegel nachgewiesen werden, die zu einer um 65% erniedrigten Fettsäuresyntheserate führte im Vergleich zu Wildtyptieren [63]. In einer bereits veröffentlichten Publikation der Erkenntnisse meiner Doktorarbeit, sowie der Arbeit von Sonke und Lohr konnte in den klarzelligen Herden diabetischer ChREBP-Knockout Mäuse nach Inseltransplantation immunhistochemisch ebenfalls eine weniger starke Aktivierung von Enzymen der de-Novo Lipogenese (Fettsäuresynthese) und der Glykolyse (Aldolase und Hexokinase II) im Vergleich zu den CCF der Wildtypmäuse nachgewiesen werden [65].

Diese Stoffwechselschritte könnten die metabolischen Alterationen der klarzelleigen Herde der ChREBP-Knockout Mäuse bei systemischer Hyperglykämie und lokaler Hyperinsulinämie erklären.

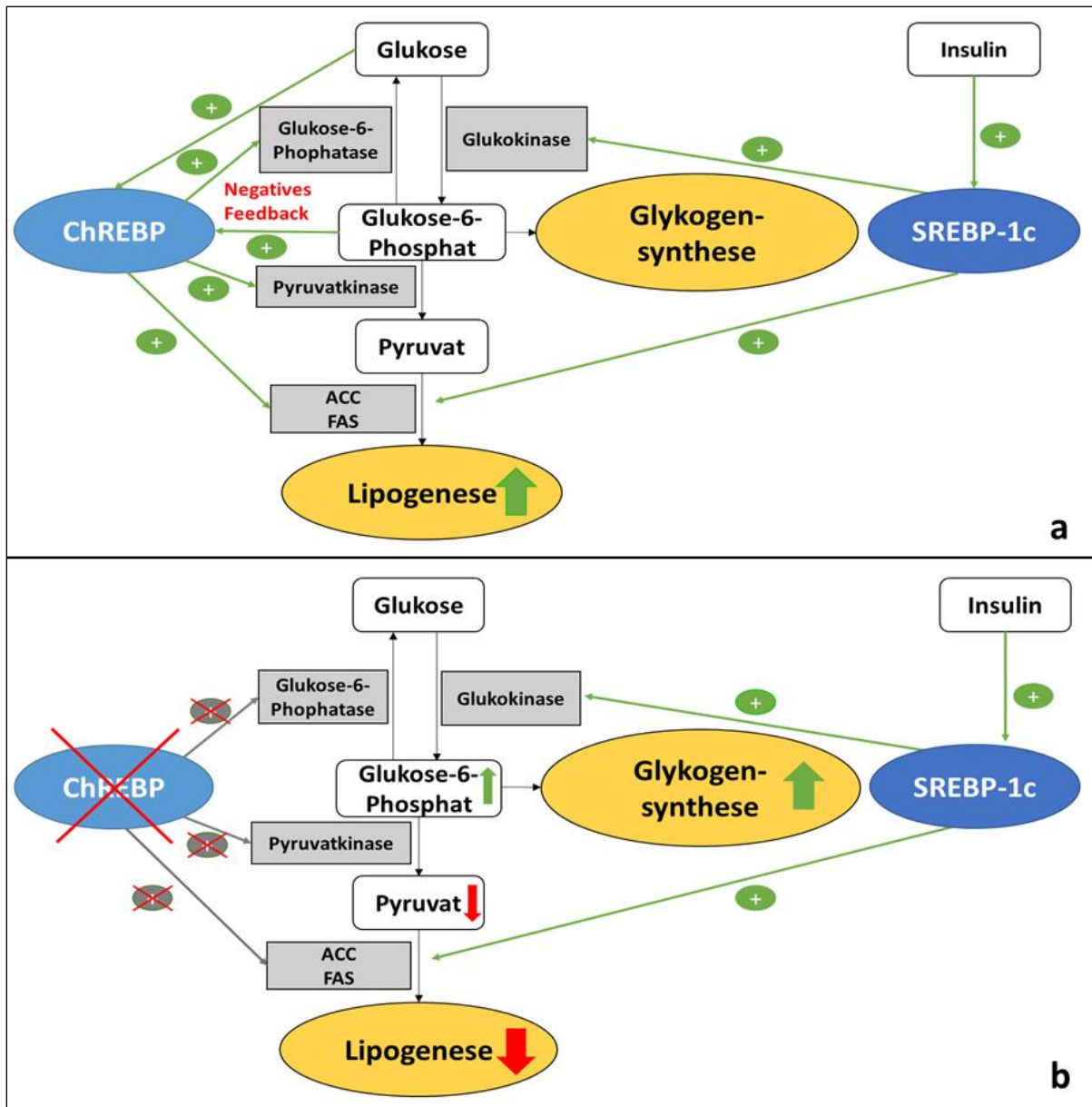


Abbildung 16: Metabolische Alterationen der klarzelligen Leberherde der Wildtyp- und ChREBP-Knockout Mäuse im Zuge einer Hyperglykämie und Hyperinsulinämie (modifiziert nach [63, 66])

a Wildtyp-Mäuse **b** ChREBP-Knockout Mäuse

ACC: Acetyl-CoA-Carboxylase; FAS: Fettsäure-Synthase

4.8. Analyse der Spontanherde der diabetischen ChREBP-Knockout Mäuse ohne Inseltransplantation

Interessanterweise kam es nach vier Wochen alleiniger Hyperglykämie ohne Inseltransplantation ebenfalls zur Entstehung hellzellig veränderter Areale in den Lebern der ChREBP-Knockout Mäuse. Lichtmikroskopisch und elektronenmikroskopisch konnten diese hellzelligen Areale als

Glykogenspeicherareale identifiziert werden, die den klarzelligen Herden der ChREBP Knockout Mäuse nach Inseltransplantation sehr ähneln (siehe Abbildung 14), das Verteilungsmuster zeigte sich jedoch weniger begrenzt und eher diffus.

Der entscheidende Unterschied im Stoffwechsellmilieu beider Versuchsgruppen war der Faktor Hyperinsulinämie durch Pankreasinseltransplantation.

Eine Hyperglykämie kann insulinunabhängig zu einer vermehrten Glykogenspeicherung in den Hepatozyten führen. Diese Ergebnisse werden unterstützt durch vorherige Erkenntnisse aus etablierten ChREBP-Knockout Modellen [134]. Auf molekularer Ebene konnte in Immunassays der klarzelligen Leberherde von Sonke und Lohr eine stärkere Expression des Transkriptionsfaktors SREBP-1c in den hellzelligen Arealen der ChREBP-Knockout Mäuse sowohl mit als auch ohne Inseltransplantation als in den CCF der Wildtyp Mäuse nachgewiesen werden [65].

In den Versuchsgruppen der transplantierten ChREBP-Knockout Mäuse herrschte nach Inseltransplantation eine chronische Hyperinsulinämie mit einem Maximum der Insulinkonzentration periportal um die Inseltransplantate herum. Durch diese chronische Hyperinsulinämie kann es zu einer Überexpression von SREBP-1c gekommen sein. Es wurde gezeigt, dass die Glukokinase, das erste Enzym des glykolytischen Weges, ein Zielgen von SREBP-1c allein ist, unabhängig der Expression von ChREBP [135]. Durch die vermehrt eingeleitete Glykolyse kam es in den transplantierten ChREBP-Knockout Mäusen zu einem Überschuss an Glucose-6-Phosphat, insbesondere in den zonalen Abschnitten, in denen durch eine Hyperinsulinämie SREBP-1c überexprimiert war. Glucose-6-Phosphat, als erster Baustein der Glykogensynthese [136], leitete diese nun vermehrt ein. Über diesen Mechanismus kann es zu einer vermehrten periportal Glykogenablagerung in den transplantierten CHREBP-Knockout Mäusen gekommen sein (siehe Abbildung 16).

In den nicht transplantierten ChREBP-Knockout Mäusen herrschte keine Hyperinsulinämie sondern ein durch Streptozotocin induzierter absoluter Insulinmangel. SREBP-1 konnte somit nicht zu einer lokalen Mehrproduktion von Glucose-6-Phosphat führen. Die verminderte L-Pyruvatkinase Expression in den ChREBP-Knockout Mäusen führte insgesamt zu einer geringeren glykolytischen Aktivität [7] und folglich zu einem höheren Glukose-6-Phosphat-Gehalt diffus in der Leber verteilt. Dies könnte letztlich zu einer erhöhten Glykogensynthese ohne zonales Verteilungsmuster in den nicht transplantierten CHREBP Knockout Mäusen geführt haben.

