

**Pankreatische alpha-Zellfunktion
in Abhängigkeit vom Alter des Organismus
im Mausmodell**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Benedikt Funk

aus Heinsberg

Hamm, Oktober 2015

Aus der Klinik für Endokrinologie und Diabetologie
des Universitätsklinikums der Stadt Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Sven Schinner
Korreferent: Prof. Dr. Eckhard Lammert

Tag der mündlichen Prüfung: 20.01.2016

Inhalt

Inhaltsverzeichnis..... I

Abkürzungsverzeichnis IV

Zusammenfassung..... VII

Summary IX

1 Einleitung..... 1

 1.1 Epidemiologie des Diabetes mellitus 1

 1.2 Diabetes mellitus laut Definition 1

 1.3 Typ 1 Diabetes mellitus..... 2

 1.4 Typ 2 Diabetes mellitus..... 3

 1.5 Aufbau des Pankreas..... 4

 1.5.1 Der endokrine Pankreas: die Langerhansschen Inseln 5

 1.5.2 Die Funktion und Pathophysiologie der pankreatischen beta-Zellen 7

 1.6 Insulin und seine Wirkung am Zielgewebe 8

 1.6.1 Mechanismen der Insulinresistenz im Allgemeinen..... 11

 1.6.2 Gewebebezogene Insulinresistenz 13

 1.7 Physiologie der alpha-Zellen..... 14

 1.7.1 Glukagon und seine Wirkung am Zielgewebe 17

 1.8 GLP-1 (Glucagon-like-peptide 1) 20

 1.9 Zielsetzung 22

2 Material und Methoden 23

 2.1 Chemikalien und Verbrauchsgüter..... 23

 2.1.1 Medien und Seren..... 23

 2.1.2 Radioimmunassay (RIA) und Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 23

 2.1.3 Antikörper 23

 2.1.4 Chemische und biologische Reagenzien..... 24

 2.2 Tierexperimentelle Methoden 27

 2.2.1 Exendin-4 Behandlung..... 27

 2.2.2 Adipositasinduktion 28

 2.2.3 Durchführung eines intraperitonealen Glukosetoleranztest bei Mäusen 29

 2.2.4 Isolation von Langerhansschen Inseln aus murinen Pankreata 32

2.2.5 <i>in vitro</i> Stimulierung der Glukagonsekretion von isolierten, murinen Langerhansschen Inseln	34
2.3 Histologische Methoden	36
2.3.1 Kryokonservierung eines murinen Pankreas	36
2.3.2 Immunfluoreszenzfärbung	36
2.3.3 Bestimmung der pankreatischen alpha- und beta-Zellmasse	38
2.4 Biochemische Methoden	43
2.4.1 Ultra sensitive mouse insulin ELISA Kit	43
2.4.2 Glukagon RIA	45
2.5. Statistische Auswertung	47
3 Ergebnisse	48
3.1 Gewichtszunahme durch Hochfettfütterung bei jungen und alten C57BL67-Mäusen	48
3.2 Induktion einer Insulinresistenz bei adipösen Tieren nach Hochfettdiät	51
3.2.1 Unter Hochfettdiät entwickelten nur alte Tiere eine gestörte Glukosetoleranz	51
3.2.2 Deutliche Hyperinsulinämie bei alten Tieren nach Hochfettdiät	54
3.2.3 Mangelnde Suppression der Glukagonspiegel bei alten Tieren nach Hochfettdiät	56
3.3 Bestimmung der Glukagonsekretion von isolierten Langerhansschen Inseln <i>in vitro</i>	58
3.3.2 Mangelnde Hemmung des Glukagons durch Insulin <i>in vitro</i>	58
3.4 Anstieg der beta-, jedoch nicht der alpha-Zellmasse, nach Hochfettdiät	60
3.5 Exendin-4 Therapie von jungen und alten C57BL67-Mäusen	62
3.5.1 Exendin-4 wirkt sich nicht auf die Gewichtsentwicklung von C57BL6-Mäusen aus	62
3.5.2 Exendin-4 verbessert die Glukosetoleranz altersunabhängig	63
3.5.3 Schnellere Insulinreaktion unter Exendin-4	65
3.5.4 Tendenziell niedrigere basale Glukagonspiegel unter Exendin-4	67
3.6 Verminderte beta- jedoch unveränderte alpha-Zellmasse nach 3 wöchiger Exendin-4 Behandlung	69
4 Diskussion	71
4.1 Mit steigendem Lebensalter verschlechtert sich die Glukosetoleranz adipöser Tiere	71
4.2 Die beta-Zellen adipöser Tiere zeigen abnormale Insulinsekretionsmuster	73

4.3 Pankreatische alpha-Zellen von alten, adipösen Tieren zeigen Anzeichen einer Insulinresistenz.	74
4.4 Die Adipositas bewirkt eine Zunahme der beta-Zellmasse, jedoch keine Veränderung der alpha-Zellmasse.....	76
4.5 Exendin-4 verbessert altersunabhängig die Glukosetoleranz von Mäusen.....	77
4.6 Exendin-4 bewirkt nach einem 3 wöchigen Behandlungszeitraum noch einen Inkretineffekt.....	78
4.7 Exendin-4 hat keinen zusätzlichen Effekt auf die Glukagonsekretion im ipGTT	79
4.8 3 wöchige Behandlung mit Exendin-4 führt zu einer Reduzierung der beta-Zellmasse, die alpha-Zellmasse verändert sich hingegen nicht	79
4.9 Vor- und Nachteile des verwendeten Modellorganismus	81
5 Schlussfolgerung.....	83
6 Literaturverzeichnis	84
7 Abbildungsverzeichnis	95
8 Tabellenverzeichnis.....	96
Danksagung	97
Eidesstattliche Erklärung.....	98

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	5'-Adenosin Monophosphat-aktivierte Protein Kinase
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Calciumionen
CO KG	Compagnie Kommanditgesellschaft
CREB	cAMP response element-binding protein
DPP4	Dipeptidylpeptidase 4
eNOS	endotheliale Stickstoffoxid Synthase
<i>et al.</i>	und andere
etc.	et cetera
F(2,6)P2	Fruktose-2,6-Bisphosphat
FBP1	Fruktose-1,6-Bisphosphatase
FFA	Freie Fettsäuren
Foxo1a	Forkhead-Box-Protein O1a
G6PC	Glukose-6-Phosphatase
GLP1	Glucagon-like Peptid 1
GLUT-1	Glukosetransporter 1
GLUT-2	Glukosetransporter 2
GLUT-4	Glukosetransporter 4
GmbH	Gemeinschaft mit beschränkter Haftung
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
HI	Hitzeinaktiviert
i.p.	intraperitoneal
IDF	Internationale Diabetes Föderation
IFG	verschlechterte Nüchtern-Glukose (impaired fasting glucose)
IGT	gestörte Glukosetoleranz
IGT	gestörte Glukosetoleranz (impaired glucose tolerance)
IL-6	Interleukin 6
INS	Insulin

INS	Insulin
ipGTT	intraperitonealer Glukosetoleranztest
IRS-1	Insulin Rezeptor Substrat 1
K ⁺	Kaliumionen
KG	Körpergewicht
M	Molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MEK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mg	Milligramm
min.	Minuten
min.	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mV	Millivolt
Na ⁺	Natriumionen
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
NSS	Normales Schweine Serum
PCK2	Phosphoenolpyruvat Carboxykinase
PDK-1	Phosphoinositid-abhängige Kinase-1
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP	Phosphatidylinositol
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphat
PKB	Proteinkinase B
PPARGC1A	Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor G-Coaktivator-1
PPARγ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
sek.	Sekunden
Shc	Src homology 2 domain containing transforming protein

SNP	single nucleotid polymorphism
std.	Stunden
Tab.	Tabelle
TCF7L2	Transcription Factor 7-Like 2
TSC1/2	Tuberöses Sklerose Protein 1 und 2
u.a.	unter anderem
u.s.w.	und so weiter
üN	über Nacht
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
z.Zt.	zur Zeit

Zusammenfassung

Der Diabetes mellitus ist eine der häufigsten, chronischen Stoffwechselerkrankungen der Weltbevölkerung und betrifft, laut Schätzungen der Internationalen Diabetes Föderation (IDF), zurzeit etwa 382 Millionen Menschen. Die Erkrankungswahrscheinlichkeit steigt mit zunehmendem Lebensalter an. Ein weiterer Manifestationsfaktor ist Adipositas.

Es wird bei Typ 2 Diabetikern eine Hyperglukagonämie beobachtet, welche über eine dysregulierte hepatische Glukoneogenese zur präprandialen Hyperglykämie beiträgt. Daher stellten Gonzalez *et al.* (2008) die Hypothese einer Insulinresistenz von pankreatischen alpha-Zellen auf. Sie konnten durch Ihre Arbeiten mit InR1-G9 Zellen bereits zeigen, dass pankreatische alpha-Zellen nach Langzeitstimulation mit Insulin ihre Responsivität gegenüber Insulin *in vitro* verlieren. Eine Insulinresistenz bei pankreatischen alpha-Zellen wurde jedoch nicht *in vivo* bewiesen.

Exendin-4 ist ein GLP-1 Rezeptoragonist. Da Exendin-4 nicht durch DPP-4 degradiert wird, verspricht synthetisch hergestelltes Exendin-4 ein wirksames Antidiabetikum zu sein. Dabei wird diskutiert, ob es bei Typ 2 Diabetikern, während des progressiven Fortschritts ihrer Erkrankung, die beta-Zellfunktion möglichst lange aufrechterhalten kann. Es wurde zudem gezeigt, dass GLP-1 Rezeptoragonisten die Glukagonfreisetzung hemmen können.

In der hier vorgelegten Studie wurde deshalb untersucht, ob das Lebensalter des Organismus (Maus) die Entstehung einer gestörten Glukosetoleranz unter Adipositasinduktion bestimmt und insbesondere, wie unter diesen Bedingungen die Funktion pankreatischer alpha-Zellen verändert wird. Dies wurde von uns auch im Hinblick auf die Responsivität gegenüber Insulin und GLP-1 Rezeptor Agonisten untersucht.

Die hier vorgelegten Daten zeigen, dass schlanke Tiere unabhängig vom Alter eine vergleichbar gute Glukosetoleranz, normale Insulinsekretionsmuster und auch eine normale Glukagonsekretion zeigen. Adipöse Tiere zeigten im ipGTT hingegen eine drastischere Störung des Blutzuckerhaushaltes mit steigendem Alter. Ausserdem konnten wir bei alten adipösen Mäusen eine Insulinresistenz der pankreatischen alpha-Zellen *in vivo* und *in vitro* beobachten. Während die von uns induzierte Adipositas zu einer Steigerung der beta-Zellmasse bei den betroffenen Versuchstieren führte, blieb die alpha-Zellmasse von einer

Adipositas und auch von einem steigenden Lebensalter unberührt. Exendin-4 zeigte in unseren Experimenten keinen signifikanten Einfluss auf die Glukagonsekretion pankreatischer alpha-Zellen und deren Masse. Es führte jedoch zu einer verbesserten Glukosetoleranz bei jungen und alten Tieren. Ebenso konnten wir eine verminderte beta-Zellmasse beobachten.

In der Zusammenschau konnten wir das Alter des Organismus als einen wesentlichen Risikofaktor für die Entstehung eines Diabetes mellitus unter diabetogenen Bedingungen zeigen. Hierbei konnten wir eine Insulinresistenz von pankreatischen alpha-Zelle darstellen.

Summary

Diabetes mellitus is a common, chronic metabolic disease of the global population and affects, according to estimates by the International Diabetes Federation (IDF), currently about 382 million people. The probability of illness increases with age. Another manifestation factor is obesity.

Hyperglucagonemia is often observed in type 2 diabetics and contributes via a dysregulated hepatic gluconeogenesis to predominantly preprandial hyperglycemia. Therefore Gonzalez *et al.* (2008) presented the hypothesis of insulin resistance of pancreatic alpha cells. The results of their experiments demonstrated, that glucagon producing InR1-G9 cells lose their responsiveness to insulin after long-term stimulation *in vitro*. But until now, Insulin resistance in pancreatic alpha cells has not been demonstrated *in vivo*.

Exendin-4 is a GLP-1 receptor agonist. Since Exendin-4 is not degraded by DPP-4, GLP-1 receptor agonists like synthetically produced exendin-4 are promising to be effective as anti-diabetic drugs. It is discussed whether these type of drugs might preserve beta-cell function in type 2 diabetics during the progression of disease. It was also shown that GLP-1 receptor agonists can inhibit glucagon release.

In the present study we therefore examined whether the age of the organism (mouse) determines the development of impaired glucose tolerance after obesity induction. We investigated in particular how the function of pancreatic alpha cells is altered under these conditions. This was investigated by us with regard to responsiveness of alpha-cells to insulin and GLP-1 receptor agonists. The data presented here, show that glucose tolerance, as well as Insulin and glucagon secretory patterns of lean animals are not influenced by age. In contrast, old obese mice showed a more dramatic disorder of blood glucose balance in IPGTT than their younger counterparts. In addition, we were able to observe insulin resistance of pancreatic alpha cells in old obese mice *in vivo* and *in vitro*. Induction of obesity resulted in an increase of beta-cell mass in the affected animals, whereas alpha-cell mass remained constant in young and old mice. In our experiments, Exendin-4 showed no significant effect on glucagon secretion of pancreatic alpha cells and alpha cell mass. However, Exendin-4 improved glucose tolerance in young and old animals. Also, we have observed a decreased beta-cell mass after treatment with exendin-4.

In summary, we found age to an important risk factor for diabetes development under diabetogenic conditions. In this context, we could demonstrate insulin resistance of pancreatic alpha cells.

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus ist eine der häufigsten, chronischen Stoffwechselerkrankungen der Weltbevölkerung und betrifft, laut Schätzungen der Internationalen Diabetes Föderation (IDF), zurzeit etwa 382 Millionen Menschen. Obwohl das Wissen über die Hintergründe des Diabetes kontinuierlich steigt und intensive Maßnahmen ergriffen werden, um neuen Erkrankungen vorzubeugen, steigt die Anzahl der Betroffenen vermutlich bis zum Jahre 2035 auf 592 Millionen Menschen an. Im Jahre 2013 wurden weltweit ca. 548 Milliarden US-Dollar für die Therapie des Diabetes mellitus ausgegeben. Dies entspricht etwa 11 % der gesamten, globalen Gesundheitsausgaben. Obwohl Nordamerika und Europa zusammen nur knapp 25 % aller Diabetiker (93 Millionen) beherbergen, geben diese gemeinsam fast 75 % der weltweiten Aufwendungen (410 Milliarden) für die Therapie des Diabetes aus. Die Diabetiker in armen und mittelständigen Ländern sind selbstverständlich besonders stark betroffen und sterben meist vor dem Erreichen des 60. Lebensjahres an ihrer Erkrankung oder den Begleiterscheinungen. Zudem geht die IDF davon aus, dass in diesen Ländern die Anzahl der undiagnostizierten Diabetiker besonders hoch ist (6. IDF Diabetes Atlas).

1.2 Diabetes mellitus laut Definition

Diabetiker sind nicht in der Lage ausreichend Insulin zu produzieren und/ oder adäquat auf ein körpereigenes Insulinsignal zu reagieren (Insulinresistenz). Hierdurch ist die zelluläre Glukoseaufnahme gestört oder zumindest stark beeinträchtigt und es kommt zu einer Hyperglykämie.

Die Deutsche Diabetesgesellschaft gibt Leitlinien aus nach denen ein Diabetes diagnostiziert werden kann. So gilt dieser als manifestiert, wenn die venöse Blutzuckerkonzentration im nüchternen Zustand einen Wert von 126 mg/dl (= 7 mM) überschreitet oder diese, während einer Gelegenheitsbestimmung

≥ 200 mg/dl ist oder im Rahmen oralen Glukosetoleranztests (75 g), nach 2 Stunden nicht unter 200 mg/dl (= 11 mM) sinkt.

Ist die Nierenschwelle für Glucose überschritten kommt es folglich zur Glucosurie. Durch dieses Symptom wurde der Name Diabetes mellitus („honigsüßer Durchfluß“, griechisch *Diabetes* „hindurchgehen“, „hindurchfließen“ und lateinisch *mellitus* „honigsüß“) geprägt. Der „honigsüße Durchfluß“ diente in der Antike zur Diagnose des Diabetes mellitus.

Trotz der modernen Therapiemöglichkeiten, bilden sich häufig mikro- und makrovaskuläre Begleiterscheinungen aus, die die Morbiditäts- und Mortalitätsrate von Diabetikern immens steigern. Zu den mikrovaskulären Begleiterscheinungen zählen die diabetische Retinopathie, die diabetische Nephropathie und die diabetische Neuropathie. Zudem begünstigt das Vorliegen eines Diabetes mellitus makrovaskuläre Erkrankungen wie die koronare Herzkrankheit, Herzinfarkte und Schlaganfälle (Hien und Böhm, 2007).

Es gibt unterschiedliche Typen des Diabetes mellitus. Zwei Formen seien kurz erläutert, auf den Diabetes mellitus Typ 2 wird genauer eingegangen.

1.3 Typ 1 Diabetes mellitus

Am Typ 1 Diabetes erkranken Personen aller Altersklassen, bevorzugt aber Kinder und Jugendliche. Der Typ 1 Diabetes wird durch eine Auto-Immunstörung verursacht (Atkinson und Eisenbarth, 2001). Durch Autoimmunphänomene werden dabei die Insulin-produzierenden beta-Zellen im Pankreasgewebe geschädigt. Dies kann durch äußere Umwelteinflüsse, wie z.B. Toxine, Immunstimulanzien und virale Infektionen, begünstigt werden (van Belle *et al.*, 2011). Nach dem Verlust von intakten pankreatischen beta-Zellen ist der Organismus nicht mehr in der Lage auf einen erhöhten Blutzucker durch die Ausschüttung von Insulin zu reagieren. In Folge dessen verliert der Körper seine Fähigkeit den Blutzucker effektiv zu regulieren. Ohne eine entsprechende Insulintherapie führt der Typ 1 Diabetes daher unweigerlich zum Tod des

Betroffenen. Durch eine sorgfältige medizinische Überwachung mit angepasster Insulintherapie, einer gesunden Ernährung und ausreichend körperlicher Aktivität kann ein Typ 1 Diabetiker heutzutage jedoch ein nahezu beschwerdefreies Leben führen (6. IDF Diabetes Atlas).