Diese divergenten Stoffwechselschritte der nicht transplantierten und der transplantierten ChREBP-Knockout Mäuse können das unterschiedliche Verteilungsmuster der hellzelligen hepatozellulären Areale erklären.

4.9. Die Rolle von ChREBP in der hormonell induzierten Hepatokarzinogenese

Wie bereits beschrieben konnte in Immunassays der klarzelligen Leberherde von Sonke und Lohr eine stärkere Expression des Transkriptionsfaktors SREBP-1c in den hellzelligen Arealen der ChREBP-Knockout Mäuse als in den CCF der Wildtyp Mäuse nachgewiesen werden [65]. Frühere Studien identifizierten PI3K und AKT als die wichtigsten nachgeschalteten Kinasen, die während der insulininduzierten Expression von SREBP-1c aktiviert werden [137]. In Immunassays der klarzelligen Leberherde von Sonke und Lohr konnte jedoch eine verminderte Expression des EGFR, des TGF α , der Proteine der protoonkogenen Kaskaden Ras/Raf-1 und Akt/mTOR in den klarzelligen Leberherden der ChREBP-Knockout Mäuse im Vergleich zu den CCF der Wildtyp-Mäuse nachgewiesen werden [65]. Somit zeigte sich zum einen eine erhöhte Expression von SREBP-1c in den klarzelligen Leberherden der ChREBP-Knockout Mäuse, jedoch zum anderen eine verminderte Expression der nachgeschalteten Wachstumsfaktoren dieses Transkriptionsfaktors.

Durch den verminderten Lipidgehalt der klarzelligen Herde der ChREBP-Knockout Mäuse kommt es zu einem Substratverlust der Aminosäuresynthese [65, 76]. Diese werden wiederum zur Synthese von Wachstumsfaktoren benötigt [138]. Dies könnte die verminderte Expression dieser Proteine erklären. Die Bedeutung der Akt/mTOR und Ras/MAPK Kaskaden in der Hepatokarzinogenese wurde bereits in früheren Studien untersucht [139]. Es zeigte sich, dass die Aktivierung beider Signalkaskaden (AKT/mTOR und RAS/MAPK) mit einem gesteigerten Tumorzellwachstum und einer schlechteren Prognose des HCC assoziiert war [54, 140]. Im Umkehrschluss würde eine verminderte Aktivierung dieser Signalwege zu einer verminderten Proliferation führen. Nach einwöchiger BrdU Applikation zeigte sich interessanterweise eine signifikant geringere Proliferation der Hepatozyten der hellzelligen Areale der ChREBP-Knockout Mäuse im Vergleich zu den Hepatozyten der CCF der Wildtypmäuse im Rahmen meiner Doktorarbeit, was möglicherweise u.a. auf eine verminderte Aktivierung dieser Signalkaskaden zurückzuführen ist.

Bereits in früheren Analysen der präneoplastischen hepatozellulären Läsion im chemisch-induzierten Hepatokarzinogenesemodell in Ratten wurde zudem eine umgekehrte Korrelation

zwischen der Glykogenakkumulation und Zellproliferation während der Progression von glykogenotischen präneoplastischen Läsionen zu glykogenarmen HCC aufgezeigt [141].

Enzymhistochemisch war dieser Transformationsprozess mit einer Reduktion der Aktivitäten der Glykogenphosphorylase und der Glukose-6-Phosphatase verbunden, während die Aktivität der Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (G6PD) erhöht war [142]. In menschlichen HCC korrelierte eine Erhöhung der G6PD-Expression positiv mit der Metastasenbildung und einem verringerten Gesamtüberleben [143]. Die G6PD stellt ein Schlüsselenzym für den Pentosephosphatweg (PPP) dar [142].

In prä- und neoplastischen Hepatozyten kommt es zur Entstehung vermehrter reaktiver Sauerstoffspezies [143]. Die primäre Rolle der Induktion des oxidativen PPP besteht darin, das Redox-Gleichgewicht der Zelle aufrechtzuerhalten [144]. Es wurde vorgeschlagen, dass der Stoffwechsel hochgradig teilender Zellen, so angepasst ist, dass er die Aufnahme und den Einbau von Nährstoffen in die Biomasse (z.B. Nukleotide, Aminosäuren und Lipide) erleichtert, die zur Produktion einer neuen Zelle benötigt werden [138]. Da Pentosen für die DNA-Synthese benötigt werden, ist es nicht überraschend, dass metabolische Veränderungen, die zu einer erhöhten G6PD-Expression führen, bei verschiedenen Tumorentitäten, einschließlich HCC, auftreten [145]. Nach aktueller Studienlage wird dabei die Expression der G6PD sowohl durch ChREBP als auch durch SREBP-1c kontrolliert [146]. Man könnte postulieren, dass durch den gezielten ChREBP Knockout im Rahmen meiner Doktorarbeit, es hierdurch zur verminderten Expression der G6PD kam und somit eine gesteigerte Proliferation durch fehlende Pentosen bzw. einen gestörten Redox-Status nicht möglich war. Auf der anderen Seite wäre es möglich, dass die glykogenreichen, weniger proliferativ aktiven hellzelligen hepatozellulären Areale nach Inseltransplantation der ChREBP-KO Mäuse weniger ROS bildeten und somit der oxidative Schritt des PPP nicht maximal stimuliert werden musste [147].

Jüngste Hinweise deuten zudem darauf hin, dass die Expression bzw. Aktivität von ChREBP in frühen und späten Tumorstadien unterschiedlich reguliert wird. Funktionelle Analysen in Kolorektal- und Hepatoblastomtumorzellen zeigten, dass die Unterdrückung von ChREBP einen metabolischen Wechsel von aerober Glykolyse zur mitochondrialen Atmung auslöste, was in der Folge die Lipogenese und Zellproliferation verringerte [147]. Tong *et al.* konnten *in vivo* an kolorektalen Tumorzellen und Hepatoblastomzellen eine p53-abhängige Reduktion des Tumorwachstums bei einer ChREBP Suppression beobachten [147]. Beim androgenresistenten Prostatakarzinom konnte weiterhin *in vivo* und *in vitro* durch die Aktivierung des PI3K-Akt-Signalwegs und von ChREBP eine verminderte Biosynthese von Hexosaminen und erhöhte Flüsse im Pentosephosphatweg gezeigt werden, was zu einer erhöhten Tumorzellproliferation

fürhte [148]. Andererseits förderte die Deletion von ChREBP in leukämischen Mäusen die Blockade der Differenzierung von Leukämie-initiiierenden Zellen und führte zu einer signifikanten Lebenszeitverkürzung [149]. Diese Daten legen nahe, dass die Funktion von ChREBP innerhalb der Onkogenese vom Gewebetyp und den spezifischen Stoffwechselbedürfnissen abhängt [66, 76].

Weiterhin scheint ChREBP in Tumorzellen am Übergang der oxidativen Phosphorylierung zur aeroben Glykolyse maßgeblich beteiligt zu sein, ein Effekt der als Warburg-Effekt bekannt ist [60]. Die Befunde der reduzierten Glykolyse und der *de-novo*-Lipogenese als nachgeschaltete Effekte der herunterregulierten Signalwege von AKT/mTOR, EGFR und Ras/raf-1/MAPK in den hellzelligen hepatozellulären Arealen der ChREBP-Knockout Mäuse weisen auf einen ChREBP-vermittelten Stoffwechselschalter hin bei frühen präneoplastischen hepatozellulären klarzelligen Läsionen [48, 52].

Diese frühen präneoplastischen Läsionen wurden erstmals von Bannash et al. beschrieben [50]. Es konnte eine phänotypische Stadienabfolge mit steigender Proliferationsaktivität der präneoplastischen Läsionen bis hin zum invasiven hepatozellulären Karzinom am Tiermodell Ratte nachvollzogen werden. Hierbei zeigte sich eine zunehmende Proliferationsaktivität von klarzelligen, glykogenreichen Zellfoci bis hin zu glykogenarmen Zellpopulationen [47, 50] (siehe Abbildung 1). Die inverse Korrelation zwischen Glykogenakkumulation und Zellproliferation während der Progression von glykogenotischen hepatozellulären Herden zum glykogenarmen HCC zeigt, dass die grundlegende metabolische Verschiebung, die mit dem allmählichen Verschwinden der Glykogenose verbunden ist, wesentlich für die Entwicklung des malignen Phänotyps ist [141].

Durch den ChREBP-Knockout im Rahmen meiner Doktorarbeit könnten früheste Läsionen dieser präneoplastischen Herde aufgezeigt worden sein. Möglicherweise stellt ChREBP hierbei den entscheidenden Vermittler bestimmter Stoffwechselschritte von proliferationsärmeren, glykogenreichen Läsionen zu proliferationsaktiveren, lipidreicheren Läsionen dar. Die beschriebenen Alterationen der hellzelligen hepatozellulären Areale der ChREBP-Knockout Mäuse nach Inseltransplantation zeigen die Effekte einer Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53 und eine inverse Reduktion des protoonkogenen Akt/mTOR-Signalweges. ChREBP scheint eine Schlüsselrolle in der intrazellulären Reprogrammierung des oxidativen Metabolismus auf aerobe Glykolyse hin darzustellen.

4.10. Die Rolle von ChREBP in der Hepatokarzinogenese im Zuge der NASH

Im Zuge der nicht-alkoholischen Steatohepatitis kommt es wie im Punkt 1.2. beschrieben zu einer vermehrten hepatischen Lipidakkumulation, die in der Summe zu Stress des endoplasmatischen Retikulums, oxidativem Stress, mitochondrialen Stress und beeinträchtigter Autophagie führt, was in dem als Lipotoxizität bekannten Zustand resultiert [34]. Obwohl sowohl Typ-2-Diabetes als auch Adipositas als unabhängige Risikofaktoren für das HCC in Betracht gezogen wurden, sind Studien, die eine klare Verbindung zum HCC in nicht-zirrhotischen Lebern herstellen, selten [34, 150]. In insulinresistenten Zuständen sind Hyperglykämie und Hyperinsulinämie für eine verstärkte Lipogenese zum Teil durch die Aktivierung von ChREBP und SREBP-1c verantwortlich.

Die Rolle von ChREBP im Zuge der Insulinresistenz ist recht komplex, da zum einen ein globaler ChREBP-Mangel zu einer beeinträchtigten Glukosetoleranz und Insulinresistenz bei C57BL/6J Mäusen führt [63], und andererseits der ChREBP-Mangel in einem adipösen Hintergrund die Lebersteatose und andere damit zusammenhängende Stoffwechseländerungen, einschließlich Insulinresistenz, verbessert [7, 151]. Interessanterweise führt die hepatische Überexpression von ChREBP in Mäusen zu einer verbesserten Insulinempfindlichkeit trotz verschlimmelter hepatischer Steatosis [152]. Studien am Menschen konnten den komplexen Zusammenhang zwischen ChREBP-Aktivierung und systemischer Insulinsensitivität nicht weiter klären. Eine Studie berichtete von einer negativen Korrelation zwischen der hepatischen ChREBP-Expression und der Insulinresistenz in einer Kohorte von Patienten mit NASH [152]. Im Gegensatz dazu wurde eine erhöhte hepatische ChREBP-Expression bei Lebern bei Patienten mit Adipositas sowie Typ-2-Diabetes gefunden [153, 154]. Diese entgegengesetzten Daten können darin begründet liegen, dass ChREBP sowohl die Glykolyse als auch die Lipogenese kontrolliert und dass die positive Wirkung des ChREBP-Mangels möglicherweise nur im Zusammenhang mit Lipidüberlastung erkennbar ist [152]. Angesichts des erhöhten Glukosemetabolismus und der hohen Lipidsyntheserate vieler Tumorzellen wurde die Rolle von ChREBP als Schlüsselvermittler der durch Glukose induzierten lipogenen Genexpression im Tumorstoffwechsels untersucht [155]. Die ChREBP-Aktivierung, insbesondere im Zuge einer Hyperglykämie, wurde als wesentlicher Vermittler einer fortgeschrittenen Glykierungsprodukt-induzierten Proliferation sowohl in Leber- als auch in Kolonkarzinom-Zelllinien hervorgehoben [155].

An humanen HCC Gewebe konnten Calvisi *et al.* die anomale Aktivierung der Lipogenese durch die Überexpression der Fettsäuresynthase (FAS) als ein dominantes onkogenes Ereignis beim menschlichen HCC identifizieren. Es konnten hierbei keine signifikanten Unterschiede im Ausmaß der *de-novo*-Lipogenese in Bezug auf die HCC-Ätiologie festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass die exazerbierte Lipogenese ein allgemeines molekulares Phänomen der Hepatokarzinogenese ist [54]. Gleichzeitig ist die Überexpression von FAS ein typisches Merkmal der alkoholischen Steatohepatitis [156]. Ebenfalls konnte eine starke Hochregulierung der FAS im Rattenmodell der insulininduzierten Hepatokarzinogenese gezeigt werden [52]. Dennoch konnte eine Deletion von ChREBP allein die hepatische Karzinogenese nicht vollständig unterdrücken trotz gestörter Lipogenese, was auf eine ChREBP unabhängige Aktivierung der FAS im Zuge des Akt/mTOR Signalweges zurückvollzogen wurde [54]. Dies stimmt mit der Erkenntnis überein, dass die FAS-Expression, sowohl von ChREBP als auch durch SREBP-1c kontrolliert wird [146]. Übereinstimmend damit konnte festgestellt werden, dass die SREBP-1c-Spiegel mit der HCC-Proliferation und der Prognose des Patienten korrelieren [53].

Im Zuge der Hepatokarzinogenese im Hintergrund der Pathogenese der NAFLD könnten mehrere Mechanismen an einer verstärkten ChREBP- Aktivität beteiligt sein, wie eine hohe Glukoseaufnahme. Damit verbunden folgt eine hohe Glykolyseraten und Bildung fortgeschrittener Glykierungsendprodukte (AGE). Der Anstieg der ChREBP- Aktivität fördert die aerobe Glykolyse auf Kosten der mitochondrialen Atmung, wodurch der Glukosestoffwechsel in anabole Bahnen umgeleitet wird, die für eine anhaltende Zellproliferation erforderlich sind [155].

Die Ergebnisse meiner Doktorarbeit zeigen, dass der Knockout von ChREBP die hepatische Steatose in einem Milieu aus Hyperglykämie und Hyperinsulinämie positiv beeinflusst. Im Hintergrund einer Hyperglykämie und angesichts der hohen Lipidsyntheserate vieler Tumorzellen könnte die Rolle von ChREBP als Schlüsselvermittler der durch Glukose induzierten lipogenen Genexpression im Tumorstoffwechsel bestehen. Dennoch deuten die Ergebnisse einiger Studien daraufhin, dass die selektive Hemmung von ChREBP im menschlichen HCC bzw. im Zuge der Hepatokarzinogenese der NASH, die eine Aktivierung des Akt/mTOR Signalweges zeigt, entweder begrenzt oder unwirksam sein könnte [54].

In Anbetracht der fast allgegenwärtigen Aktivierung dieses Signalwegs bei menschlichem HCC ist es denkbar, dass Inhibitoren dieses Signalweges zur Behandlung des HCC insbesondere im Hintergrund der NASH an ChREBP-Inhibitoren gekoppelt werden könnten.

4.11. Schlussfolgerung

Im Rahmen meiner Doktorarbeit wurde das bereits von Prof. Dr. F. Dombrowski in Ratten etablierte und von J. Sonke und A. Lohr auf die Maus übertragene insulin-vermittelte Hepatokarzinogenesemodell nach intraportaler Transplantation von Pankreasinseln erfolgreich modifiziert. Anhand meiner Modifikationen des Isolationsprozesses konnte ich das zu transplantierende Volumen drastisch senken und so das Auftreten von Leberzellnekrose vollständig verhindern, trotz erhöhter Inselzahl im Transplantat und somit die erste von mir aufgestellte These bestätigen. Das primäre Ziel und die zweite These meiner Doktorarbeit, eine signifikant erhöhte Herdfrequenz im Vergleich mit Sonke und Lohr durch eine erhöhte transplantierte Inselzahl, konnte nicht erreicht werden, wohl aber eine tendenzielle Steigerung der Herdfrequenz bei erhöhter Inselzahl (200 Inseln).