1.4 Typ 2 Diabetes mellitus

Der Typ 2 Diabetes ist die häufigste Form des Diabetes mellitus (ca. 85 – 90 % der weltweiten Diabetiker) und die Anzahl an Betroffenen steigt rasant. Allgemein ist er unter der Bezeichnung Altersdiabetes bekannt, denn die Erkrankungshäufigkeit steigt deutlich mit dem Alter an. Doch es erkranken auch immer mehr junge Menschen an ihm. Wodurch diese Form des Diabetes genau ausgelöst wird, ist noch nicht vollständig verstanden. Erworbene Faktoren wie eine ausgeprägte Adipositas, eine kalorienreiche Ernährung, mangelnde Bewegung, das Alter sowie nicht erworbene Faktoren (genetische Prädispositionen wie z.B. Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) in den Loci TCF7L2, INS, IRS-1, PPAR γ) können dessen Ausbildung begünstigen (Sladek *et al.*, 2007; Zimmet *et al.*, 2001; Zeggini *et al.*, 2007; 6. IDF Diabetes Atlas). Während der Manifestation des Typ 2 Diabetes durchläuft der Betroffene verschiedene Phasen.

Zunächst bildet sich eine leichte Insulinresistenz aus, welche im weiteren Verlauf durch eine gestörte Glukosetoleranz (IGT, impaired glucosetolerance) oder eine erhöhte Nüchtern-Glukose (IFG, impaired fasting glucose) festgestellt werden kann. Der Körper begegnet dieser durch eine erhöhte Ausschüttung des Hormons Insulin (Porte, 2001 und Liu *et al.*, 2002). In dieser Phase sind die Symptome meist reversibel. Alles was hierzu notwendig ist, ist eine Umstellung der Ernährung und eine Steigerung der körperlichen Aktivität (Pan *et al.*, 1997).

Mit zunehmender Insulinresistenz reicht die im Pankreas gebildete Menge an Insulin nicht mehr aus, um im Körper Insulin-abhängige Effekte adäquat auszulösen. Als Folge steigt die beta-Zellmasse im Pankreas zunächst an (Steil, *et al.*, 2001). Durch konservative Maßnahmen oder die Behandlung (oral) z.B. mit Metformin, DPP4-Hemmern und Sulfonylharnstoffen kann in der Regel

eine gute Blutzucker-Einstellung erfolgen. Eine Umstellung der Ernährung, sowie eine Steigerung der körperlichen Aktivität wirken sich, auch jetzt noch, begünstigend auf den Krankheitsverlauf aus (Pan *et al.*, 1997).

Im weiteren Verlauf wird die körpereigene Insulinproduktion zunehmend insuffizient (Butler *et al.*, 2003). Im Verlauf ist eine Kombinationstherapie aus oralen Antidiabetika und rekombinantem Insulin (subkutane Injektion) häufig nötig. Diese muss auf den jeweiligen Patienten einzeln abgestimmt werden, um ein bestmögliches Resultat zu erzielen.

1.5 Aufbau des Pankreas

Der Pankreas ist ein Organ entodermalen Ursprungs mit Lokalisation im Oberbauch. Er besitzt sowohl eine exo- als auch eine endokrine Drüsenfunktion. Seine Erscheinung ist keilförmig. Beim Menschen kann er bis zu 20 cm lang werden und bis zu 150 g wiegen. Bei Mäusen wird dieser nur ca. 3 cm lang und bringt bis zu 400 mg auf die Waage. Der Pankreas besteht aus drei Arealen. Der Pankreaskopf (*Caput pancreatis*) liegt dem Dünndarm auf, der Pankreaskörper (*Corpus pancreatis*) überspannt die Wirbelsäule und der Pankreasschwanz (*Cauda pancreatis*) endet an der Milz (Slack, 1995).

Während der Embryogenese entsteht der Pankreas aus zwei Knospen, die ventral und dorsal des Duodenums angelegt werden. Während der Drehung des Magens und des Duodenums kommen beide Knospen in Kontakt miteinander und fusionieren. Der Pankreaskörper, der Pankreasschwanz und ein kleiner Teil des Pankreaskopfes entstehen aus der dorsalen, der größte Teil des Pankreaskopfes aus der ventralen Knospe (Slack, 1995).

Der überwiegende Teil (bei der Ratte ca. 96 %) des Pankreas besteht aus exokrinem Drüsengewebe. Dabei bilden von Acinuszellen umgebene Drüsengänge (Azini) kleine lappenförmige Strukturen mit ca. 3 mm Größe aus. Die Acinuszellen produzieren mindestens 22 verschiedene Verdauungsenzyme (Amylasen, Lipasen, Nukleasen und Proteasen) und geben diese über merokrine Sekretion ab, sobald sie hormonell (Sekretin und Cholecystokinin)

durch den Magen-Darm-Trakt oder parasymphatisch über den *Nervus vagus* dazu angeregt werden.

Dabei werden die meisten Verdauungsenzyme als inaktive Vorläufer gebildet, welche erst nach der Ausschüttung in den Magen-Darm-Trakt ihre Aktivität entfalten. Über den *Ductus pancreaticus* werden die Verdauungsenzyme ausgeführt, dabei verläuft dieser Richtung Zwölffingerdarm. An der *Papilla vateri* werden die Sekrete in den Verdauungstrakt übergeben (Slack, 1995).

Den endokrinen Teil des Pankreas stellen die Langerhansschen Inseln dar. Diese liegen verteilt im exokrinen Gewebe der Bauspeicheldrüse.

1.5.1 Der endokrine Pankreas: die Langerhansschen Inseln

Im Jahre 1869 entdeckte der deutsche Mediziner Paul Langerhans, im Rahmen seiner Dissertation, Insel-förmige Strukturen im Pankreasgewebe. Diese wurden 1893 nach ihm benannt.

Die Langerhansschen Inseln (*Insulae pancreaticae*) stellen nur einen kleinen Teil des Pankreasgewebes (bei der Ratte ca. 4 %) dar, sind aber für seine endokrine Funktion verantwortlich und gewährleisten in erster Linie den Zustand der Euglykämie. Die Langerhansschen Inseln setzen sich aus verschiedenen Zelltypen zusammen. Besonders hervorzuheben sind die Insulin-produzierenden beta-Zellen, die Glukagon-produzierenden alpha-Zellen und die Somatostatin-produzierenden delta-Zellen. Der Vollständigkeit geschuldet, sind auch die auch Grehlin-produzierenden epsilon-Zellen und die pankreatisches Polypeptid-produzierenden PP-Zellen zu nennen (Slack, 1995; Guney und Gannon 2009).

Die prozentuale Zellzusammensetzung der Langerhansschen Inseln von Ratten unterscheidet sich, je nach Lokalisation im Pankreas, erheblich voneinander. Im Pankreaskörper und Schwanz bilden sich vornehmlich alpha-Zell reiche Inseln aus (ca. 30 % alpha-Zellen). Die Langerhansschen Inseln aus dem

Pankreaskopf sind überwiegend arm an alpha-Zellen (ca. 2 %), setzen sich dafür aus mehr PP-Zellen zusammen (ca. 20 %; Baetens *et al.*, 1979). Bei Nagetieren besteht der Kern der Langerhansschen Inseln meist ausschließlich aus beta-Zellen. Dieser wird von den anderen endokrinen Zelltypen wie ein Mantel umgeben (Slack, 1995). Daher werden diese Inseln auch als Manteltyp bezeichnet (siehe Besonderheiten in Abb. 1).

Lange Zeit ging die Wissenschaft davon aus, dass es nur einen Inseltyp im humanen Pankreas gäbe. In diesem wären die verschiedenen, endokrinen Zelltypen diffus verteilt. Die Bezeichnung Mosaiktyp wurde geprägt. Neue Forschungsergebnisse (Proshchina und Savel'yev, 2013) konnten jedoch zeigen, dass die humanen Langerhansschen Inseln während ihrer Entwicklung verschiedene Organisationsstufen durchlaufen. Aus wenigen beta-Zellen bestehende Inseln bilden, während der Morphogenese, zunächst den Manteltyp (Inseln mit einem Durchmesser von bis zu 60 µm) aus. In ihrer weiteren Reifung gehen diese in den Mosaiktyp (Inseln mit einem Durchmesser von bis zu 300 µm) über, zudem steigt die Anzahl der alpha-Zellen mit dem Alter der Inseln an. Weitere Forschungsergebnisse (Farhat *et al.*, 2013) konnten zeigen, dass die Manteltyp Inseln des humanen Pankreas mehr Insulin ausschütten als die Inseln des Mosaiktyps. Dabei scheinen die Inseln des Mosaiktyps nur für die basale Insulinausschüttung verantwortlich zu sein, da diese in *in vitro* Experimenten, im Gegensatz zu den Inseln des Manteltyps, nicht auf eine Erhöhung der Glukosekonzentration im Medium reagierten.

Die Anzahl der Blutgefäße ist im endokrinen Pankreas, gegenüber dem exokrinen Teil, um den Faktor 5-7 gesteigert. Die Inseln scheinen von innen nach außen durchblutet zu werden, wodurch die beta-Zellen als erstes auf einen neuen Reiz reagieren können (Slack, 1995). Allerdings scheint dies bevorzugt für den Manteltyp zu gelten. Langerhanssche Inseln des Mosaiktyps zeigten hingegen eine stärkere Assoziation der alpha-Zellen mit den Blutgefäßen (Farhat *et al.*, 2013).

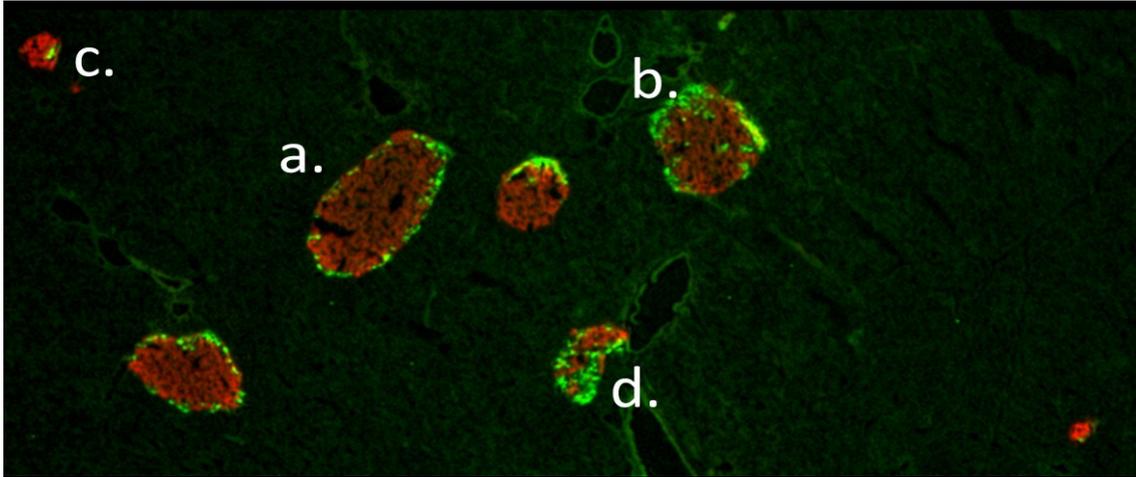


Abbildung 1: Langerhanssche Inseln im Pankreas einer C57BL6-Maus. Auch die Langerhansschen Inseln in murinen Pankreata zeigen verschiedene Organisationsformen. Neben dem bekannten Manteltyp (a.) lässt sich auch der Mosaiktyp (b.) finden. Ebenfalls können alpha-Zell-arme (c.) und -reiche (d.) Inseln beobachtet werden. Alpha-Zellen (grün) und beta-Zellen (rot) wurden durch eine indirekte Antikörperfärbung gegen Insulin und Glukagon detektiert (Benedikt Funk, nicht publizierte Daten).

1.5.2 Die Funktion und Pathophysiologie der pankreatischen beta-Zellen

Der überwiegende Anteil der endokrinen Zellen in den Langerhansschen Inseln wird von den beta-Zellen gebildet. Beta-Zellen nehmen Glukose über Insulin-unabhängige Glukose-Transporter (GLUT1 u. GLUT2) aus dem Blut auf (Liang *et al.*, 1997). Während der Metabolisierung der Glukose steigt die ATP-Konzentration innerhalb der beta-Zellen an, wodurch ATP sensitive Kalium-Kanäle (K_{ATP} Kanäle) geschlossen werden. Das Membranpotential depolarisiert, wodurch spannungsabhängige Calcium-Kanäle geöffnet werden. Der Anstieg der innerzellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) führt zur Freisetzung des Insulins in die Blutbahn (Prentki, 1996). Die Ausschüttung von Insulin wird jedoch auch durch eine Reihe von weiteren Faktoren begünstigt. Hierzu zählen z.B. die gastro-intestinalen Hormone GLP-1 („glukagon-like peptide-1“) und GIP („glucose-dependent insulinotropic peptide“; Creutzfeldt, 2001).

1.6 Insulin und seine Wirkung am Zielgewebe

Das fertig prozessierte Insulin besteht aus der 21 Aminosäuren langen A-Kette und der 30 Aminosäuren langen B-Kette, welche über zwei intermolekulare Disulfidbrücken miteinander verbunden werden. Eine weitere intramolekulare Disulfidbrücke wird innerhalb der A-Kette gebildet. Insulin besitzt ein Molekulargewicht von ca. 6 kDa. In den Vesikeln des Golgi-Apparates wird es zusammen mit Zink gespeichert. Dort bilden sich inaktive Komplexe aus, die aus sechs Insulinmolekülen und zwei Zinkatomen bestehen. Nach der Freisetzung in die Blutbahn dissoziiert dieser Komplex aufgrund einer pH-Wertänderung und es kommt zur Aktivierung des Insulins (Banting und Best, 1922; Derewenda *et al.*, 1989; Gyulhandanyan *et al.*, 2008).

Die postprandiale Insulinsekretion verläuft biphasisch. Bereits wenige Minuten nach der Nahrungsaufnahme kommt es zu einer starken Sekretion gespeicherter Insulinmoleküle. Diese erste Phase der Insulinsekretion dauert ca. 10 Minuten an, erreicht jedoch schon nach 5 Minuten ihren Höhepunkt. Die zweite Phase verläuft bis zur Rekonstitution normglykämischer Zustände, was mitunter mehrere Stunden dauern kann. In dieser Phase werden nicht nur gespeicherte Insulinmoleküle sezerniert, sondern auch neugebildete. Allerdings werden nicht so hohe Insulinkonzentrationen im Blut erzielt wie in der ersten Phase (Rorsman und Renstrom, 2003). Während beider Phasen erfolgt die Insulinsekretion in pulsatilen, kurzen Schüben. Hierdurch resultiert ein periodischer Abfall der Insulinkonzentration im Blut, wodurch die Insulinsensitivität der Zielzellen verbessert wird (Rorsman *et al.*, 2000; Porksen, 2002).

Zirkulierendes Insulin kann an Insulinrezeptoren (IR) binden. Der Insulinrezeptor gehört zur Familie der Tyrosin Kinase Rezeptoren. Durch alternatives Spleißen des Intron 11 entstehen zwei Genprodukte, das IR-A und das IR-B. Diese werden als Homo- oder Heterodimer zusammengesetzt, indem diese über Disulfidbrücken miteinander verbunden werden (Seino und Bell, 1989). Bindet Insulin an die in den extrazellulären Raum ragenden α -Untereinheiten des Dimers, so kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors. Die intrazellulären β -Untereinheiten treten dabei in Kontakt und

phosphorylieren die Tyrosinreste der jeweils anderen Untereinheit automatisch (Lee und Pilch, 1994). Über die Kinase-Aktivität des Rezeptors werden Scaffold-Proteine, wie z.B. das IRS-1 (Insulin Rezeptor Substrat 1) und das IRS-2 (Insulin Rezeptor Substrat 2), phosphoryliert und somit aktiviert. Diese wiederum aktivieren u.a. die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), welche Phosphatidylinositol (PIP) in der Zellmembran phosphoryliert. Hierdurch werden die Proteinkinase B (PKB) und die Phosphoinositid-abhängige Kinase-1 (PDK1) an die Zellmembran rekrutiert, wo PDK1 PKB phosphoryliert. PKB (auch Akt genannt) ist in vielen Stoffwechselfvorgängen involviert. Hierzu gehören der Einbau von Glukosetransportern (z.B. GLUT4) in die Zellmembranen (hauptsächlich Skelettmuskel und Fettgewebe), die Glykogensynthese, die Lipogenese und die Hemmung der hepatischen Glukoneogenese (siehe Abb. 2; Alessi und Cohen, 1998; Pansuria *et al.*, 2012). Durch die Bindung des Insulins an den Insulinrezeptor werden noch zwei weitere große Signalwege beeinflusst, der Cbl/CAP- und der MAP-Kinase-Signalweg (mitogen activated protein kinase). Der Cbl/CAP-Signalweg reguliert unabhängig von PKB die Translokation von Glukosetransportern in die Zellmembranen. Der MAP-Kinase-Weg reguliert das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung (Avogaro *et al.*, 2010).