Der wachstumsstimulierende Effekt einer Hyperglykämie in Verbindung mit einer Hyperinsulinämie konnte sowohl am Wildtyp- als auch am ChREBP-Knockout-Stamm anhand der morphologischen und proliferationskinetischen Eigenschaften der entstandenen klarzelligen Leberherde untersucht werden und somit meine dritte These bestätigt werden. Durch den ChREBP-Knockout im Rahmen meiner Doktorarbeit könnten früheste Läsionen im Rahmen der Hepatokarzinogenese aufgezeigt worden sein. Das Ziel, eine pathogenetische Rolle von ChREBP im Zuge der hormonell induzierten Hepatokarzinogenese zu charakterisieren als entscheidenden Vermittler bestimmter Stoffwechselschritte von proliferationsärmeren, glykogenreichen Läsionen zu proliferationsaktiveren, lipidreicheren Läsionen, konnte so erreicht werden.

5. Zusammenfassung

In den letzten Jahren erhöhte sich die Inzidenz des humanen hepatozellulären Karzinoms in nicht-zirrhatischen Lebern bei gleichzeitigem Diabetes mellitus Typ 2 deutlich. Im Hepatokarzinogenesemodell nach intraportaler Pankreasinseltransplantation in der diabetischen Ratte konnte Prof. Dr. F. Dombrowski durch eine kombinierte Hyperinsulinämie und Hyperglykämie glykogen- und lipidreiche, klarzellige Herde induzieren, sogenannte *clear cell foci* (CCF), die sich in Langzeitexperimenten zu hepatozellulären Adenomen und Karzinomen entwickelten. Sowohl in den CCF als auch in humanen und rodenten hepatozellulären Karzinomen fand sich eine Heraufregulation des Transkriptionsfaktors *carbohydrat-responsive element-binding proteins* (ChREBP), der glukoseabhängig und insulinunabhängig Enzyme der Glykolyse und Lipogenese reguliert. Das Inseltransplantationsmodell wurde anschließend auf die Maus unter Verwendung von 70 transplantierten Inseln übertragen, wobei die Frequenz der CCF sehr niedrig und die Anzahl thrombosebedingten Leberzellnekrosen hoch war. Das primäre Ziel meiner Doktorarbeit war es, die Frequenz der CCF am Modelltier Maus zu steigern. Mit der These, eine erhöhte transplantierte Inselanzahl führt zu einer höheren Frequenz der CCF, modifizierte ich die Inselisoliationsprozesse systematisch, um qualitativ hochwertige und vom exokrinen Pankreasgewebe bereinigte Inseln zu erhalten. Anschließend schloss ich anhand immunhistochemischer Reaktionen und Vitalitätstests mögliche schädliche Einflüsse der Isolation aus. Ich konnte somit die Anzahl auf 120 und 200 Inseln erhöhen, die Streptozotocin-diabetischen Wildtyp (WT) - und ChREBP-Knockout-Mäusen intraportal transplantiert wurden, ohne Leberzellnekrosen zu induzieren. Nicht-transplantierte Kontrollgruppen blieben vier Wochen lang hyperglykämisch. Nach einer und nach vier Wochen konnte ich klarzellige Leberherde in transplantierten WT-Mäusen histologisch, immunhistochemisch und elektronenmikroskopisch nachweisen, die den klassischen CCF entsprachen. Durch Erhöhung der Inselzahl konnte ich eine tendenziell jedoch nicht signifikant erhöhte Frequenz der CCF erreichen. Nach vier Wochen kam es bei diabetischen transplantierten ChREBP-Knockoutmäusen ebenfalls zur Induktion klarzelliger Herde, die sich durch eine enorme Glykogenakkumulation, fehlende Lipidspeicherung und eine erniedrigte Proliferationsaktivität von den WT-CCF unterschieden. Durch diese Ergebnisse konnte ChREBP als Vermittler zwischen proliferationsärmeren, glykogenreichen und proliferationsaktiveren, lipidreicheren hepatischen Läsionen charakterisieren. Das primäre Ziel meiner Doktorarbeit, die Frequenz der CCF signifikant zu erhöhen, konnte nicht erreicht werden, jedoch durch ein verringertes Transplantatvolumen der Weg für Folgeexperimente mit erhöhter Inselzahl sowie für Langzeitexperimente geebnet werden.

6. Literaturnachweis

1. Ferlay, J., et al., *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. Int J Cancer, 2010. **127**(12): p. 2893-917.
2. Forner, A., J.M. Llovet, and J. Bruix, *Hepatocellular carcinoma*. Lancet, 2012. **379**(9822): p. 1245-55.
3. Ishii, S., et al., *Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(44): p. 15597.
4. Parikh, S. and D. Hyman, *Hepatocellular cancer: a guide for the internist*. Am J Med, 2007. **120**(3): p. 194-202.
5. El-Serag, H.B. and K.L. Rudolph, *Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis*. Gastroenterology, 2007. **132**(7): p. 2557-76.
6. El-Serag, H.B. and F. Kanwal, *Epidemiology of hepatocellular carcinoma in the United States: where are we? Where do we go?* Hepatology, 2014. **60**(5): p. 1767-75.
7. 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.
8. El-Serag, H.B., *Hepatocellular carcinoma*. N Engl J Med, 2011. **365**(12): p. 1118-27.
9. Cohen, J.C., J.D. Horton, and H.H. Hobbs, *Human fatty liver disease: old questions and new insights*. Science, 2011. **332**(6037): p. 1519-23.
10. Brunt, E.M., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease*. Nat Rev Dis Primers, 2015. **1**: p. 15080.
11. Younossi, Z.M., et al., *Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes*. Hepatology, 2016. **64**(1): p. 73-84.
12. Hardy, T., et al., *Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Disease Spectrum*. Annu Rev Pathol, 2016. **11**: p. 451-96.
13. Evert, M. and F. Dombrowski, *[Hepatocellular carcinoma in the non-cirrhotic liver]*. Pathologe, 2008. **29**(1): p. 47-52.
14. Kawada, N., et al., *Hepatocellular carcinoma arising from non-cirrhotic nonalcoholic steatohepatitis*. J Gastroenterol, 2009. **44**(12): p. 1190-4.
15. Paradis, V., et al., *Hepatocellular carcinomas in patients with metabolic syndrome often develop without significant liver fibrosis: a pathological analysis*. Hepatology, 2009. **49**(3): p. 851-9.

16. Schlesinger, S., et al., *Diabetes mellitus, insulin treatment, diabetes duration, and risk of biliary tract cancer and hepatocellular carcinoma in a European cohort*. *Ann Oncol*, 2013. **24**(9): p. 2449-55.
17. El-Serag, H.B., H. Hampel, and F. Javadi, *The association between diabetes and hepatocellular carcinoma: a systematic review of epidemiologic evidence*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2006. **4**(3): p. 369-80.
18. Sun, B. and M. Karin, *Obesity, inflammation, and liver cancer*. *J Hepatol*, 2012. **56**(3): p. 704-13.
19. Margini, C. and J.F. Dufour, *The story of HCC in NAFLD: from epidemiology, across pathogenesis, to prevention and treatment*. *Liver Int*, 2016. **36**(3): p. 317-24.
20. Li, C.I., et al., *Hyperglycemia and chronic liver diseases on risk of hepatocellular carcinoma in Chinese patients with type 2 diabetes--National cohort of Taiwan Diabetes Study*. *Int J Cancer*, 2015. **136**(11): p. 2668-79.
21. Michelotti, G.A., M.V. Machado, and A.M. Diehl, *NAFLD, NASH and liver cancer*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013. **10**(11): p. 656-65.
22. Adams, L.A., et al., *The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study*. *Gastroenterology*, 2005. **129**(1): p. 113-21.
23. Yatsuji, S., et al., *Clinical features and outcomes of cirrhosis due to non-alcoholic steatohepatitis compared with cirrhosis caused by chronic hepatitis C*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009. **24**(2): p. 248-54.
24. Reddy, S.K., et al., *Outcomes of curative treatment for hepatocellular cancer in nonalcoholic steatohepatitis versus hepatitis C and alcoholic liver disease*. *Hepatology*, 2012. **55**(6): p. 1809-19.
25. Ryerson, A.B., et al., *Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2012, featuring the increasing incidence of liver cancer*. *Cancer*, 2016. **122**(9): p. 1312-37.
26. Vanni, E. and E. Bugianesi, *Obesity and Liver Cancer*. *Clinics in Liver Disease*, 2014. **18**(1): p. 191-203.
27. Arab, J.P., M. Arrese, and M. Trauner, *Recent Insights into the Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. *Annu Rev Pathol*, 2018. **13**: p. 321-350.
28. Lambert, J.E., et al., *Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease*. *Gastroenterology*, 2014. **146**(3): p. 726-35.