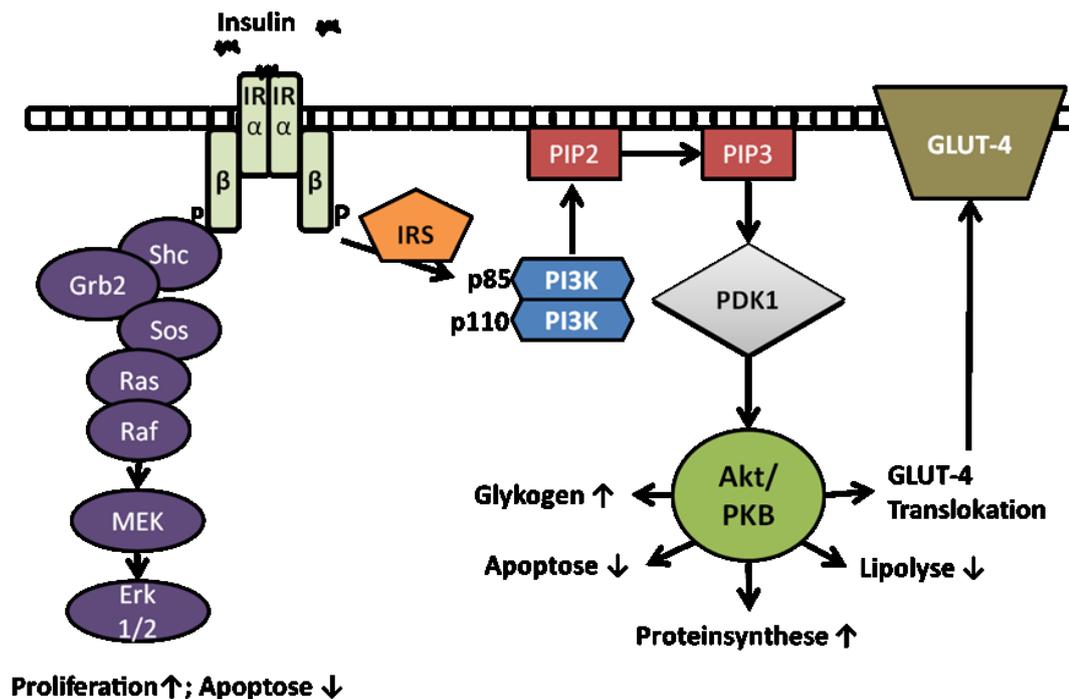


Abbildung 2: Wirkung des Insulins über den PI₃K/PKB-Signalweg: Die Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor führt zu einer Änderung seiner räumlichen Struktur, die Autophosphorylierung des Rezeptors führt unter anderem zur Aktivierung des PI₃K/PKB- und des MAP-Kinase-Signalwegs. Der PI₃K/PKB-Signalweg führt zur Phosphorylierung von Tyrosinresten der Insulin Rezeptor Substrate (IRS), die wiederum die p85 Untereinheit der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) phosphorylieren, wodurch die Untereinheiten p85 und p110 dimerisieren. Hierdurch werden Phosphatidylinositol Trisphosphate (PIP₃) gebildet, die die Proteinkinase B (PKB, auch Akt genannt) und die Phosphoinositid-abhängige Kinase-1 (PDK1) an die Zellmembran rekrutieren, wo PDK1 nach Aktivierung PKB phosphoryliert. Aktives PKB führt u.a. zur Translokation von GLUT-4 in die Zellmembran, hat genregulatorische Effekte, wirkt der Apoptose entgegen, fördert die Glykogensynthese und die Lipogenese. Körperliche Betätigung und/oder Adiponektin führen ebenfalls zur Phosphorylierung von Insulin Rezeptor Substraten und somit zur Aktivierung des PI₃K/PKB-Signalweges. Der MAP-Kinase-Weg reguliert das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung. IRS: insulin Rezeptor Substrat, PIP₂: Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat, PIP₃: Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphat, PDK1: Phosphoinositid-abhängige Kinase-1, PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase, PKB: Protein Kinase B, eNOS: endothele Stickstoffoxid Synthase, GLUT4: Glukose Transporter 4, AMP: Adenosin Monophosphat, ATP: AdenosinTriphosphate, AMPK: 5'-Adenosin Monophosphat-aktivierte Protein Kinase, TSC1/2: Tuberöses Sklerose Protein 1 and 2- Tumor Suppressor, Shc: Src homology 2 domain containing transforming protein, Grb2: growth factor receptor-bound protein 2, Sos: son of sevenless, MAPK: Mitogen-aktivierte Protein Kinase, MEK: Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase, Erk1/2: extracellular signal-regulated kinase1/2. (nach Pansuria *et al.*, 2012).

1.6.1 Mechanismen der Insulinresistenz im Allgemeinen

Unter der Insulinresistenz wird im Allgemeinen ein vermindertes Ansprechen der Zielgewebe (Skelettmuskel, Fettgewebe und Leber) auf Insulin verstanden (DeFronzo, 1988). Sie gilt als einer der primären pathologischen Faktoren des Typ 2 Diabetes mellitus (Reaven, 1995). Sie kann als erstes Symptom während der Manifestation eines Diabetes festgestellt werden. Die bei Diabetikern beobachtete Hyperglykämie wird u.a. durch diese verursacht (Kahn, 2003; Schinner *et al.*, 2005).

Die Ausbildung einer Insulinresistenz wird durch genetische Prädispositionen (z.B. Foxo1a, PKB, IRS-2, TCF7L2) begünstigt. In Verbindung mit einer hochkalorischen Ernährung und durch ein Missverhältnis von insulinantagonistisch wirkenden Stresshormonen (z.B. Katecholamine und Cortisol), Fettsäuren und/oder Adipozytokinen (TNF α , Resistin, IL-6 etc.) zu Insulin kann die Insulinresistenz letztendlich hervorgerufen werden (siehe auch Tabelle 1). Es wird diskutiert ob auch die endogene und therapeutisch induzierte Hyperinsulinämie zur Insulinresistenz beiträgt (Bratusch-Marrain und Waldhäusl, 1987; DeFronzo, 1988; Gonzales *et al.*, 2008; Waldhäusl und Roden, 2000).

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen vermehrt durch die oxidative Phosphorylierung während der anaeroben Glykolyse, der Glukose Autooxidation und der Metabolisierung von Hexosaminen. Diese Faktoren werden durch die bei Diabetikern chronisch auftretende Hyperglykämie begünstigt und führen zu einem Phänomen, das als Glukosetoxizität bekannt ist. Die Glukosetoxizität führt bei pankreatischen beta-Zellen zu einer reduzierten Insulinproduktion und Sekretion. Dies scheint auf genregulatorischer Ebene stattzufinden und wird vermutlich durch Defekte in der posttranskriptionellen Prozessierung der mRNA des Pankreas Duodenum Homeobox-1 (PDX-1) verursacht (Robertson *et al.*, 2003). Die Glukosetoxizität scheint zudem für die mikrovaskulären Begleiterscheinungen des Diabetes verantwortlich zu sein (Waldhäusl *et al.*, 2004).

Die Insulinresistenz könnte als ein Abwehrmechanismus gegen die Überernährung der Zellen gedeutet werden, dessen Metabolisierung mit der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), insbesondere von Superoxiden, einhergeht. So zeigen Tiermodelle und Zellkulturen, an denen verschiedene Aspekte der Insulinresistenz untersucht werden, eine Gemeinsamkeit - Die Erhöhung der mitochondrialen Superoxid-Dismutasekonzentration. Dass die Insulinresistenz durch mitochondriale Entkoppler, Inhibitoren der Elektronentransportkette und mitochondriale Superoxiddismutase-Mimetika aufgehoben werden kann, spricht ebenfalls für die Insulinresistenz als Schutzmechanismus gegen oxidativen Stress (Hoehn *et al.*, 2009).

Tabelle 1: Ursachen der Insulinresistenz (Auswahl; Waldhäusl *et al.*,2004 und Schinner *et. al* 2005)

Ursachen einer Insulinresistenz	Mediatoren der Insulinresistenz
Insulinantagonistische Hormone	Katecholamine Cortisol Wachstumshormon Glukagon
Hyperosmolarität	Dehydratation
Adipositas	Gestörte Sekretion von Adipokinen (u.a. Adiponektin, TNF α , Resistin, Interleukin-6). Freie Fettsäuren
Rezeptordefekte	Rezeptorantikörper Rezeptormangel
Rezepter-Downregulation	Hyperinsulinämie
Iatrogen/ Medikamentenbedingt	Glukokortikoide, Kontrazeptiva
Genetische Prädisposition	z.B. Polymorphismen/ Mutationen in den Genen für Foxo1a, IRS-2, PKB, TCF7L2

1.6.2 Gewebebezogene Insulinresistenz

Fettgewebe:

Das Fettgewebe schüttet Adipozytokine wie Leptin, TNF- α , Resistin und Interleukin-6 (IL-6) aus. Viele dieser Moleküle wirken insulinantagonistisch (TNF- α , IL-6 und Resistin). Die Ausschüttung des Insulin-agonistisch wirkenden Leptins könnte zum Gegenteiligen führen, wenn eine Adipositas/Insulinresistenz nicht auch oft mit einer Leptinresistenz einhergehen würde. Kommt es zu einer dysregulierten Ausschüttung dieser Faktoren, wird die Reaktion des Körpers auf Insulin modifiziert (Guerre-Millo, 2004). Ist die Fettspeicher-Kapazität der weißen Adipocyten überschritten, so wird Fett auch in den übrigen, nicht für die Fettspeicherung vorgesehenen Zellen (z.B. Leber, Muskel und beta-Zellen) angereichert. Da diese nicht auf die Lagerung von FFAs spezialisiert sind, kommt es vermehrt zur Bildung von schädlichen Lipid-Intermediaten (Diacylglycerine, Ceramide etc.). Diese können sich negativ auf die Zellfunktion und Zusammensetzung auswirken (Summers, 2006). Ein Phänomen, das als Lipotoxizität bekannt ist und, auch wenn die Mechanismen die dazu führen noch nicht hinreichend verstanden sind, zur Apoptose der betroffenen Zellen führen kann (Waldhäusl und Roden, 2000). Das Fettgewebe trägt somit zur Entstehung der Insulinresistenz von Leber und Skelettmuskel bei.

Leber:

Hohe Insulinspiegel unterdrücken bei gesunden Menschen die hepatische Gluconeogenese vollständig (Bratusch-Marrain und Waldhäusl, 1987). Bei Typ 2 Diabetikern kann die hepatische Glukoseproduktion unter diesen Bedingungen jedoch teilweise erhalten bleiben. Somit kann es, trotz einer therapeutischen Hyperinsulinämie, bei fortgeschrittenem Typ 2 Diabetes mellitus zur Nüchternhyperglykämie kommen (Waldhäusl *et al.*, 2004). Es wird des Weiteren diskutiert, ob die dysregulierte hepatische Gluconeogenese durch eine Insulinresistenz der pankreatischen alpha-Zellen verstärkt wird, da Glukagon die Glykogenolyse und Glukoneogenese anregt (Reaven *et al.*, 1987; Baron *et al.*, 1987).

Skelettmuskel:

Bei bestehender Adipositas steigt die Konzentration der FFAs im Blut an. Diese senken die Fähigkeit der Muskulatur Glukose insulinabhängig aufzunehmen und zu verwerten. Gemeinsam mit der dysregulierten hepatischen Gluconeogenese wird die postprandiale Hyperglykämie hierdurch verstärkt (Waldhäusl *et al.*, 2004). Ebenfalls können dysregulierte Adipokine eine Insulinresistenz der Skelettmuskulatur bewirken.

1.7 Physiologie der alpha-Zellen

Obwohl alpha-Zellen die zweit-häufigsten endokrinen Zellen im Pankreas sind, sind diese bei Weitem noch nicht so gut untersucht wie die beta-Zellen. Dies liegt unter anderem daran, dass die technischen Verfahren aus der beta-Zellforschung nur eingeschränkt auf die alpha-Zellforschung übertragbar sind. Zudem ist die Anzahl der alpha-Zellen in den Pankreata der Modellorganismen (Maus und Ratte) stark limitiert (Quoix *et al.*, 2007).

Die primäre Aufgabe der alpha-Zellen ist die Sekretion des Insulin-antagonistisch wirkenden Glukagons als Reaktion auf eine Hypoglykämie. Hierdurch wird die hepatische Gluconeogenese stimuliert, wodurch Glukose aus der Leber in die Blutbahn freigesetzt wird. Eine dysregulierte Glukagonsekretion kann daher die bei Diabetikern auftretende Hyperglykämie zusätzlich verstärken (Nadal *et al.*, 1999; Quesada *et al.*, 2006; Dunning *et al.*, 2005).

Pankreatische alpha-Zellen sind, im Gegensatz zu beta-Zellen, nicht in Clustern organisiert und reagieren daher autonom auf einen Reiz (Ahren, 2000). Sie nehmen Glukose über SLC2A1-Transporter (hoch affin, doch niedrige Kapazität) auf. Das durch den Abbau der Glukose entstehende Verhältnis von ATP zu ADP ist entscheidend für die Reaktion der alpha-Zelle. Niedrige Glukosespiegel führen zu einer moderaten Aktivierung von ATP-abhängigen Kalium-Kanälen, wodurch ein Membranpotential (-60 mV) erzielt wird, bei dem sich spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle des T- und N-Typs, sowie spannungsabhängige Na^{+} -Kanäle öffnen (MacDonald *et al.*, 2007).

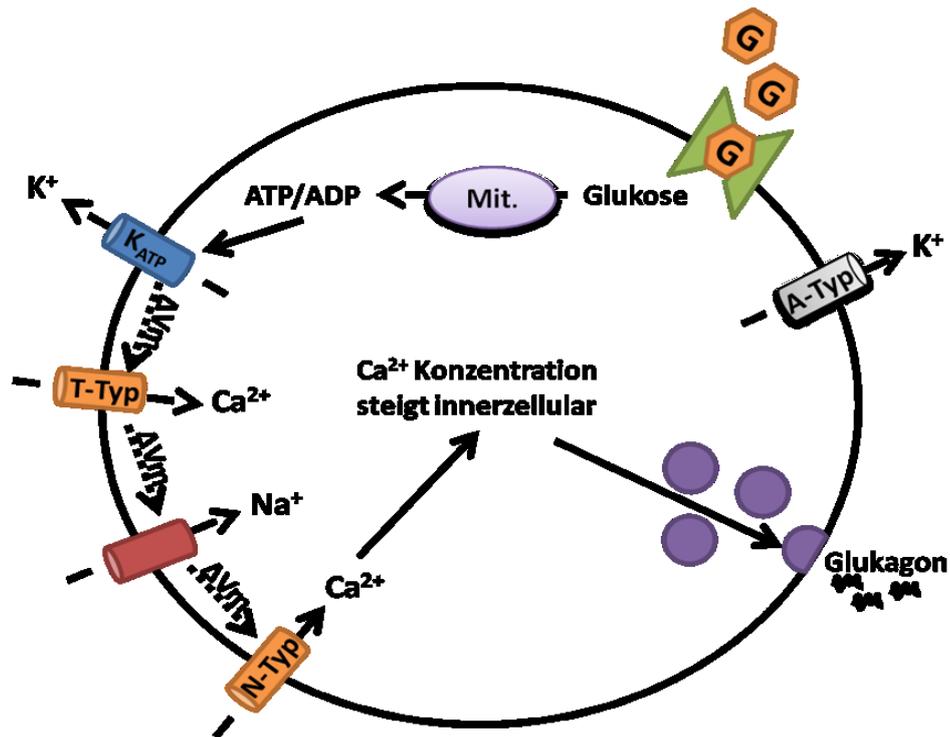


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Glukagonsekretion von murinen pankreatischen alpha-Zellen: Niedrige Glukosespiegel führen zu einer moderaten Aktivierung von ATP-abhängigen Kalium-Kanälen, wodurch ein Membranpotential (-60 mV) erzielt wird, bei dem sich spannungsabhängige Ca²⁺- und Na⁺-Kanäle öffnen. Durch den Anstieg der intrazellulären Na⁺- und Ca²⁺-Konzentration kommt es zur Depolarisation der Zellmembran und in Folge dessen zur Freisetzung von Glukagon in die Blutbahn. Dieser Vorgang wird durch hohe Glukosekonzentrationen im Blut verhindert. Für eine detailliertere Erklärung der involvierten Vorgänge siehe Text oben; G = Glukose, Mit. = Mitochondrium (nach MacDonald et al., 2007).

Durch den Anstieg der intrazellulären Na⁺- und Ca²⁺-Konzentration kommt es zu einem Aktionspotential und in Folge dessen zur Freisetzung von Glukagon in die Blutbahn (siehe Abbildung 3; Gromada *et al.*, 2004; MacDonald *et al.*, 2007). Die anschließende Öffnung von Kalium-Kanälen des A-Typs führt zur Repolarisation der alpha-Zelle (Nadal *et al.*, 1999; Quesada *et al.*, 1999 und 2006). Hohe Glukosespiegel verschieben das ATP/ADP-Verhältnis zugunsten des ATP. Hierdurch werden die ATP-abhängigen Kalium-Kanäle blockiert. In Folge dessen steigt das Membranpotential stärker an, wodurch spannungsabhängige Ionenkanäle inaktiviert werden. Der Ca²⁺-Einstrom und die Glukagonsekretion bleiben aus (Gromada *et al.*, 2004; MacDonald *et al.*, 2007).

Die Glukagongenexpression und -sekretion wird sowohl durch hohe Glukosespiegel als auch durch Insulin gehemmt (Gosmain *et al.*, 2013; Schinner *et al.*, 2005 (2)). Arbeiten mit pankreatischen alpha-Zellen aus Ratten konnten zeigen, dass die Inhibition der Glukagonssekretion von Insulin abhängig ist (Wendt *et al.*, 2004, Franklin *et al.*, 2005, Olsen *et al.*, 2005). Humane und murine alpha-Zellen reagieren schon auf Glukoselevel, bei denen die Insulinsekretion ausbleibt, wie Zellkulturexperimente mit isolierten alpha-Zellen und intakten Langerhansschen Inseln zeigten (MacDonald *et al.*, 2007, Vieira *et al.*, 2007). Ob eine Regulation der Glukagonssekretion vornehmlich durch Glukose oder parakrine Effekte beeinflusst wird ist wahrscheinlich von den physiologischen Gegebenheiten (Blutzuckerspiegel) abhängig.

Die Regulation der Glukagonssekretion durch Glukose ist vermutlich von der Expression des Insulinrezeptors in den alpha-Zellen abhängig (Diao *et al.*, 2005). Die Stimulierung von INR1-G9 Zellen mit Insulin führte zur Aktivierung der Phosphoinositid-abhängigen Kinase-1 (PKC1) und unterdrückte die Freisetzung des Glukagons (Gosmain *et al.*, 2013; Kaneko *et al.*, 1999; Schinner *et al.*, 2005 (2)). Die Glukose- abhängige Glukagonssekretion ist von der Sensitivität der ATP abhängigen Kalium-Kanäle abhängig. Diese wird bei Mäusen durch den Insulinrezeptor-abhängigen PI3K-Signalweg modifiziert (Leung, *et al.*, 2006). Neben diesem Effekt bewirkt Insulin auch die Translokation von GABA-Rezeptoren in die Zellmembran der alpha-Zellen. Diese sprechen hierdurch stärker auf das von den beta-Zellen sezernierte GABA an, wodurch eine Membranhyperpolarisation verursacht und die Glukagonssekretion verhindert wird (Xu *et al.*, 2006).

Während der Freisetzung des Insulins dissoziieren die Insulinhexamere von den beiden Zinkatomen und es kommt zu einer lokalen Erhöhung der Zinkkonzentration. Zink könnte sich ebenfalls auf die alpha-Zellfunktion auswirken (Gyulhandanyan *et al.*, 2008). Studien mit verschiedenen Modellorganismen brachten widersprüchliche Ergebnisse hervor. Zink hemmt die Freisetzung von Glukagon bei Ratten (Ishihara *et al.*, 2003; Franklin *et al.*,

2005), zeigt auf die alpha-Zellen von Mäusen jedoch keinerlei Wirkung (Ravier und Rutter, 2005).

Somatostatin wird neben den pankreatischen delta-Zellen auch von einer Reihe weiterer Zelltypen gebildet und sezerniert. Es ist zugleich ein Inhibitor der Insulin- und Glukagonsekretion (Fehmann *et al.*, 1995). Auf der Oberfläche der pankreatischen alpha-Zellen von Maus, Mensch und Ratte werden überwiegend Somatostatinrezeptoren des Typs 2 (SSTR2) präsentiert (Hunyady *et al.*, 1997; Strowski *et al.*, 2000). Dieser G-Protein gekoppelte Rezeptor vermittelt eine Reihe von intrazellulären Effekten. Elektrophysiologische Studien konnten zeigen, dass die Bindung von Somatostatin an SSTR2 G-Protein gekoppelte Kalium-Kanäle aktiviert und so zu einer Membranhyperpolarisierung führt, wodurch die Freisetzung des Glukagons unterbunden wird (Yoshimoto *et al.*, 1999; Gromada *et al.*, 2001). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich Somatostatin auch direkt auf die Exocytose auswirkt. Durch die Rezeptorvermittelte Aktivierung von Calcineurin werden die sekretorischen Granula der alpha-Zellen entladen (Gromada *et al.*, 2001).

Über einen positiven Feedback-Loop begünstigt die Glukagonsekretion die Freisetzung von weiterem Glukagon. Dies geht mit einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration einher (Ma *et al.*, 2005).

1.7.1 Glukagon und seine Wirkung am Zielgewebe

Proglukagon wird in verschiedenen Zelltypen gebildet. In den pankreatischen alpha-Zellen wird dieses vermutlich durch die Prohormon Konvertase 2 (PC 2) zu Glukagon (Gcg) umgesetzt (Furuta, 1998 und 2001). Es entsteht ein 29 Aminosäuren langes, einzelsträngiges Peptid (Thomsen und Kristiansen, 1972). Pankreatische alpha-Zellen reagieren auf eine Hypoglykämie durch eine vermehrte Freisetzung von Glukagon. Über den Blutkreislauf gelangt das Glukagon an seine Bestimmungsorte, wozu die Leber, die Nieren, der Pankreas, die glatte Muskulatur des Intestinaltraktes, das Gehirn und das Herz zählen (Quesada *et al.*, 2008). Glukagon gehört somit zur Klasse der endokrin wirkenden Hormone.

An den Zielgeweben bindet das Glukagon an den Glukagonrezeptor (Gcgr). Dieser besteht bei Ratten und Mäusen aus 485 Aminosäuren und gehört zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Jelinek und Rosenberg, 1993; Mayo *et al.*, 2003). Die Signaltransduktion erfolgt zum einen über die Aktivierung von Adenylatcyclasen und den damit verbundenen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration (cyclisches Adenosin Mono-Phosphat). Zum anderen wird der Proteinkinase A (PKA) Signalweg aktiviert und es kommt zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (Jelinek und Rosenberg, 1993; Wakelam und Murphy, 1986; Mayo *et al.*, 2003).

Die wichtigste Funktion des Glukagons ist die Stimulierung der hepatischen Gluconeogenese. Nach Rezeptorbindung wird u.a. der Transkriptionsfaktor CREB (cAMP response element-binding protein) und der nachgeschaltete PPARGC1A (peroxisome proliferator-activated receptor g-coactivator-1) aktiviert. Diese stimulieren die Expression der für die Gluconeogenese verantwortlichen Schlüsselenzyme, wozu die Glukose-6-Phosphatase (G6PC) und die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PCK2) zählen (Herzig *et al.*, 2001, Yoon *et al.*, 2001). Zugleich führt Glukagon zu einer Senkung der intrazellulären Spiegel des Fruktose-2,6-Bisphosphates (F(2,6)P₂), welches ein allosterischer Inhibitor der Fruktose-1,6-Bisphosphatase (FBP1) ist. Diese drei Enzyme bestimmen die Rate der Gluconeogenese maßgeblich. Die Aufgabe der PCK2 ist die Umwandlung von Oxalacetat in Phosphoenolpyruvat, G6PC bildet Glukose aus Glukose-6-Phosphat und FBP1 wandelt Fruktose-1,6-Bisphosphat in Fruktose-6-Phosphat um (Kurland und Pilkis, 1995).

Glukagon wirkt sich auch negativ auf die hepatische Glykolyse aus, denn durch die Senkung der intrazellulären Level des Fruktose-2,6-Bisphosphates wird ebenfalls die Aktivität der Phosphofruktokinase 1 (PFKM) herabgesetzt. Zudem werden durch Glukagon die Pyruvatkinase Spiegel gesenkt (Slavin *et al.*, 1994). Die Metabolisierung des Glykogens wird hauptsächlich über die Aktivität der Glykogensynthase (GS) und der Glykogenphosphorylase (GP) bestimmt. Glukagon bewirkt die Phosphorylierung und die damit verbundene Aktivierung der GP, zudem bewirkt es die Umwandlung der GS in eine inaktive Form (Band und Jones, 1980; Ciudad *et al.*, 1984; Andersen *et al.*, 1999).

Bei Gesunden wirkt Glukagon daher einer Hypoglykämie entgegen und stellt die Glukoseversorgung der Körpers, insbesondere die des Gehirns, sicher. Bei Patienten des Typ 2 Diabetes mellitus kann, trotz Insulintherapie, häufig eine Hyperglykämie bei gleichzeitiger Hyperglukagonämie, beobachtet werden. Ein Umstand der vermutlich auf eine Insulinresistenz der pankreatischen alpha-Zellen zurückzuführen ist (Reaven *et al.*, 1987; Baron *et al.*, 1987). Ein Beweis hierfür fehlt jedoch bis heute.

1.8 GLP-1 (Glucagon-like-peptide 1)

Zusammen mit dem glukoseabhängigen insulinotropen Peptid (GIP) bildet GLP-1 die Klasse der Inkretine (Intestinale Sekretion von Insulin = Inkretin). Inkretine führen bei oraler Glukoseaufnahme zu einer stärkeren Insulinsekretion als es eine intravenöse Darreichung von Glukose bewirkt. Dieses Phänomen wird als Inkretin Effekt bezeichnet (McIntyre *et al.*, 1964; Wajchenberg, 2007).

Proglukagon wird auch in den intestinalen L-Zellen des Darms gebildet, welche überwiegend im distalen Ileum und Colon lokalisiert sind. Dort wird es, vermutlich durch die Prohormon Konvertasen 1 und 3 (PC1/3), zu zwei verschiedenen Molekülen umgesetzt, dem GLP-1 (7-36) Amid und dem GLP-1 (7-37). Diese beiden Moleküle zeigen die gleichen biologischen Funktionen, allerdings wird der überwiegende Anteil des zirkulierenden GLP-1 vom GLP-1(7-36) Amid gebildet (Orskov *et al.*, 1993 und 1994). Die Peptidhormone werden nach der Nahrungsaufnahme in die Blutbahn sezerniert, wo sie ihre Funktion in der Regulation der Glukosehomeostase erfüllen (Kieffer *et al.*, 1999; Baggio *et al.*, 2007). Die Moleküle haben eine Halbwertszeit von wenigen Minuten, bevor diese von der Dipeptidyl-Peptidase-4 (DPP-4 oder CD 26) proteolytisch gespalten werden (Kieffer *et al.*, 1995).

Zu den wichtigsten biologischen Funktionen des GLP-1 gehören die Stimulierung der Glukose-abhängigen Insulinsekretion und Biosynthese (PI3K/PDX-1-abhängig; Buteau *et al.*, 1999; Stoffers *et al.*, 2000) und die Hemmung der Glukagonsekretion (direkt, oder indirekt über Insulin; Drucker, 2001). Zudem spielt es eine Rolle in der Nahrungsassimilation, da es die Magenentleerung hemmt und ein Sättigungsgefühl hervorruft (Drucker, 2001).

Exendin-4 ist ein GLP-1 Analogon, das aus dem Speichel der Gila-Krustenechse (*Heloderma suspectum*) isoliert werden kann. Obwohl es nur eine 53 %ige Sequenzhomologie (Kieffer *et al.*, 1999) zum nativen GLP-1 besitzt, bindet es hochaffin an den G-Protein gekoppelten GLP-1 Rezeptor und entfaltet dabei eine vergleichbare Glukose-regulatorische Wirkung wie das Originalsubstrat (Neumiller, 2009; Wajchenberg, 2007). Zudem fördert es die beta-Zell-Proliferation, wie anhand von Zelllinien *in vitro* und im Tiermodell *in*

vivo gezeigt werden konnte (Arakawa *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2008). Da Exendin-4 nicht durch DPP-4 degradiert wird, besitzt es eine längere Halbwertszeit als GLP-1 und wird daher als Antidiabetikum eingesetzt. GLP-1 Rezeptoragonisten verbessern die Blutzuckereinstellung und es wird diskutiert, ob sie bei Typ 2 Diabetikern helfen, während des progressiven Fortschritts ihrer Erkrankung, die beta-Zellfunktion möglichst lange aufrechtzuerhalten (Liu *et al.*, 2008). Dies ist jedoch *in vivo* bislang nicht belegt.

1.9 Zielsetzung

Die Rolle der pankreatischen beta-Zellen in der Pathogenese des Typ 2 Diabetes mellitus wird vielfach untersucht, wenn auch nicht vollends verstanden. Obwohl die alpha-Zelle der zweit-häufigste endokrine Zelltyp im Pankreas ist und durch die Ausschüttung des Hormons Glukagon den direkten Antagonisten der Insulin-produzierenden beta-Zelle darstellt, wurde deren Funktionen weniger intensiv erforscht.

Während der Manifestation eines Diabetes mellitus nimmt initial die Anzahl der pankreatischen beta-Zellen im Pankreas zu. Dieser Umstand geht auf einen erhöhten Insulinbedarf des Körpers zurück. Bei Typ 2 Diabetikern besteht trotz erhöhter Insulinspiegel eine Hyperglukagonämie, die zur Hyperglykämie beiträgt. Daher wird eine Insulinresistenz bei pankreatischen alpha-Zellen vermutet (Reaven, *et al.*, 1987 und Baron, *et al.*, 1987), jedoch bisher nicht *in vivo* untersucht.

Exendin-4 stellt ein therapeutisches Analogon zum intestinalen Glucagon-like peptid-1 (GLP-1) dar. Es fördert die Insulinfreisetzung und hemmt gleichzeitig die Freisetzung des Glukagons. Seine Eigenschaften machen Exendin-4 zu einem Therapeutikum, um die u.a. durch eine Hyperglukagonämie hervorgerufene Hyperglykämie zu behandeln. Ob es eine alterabhängige Wirkung von GLP-1 auf alpha-Zellen gibt, ist nicht bekannt.

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es, die Auswirkung von metabolischen Parametern (Adipositas, mit einhergehender Hyperinsulinämie und Hyperglykämie) auf die pankreatische alpha-Zellfunktion und Masse, in jungen und alten Organismen, zu untersuchen. Dabei untersuchten wir die Hypothese, ob es eine altersabhängige Wirkung von Adipositas auf die Ausbildung einer Insulinresistenz bei murinen alpha-Zellen gibt. Zudem untersuchten wir eine mögliche altersabhängige Wirkung eines GLP-1 Rezeptoragonisten (Exendin-4) auf pankreatische alpha-Zellen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Verbrauchsgüter

2.1.1 Medien und Seren

Medium/ Serum	Bestellnummer	Vertrieb/ Hersteller
Bovines Serum Albumin	A9647-100G	Sigma Aldrich Inc. (Steinheim)
Fetales Kälber Serum (FKS/FBS)	F7524	Sigma Aldrich Inc. (Steinheim)
RPMI 1640 (-Glucose; + L-Glutamine)	11879-020	Invitrogen (Darmstadt)
RPMI 1640 GlutaMAX™	61870-010	Invitrogen (Darmstadt)

2.1.2 Radioimmunassay (RIA) und Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Kit	Bestellnummer	Vertrieb/ Hersteller
ELISA Kit for Glucagon	E91266Mu	USCN Life Science (Hubei, PRC)
Glucagon RIA	GL-32K	Merck Millipore (Darmstadt) Crystal Chem Inc.
ultra sensitive mouse insulin	90080	(Downers Grove, IL, USA)

2.1.3 Antikörper

Epitop	Wirt	Art.-Nr.	Hersteller
Alexa Fluor 488 Anti rabbit	Huhn	A21441	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Alexa Fluor 594 Anti Guinea Pig	Ziege	A11076	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Glukagon	Kaninchen	PA5-16372	Pierce (Rockford, IL, USA)
Insulin	Meerschweinchen	ab7842	Abcam (Cambridge, UK)

2.1.4 Chemische und biologische Reagenzien

Reagenz	Bestellnummer	Vertrieb/ Hersteller
Aceton	5025.2	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Antibody Diluent	S3022	Dako (Hamburg)
Aprotinin	616370-10MG	Merck Millipore (Darmstadt)
D-(+)-Glucose	G7528-250G	Sigma Aldrich Inc. (Steinheim)
Ethanol	20821.330	VWR Chemicals (Darmstadt)
Ethylen-Diamin- Tetra-Essigsäure	E5134	Sigma Aldrich Inc. (Steinheim)
Exendin-4	1933	Tocris Bioscience/ bio-techne (Minneapolis, USA)
HBSS Puffer (+Ca; +Mg)	H15-007	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
Insulin (Actrapid®)	04091407	Novo Nordisk (Bagsvaerd, Dänemark)
Natrium Chlorid (NaCl)	S1679-500G	Sigma Aldrich Inc. (Steinheim)
Natrium Deoxycholat	D6750-10G	Sigma Aldrich Inc. (Steinheim)
Natrium Orthovanadat (Na ₃ VO ₄)	450243-10G	Sigma Aldrich Inc. (Steinheim)
Natriumfluorid (NaF)	S7920-100G	Sigma Aldrich Inc. (Steinheim)
ProLong® Gold antifade reagent with DAPI	P36931	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Salzsäure (HCL)	1.00317.1000	Merck Millipore (Darmstadt)
Schweine Serum (Normal)	X0901	Dako (Hamburg)
Tergitol® Lösung (NP-40)	NP40S-100ML	Sigma Aldrich Inc. (Steinheim)
Tris (Pufferan®)	5429.3	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
TWEEN® 20	P7949-100ML	Sigma Aldrich Inc. (Steinheim)

2.1.5 Geräte

Gerät	Bestellnummer/ Artikelname	Vertrieb/ Hersteller
Analysewaage	VIBRA	Drexel (Hannover)
Autoklav	3850 ELC	Tuttnauer Systec (Breda, NL)
Contour Blutzuckermessgrät	82723456	Bayer Vital GmbH (Leverkusen)
Eismaschine	SPR 80	NordCap (Erkrath)
Feinwaage	AE 166	Mettler (Gießen)
Inkubator	HERA cell	Heraeus (Hanau)
Microtom	FRIGOCUT 2800 E	Reichert-Jung (Buffalo, USA)
Sunrise (ELISA Reader)	F039300	Tecan Austria GmbH (Grödig/ Salzburg, Österreich)
Zentrifuge	Biufuge pico	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge	Rotixa/RP	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)
Zentrifuge	5810 R	Eppendorf AG (Hamburg)
Thermomixer compact	5355	Eppendorf AG (Hamburg)

2.1.6 Verbrauchsgüter

Verbrauchsgut	Bestellnummer	Vertrieb/ Hersteller
15 ml Tubes	188 271	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
50ml Tubes	227 261	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Borosilikattubes 75x12,00x0,8-1,0 mm	212-0028	VWR International (Darmstadt)
Contour Blutzuckersensoren	06707326	Bayer Vital GmbH (Leverkusen)
COSTAR® STRIPETTE® 10 ml	4488	Corning Inc. (New York, USA)
COSTAR® STRIPETTE® 25 ml	4489	Corning Inc. (New York, USA)
COSTAR® STRIPETTE® 5 ml	4487	Corning Inc. (New York, USA)
DAKO Pen	S2002	Dako (Hamburg)

Verbrauchsgut	Bestellnummer	Vertrieb/ Hersteller
Injekt® 2 ml	4606027V	Braun (Melsungen)
Microvette 500 K3E	20.1341	Sarstedt (Nümbrecht)
Mikropipetten Blaubrand intraMARK	7087 28	Brand GmbH + CO KG (Wertheim)
Objektträger (~76x26x1 mm)	08 100 00	Marienfeld GmbH &Co.KG (Lauda Königshofen)
Omnican® 50	9151117	Braun (Melsungen)
Omnifix® 20 ml Luer Lock Solo	4617207V	Braun (Melsungen)
Pipettenspitzen 10 µl, TipOne® steril	S1121-3810	STARLAB GmbH (Ahrensburg)
Pipettenspitzen 1000 µl, TipOne®	S1111-6700	STARLAB GmbH (Ahrensburg)
Pipettenspitzen 1000 µl, TipOne® steril	S1122-1830	STARLAB GmbH (Ahrensburg)
Pipettenspitzen 20 µl, TipOne®	S1110-3700	STARLAB GmbH (Ahrensburg)
Pipettenspitzen 200 µl, TipOne®	S1111-1700	STARLAB GmbH (Ahrensburg)
Pipettenspitzen 200 µl, TipOne® steril	S1120-8810	STARLAB GmbH (Ahrensburg)
Reaktionsgefäß 1,5 ml	0030 121.589	Eppendorf AG (Hamburg)
Reaktionsgefäß 1,6 ml, steril	710290	Biozym Scientific GmbH (Oldendorf)
TipOne® Repeat 12,5 ml Dispenser	S4778-1250	STARLAB GmbH (Ahrensburg)
TipOne® Repeat 5 ml Dispenser	S4776-0500	STARLAB GmbH (Ahrensburg)
Whatman® Filter Unit, 0,2 µm	10 462 200	GE Healthcare (Chalfont St Giles, Buckinghamshire, UK)
Zellkulturplatten, 94x16 mm	633 171	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Cryomold 10x10x5 mm	4565	Sakura Finetek Germany GmbH (Staufen)
Tissue Tek®	4583	Sakura Finetek Germany GmbH (Staufen)

2.2 Tierexperimentelle Methoden

2.2.1 Exendin-4 Behandlung

Die Tierversuchsgenehmigung wurde beantragt und lag vor (Aktenzeichen 8.84-02.05.20.11.091). Die Versuchstiere (C57BL6, bei Start 6 Wochen oder 8 Monate alt) bekamen über einen Zeitraum von 21 Tagen täglich 10 nM Exendin-4/g Körpergewicht (KG) intraperitoneal injiziert. Hierfür wurde eine Exendin-4 Lösung (2000 nM in ddH₂O) hergestellt und bis zur Verwendung in 1 ml Aliquots bei -20°C gelagert. Die Tiere der respektiven Kontrollgruppe wurden analog hierzu mit einer 0,9 %igen Kochsalzlösung behandelt, deren Injektionsvolumen dem der Exendin-4 Lösung bei einem spezifischen Gewicht entsprach.

g KG	Injektionsvolumen	g KG	Injektionsvolumen
20	100,0	31	155,0
21	105,0	32	160,0
22	110,0	33	165,0
23	115,0	34	170,0
24	120,0	35	175,0
25	125,0	36	180,0
26	130,0	37	185,0
27	135,0	38	190,0
28	140,0	39	195,0
29	145,0	40	200,0
30	150,0		

Tabelle 2: Gewichtsspezifische Injektionsvolumina der 2000 nM Exendin-4 Lösung zur täglichen Behandlung von C57BL6 Mäusen.