29. Yamaguchi, K., et al., *Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology, 2007. **45**(6): p. 1366-74.
30. Schattenberg, J.M. and M. Schuchmann, *Diabetes and apoptosis: liver*. Apoptosis, 2009. **14**(12): p. 1459-71.
31. Sanyal, A.J., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities*. Gastroenterology, 2001. **120**(5): p. 1183-92.
32. Wainwright, P., E. Scorletti, and C.D. Byrne, *Type 2 Diabetes and Hepatocellular Carcinoma: Risk Factors and Pathogenesis*. Curr Diab Rep, 2017. **17**(4): p. 20.
33. Spickett, C.M., *The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal: Advances in chemistry and analysis*. Redox Biol, 2013. **1**(1): p. 145-52.
34. Koo, S.H., *Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis*. Clin Mol Hepatol, 2013. **19**(3): p. 210-5.
35. Rosenfeld, R.G., *Insulin-like growth factors and the basis of growth*. N Engl J Med, 2003. **349**(23): p. 2184-6.
36. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *mTOR signaling in growth control and disease*. Cell, 2012. **149**(2): p. 274-93.
37. Villanueva, A., et al., *Pivotal Role of mTOR Signaling in Hepatocellular Carcinoma*. Gastroenterology, 2008. **135**(6): p. 1972-1983.e11.
38. 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.
39. Dombrowski, F. and U. Pfeifer, *Hyperproliferative state of liver acini and pancreatic islets after intraportal transplantation of a small mass of islets of Langerhans in streptozotocin-induced diabetic rats*. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 1995. **103 Suppl 2**: p. 112-17.
40. Dombrowski, F., et al., *Altered liver acini induced in diabetic rats by portal vein islet isografts resemble preneoplastic hepatic foci in their enzymic pattern*. The American journal of pathology, 1996. **148**(4): p. 1249-1256.
41. Dombrowski, F., P. Bannasch, and U. Pfeifer, *Hepatocellular neoplasms induced by low-number pancreatic islet transplants in streptozotocin diabetic rats*. The American journal of pathology, 1997. **150**(3): p. 1071-1087.
42. Robertson, R.P., *Islet transplantation as a treatment for diabetes - a work in progress*. N Engl J Med, 2004. **350**(7): p. 694-705.

43. 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.
44. Calvisi, D.F., M. Evert, and F. Dombrowski, *Hepatocarcinogenesis following pancreatic islet transplantation in streptozotocin- and autoimmune-diabetic rats*. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 2009. **115**(2): p. 97-104.
45. Bannasch, P. and H. Zerban, *Pathology of tumours in laboratory animals. Tumours of the rat. Tumours of the liver*. IARC Sci Publ, 1990(99): p. 199-240.
46. 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.
47. Bannasch, P., D. Mayer, and H.J. Hacker, *Hepatocellular glycogenosis and hepatocarcinogenesis*. *Biochim Biophys Acta*, 1980. **605**(2): p. 217-45.
48. 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.
49. 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.
50. Bannasch, P., *Pathogenesis of hepatocellular carcinoma: sequential cellular, molecular, and metabolic changes*. *Prog Liver Dis*, 1996. **14**: p. 161-97.
51. Radaeva, S., et al., *Hepadnaviral hepatocarcinogenesis: in situ visualization of viral antigens, cytoplasmic compartmentation, enzymic patterns, and cellular proliferation in preneoplastic hepatocellular lineages in woodchucks*. *J Hepatol*, 2000. **33**(4): p. 580-600.
52. 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.
53. Yamashita, T., et al., *Activation of lipogenic pathway correlates with cell proliferation and poor prognosis in hepatocellular carcinoma*. *J Hepatol*, 2009. **50**(1): p. 100-10.
54. 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.
55. Cao, D., et al., *Both de novo synthesized and exogenous fatty acids support the growth of hepatocellular carcinoma cells*. *Liver Int*, 2017. **37**(1): p. 80-89.

56. 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.
57. Ribback, S., et al., *Oncogene-dependent addiction to carbohydrate-responsive element binding protein in hepatocellular carcinoma*. *Cell Cycle*, 2018. **17**(12): p. 1496-1512.
58. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
59. Phan, L.M., S.C. Yeung, and M.H. Lee, *Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies*. *Cancer Biol Med*, 2014. **11**(1): p. 1-19.
60. Warburg, O., *On the origin of cancer cells*. *Science*, 1956. **123**(3191): p. 309-14.
61. Kirstein, M.M., et al., *Activity of the mTOR inhibitor RAD001, the dual mTOR and PI3-kinase inhibitor BEZ235 and the PI3-kinase inhibitor BKM120 in hepatocellular carcinoma*. *Liver Int*, 2013. **33**(5): p. 780-93.
62. Yamashita, H., et al., *A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(16): p. 9116-21.
63. 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.
64. Sonke, J., *Morphologische und proliferationskinetische Unterschiede klarzelliger Leberherde diabetischer Wildtyp- und Carbohydrate responsiv element-binding protein-Knockout- Mäuse nach intraportaler Pankreasinseltransplantation*. 2019.
65. 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.
66. Abdul-Wahed, A., S. Guilmeau, and C. Postic, *Sweet Sixteenth for ChREBP: Established Roles and Future Goals*. *Cell Metab*, 2017. **26**(2): p. 324-341.
67. Kawaguchi, T., et al., *Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(6): p. 3829-35.
68. Kawaguchi, T., et al., *Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(24): p. 13710-5.

69. Sato, S., et al., *Metabolite Regulation of Nuclear Localization of Carbohydrate-response Element-binding Protein (ChREBP): ROLE OF AMP AS AN ALLOSTERIC INHIBITOR*. J Biol Chem, 2016. **291**(20): p. 10515-27.
70. Kabashima, T., et al., *Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(9): p. 5107-12.
71. Davies, M.N., B.L. O'Callaghan, and H.C. Towle, *Glucose activates ChREBP by increasing its rate of nuclear entry and relieving repression of its transcriptional activity*. J Biol Chem, 2008. **283**(35): p. 24029-38.
72. Bricambert, J., et al., *Salt-inducible kinase 2 links transcriptional coactivator p300 phosphorylation to the prevention of ChREBP-dependent hepatic steatosis in mice*. J Clin Invest, 2010. **120**(12): p. 4316-31.
73. Meng, J., et al., *Identification of HNF-4a as a key transcription factor to promote ChREBP expression in response to glucose*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 23944.
74. Ma, L., L. Robinson, and H. Towle, *ChREBP* Mlx Is the Principal Mediator of Glucose-induced Gene Expression in the Liver*. The Journal of biological chemistry, 2006. **281**: p. 28721-30.
75. Uyeda, K. and J.J. Repa, *Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis*. Cell Metabolism, 2006. **4**(2): p. 107-110.
76. 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.
77. Postic, C., et al., *ChREBP, a transcriptional regulator of glucose and lipid metabolism*. Annu Rev Nutr, 2007. **27**: p. 179-92.
78. Ahmed, M.H. and C.D. Byrne, *Modulation of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) as potential treatments for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)*. Drug Discov Today, 2007. **12**(17-18): p. 740-7.
79. 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.
80. Denechaud, P.D., et al., *ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver*. J Clin Invest, 2008. **118**(3): p. 956-64.