2.2.2 Adipositasinduktion

Die Tierversuchsgenehmigung wurde beantragt und lag vor (Aktenzeichen 8.84-02.05.20.11.091). Die Versuchstiere (C57BL6, bei Start 6 Wochen oder 8 Monate alt) wurden mit einer Hoch-Fett-Diät (DIO D12492, 60 % der Kalorien aus Fett, s. unten) über einen Zeitraum von 8 Wochen *ad libitum* gefüttert, um eine ausgeprägte Adipositas zu entwickeln. Dabei sollten diese in einen prädiabetischen Zustand mit gleichzeitiger Hyperinsulinämie eintreten. Die respektive Kontrollgruppe erhielt über den gleichen Zeitraum eine angepasste Kontrolldiät (DIO D12450J, 10 % der Kalorien aus Fett, s. unten). Die Tiere wurden 2-mal wöchentlich gewogen und mit frischem Futter versorgt. Die aufgezehrte Futtermenge wurde ebenfalls quantifiziert.

Das Futter wurde zunächst für uns von der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH aus Soest hergestellt. Später wurde das Produkt von Research Diets über die Firma Brogaarden (Dänemark) bezogen.

Produkt	DIO D12492		DIO D12450J	
	gm%	kcal%	gm%	kcal%
Proteine	26,2	20,0	19,2	20,0
Kohlenhydrate	26,3	20,1	67,3	70
Fette	34,9	59,9	4,3	10
Total		100		100
kcal/gm	5,24		3,85	
Inhaltsstoffe	gm	kcal	gm	kcal
Casein, 80 Mesh	200	800	200	800
L-Cystin	3	12	3	12
Maisstärke	0	0	506,2	2024,8
Maltodextrin 10	125	500	125	500

Produkt	DIO D12492		DIO D12450J	
	gm	kcal	gm	kcal
Saccharose	68,8	275,2	68,8	275,2
Cellulose, BW200	50	0	50	0
Sojabohnenöl	25	225	25	255
Schmalz	245	2205	20	180
Mineral Mix, S10026	10	0	10	0
Di-Calcium Phosphat	13	0	13	0
Calcium Carbonat	5,5	0	5,5	0
Kalium Citrat, 1 H ₂ O	16,5	0	16,5	0
Vitamin Mix, V10001	10	40	10	40
Cholin Bitartrat	2	0	2	0
FD&C Blue Dye #1	0,00		0,01	
FD&C Yellow Dye #5	0,05		0,04	
Total	773,85	4057	1055,5	4057

Tabelle 3: Zusammensetzung der verschiedenen, in den Versuchen verwendeten, Spezial-Diäten.

2.2.3 Durchführung eines intraperitonealen Glukosetoleranztest bei Mäusen

1. Die Versuchstiere werden am Vortag nüchtern gesetzt, so dass mindestens 12 Stunden lang eine Nahrungskarenz besteht. Trinkwasser steht den Tieren uneingeschränkt zur Verfügung.
2. Den Tieren sollen jeweils 1,5 mg Glukose/g Körpergewicht injiziert werden. Hierfür wird eine 30 %ige Glukoselösung verwendet (Rezept s. unten). Unmittelbar vor dem Versuchsbeginn werden die Tiere gewogen. Anhand der Tabelle (s. unten) werden die gewichtsspezifischen Injektionsvolumina bestimmt und die Spritzen vorbereitet.

3. Für die Gewinnung der basalen Blutproben werden die Schwanzspitzen der Versuchstiere mit einem scharfen Gegenstand (Skalpelli oder Schere) gekappt. Mit den Fingern wird das Blut unter leichtem Druck von der Schwanzwurzel zur Schwanzspitze gedrückt. Der erste Tropfen des Blutes wird verworfen. Der zweite und dritte Tropfen wird für die Blutzuckerbestimmung mit dem Bayer Contour System verwendet. Die weiteren Blutropfen werden, für die Bestimmung des Plasmainsulins, mit einer Micropette (Blaubrand intraMARK, Brand GmbH + CO KG) aufgenommen bis ein Volumen von ca. 40 µl erreicht wird. Das Blut wird anschließend in ein mit Kalium- 3-EDTA (Microvette 500 K3E, Sarstedt) beschichtetes Röhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.
4. Nachdem die basalen Blutproben von allen Versuchstieren gewonnen wurden, wird diesen im Abstand von 2 Minuten die Glukose appliziert. Der Zeitpunkt der intraperitonealen Injektion wird notiert.
5. Wie unter Punkt 3 beschrieben, werden weitere Blutproben ggf. 15, 30, 60 und 120 Minuten nach der Glukoseapplikation entnommen. Ein erneutes Kappen der Schwanzspitze ist nicht nötig.
6. Für eine einfache Bestimmung des Plasmaglukagons werden mindestens 200 µl Vollblut benötigt. Die Proben sollen doppelt bestimmt werden. Die Gewinnung von 400 µl Vollblut aus dem lebenden Versuchstier stellt einen erheblichen Blutverlust dar. Dieser würde sich zum einen, negativ auf den Blutzuckerstoffwechsel auswirken und zum anderen, ein erhebliches Leid für das Versuchstier darstellen. Daher können solch große Blutvolumina nur aus toten Mäusen gewonnen werden. Blutproben für die Glukagonmessung werden zu den Zeitpunkten 0, 30 und 120 Minuten gesammelt. Hierfür werden die Tiere unmittelbar vor dem jeweiligen Zeitpunkt mit CO₂ euthanasiert und anschließend auf einem Steckbrett, dorsal liegend, fixiert. Das Blut wird durch transthorakale, intraventrikuläre Punktion gewonnen und nach der Entnahme in Kalium 3 EDTA (Microvette 500 K3E, Sarstedt) beschichtete Röhrchen überführt. Die Proben werden bis zur Aufarbeitung auf Eis gelagert.
7. Die Blutproben (Insulin und Glukagon) werden für 5 Minuten bei 4000 upm und 10°C zentrifugiert. Die Blutplasmen werden in 1,5 ml Reaktionsgefäße

überführt. Für die finale Insulinmessung werden aus den Glukagonproben 20 µl des Plasmas entnommen. Anschließend werden die Glukagonproben mit Aprotinin behandelt (finale Konzentration 500 KIU). Alle Proben werden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert und sollten innerhalb von 1. Monat ausgewertet werden.

30 % (w/v) Glukoselösung

30 g Glukose

ad 100 ml ddH₂O

Die Lösung wird durch einen 10 µm Filter gepresst und hierdurch sterilisiert.

1,5 mg Glukose/g KG			
Gewicht in g	µl 30 % Glukose	Gewicht in g	µl 30 % Glukose
15	75,0	36	180,0
16	80,0	37	185,0
17	85,0	38	190,0
18	90,0	39	195,0
19	95,0	40	200,0
20	100,0	41	205,0
21	105,0	42	210,0
22	110,0	43	215,0
23	115,0	44	220,0
24	120,0	45	225,0
25	125,0	46	230,0
26	130,0	47	235,0
27	135,0	48	240,0
28	140,0	49	245,0
29	145,0	50	250,0
30	150,0	51	255,0

Gewicht in g	µl 30 % Glukose	Gewicht in g	µl 30 % Glukose
31	155,0	52	260,0
32	160,0	53	265,0
33	165,0	54	270,0
34	170,0	55	275,0
35	175,0	56	280,0

Tabelle 4: Gewichtsspezifische Injektionsvolumina einer 30 %igen Glukoselösung für die Durchführung eines ipGTT mit 1,5 mg Glukose pro g Körpergewicht.

2.2.4 Isolation von Langerhansschen Inseln aus murinen Pankreata

1. Pro Pankreas werden 2 ml HBSS-Puffer (mit Ca^{2+} und Mg^{2+}) mit 2 mg Kollagenase (Serva, NB 8) vermengt.
2. Anschließend wird die Lösung steril filtriert (10 µm Filter) und in eine 2 ml Spritze (Braun) aufgenommen. Auf die Spritze wird eine Microlance 3 Kanüle aufgesetzt, welche unmittelbar vor der Verwendung 45° geneigt wird. Bis zur Verwendung wird die Spritze auf Eis gelagert.
3. Pro Pankreas werden 2 ml steriler HBSS-Puffer (mit Ca^{2+} und Mg^{2+}) in ein 50 ml Falcon überführt. Bis zur Verwendung wird das Falcon ebenfalls auf Eis gelagert.
4. Das Versuchstier wird mit CO_2 euthanasiert und anschließend auf einem Steckbrett fixiert.
5. Die ventrale Seite der Maus wird mit Ethanol sterilisiert und das Abdomen geöffnet. Für eine bessere Handhabung wird ebenfalls der Thorax des Versuchstieres entfernt.
6. Als nächstes muss die *Papilla Vateri* mit einer Bulldog-Klemme verschlossen werden.
7. Anschließend wird die Kanüle in den Gallengang eingeführt und die Kollagenaslösung unter leichtem Druck in die Bauchspeicheldrüse appliziert. Der Pankreas dehnt sich hierdurch aus.
8. Das perfundierte Pankreas wird entnommen und in ein 50 ml Falcon mit eiskaltem HBSS-Puffer (mit Ca^{2+} und Mg^{2+}) überführt. Während weitere

- Pankreata entnommen werden erfolgt die Lagerung des entnommenen Gewebes auf Eis.
9. Die perfundierten Bauchspeicheldrüsen werden in ein 37° warmes Heizbad überführt und dort für 16 min inkubiert (die ideale Inkubationszeit muss für jede Charge der Kollagenase neu bestimmt werden). Während der Inkubation werden die Proben mehrmals geschüttelt.
 10. Anschließend wird das Probengefäß mit RPMI-Medium (RPMI1640, Glutamax, 10 % FKS) gefüllt, gut gemischt und 3 min bei 900 upm zentrifugiert
 11. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 20 ml RPMI-Medium (RPMI1640, Glutamax) resuspendiert. Die Suspension wird durch ein 100 µm Zellsieb gefiltert und in einem neuen 50 ml Falcon aufgefangen. Das Sieb wird mit weiteren 20 ml RPMI-Medium gespült.
 12. Das Probengefäß wird erneut für 3 min bei 900 upm zentrifugiert.
 13. Der Überstand wird erneut verworfen. Nun wird das Pellet in 10 ml Histopaque (1077, Sigma Aldrich Inc.) resuspendiert. Vorsichtig wird eine obere Phase aus 13 ml RPMI-Medium (RPMI1640, Glutamax) aufgesetzt.
 14. Die Bremse der Zentrifuge wird deaktiviert und die Proben 45 min bei 1200 upm zentrifugiert.
 15. Mit einer 25 ml Stripette wird die Interphase entnommen und in ein unbenutztes 50 ml Falcon überführt, auf 50 ml mit RPMI-Medium (RPMI1640, Glutamax) aufgefüllt und 3 min bei 900 upm zentrifugiert.
 16. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 20 ml Kulturmedium resuspendiert (RPMI1640, L-Glutamat, Pen/Strep, 10 % FKS (HI), 5 mM Glukose)
 17. Die Suspension wird in eine 10 cm Petrischale überführt.
 18. Die Langerhansschen Inseln werden unter einem Binokular mit Durchsicht bei einer 35-fachen Vergrößerung handsortiert und in ein Well einer 6 Well-Platte, in dem sich 5 ml Kulturmedium befinden, überführt.
 19. Die Inseln werden anschließend erneut handsortiert und in ein neues Well überführt. Dieser Vorgang wird mindestens einmal wiederholt um die Inseln von Überresten des exokrinen Pankreasgewebes zu separieren.
 20. Die Inseln werden zur Regenerierung ün bei 37°Celsius, 5 % $(g)CO_2$ und 95 % $(g)H_2O$ inkubiert.

2.2.5 *in vitro* Stimulierung der Glukagonsekretion von isolierten, murinen Langerhansschen Inseln

1. Nach der Isolation der Langerhansschen Inseln aus murinen Pankreata werden diese zur Regeneration üN bei 37°C, 5 % $_{(g)}$ CO₂ und 95 % $_{(g)}$ H₂O in Kulturmedium (RPMI1640, L-Glutamat, Pen/Strep, 10 % FKS (HI), 5 mM Glukose) inkubiert.
2. Am nächsten Morgen werden die Inseln erneut handsortiert und, mit so wenig Medium wie möglich, in vorgewärmtes (37°C), basales Stimulationsmedium überführt (RPMI1640, L-Glutamat, Pen/Strep, 2 % BSA, 5 mM Glukose). Dieser Schritt wird mind. einmal wiederholt um die Inseln zu waschen.
3. Im basalen Stimulationsmedium werden die Inseln eine Stunde lang bei 37°C, 5 % $_{(g)}$ CO₂ und 95 % $_{(g)}$ H₂O präinkubiert.
4. Anschließend werden die Inseln ein letztes Mal mit vorgewärmtem (37°C), basalen Stimulationsmedium gewaschen.
5. Jeweils 15 Inseln werden mit 100 µl basalem Stimulationsmedium in ein Well einer 96 Well Platte, mit U-förmigem Boden, überführt.
6. Für die Stimulation der Glukagonsekretion kommen entweder 100 µl basales Stimulationsmedium (Kontrolle), 100 µl Stimulationsmedium mit 200 nM Insulin oder 20 nM Exendin-4 pro Well hinzu.
7. Die Inseln werden 4 Stunden lang bei 37°C, 5 % $_{(g)}$ CO₂ und 95 % $_{(g)}$ H₂O stimuliert.
8. Anschließend werden die Inseln mit dem Stimulationsmedium in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, mit 10 µl einer Aprotininlösung versehen (10.000 KIU) und 30 Sekunden bei 2.000 upm zentrifugiert (Heraeus, Biofuge Pico)
9. 150 µl des Überstandes werden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.
10. Die restlichen 50 µl des Mediums verbleiben mit den Inseln im ursprünglichen Reaktionsgefäß. Hierzu wird die Suspension mit 200 µl RIPA-Puffer versehen und anschließend zur Lyse für 30 Minuten bei 37°C und 1400 upm schüttelnd (Eppendorf, Thermomixer compact) inkubiert.

11. Abschließend werden die Insellysate 1 Minute bei 13.000 upm zentrifugiert (Heraeus, Biofuge Pico), 200 µl des Überstandes werden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

RIPA-Puffer

Chemikalie und Ausgangskonzentration	Eingesetztes Volumen in ml	Endkonzentration im Puffer
1 M Tris HCl, pH 7,4	5	0,1 M
2 % Natriumdeoxycholat	12,5	0,5 %
5 M NaCl	3	0,3
0,25 M EDTA	0,4	2 mM
10 % NP-40 (Tergitol)	10	2 %
200 mM Na₃VO₄	0,5	2 mM
1 M NaF	0,1	2 mM
ddH₂O	18,5	

2.3 Histologische Methoden

2.3.1 Kryokonservierung eines murinen Pankreas

1. Das Versuchstier wird mit CO₂ euthanasiert und anschließend auf einem Steckbrett fixiert, so dass die ventrale Seite nach oben zeigt. Diese wird mit Ethanol sterilisiert.
2. Das Abdomen wird geöffnet und der Thorax entfernt.
3. Der Darm des Tieres wird mit einer Pinzette vorsichtig ergriffen. Die Grenzfläche zwischen Darm und Pankreas wird mit einer kleinen Schere durchtrennt. Der Pankreas wird entnommen und in PBS-Puffer überführt.
4. Unter einem Binokular wird der Pankreas untersucht und ggf. von Fremdgewebe befreit. Anschließend wird der Pankreas mit Zellstoff trocken getupft und gewogen.
5. Der Pankreas wird in ein Cryomold (10x10 mm, Sakura) gegeben. Hier wird er in eine kompakte Form gelegt und anschließend mit Tissue Tek (Sakura), blasenfrei, überzogen.
6. Das Cryomold wird mit einer Pinzette ergriffen und in flüssigem Stickstoff gebadet. Danach wird das kryokonservierte Organ in einen Konservierungsbeutel überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.3.2 Immunfluoreszenzfärbung

1. Zunächst werden die kryokonservierten Pankreata mit einem Gefrier-Mikrotom geschnitten (7-9 µm) und es werden jeweils zwei Schnitte auf einem Objektträger platziert. Für die Bestimmung der zelltypspezifischen Massen des Pankreas werden serielle Schnittreihen angefertigt. Hierzu werden jeweils 10 Objektträger, wie oben beschrieben, angefertigt. Danach werden 40 Schnitte (20 Objektträgern entsprechend) verworfen. So wird verfahren bis das Organ komplett geschnitten wurde. Je nachdem wie kompakt sich das Organ im Cryomold befindet, ergeben sich hieraus 6 bis 11 Schnittreihen.

2. Die Objekte werden für 10 min bei RT getrocknet, dann für 10 min bei -20°C in Aceton fixiert und anschließend erneut für 10 min bei RT getrocknet.
3. Die trockenen Objekte werden mit einem Fettstift (DAKO-Pen) umrandet und danach 3-mal für 5 min in TBS und 2-mal für 5 min in TBS-T gewaschen.
4. Die Objekte werden nun für 1 Stunde in TBS mit 5 % NSS bei RT inkubiert, um unspezifischen Proteinbindungen zu blockieren.
5. Beide primären Antikörper (pAB to Insulin, Abcam ab7842, Guinea Pig und Glucagon Antibody, Pierce PA5-16372, Rabbit) werden in Anitbody-diluent (S3022, Dako) verdünnt (Insulin 1/400 und Glukagon 1/250) und auf die Objekte gegeben, Inkubation ün bei 4°C.
6. Die Objekte werden 5-mal für 5 min in TBS gewaschen.
7. Beide sekundären Antikörper (Anti guinea pig IgG Alexa Fluor 594 und anti rabbit IgG Alexa Fluor 488) werden in Anitbody-diluent (S3022, Dako) 1:1500 verdünnt und auf die Objekte gegeben, Inkubation für 1,5 Stunden bei RT.
8. Die Objekte werden abschließend 3-mal für 5 min in TBS gewaschen und dann mit "Prolong Gold antifade reagent with DAPI" (Thermo scientific) und einem Deckgläschen versiegelt.

TBS-Puffer (10fach):

60,57 g TRIS (0,5 M)

87,66 g NaCl (1,5 M)

in 600 ml ddH₂O lösen und pH-Wert mit HCl auf 7,5 einstellen

ad 1000 ml ddH₂O

TBS-T-Puffer (10fach):

60,57 g TRIS (0,5 M)

87,66 g NaCl (1,5 M)

+ 5 ml TWEEN® 20

in 600 ml ddH₂O lösen und pH-Wert mit HCl auf 7,5 einstellen

ad 1000 ml ddH₂O

2.3.3 Bestimmung der pankreatischen alpha- und beta-Zellmasse

1. Pro Schnittreihe wird ein Objektträger für die Zellmassenbestimmung ausgewählt. Auf jedem Objekt werden Insulin- und Glukagon-haltige Zellen durch Immunfluoreszenzfärbungen detektiert. Das weitere Vorgehen wird anhand eines Beispiels erläutert.
2. Die Immunfluoreszenz gefärbten Objekte werden mit dem Keyence BZ9000-E Mikroskop abgelichtet. Hierzu werden die Fluoreszenzkanäle 488 und 594, sowie das 4 er Objektiv ausgewählt. Ebenfalls können beide Fluoreszenzkanäle indirekt übereinander gelegt und abgelichtet werden. Das obere, untere, linke und rechte Ende des Objektes werden einzeln, manuell markiert und fokussiert. Durch die Z-Achsen Synchronisation wird eine einheitliche Schärfe der Aufnahme gewährleistet. Über die Funktion "auto range" wird das gesamte Objekt in Teilaufnahmen zerlegt und abgelichtet. Diese werden durch die Keyence Viewer Software zusammengefügt und abgespeichert. Dabei wird die Größe der Gesamtaufnahme reduziert, um Speicherplatzkonflikte zu minimieren.
3. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgt über die open source Software FIJI (FIJI is just Image J). Hierzu wird zunächst eine Aufnahme ausgewählt und geöffnet. Der Kontrast und die Helligkeit des Objektes werden eingestellt (s. unten).

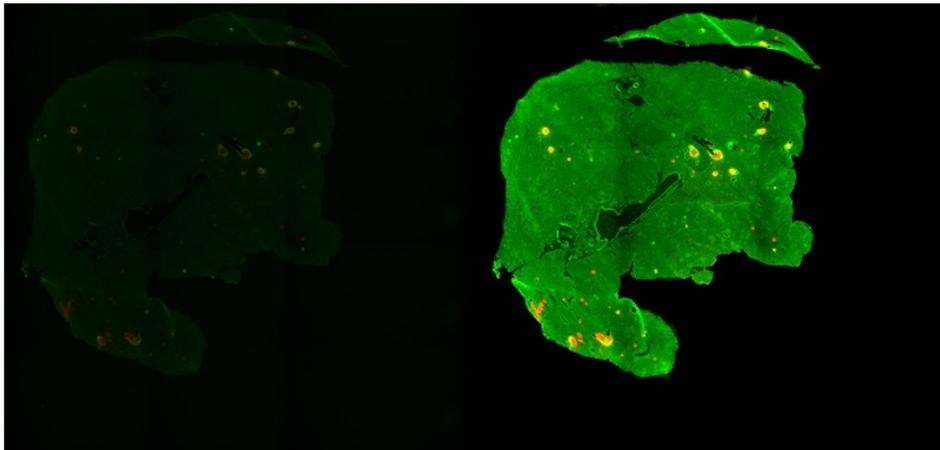


Abbildung 4: Einstellung der Helligkeit und des Kontrastes zur Optimierung der Darstellung für das menschliche Auge. Jeder Bildschirm unterscheidet sich geringfügig in der Darstellung von mikroskopischen Aufnahmen. Für eine bessere Darstellung muss der Kontrast und die Helligkeit manuell für das menschliche Auge optimiert werden.

4. Das Keyence BZ900E ist mit einer leistungsfähigen Kamera ausgestattet, welche Fluoreszenzbilder monochrom aufnimmt. Die Software färbt die Aufnahmen automatisch neu ein und legt diese, wenn gewünscht, übereinander. Über die Funktion "Image >>> color >>> split channels" können die einzelnen Farbkanäle wieder sauber voneinander getrennt werden, was für die weitere Bearbeitung von Vorteil ist.
5. Zunächst wird der grüne Fluoreszenzkanal bearbeitet (s. unten, rechts). Über das "Wand tool" kann ein zusammenhängendes Objektareal (Hintergrundfluoreszenz) von dem unspezifischen Teil der Aufnahme abgegrenzt und vermessen werden. Hierzu wird zunächst, über den Mode "Legacy", eine Toleranz von 50 eingestellt und ein Areal markiert. Anschließend wird die Arealgröße über die Funktion "measure" bestimmt. So werden alle Areale des Pankreasschnittes nach und nach erfasst (s. unten). In der Abbildung unten rechts fällt auf, dass nicht zum Pankreasschnitt gehörende Areale in der Auswahl erfasst wurden. Diese werden anschließend ebenfalls markiert und vermessen. Abschließend werden die unspezifischen Arealflächen von den spezifischen Arealflächen subtrahiert und das tatsächliche Pankreasareal bestimmt.

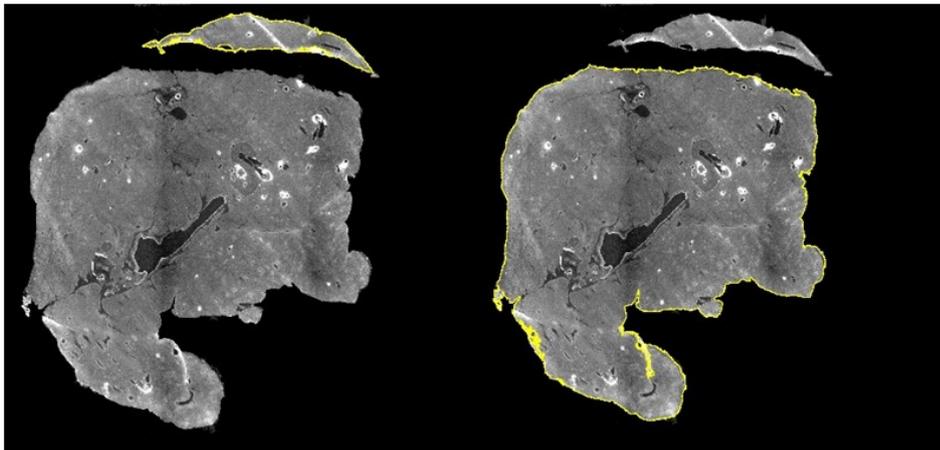


Abbildung 5: Bestimmung der Querschnittsfläche eines murinen Pankreasschnittes. Während des Schnittvorgangs und der Überführung des Objektes auf den Objektträger kann sich das Pankreasgewebe verschieben. Zudem können Hohlräume im Inneren des Pankreasareals vorhanden sein. Daher muss das spezifische Pankreasareal aus einzelnen Teilflächen berechnet werden.

6. Als nächstes wird der rote Fluoreszenzkanal bearbeitet (s. unten). Dieser zeigt fast ausschließlich die Insulin-positiven Areale. Über die Funktion "Image >>> Adjust >>> Threshold" können anhand der Signalstärke spezifisch und unspezifisch gefärbte Bereiche voneinander abgegrenzt werden (s. unten rechts). Nachdem nur die spezifischen Areale markiert sind, wird deren Größe wieder über die Funktion "measure" bestimmt.

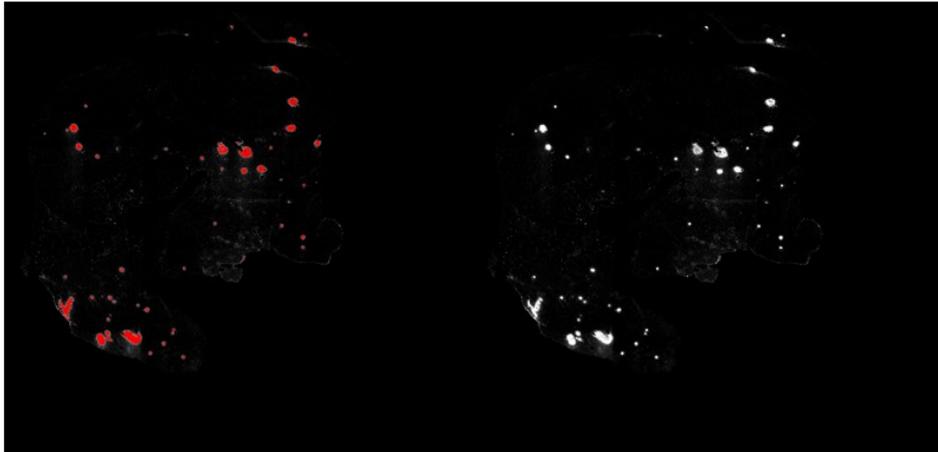


Abbildung 6: Bestimmung der Querschnittsfläche der beta-Zellen. Die durch den Insulinantikörper markierten Areale werden durch einen sekundär Antikörper (Alexa Fluor 594) detektiert. Nachdem die Farbkanäle voneinander getrennt wurden, zeigt der rote Farbkanal fast nur spezifische Insulinsignale an. Die Datei wird von unspezifisch gefärbten Arealen gereinigt. Durch die Funktion "Image >>> Adjust >>> Threshold" wird die Querschnittsfläche der beta-Zellen bestimmt.

7. Die Glukagon-positiven Areale befinden sich ebenfalls im grünen Fluoreszenzkanal der Gesamtaufnahme (s. unten). Um diese zu erfassen werden zunächst alle unspezifisch gefärbten, oder durch Hintergrundfluoreszenz erfassten, Areale im Overlay großflächig entfernt (retangular selection >>> delete). Anschließend werden die Farbkanäle erneut voneinander getrennt. Die spezifisch gefärbten Areale des grünen Fluoreszenzkanals werden ebenfalls Über die Funktion "Image >>> Adjust >>> Threshold" erfasst (s. unten rechts) und vermessen.

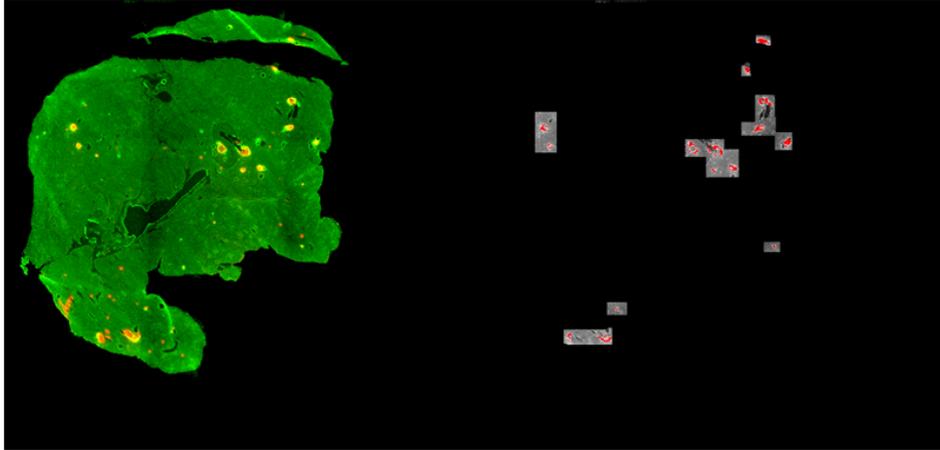


Abbildung 7: Bestimmung der Querschnittsfläche der alpha-Zellen. Der Glukagonantikörper wird ebenfalls durch einen sekundären Antikörper detektiert (Alexa Fluor 488). Durch die Lokalisation der Antikörper gegen Insulin und Glukagon werden die Langerhansschen Inseln identifiziert. Die übrigen gefärbten Bereiche im Overlay werden entfernt, bevor die Farbkanäle für die weitere Bearbeitung getrennt werden. Durch die Funktion "Image >>> Adjust >>> Threshold" wird die Querschnittsfläche der alpha-Zellen bestimmt.

- Die Daten werden in einer Tabelle zusammengestellt (s. exemplarisch unten). Die alpha- und beta-Zellmassen werden, nach den unten angegebenen Formeln, berechnet. Die Ergebnisse aller Schnittreihen eines Organs werden erfasst und der Mittelwert gebildet. Aus den Mittelwerten aller Organe einer Gruppe werden ebenfalls der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt.

Querschnittsfläche in Pixel			Pankreasgewicht
Pankreasschnitt	beta-Zellen	alpha-Zellen	in mg
251939880303	1477593611	219825629	220

$$\frac{\text{Querschnittsfläche beta-Zellen x Pankreasgewicht in mg}}{\text{Querschnittsfläche Pankreasschnitt}} = \text{beta-Zellmasse}$$

$$\frac{\text{Querschnittsfläche alpha-Zellen x Pankreasgewicht in mg}}{\text{Querschnittsfläche Pankreasschnitt}} = \text{alpha-Zellmasse}$$

Querschnittsfläche in Pixel			Pankreasgewicht
Pankreasschnitt	beta-Zellen	alpha-Zellen	in mg
251939880303	1477593611	219825629	220
Zellmasse in mg >	1,29	0,19	

Abbildung 8: Beispiel zur Berechnung der alpha- und beta-Zellmasse aus murinen Pankreata. Die ermittelten Querschnittsflächen werden tabellarisch zusammengefasst. Ebenso wird das Pankreasgewicht in mg vermerkt. Durch die Verwendung der oben angegebenen Formeln kann die Zellmasse der endokrinen Zelltypen berechnet werden. So wird mit jeder observierten Pankreasebene verfahren. Aus den Werten eines Pankreas wird die mittlere Zellmasse des jeweiligen Tieres erfasst. Aus den Daten einer Gruppe wird der Mittelwert und die Standardabweichung gebildet. Die Mittelwerte der verschiedenen Gruppen werden miteinander verglichen, um die versuchsbedingten Auswirkungen zu untersuchen.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Ultra sensitive mouse insulin ELISA Kit

1. Unmittelbar vor der Verwendung werden die benötigten Kit-Komponenten auf Raumtemperatur gebracht. Die flüssigen Komponenten werden durch mehrfaches Invertieren homogenisiert.
2. Die antikörperbeschichteten Mikroplatten werden aus der Verpackung genommen, in den mitgelieferten Rahmen gesetzt und mit dem entsprechenden Deckel verschlossen.
3. Der Maus-Insulin Standard wird vorbereitet. Hierzu wird der lyophilisierte Standard (Mouse Insulin Standard, B) mit 100 μ l ddH₂O vermengt und durch mehrfaches Invertieren vollständig gelöst. Der Standard enthält zu diesem Zeitpunkt 25,6 ng/ml murines Insulin. Für unsere experimentelle Auswertung reicht die Anfertigung einer Verdünnungsreihe mit niedriger Auflösung. Hierzu werden acht 1,5 ml Reaktionsgefäße benötigt und mit 0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 3,2, 6,4 ng/ml beschriftet. In das Gefäß mit der Aufschrift 6,4 ng/ml werden 150 μ l "sample diluent" (G) pipettiert, in alle anderen Gefäße werden nur 50 μ l der Verdünnungslösung vorgelegt. Von dem Standard werden 50 μ l in das Gefäß mit der Aufschrift 6,4 ng/ml gegeben. Die Lösung wird sachgemäß homogenisiert. Hieran schließt sich die Verdünnungsreihe (50:50 μ l) an. In das Gefäß mit der Beschriftung 0 ng/ml wird selbstverständlich nichts zusätzlich pipettiert.
4. In jedes benötigte Well werden 95 μ l Verdünnungslösung (sample diluent, G) vorgelegt. Alle Proben und Standards werden doppelt bestimmt. Von diesen werden jeweils 5 μ l in die entsprechenden Wells pipettiert. Anschließend wird die Platte vorsichtig geschüttelt.
5. Die Platte wird für 2 Stunden bei 4°C inkubiert. In dieser Zeit wird der Waschpuffer vorbereitet. Dazu wird der konzentrierte Waschpuffer (Wash Buffer Stock Solution, H) mit ddH₂O 20fach verdünnt. Ebenso wird 15 Minuten vor Ende der Inkubationszeit das Anti-Insulin Enzym Konjugat vorbereitet. Hierfür werden 7,2 ml der Stocklösung (Enzyme Conjugate Stock Solution, C) mit 3,6 ml der entsprechenden Lösung (Enzyme

- Conjugate Diluent, D) verdünnt und, durch mehrfaches Invertieren, homogenisiert.
6. Nach der Inkubationszeit wird die Flüssigkeit aus den Wells verworfen. Jedes Well wird anschließend 5mal gewaschen. In jedes Well werden pro Waschvorgang 300 µl Puffer pipettiert. Anschließend wird die Flüssigkeit verworfen. Die verbleibende Flüssigkeit wird möglichst restlos entfernt. Dazu wird die Platte mehrfach auf ein Papiertuch geklopft.
 7. Auf jedes Well werden 100 µl des Anti-Insulin Enzym Konjugat gegeben. Die Platte wird mit dem Deckel verschlossen und bei RT für 30 Minuten inkubiert.
 8. Während der Inkubation wird das Enzym Substrat (Enzym Substrate Solution, E) auf RT gebracht.
 9. Nach der Inkubation wird die Platte wie unter Punkt 6 beschrieben 7mal gewaschen.
 10. Auf jedes Well werden 100 µl des Enzym Substrats gegeben. Die Platte wird mit dem Deckel verschlossen und bei RT für 40 Minuten inkubiert. Während der Inkubation darf die Platte nicht dem Licht ausgesetzt werden.
 11. Die Enzymreaktion in jedem Well wird durch die Zugabe von 100 µl Stoplösung (Enzyme Reaction Stop Solution, F) beendet. Die Platte sollte innerhalb von 30 Minuten mit einem ELISA-Reader ausgewertet werden.
 12. Die Platte wird mit dem ELISA Reader Sunrise und der Magellan Software von Tecan Austria GmbH ausgewertet. Dazu werden die Messwellenlänge auf 450 nm und die Referenzwellenlänge auf 630 nm eingestellt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt über eine, Punkt zu Punkt, Auftragung der Absorptionskoeffizienten der Verdünnungsreihe des Standards in linearer Skalierung.