81. Kim, S.Y., et al., *SREBP-1c mediates the insulin-dependent hepatic glucokinase expression*. J Biol Chem, 2004. **279**(29): p. 30823-9.
82. Kim, M.S., et al., *ChREBP regulates fructose-induced glucose production independently of insulin signaling*. J Clin Invest, 2016. **126**(11): p. 4372-4386.
83. Szkudelski, T., *The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas*. Physiol Res, 2001. **50**(6): p. 537-46.
84. O'Dowd, J.F., *The isolation and purification of rodent pancreatic islets of Langerhans*. Methods Mol Biol, 2009. **560**: p. 37-42.
85. Carter, J.D., et al., *A practical guide to rodent islet isolation and assessment*. Biol Proced Online, 2009. **11**: p. 3-31.
86. Nachlas, M.M., et al., *The determination of lactic dehydrogenase with a tetrazolium salt*. Anal Biochem, 1960. **1**: p. 317-26.
87. Strober, W., *Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability*. Curr Protoc Immunol, 2015. **111**: p. A3.B.1-a3.B.3.
88. Bratthauer, G.L., *The avidin-biotin complex (ABC) method and other avidin-biotin binding methods*. Methods Mol Biol, 2010. **588**: p. 257-70.
89. Sorrelle, N., et al., *Improved Multiplex Immunohistochemistry for Immune Microenvironment Evaluation of Mouse Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2019. **202**(1): p. 292-299.
90. Ashida, H., K. Yamamoto, and H. Kumagai, *Trypsin inhibitory activity of bovine fetuin de-O-glycosylated by endo-alpha-N-acetylgalactosaminidase*. Biosci Biotechnol Biochem, 2000. **64**(10): p. 2266-8.
91. Eldrige, S.R., B.E. Butterworth, and T.L. Goldsworthy, *Proliferating cell nuclear antigen: a marker for hepatocellular proliferation in rodents*. Environmental health perspectives, 1993. **101 Suppl 5**(Suppl 5): p. 211-218.
92. Yin, D., et al., *Liver ischemia contributes to early islet failure following intraportal transplantation: benefits of liver ischemic-preconditioning*. Am J Transplant, 2006. **6**(1): p. 60-8.
93. Biarnés, 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.
94. Jirak, D., et al., *Monitoring the survival of islet transplants by MRI using a novel technique for their automated detection and quantification*. Magma, 2009. **22**(4): p. 257-65.

95. Johansson, H., et al., *Tissue factor produced by the endocrine cells of the islets of Langerhans is associated with a negative outcome of clinical islet transplantation.* Diabetes, 2005. **54**(6): p. 1755-62.
96. Bottino, R., et al., *Transplantation of allogeneic islets of Langerhans in the rat liver: effects of macrophage depletion on graft survival and microenvironment activation.* Diabetes, 1998. **47**(3): p. 316-23.
97. Perez-Basterrechea, M., et al., *Plasma-fibroblast gel as scaffold for islet transplantation.* Tissue Eng Part A, 2009. **15**(3): p. 569-77.
98. Fu, F., et al., *Costimulatory molecule-deficient dendritic cell progenitors (MHC class II+, CD80dim, CD86-) prolong cardiac allograft survival in nonimmunosuppressed recipients.* Transplantation, 1996. **62**(5): p. 659-65.
99. Ito, T., et al., *Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand.* J Exp Med, 2007. **204**(1): p. 105-15.
100. Corbett, J.A., et al., *Nitric oxide mediates cytokine-induced inhibition of insulin secretion by human islets of Langerhans.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(5): p. 1731-5.
101. Barshes, N.R., S. Wyllie, and J.A. Goss, *Inflammation-mediated dysfunction and apoptosis in pancreatic islet transplantation: implications for intrahepatic grafts.* J Leukoc Biol, 2005. **77**(5): p. 587-97.
102. Lifson, N., C.V. Lassa, and P.K. Dixit, *Relation between blood flow and morphology in islet organ of rat pancreas.* Am J Physiol, 1985. **249**(1 Pt 1): p. E43-8.
103. Griffith, R.C., et al., *A morphologic study of intrahepatic portal-vein islet isografts.* Diabetes, 1977. **26**(3): p. 201-14.
104. Vasir, B., et al., *Hypoxia induces vascular endothelial growth factor gene and protein expression in cultured rat islet cells.* Diabetes, 1998. **47**(12): p. 1894-903.
105. Vajkoczy, P., et al., *Histogenesis and ultrastructure of pancreatic islet graft microvasculature. Evidence for graft revascularization by endothelial cells of host origin.* Am J Pathol, 1995. **146**(6): p. 1397-405.
106. Vajkoczy, P., et al., *Angiogenesis and vascularization of murine pancreatic islet isografts.* Transplantation, 1995. **60**(2): p. 123-7.
107. Merchant, F.A., et al., *Angiogenesis in cultured and cryopreserved pancreatic islet grafts.* Transplantation, 1997. **63**(11): p. 1652-60.
108. Giuliani, M., et al., *Central necrosis in isolated hypoxic human pancreatic islets: evidence for postisolation ischemia.* Cell Transplant, 2005. **14**(1): p. 67-76.

109. Zheng, X., et al., *Acute hypoxia induces apoptosis of pancreatic β -cell by activation of the unfolded protein response and upregulation of CHOP*. *Cell Death Dis*, 2012. **3**(6): p. e322.
110. Dionne, K.E., C.K. Colton, and M.L. Yarmush, *Effect of hypoxia on insulin secretion by isolated rat and canine islets of Langerhans*. *Diabetes*, 1993. **42**(1): p. 12-21.
111. Bensellam, M., D.R. Laybutt, and J.-C. Jonas, *The molecular mechanisms of pancreatic β -cell glucotoxicity: Recent findings and future research directions*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2012. **364**(1): p. 1-27.
112. Davalli, A.M., et al., *Vulnerability of islets in the immediate posttransplantation period. Dynamic changes in structure and function*. *Diabetes*, 1996. **45**(9): p. 1161-7.
113. Nacher, V., et al., *Normoglycemia restores beta-cell replicative response to glucose in transplanted islets exposed to chronic hyperglycemia*. *Diabetes*, 1998. **47**(2): p. 192-6.
114. Montaña, E., S. Bonner-Weir, and G.C. Weir, *Beta cell mass and growth after syngeneic islet cell transplantation in normal and streptozocin diabetic C57BL/6 mice*. *The Journal of clinical investigation*, 1993. **91**(3): p. 780-787.
115. Unger, R.H. and S. Grundy, *Hyperglycaemia as an inducer as well as a consequence of impaired islet cell function and insulin resistance: implications for the management of diabetes*. *Diabetologia*, 1985. **28**(3): p. 119-21.
116. Prentki, M., et al., *Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes*. *Diabetes*, 2002. **51 Suppl 3**: p. S405-13.
117. Roche, E., et al., *Long-term exposure of beta-INS cells to high glucose concentrations increases anaplerosis, lipogenesis, and lipogenic gene expression*. *Diabetes*, 1998. **47**(7): p. 1086-94.
118. Kaneto, H., et al., *Involvement of oxidative stress in the pathogenesis of diabetes*. *Antioxid Redox Signal*, 2007. **9**(3): p. 355-66.
119. Piro, S., et al., *Chronic exposure to free fatty acids or high glucose induces apoptosis in rat pancreatic islets: possible role of oxidative stress*. *Metabolism*, 2002. **51**(10): p. 1340-7.
120. Briaud, I., et al., *Long-term exposure of isolated rat islets of Langerhans to supraphysiologic glucose concentrations decreases insulin mRNA levels*. *Metabolism*, 1999. **48**(3): p. 319-23.