2.4.2 Glukagon RIA

Alle benötigten Reagenzien werden vor der Verwendung aufgetaut und durch mehrfaches Invertieren homogenisiert.

Herstellung des Standards: Die Stocklösung enthält 400 pg/ml Glukagon. Es werden vier Reaktionsgefäße aus Borosilikatglas benötigt. Diese werden mit 200, 100, 50 und 25 pg/ml beschriftet und mit jeweils 1 ml Assay-Puffer beladen. Von der Stocklösung wird 1 ml in das Glas mit der Beschriftung 200 pg/ml transferiert. Durch vortexen werden die Lösungen gleichmäßig vermischt. Die Verdünnungsreihe wird nach diesem Schema fortgesetzt (s. Tab. 5).

Glas	Standard Konzentration in pg/ml	Volumen des Assay-Puffers	Volumen aus Standard X
1	200	1 ml	1 ml aus 400 pg/ml
2	100	1 ml	1 ml aus 200 pg/ml
3	50	1 ml	1 ml aus 100 pg/ml
4	25	1 ml	1 ml aus 50 pg/ml

Tabelle 5: Pipettierschema zur Herstellung eines Standards mit verschiedenen Glukagonkonzentrationen.

1.Tag

1. Am ersten Tag werden 300 µl des Assay-Puffers in die Reaktionsgefäße mit der Aufschrift NSB (Non-Specific Binding; Gläser 3-4) pipettiert. In die Gläser mit der Aufschrift Bo (Referenzgläser 5-6) werden 200 µl und in die, ab hier numerisch aufsteigenden, Gläser werden 100 µl des Assay-Puffers vorgelegt.
2. Von jedem Standard und den beiden Qualitätskontrollen werden jeweils 100 µl in die entsprechenden Gläser (7-20) pipettiert. Diese werden jeweils doppelt-bestimmt.
3. Die Proben werden ebenfalls doppelt bestimmt. Von diesen werden auch 100 µl des Volumens in die entsprechend, gekennzeichneten Reaktionsgefäße gegeben. (Sollte die Glukagonkonzentration in den Proben zu hoch sein, so können diese mit dem Assay-Puffer verdünnt werden).

4. Mit Ausnahme der Gläser mit der Beschriftung TC (Total Count; 1-2) und NSB (3-4), werden in jedes Reaktionsgefäß 100 µl des Glukagon-Antikörpers gegeben.
5. Die Reagenzgefäße werden gevortext, mit Parafilm versiegelt und für 20-24 Stunden bei 4°C inkubiert.

2. Tag

6. Der lyophilisierte und radioaktiv gelabelte ¹²⁵I-Glukagon Tracer wird mit 27 ml des Label Hydrating Puffers gelöst. Durch mehrfaches Invertieren wird die Lösung homogenisiert. Anschließend werden 100 µl davon in jedes Reaktionsgefäß pipettiert.
7. Die Reagenzgefäße werden gevortext, mit Parafilm versiegelt und für 22-24 Stunden bei 4°C inkubiert.

3. Tag

8. Die Reaktionsgefäße mit der Beschriftung TC (1-2) werden außen vorgelassen. In alle anderen Gläser werden 1 ml des 4°C kalten Präzipitations-Puffers gegeben.
9. Die Reagenzgefäße werden gevortext, mit Parafilm versiegelt und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert.
10. Die Reaktionsgefäße werden für 20 Minuten bei 4°C und 3500 upm zentrifugiert (Rotixa/RP, Hettich).
11. Die Reaktionsgefäße mit der Beschriftung TC (1-2) werden erneut außen vorgelassen. Aus allen anderen Reaktionsgefäßen wird der Überstand möglichst vollständig verworfen.
12. Die Auswertung der Proben erfolgt am Gamma Counter LB 2111 der Firma Berthold. Die Messzeit beträgt 2 Minuten.

2.5. Statistische Auswertung

Die Rohdaten wurden in tabellarischer Form mit der Excel-Software von Microsoft zusammengefasst. Die Summen, Mittelwerte und Standardabweichungen wurden ebenfalls mit dieser Software errechnet. Die tiefergehenden statistischen Analysen wurden mit der Prism Software von Graph Pad durchgeführt. Normalverteilung wurde angenommen. Da wir bei unseren Daten die Auswirkungen mehrerer Faktoren (z.B. Gewicht und Alter) analysierten, werteten wir unsere Daten mit two-way ANOVAs aus. Daran schlossen wir multiple Vergleichstest mit Tukey-Korrektur als Postanalyse an. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem p -Wert von kleiner 0,05 angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Gewichtszunahme durch Hochfettfütterung bei jungen und alten C57BL67-Mäusen

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit sollte die Auswirkung einer ausgeprägten Adipositas auf die alpha-Zellfunktion von jungen (zu Versuchsstart 6 Wochen alt) und alten (bei Versuchsstart 8 Monate alt) C57BL6-Mäusen untersucht werden. Um dies zu erreichen, wurden die Tiere 8 Wochen mit einer Hoch-Fett-Diät (HFD D12492, 60 % der kcal aus Fett, siehe auch 3.2.2) gefüttert. Die entsprechenden Kontroll-Tiere erhielten zur gleichen Zeit eine in ihrer Zusammensetzung angepasste Kontroll-Diät (D12450J, 10 % der kcal aus Fett, siehe auch 3.2.2). Die Gewichtszunahme wurde protokolliert (siehe Abbildung 9).

Insgesamt wurden 8 Versuchsreihen benötigt. Die Versuchsreihen 2, 5 und 7 wurden von jungen Tieren gebildet, die Versuchsreihen 1, 3, 4, 6 und 8 setzten sich aus alten Tieren zusammen. Dabei fiel auf, dass die Adipositasinduktion der Versuchsreihen 4 bis 6 nur bei wenigen Individuen zum erwünschten Ergebnis führte. Wir entschieden uns die Experimente für die Tiere, die nicht mindestens 7 g zugenommen hatten, zu wiederholen. Als Konsequenz hierauf wurde das Futter zukünftig von einem anderen Hersteller (Research Diets, zuvor ssniff) bezogen. Im weiteren Verlauf traten keine vergleichbaren Komplikationen mehr auf.

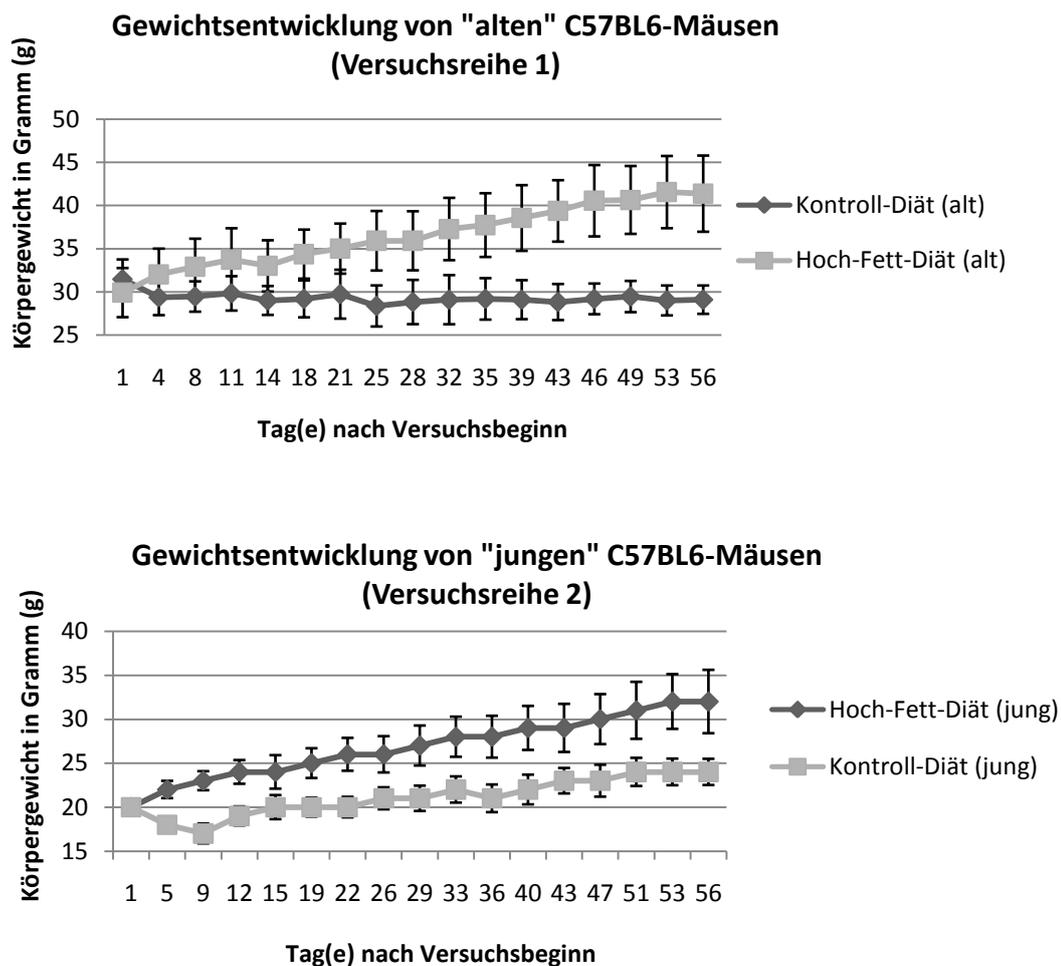


Abbildung 9: Exemplarische Gewichtsentwicklung von "jungen" und "alten" C57BL6-Mäusen. Bei Versuchsstart 6 Wochen junge ("jung") und 8 Monate alte ("alte") Mäuse wurden über einen Zeitraum von 8 Wochen mit einer Hoch-Fett-Diät (D12492, 60 % der kcal aus Fett, s. 3.2.2, n= 20) gefüttert. Die entsprechenden Kontrolltiere erhielten eine Kontroll-Diät (D12450J, 10 % der kcal aus Fett, s. 3.2.2; n= 20).

Innerhalb der 8 wöchigen Fütterungsperiode nahmen die jungen Tiere durchschnittlich ca. 12 g und die alten Tiere ca. 11 g zu. Junge, noch in der Wachstumsphase befindliche Kontrolltiere nahmen im gleichen Zeitraum ebenfalls knapp 5 g zu, während alte Kontrolltiere im Schnitt 0,5 g Gewicht verloren (siehe Tabelle 6). Somit war die Adipositas von jungen Tieren (+7 g, 30 %ige Gewichtszunahme) weniger stark ausgeprägt als bei alten Tieren (+11 g, 37 % Gewichtszunahme).

Tabelle 6: Gruppenspezifische Gewichtszunahme von "jungen" und "alten" C57BL6-Mäusen. Die Mittelwerte der einzelnen Versuchsreihen wurden für die Berechnung der gruppenspezifischen Gewichtszunahme verwendet.

	Kontroll-Diät (jung) n= 41	Hoch-Fett-Diät (jung)n= 46
Mittelwert	5,08 g	11,84 g
Standardabweichung	0,54 g	3,45 g
	Kontroll-Diät (alt) n= 37	Hoch-Fett-Diät (alt) n= 28
Mittelwert	-0,51 g	10,71 g
Standardabweichung	1,63 g	3,11 g

3.2 Induktion einer Insulinresistenz bei adipösen Tieren nach Hochfettdiät

Die Auswirkungen einer Hochfettdiät auf die Glukosetoleranz bei Mäusen sind bereits untersucht. So führt die Ausbildung einer ausgeprägten Adipositas unter anderem zu der Entwicklung einer Insulinresistenz von Leber, Skelettmuskulatur und Fettgewebe, welche sich durch eine verschlechterte Glukosetoleranz und eine chronische Hyperinsulinämie bemerkbar macht (Yoshino *et al.*, 2011). Da bei Diabetikern oftmals eine Hyperglukagonämie trotz Hyperinsulinämie diagnostiziert werden kann, wurde eine Insulinresistenz auch bei pankreatischen alpha-Zellen vermutet. Gonzales *et al.* (2008) konnten durch ihre Arbeiten mit InR1-G9 Zellen bereits erste Anzeichen einer möglichen Insulinresistenz bei alpha-Zellen finden, doch wurde dieser Befund nicht *in vivo* abgeklärt. Aus diesem Grund untersuchten wir die alpha-Zellfunktion von C57Bl6-Mäusen in Hinblick auf eine Adipositas-induzierte Insulinresistenz.

3.2.1 Unter Hochfettdiät entwickelten nur alte Tiere eine gestörte Glukosetoleranz

Junge Kontrolltiere hatten im Durchschnitt einen basalen Blutzuckerspiegel von 71 +/- 17 mg/dl (n= 35). Dieser stieg während des ipGTT innerhalb von 30 Minuten auf einen Höchstwert von 365 +/- 87 mg/dl (n= 22) an und normalisierte sich innerhalb von 120 Minuten fast vollständig (122 +/- 19 mg/dl, n= 9).

Alte Kontrolltiere zeigten ein ähnliches Bild. Diese starteten mit einem basalen Blutzucker von 73 +/- 16 mg/dl (n= 27), erreichten ebenfalls innerhalb von 30 Minuten den höchsten gemessenen Blutzuckerwert (283 +/- 55 mg/dl, n= 23) und zeigten nach 120 Minuten weitestgehend normalisierte Blutzuckerwerte (121 +/- 30 mg/dl, n= 13). Die Blutzuckerspiegel der jungen Kontrolltiere (211 +/- 42 mg/dl, n= 18) waren gegenüber den Blutzuckerspiegeln der alten Kontrolltiere (174 +/- 21 mg/dl, n= 17) 60 Minuten nach der Glukoseapplikation signifikant erhöht (siehe Abb. 10 c).

Junge, adipöse Tiere (HFD) zeigten eine beeinträchtigte Glukosetoleranz. Ihre basalen Blutzuckerspiegel waren gegenüber der entsprechenden Kontrolle leicht, wenn auch nicht signifikant erhöht (111 +/- 56 mg/dl, n= 23). Die Tiere erreichten innerhalb der ersten 30 Minuten einen maximalen Blutzucker von 338 +/- 113 mg/dl (n= 14). Nach 60 Minuten lag dieser bei 301 +/- 105 mg/dl (n= 12) und war gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht. Nach 120 Minuten betrug der Blutzucker immer noch 194 +/- 30 mg/dl (n= 9; siehe Abb. 10 a).

Alte, adipöse Tiere zeigten eine deutlich gestörte Glukosetoleranz. Vor der Glukoseapplikation zeigten diese schon einen Blutzucker von 119 +/- 32 mg/dl (n= 29). Innerhalb der ersten 30 Minuten des ipGTT zeigten diese den stärksten Anstieg des Blutzuckerspiegels, der höchste gemessene Wert (443 +/- 88 mg/dl, n= 18) wurde jedoch erst nach einer Stunde erreicht. Zwei Stunden nach der Glukoseapplikation war der Blutzucker immer noch stark erhöht (403 +/- 108 mg/dl, n= 12). Mit Ausnahme des Zeitpunkts 15 Minuten, waren die Blutzuckerspiegel der alten, adipösen Tiere immer signifikant gegenüber denen der entsprechenden Kontrolltieren erhöht. Eine durchgehende, signifikante Erhöhung des Blutzuckers konnte gegenüber jungen, adipösen Tieren ab Zeitpunkt 30 Minuten beobachtet werden ($p > 0,05$ bis 0,0001; two-way ANOVA; siehe Abb. 10 b und d).

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die Induktion einer ausgeprägten Adipositas vor allem bei alten Mäusen zu einer deutlichen Verschlechterung der Glukosetoleranz und somit zu einer Insulinresistenz führt.