121. Tajiri, Y., C. Möller, and V. Grill, *Long-term effects of aminoguanidine on insulin release and biosynthesis: evidence that the formation of advanced glycosylation end products inhibits B cell function*. *Endocrinology*, 1997. **138**(1): p. 273-80.
122. Kaneto, H., et al., *Reducing sugars trigger oxidative modification and apoptosis in pancreatic beta-cells by provoking oxidative stress through the glycation reaction*. *Biochem J*, 1996. **320** (Pt 3)(Pt 3): p. 855-63.
123. Jansson, L. and S. Sandler, *Influence of hyperglycemia on blood perfusion of autotransplanted pancreatic islets in diabetic rats*. *Diabetes*, 1989. **38 Suppl 1**: p. 196-8.
124. 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.
125. Pongvarin, N., et al., *Carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) plays a pivotal role in beta cell glucotoxicity*. *Diabetologia*, 2012. **55**(6): p. 1783-96.
126. Wang, H. and C.B. Wollheim, *ChREBP rather than USF2 regulates glucose stimulation of endogenous L-pyruvate kinase expression in insulin-secreting cells*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(36): p. 32746-52.
127. da Silva Xavier, G., et al., *ChREBP binding to fatty acid synthase and L-type pyruvate kinase genes is stimulated by glucose in pancreatic beta-cells*. *J Lipid Res*, 2006. **47**(11): p. 2482-91.
128. Noordeen, N.A., et al., *Carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP) is a negative regulator of ARNT/HIF-1beta gene expression in pancreatic islet beta-cells*. *Diabetes*, 2010. **59**(1): p. 153-60.
129. Unger, R.H., *Lipotoxic diseases*. *Annu Rev Med*, 2002. **53**: p. 319-36.
130. Zhang, H.H., et al., *Insulin stimulates adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 pathway*. *PLoS One*, 2009. **4**(7): p. e6189.
131. Ho, C., et al., *AKT (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1) and N-Ras (neuroblastoma ras viral oncogene homolog) coactivation in the mouse liver promotes rapid carcinogenesis by way of mTOR (mammalian target of rapamycin complex 1), FOXM1 (forkhead box M1)/SKP2, and c-Myc pathways*. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 2012. **55**(3): p. 833-845.
132. Nürnberger, V., et al., *Hepatocellular clear cell foci in ChREBP knockout and wild type mice after intraportal pancreatic islet transplantation – a long time experiment*. *Z Gastroenterol*, 2019. **57**(01): p. P4.27.
133. Weber, G., M.A. Lea, and N.B. Stamm, *Regulation of hepatic carbohydrate metabolism by FFA and acetyl-CoA: sequential feedback inhibition*. *Lipids*, 1969. **4**(5): p. 388-96.

134. Rajas, F., et al., *The absence of hepatic glucose-6 phosphatase/ChREBP couple is incompatible with survival in mice*. Molecular metabolism, 2021. **43**: p. 101108-101108.
135. Foretz, M., et al., *Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(22): p. 12737-42.
136. Baskaran, S., et al., *Structural basis for glucose-6-phosphate activation of glycogen synthase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(41): p. 17563-8.
137. Krycer, J.R., et al., *The Akt-SREBP nexus: cell signaling meets lipid metabolism*. Trends Endocrinol Metab, 2010. **21**(5): p. 268-76.
138. 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.
139. Liu, P., et al., *A functional mammalian target of rapamycin complex 1 signaling is indispensable for c-Myc-driven hepatocarcinogenesis*. Hepatology (Baltimore, Md.), 2017. **66**(1): p. 167-181.
140. Calvisi, D.F., et al., *Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC*. Gastroenterology, 2006. **130**(4): p. 1117-28.
141. Zerban, H., et al., *Cell proliferation and cell death (apoptosis) in hepatic preneoplasia and neoplasia are closely related to phenotypic cellular diversity and instability*. Carcinogenesis, 1994. **15**(11): p. 2467-73.
142. Bannasch, P., et al., *Hepatocellular glycogenesis and related pattern of enzymatic changes during hepatocarcinogenesis*. Adv Enzyme Regul, 1984. **22**: p. 97-121.
143. Kowalik, M.A., et al., *Metabolic reprogramming identifies the most aggressive lesions at early phases of hepatic carcinogenesis*. Oncotarget, 2016. **7**(22): p. 32375-93.
144. Patra, K.C. and N. Hay, *The pentose phosphate pathway and cancer*. Trends Biochem Sci, 2014. **39**(8): p. 347-54.
145. Kowalik, M.A., A. Columbano, and A. Perra, *Emerging Role of the Pentose Phosphate Pathway in Hepatocellular Carcinoma*. Front Oncol, 2017. **7**: p. 87.
146. Cha, J.Y. and J.J. Repa, *The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR*. J Biol Chem, 2007. **282**(1): p. 743-51.
147. Tong, X., et al., *The glucose-responsive transcription factor ChREBP contributes to glucose-dependent anabolic synthesis and cell proliferation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(51): p. 21660.

148. Kaushik, A.K., et al., *Inhibition of the hexosamine biosynthetic pathway promotes castration-resistant prostate cancer*. Nature Communications, 2016. **7**(1): p. 11612.
149. 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.
150. Davila, J.A., et al., *Diabetes increases the risk of hepatocellular carcinoma in the United States: a population based case control study*. Gut, 2005. **54**(4): p. 533-9.
151. 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.
152. Benhamed, F., et al., *The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans*. J Clin Invest, 2012. **122**(6): p. 2176-94.
153. Eissing, L., et al., *De novo lipogenesis in human fat and liver is linked to ChREBP- β and metabolic health*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 1528.
154. Hurtado del Pozo, C., et al., *ChREBP expression in the liver, adipose tissue and differentiated preadipocytes in human obesity*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2011. **1811**(12): p. 1194-1200.
155. Baraille, F., et al., *Integration of ChREBP-Mediated Glucose Sensing into Whole Body Metabolism*. Physiology, 2015. **30**(6): p. 428-437.
156. Yin, H.Q., et al., *Differential gene expression and lipid metabolism in fatty liver induced by acute ethanol treatment in mice*. Toxicol Appl Pharmacol, 2007. **223**(3): p. 225-33.

7. Eidesstaatliche 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

Josephine Frohme

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname: Frohme, Josephine
Geburtsdatum: 16.03.1992
Geburtsort: Berlin
Hauptwohnsitz: Nantesstraße 37, 13127 Berlin
Familienstand: ledig
Telefon-Nr.: 0172 198 77 41
E-Mail Adresse: fine-froh@gmx.de

Berufserfahrung

04/2019 – heute Assistenzärztin, Klinik der Gastroenterologie und Hepatologie,
Charité Campus Virchow-Klinikum

Bildungsweg

08/1998- 07/2004 Grundschule - Schule am Birkenhof, Berlin Pankow
08/2004- 07/2011 Gymnasium - Rosa-Luxemburg-Oberschule, Berlin Pankow,
Abitur
09/2011- 03/2019 Universität – Ernst- Moritz- Arndt Universität Greifswald
09.09.2013 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
– bestanden mit der Note „gut“
12.10.2017 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
– bestanden mit der Note „gut“
29.11.2018 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
– bestanden mit der Note „sehr gut“

9. Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Frank Dombrowski für die Überlassung des Themas, sowie die Einarbeitung in die Materie.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Silvia Ribback für die exzellente und stetige Betreuung während der Erfassung und Auswertung der Daten sowie der Verfassung der schriftlichen Dissertation.

Mein herzlicher Dank gilt weiterhin Frau Stefanie Bockhahn, die als medizinisch-technische Assistentin durch Ihre Fachkompetenz und Hilfe maßgeblich am Erfolg der Experimente beteiligt war. Ich bedanke mich, für die reibungslose, schöne und unvergessliche Zusammenarbeit.

Des Weiteren möchte ich Frau Ines Zimack, der Tierpflegerin des Instituts, danken. Als fundamentales Mitglied der Forschungsgruppe war Frau Zimack mit Ihrer Geduld und Hingabe essentieller Bestandteil während der gesamten Zeit.

Zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie, meinen Freunden und meinen Nächsten bedanken für die moralische Unterstützung, die fortführenden Motivationshilfen und hilfreichen Ratschläge.

10. Anhang

Chemikalien:

Isolation

Tabelle 4: Neutralrotlösung

NaCl 0,9%	500 ml
Neutralrot C ₁₅ H ₁₇ ClN ₄ (Roth®, Karlsruhe, Deutschland)	50 mg

Tabelle 5: Hanks' Balanced Salt Solution

Aqua dest.	900 ml
Hanks' Balanced Salt Solution (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland, ohne NaHCO ₃ mit Phenolrot, 10 %)	100 ml

Die Hanks' Balanced Salt Solution wurde ca. 30 min vor Beginn des Versuches auf einen pH-Wert von 7,2 mittels einer 0,1 M NaOH-Lösung und einer 0,1 M HCL- Lösung eingestellt.

Perfusion

Tabelle 6: Zusammensetzung der Spüllösung

Ringerlösung	1 l
Dextran	40 g
Procain-HCl	5 g

Tabelle 7: Zusammensetzung der Fixierlösung

Ringerlösung	1 l
Dextran	40 g
Paraformaldehyd	30g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	2,65 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	13,9 g

Tabelle 8: Zusammensetzung des Nachfix

Ringerlösung	1 l
Paraformaldehyd	30 g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	2,65 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	13,9 g

Alle Lösungen wurden ca. 30 min vor Beginn der Perfusion auf einen pH-Wert von 7,4 mittels einer 0,1 M NaOH-Lösung und einer 0,1 M HCL- Lösung eingestellt.

Vitalitätstests:

Tabelle 9: p-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid

NADH- Stammlösung	1 ml
NADH + Na ₂ (Firma: Roche)	2 mg
CC/Mount, tissue mounting medium	
Xylol	

Tabelle 10: Zusammensetzung der NADH-Stammlösung

0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH=7,2	10 ml
0,1 % Serva Nitro-blue tetrazoliumchlorid	10 ml
0,065 % KCN	4 ml
1 % MgCl ₂ x 6 H ₂ O	4 ml
Aqua dest.	8 ml

Tabelle 11: Trypanblau-Ausschlusstest

Trypanblau (Firma: Bioanalytic)	0,5 g
0,1 M Phosphatpuffer, pH=7,2	100 ml

Tabelle 12: Zusammensetzung Na-Phosphatpuffer 0.1 mol (pH 7,4)

Lösung 1: 13,80 g NaH₂PO₄ x H₂O in 1 l Aquadest

Lösung 2: 17,89 g Na₂HPO₄ x 2H₂O in 1 l Aquadest

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

Protokoll 1: Immunhistochemische Reaktion zum Nachweis von Insulin

5 min	Fixierung unter Formoldampf
1- 2 min	lufttrocknen lassen
2 X 5 min	spülen mit Na-Phospatpuffer
10 min	permeabilisieren mit 0,1 % Triton-X-100
3 X 5 min	spülen mit Na-Phospatpuffer
10 min	Novocastra peroxidase Block
5 min	spülen mit Na-Phospatpuffer
30 min	Rodent Block M
Kurz	spülen mit Na-Phospatpuffer
<u>Blockierung des endogenen Biotins</u>	
30 min	Avidin Solution
5 min	spülen mit Na-Phospatpuffer
30 min	Biotin Solution
5 min	spülen mit Na-Phospatpuffer
1 h	5 % fetales Kälberserum
<u>Primärantikörper</u>	
	INS-Anti-Maus-AK
	Verdünnung: 1:200
	Zeit: min. 12 h bei Raumtemperatur
3 X 5 min	spülen mit Na-Phospatpuffer
<u>Sekundärantikörper</u>	
30 min	4+ Biotinylated Universal Goat Link
5 min	spülen mit Na-Phospatpuffer
<u>Komplexantikörper</u>	
30 min	4+ Streptavidin AP Label
5 min	spülen mit Na-Phospatpuffer
<u>Farbentwicklung</u>	
20 min	Vulcan fast red: 2,5 ml Vulcan fast red

Gründlich	spülen in Aqua dest.
1 min	Hämalaun
2 min	Bläuen in Warmwasser
10 min	trocknen bei 60 °C
	Xylol- Extra (rot)
	Eindecken mit Roti-Histokitt

Protokoll 2: Immunhistochemische Reaktion mit BrdU

Je 5 min	langsames Entparaffinieren (3xXylol-absteigende Alkoholreihe)
3 min	In Citratpuffer, pH 6 "köcheln"
20 min	im Topf ohne Deckel abkühlen lassen
	Spülen mit Aqua dest.
10 min	einwirken lassen in 0,1% Protease bei 37 Grad, Sigma
	spülen Aqua dest.
1 h	einwirken lassen in 95% Formamid 70 Grad, Wasserbad Roth
	spülen Aqua dest.
	Einstellen in Trispuffer
30 min	Einwirken lassen in H ₂ O ₂ , RTU, DAKO
5 min	Spülen mit Trispuffer
10 min	Gabe von Schweinenormalserum (SNS) 1:5 mit Trispuffer Verdünnt, DAKO
Über Nacht	Einwirken von BrdU-Antikörper 1/100 bei 7°C
<u>5 min</u>	Spülen mit Trispuffer
Labelled Streptavidin- <u>Sekundärantikörper</u>	DAKO
30 min	4+ Biotinylated Universal Goat Link
5 min	Spülen mit Trispuffer
<u>Komplexantikörper</u>	
30 min	4+ Streptavidin AP Label
5 min	Spülen mit Trispuffer
<u>Farbentwicklung</u>	
20 min	Vulcan fast red: 2,5 ml Vulcan fast red Buffer und 1
Gründlich	spülen in Aqua dest.
1 min	Hämalaun
2 min	Bläuen in Warmwasser
10 min	trocknen bei 60 °C

	Xylol- Extra (rot)
	Eindecken mit Roti-Histokitt
5 min	spülen mit PBS-Puffer
<i>Farbentwicklung</i>	
20 min	Vulcan fast red: 2,5 ml Vulcan fast red Buffer und 1
Gründlich	spülen in Aqua dest.
1 min	Hämalaun
2 min	Bläuen in Warmwasser
10 min	trocknen bei 60 °C
	Xylol- Extra (rot)
	Eindecken mit Roti-Histokitt

Protokoll 3: elektronenmikroskopische Einbettung

2,5 % Glutaraldehydfixierung

0,5 ml 25% Glutaraldehydlösung mit 5 ml Na-Phosphatpuffer 0.1 mol (pH 7,4) kurz vor Gebrauch mischen

Nach der 2,5% Glutaraldehydfixierung:

- 1. 0,1 mol Na-Phosphat-Waschpuffer nach Sörensen ph 7,4** **3 x 30 min**
- 2. 2% OsO₄ – Gebrauchslösung** **2 h schütteln bei 4°C**
 - 4% OsO₄ mit 0,2 mol Na-Phosphatpuffer pH 7,4 1:1 mischen
- 3. 0,1 mol Na-Phosphat-Puffer pH 7,4** **3 x 5 min**
- 4. aufsteigende Alkoholreihe:**

20% Ethanol		1 x 10 min
30% Ethanol		1 x 10 min
50% Ethanol		1 x 10 min
- 5. 70% Ethanol + 0,5% Uranylacetat** **30 min bei 4°C**
 - für 2 ml 1,65 ml 70% Ethanol + 0,35 ml 3% Uranylacetat mischen
- 6. aufsteigende Alkoholreihe:**

90% Ethanol		1 x 10 min
96% Ethanol		2 x 10 min
100% Ethanol		3 x 10 min

7. Propylenoxid **2 x 15 min**

8. Propylenoxid – Epon – Gemisch **24 h bei 20°C**

- Epon-Gebrauchslösung (mit Härter) mit Propylenoxid 1:1 mischen

9. Epon I **24 h bei 20°C**

(Propylenoxid-Epon-Gemisch)

10. Epon II **48 h bei 60°C**

Kontrastierung:

Uranylacetat:

- in einer Petrischale eine feuchte Kammer herstellen
- auf Parafilm ca. 25 µl große Uranylacetat-Tropfen setzen
- Grids für 15 min auf die 3% Uranylacetat-Tropfen (wässrig) setzen
- 6x spülen in Aquadest
- mit Filterpapier Wasser von den Grids saugen und für ca. 2 h in den Trockenschrank stellen

Bleicitrat:

- Blei aus der -80°C Truhe nehmen und auftauen lassen
- vor Gebrauch das Blei zentrifugieren
- Petrischale mit NaOH-Plättchen bestücken
- auf Parafilm ca. 25 µl große Bleicitrat-Tropfen setzen
- Grids für 15 min auf die Tropfen setzen
- 1x in 0,02M NaOH spülen
- 5x spülen in Aquadest
- mit Filterpapier Wasser von den Grids saugen und diese über Nacht in den Trockenschrank stellen