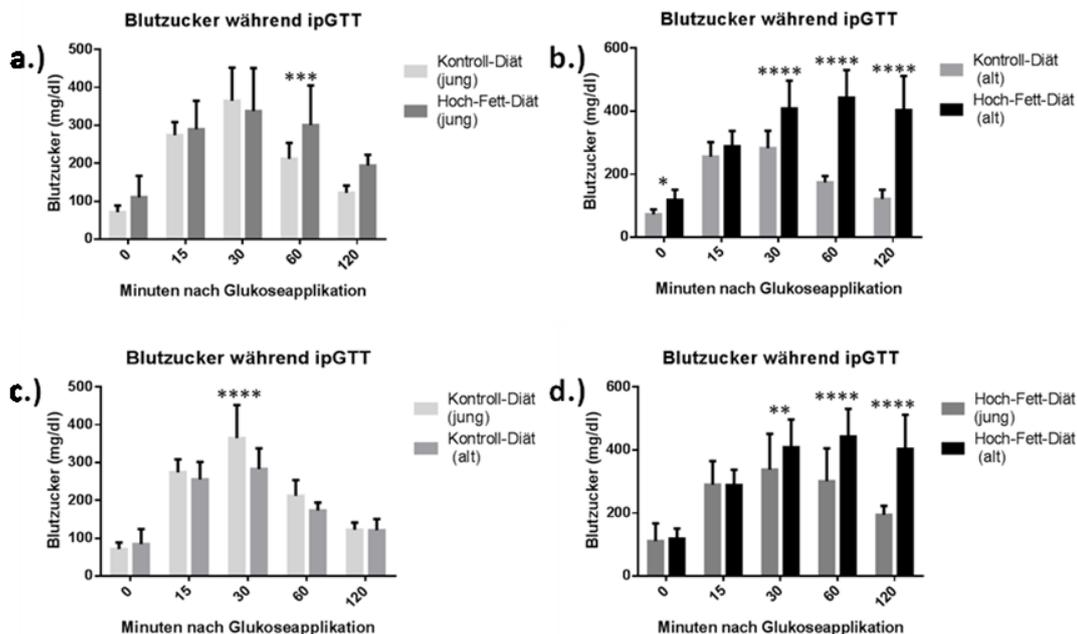


Abbildung 10: Alte Mäuse zeigten eine gestörte Glukosetoleranz nach Hochfettdiät. Junge (bei Versuchsstart 6 Wochen, $n \geq 9$) und alte (bei Versuchsstart 8 Monate, $n \geq 12$) C57Bl6-Mäuse wurden über einen Zeitraum von 8 Wochen entweder mit einer Kontroll-Diät (D12450J, 10 % der kcal aus Fett, s. 3.2.2) oder einer Hoch-Fett-Diät (D12492, 60 % der kcal aus Fett s. 3.2.2) *ad libitum* gefüttert. Intraperitoneale Glukosetoleranztests (1,5 mg Glukose/g Körpergewicht) wurden durchgeführt (s. 3.2.3). Die Blutzuckerläufe der a.) der jungen Tiere, b.) der alten Tiere, c.) der Kontrolltiere und d.) der adipösen Tiere wurden gegenüber gestellt um altersspezifische und adipositasspezifische Veränderungen in der Glukosetoleranz zu untersuchen. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Prism-Software von GraphPad (* $p > 0,05$, ** $p > 0,01$, *** $p > 0,001$, **** $p > 0,0001$, two-way ANOVA; $n \geq 9$).

3.2.2 Deutliche Hyperinsulinämie bei alten Tieren nach Hochfettdiät

Die Plasmainsulinspiegel der jungen Kontrolltiere stiegen innerhalb der ersten 30 Minuten des ipGTT von 220 +/- 40 pg/ml auf 360 +/- 60 pg/ml (n= 11) an und sanken anschließend kontinuierlich, bis nach 120 Minuten nur noch 300 +/- 80 pg/ml (n= 9) gemessen werden konnten.

Alte Kontrolltiere zeigten vergleichbare basale Insulinspiegel (230 +/- 60 pg/ml, n= 21). Sie erreichten ebenfalls die höchste Plasmainsulinkonzentration nach 30 Minuten (470 +/- 170 pg/ml, n= 14), zeigten allerdings einen zweiten Peak nach 120 Minuten (420 +/- 100 pg/ml, n= 9). Zu keinem Zeitpunkt konnten signifikant erhöhte Insulinlevel, gegenüber den jungen Kontrolltieren, beobachtet werden (siehe Abb. 11 c).

Junge, adipöse Mäuse starteten mit basalen Plasmainsulinspiegeln von 370 +/- 90 pg/ml (n= 9). Diese stiegen im weiteren Verlauf zunächst leicht an (420 +/- 60 pg/ml, n= 9). Zwischen der 60. und 120. Minute stieg die Insulinkonzentration dann jedoch drastisch. Zum Zeitpunkt 120 Minuten wurde das höchste Plasmainsulin (730 +/- 330 pg/ml, n= 8) gemessen. Gegenüber den entsprechenden Kontrolltieren war das Plasmainsulin zu diesem Zeitpunkt signifikant erhöht ($p > 0,0001$; two-way ANOVA, siehe Abb. 11 a).

Alte, adipöse Tiere zeigten erneut die gravierendsten Abweichungen von der Norm. Vor der Glukoseapplikation wiesen diese basale Plasmainsulinspiegel von durchschnittlich 510 +/- 320 pg/ml (n= 24) auf. Nach 15 Minuten wurde bereits ein erster Peak erreicht. Hier konnten eine Insulinkonzentration von 640 +/- 310 pg/ml (n= 14) beobachtet werden. Zum Zeitpunkt 30 Minuten fiel das Plasmainsulin auf 550 +/- 250 pg/ml (n= 17) und blieb bis zur 60. Minute unverändert. Die höchste Insulinkonzentration konnte erst nach 120 Minuten festgestellt werden. Zu diesem Zeitpunkt war das Plasmainsulin von 1190 +/- 470 pg/ml (n= 9), gegenüber der entsprechenden Kontrolle, um den Faktor 2,83 erhöht. Gegenüber der Kontrolle waren die Insulinspiegel der alten, adipösen Tiere zu drei Zeitpunkten signifikant erhöht ($0 = p > 0,0001$, $15 = p > 0,001$ und $120 = p > 0,0001$; two-way ANOVA; siehe Abb. 11 d). Gegenüber den jungen,

adipösen Tieren jedoch nur zu Zeitpunkt 120 min ($p > 0,0001$; two-way ANOVA; siehe Abb. 11 b und d).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Induktion einer ausgeprägten Adipositas vor allem bei alten Tieren zu einer Hyperinsulinämie führt.

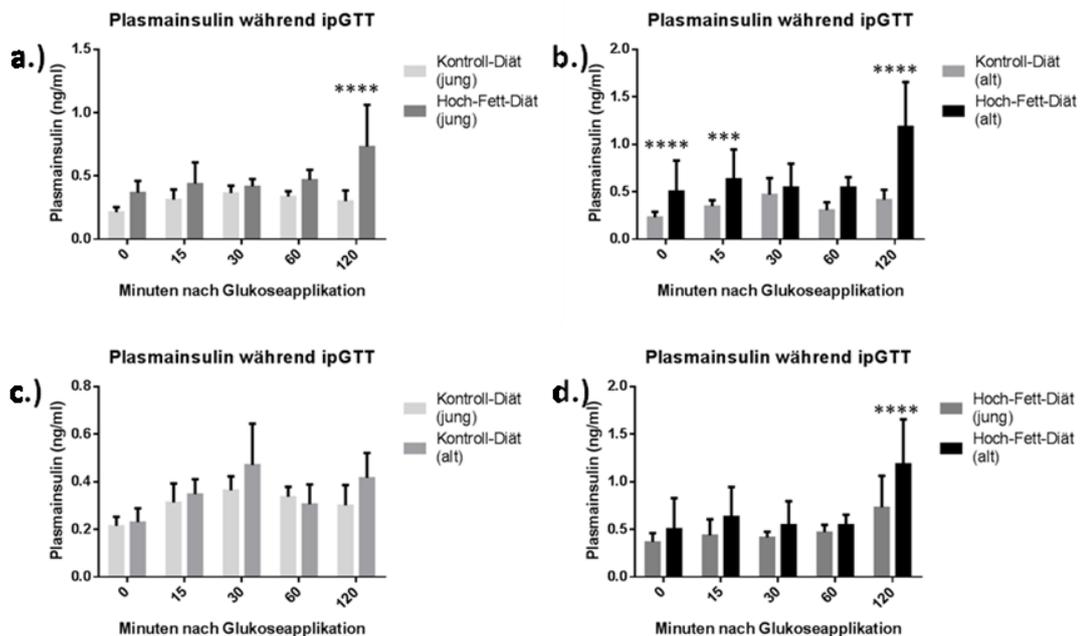


Abbildung 11: Junge und alte Mäuse zeigen eine dysregulierte Insulinsekretion nach Hochfettdiät, die Hyperinsulinämie ist bei alten Mäusen jedoch deutlicher ausgeprägt. Junge (bei Versuchsstart 6 Wochen, $n \geq 8$) und alte (bei Versuchsstart 8 Monate, $n \geq 9$) C57Bl6-Mäuse wurden über einen Zeitraum von 8 Wochen entweder mit einer Kontroll-Diät (D12450J, 10 % der kcal aus Fett, s. 3.2.2) oder einer Hoch-Fett-Diät (D12492, 60 % der kcal aus Fett s. 3.2.2) *ad libitum* gefüttert. Intraperitoneale Glukosetoleranztests (1,5 mg Glukose/g Körpergewicht) wurden durchgeführt (s. auch 3.2.3). Das Plasmainsulin der a.) der jungen Tiere, b.) der alten Tiere, c.) der Kontrolltiere und d.) der adipösen Tiere wurden gemessen und gegenüber gestellt um altersspezifische und adipositasspezifische Veränderungen der Insulinspiegel zu untersuchen. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Prism-Software von GraphPad (** $p > 0,001$, **** $p > 0,0001$, two-way ANOVA; $n \geq 8$).

3.2.3 Mangelnde Suppression der Glukagonspiegel bei alten Tieren nach Hochfettdiät

Die Plasmaglukagonspiegel der jungen Kontrolltieren wurden während der ipGTTs nicht beeinflusst und blieben stabil bei ca. 31 +/- 7 pg/ml (n= 10). Junge, adipöse Mäuse zeigten, gegenüber der entsprechenden Kontrolle, vergleichbar niedrige basale Glukagonspiegel (37 +/- 13 pg/ml, n= 9). Hier konnte jedoch eine Senkung der Glukagonkonzentration (26 +/- 8 pg/ml, n= 9) zum Zeitpunkt 30 Minuten beobachtet werden. Nach 120 Minuten hatte sich der Glukagonspiegel der jungen, adipösen Tiere bereits normalisiert (36 +/- 11 pg/ml, n= 8, siehe Abb. 12 a).

Junge Versuchstiere zeigten im direkten Vergleich mit alten Versuchstieren eine Tendenz zu niedrigeren Glukagonspiegeln, die jedoch nicht konsistent bei allen Versuchsreihen auftrat.

Alte Kontrolltiere zeigten basalen Glukagonspiegel von 61 +/- 16 pg/ml (n= 11). Nach der Glukoseapplikation fielen diese innerhalb von 30 Minuten auf 41 +/- 9 pg/ml (n= 9) und normalisierten sich bis zur 120. Minute (49 +/- 8 pg/ml, n= 9) weitestgehend. Die basalen Glukagonspiegel der alten, adipösen Tiere waren mit denen der Kontrolltiere vergleichbar (59 +/- 20 pg/ml, n= 9). Diese Tiere zeigten jedoch keine Senkung der Glukagonkonzentration zum Zeitpunkt 30 Minuten (59 +/- 8 pg/ml, n= 8). Zu diesem Zeitpunkt waren die Glukagonspiegel, gegenüber denen der Kontrolle, signifikant erhöht ($p > 0,001$, two-way ANOVA; siehe Abb. 12 b). Erst 120 Minuten nach der Glukoseapplikation wurde eine verminderte Glukagonkonzentration (44 +/- 4 pg/ml, n= 9) festgestellt.

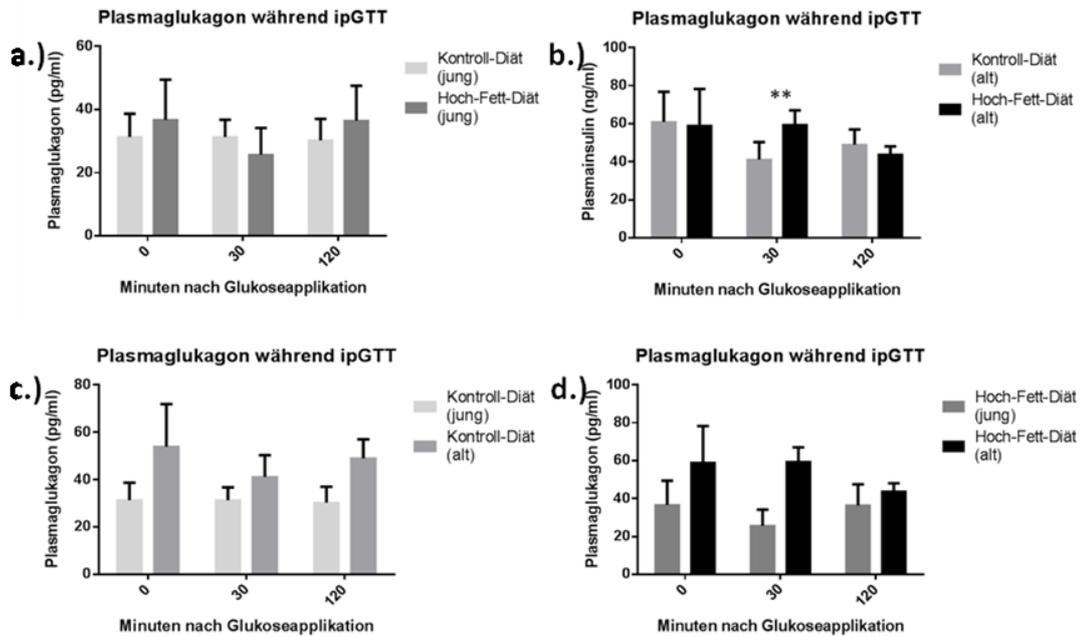


Abbildung 12: Mangelnde Suppression der Glukagonspiegel bei alten Tieren nach Hochfettdiät. Junge (bei Versuchsstart 6 Wochen, $n \geq 8$) und alte (bei Versuchsstart 8 Monate, $n \geq 8$) C57Bl6-Mäuse wurden über einen Zeitraum von 8 Wochen entweder mit einer Kontroll-Diät (D12450J, 10 % der kcal aus Fett, s. 3.2.2) oder einer Hoch-Fett-Diät (D12492, 60 % der kcal aus Fett s. 3.2.2) *ad libitum* gefüttert. Intraperitoneale Glukosetoleranztests (1,5 mg Glukose/g Körpergewicht) wurden durchgeführt (s. 3.2.3). Das Plasmaglukagon der a.) Kontrolltiere, b.) der jungen Tiere, c.) der adipösen Tiere und d.) der alten Tiere wurde gegenüber gestellt, um altersspezifische und adipositasspezifische Veränderungen der Glukagonspiegel zu untersuchen. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Prism-Software von GraphPad (** $p > 0,01$, two-way ANOVA; $n \geq 8$).

Dieser Befund zeigt, dass die Induktion einer ausgeprägten Adipositas bei alten Mäusen trotz Hyperinsulinämie zu einer nur reduzierten Suppression der Glukagonspiegel führt.

3.3 Bestimmung der Glukagonsekretion von isolierten Langerhansschen Inseln *in vitro*

Alte Mäuse zeigten eine deutlich gestörte Glukosetoleranz und eine ausgeprägte Hyperinsulinämie. Das für uns entscheidendere Phänomen ist jedoch die verminderte Supprimierbarkeit der Glukagonspiegel. Wir gehen davon aus dass dieses Phänomen durch ein vermindertes Ansprechen der alpha-Zellen auf Insulin zustande kommt, was unsere Hypothese einer Insulinresistenz dieses Zelltyps unterstützt. Um diesen Befund abzuklären, entschieden wir uns, die Langerhansschen Inseln betroffener Tiere zu isolieren und deren Glukagonsekretion unter kontrollierten Bedingungen *in vitro* zu untersuchen.

Die Isolation der Langerhansschen Inseln aus Pankreaten und deren Kultivierung erfolgte zunächst nach einem bei uns im Labor etablierten Protokoll das bei unseren Experimenten mit Langerhansschen Inseln auf Insulin Ebene bestens funktionierte. Um die Funktionsfähigkeit von alpha-Zellen zu verbessern, musste das Protokoll jedoch adaptiert werden. Die Schwierigkeit hieran wurde überwiegend durch die Lokalisierung der alpha-Zellen in murinen pankreatischen Inseln verursacht. Diese sind überwiegend in der Peripherie der Inseln lokalisiert und sind somit während des Isolierungsvorganges besonders gefährdet.

Wir danken der Arbeitsgruppe von Prof. E. Lammert für die Bereitstellung eines adaptierten Isolierungsprotokolls (s. auch 3.2.4), mit dem die Bestimmung von Glukagon *in vitro* zuverlässig gelang.

3.3.2 Mangelnde Hemmung des Glukagons durch Insulin *in vitro*

Die Langerhansschen Inseln von alten gesunden (n = 8) und adipösen Tieren (n = 11) zeigten eine vergleichbare relative Glukagonfreisetzung im basalen Stimulationsmedium (Kontrolle, 5 mM Glukose). Die Glukagonsekretion in Insulin-haltigem Stimulationsmedium unterschied sich jedoch signifikant voneinander ($p > 0,01$, two-way ANOVA, siehe Abb. 13).

Der dargebotene Insulinreiz führte bei Inseln aus gesunden Tieren zu einer hoch-signifikanten ($p > 0,0001$, two-way ANOVA, siehe Abb. 13) Reduzierung der relativen Glukagonsekretion auf ca. 40 %. Die Inseln der adipösen Tiere zeigten unter diesen Bedingungen nur eine ca. 20 %tige Reduzierung der Glukagonsekretion (nicht signifikant).

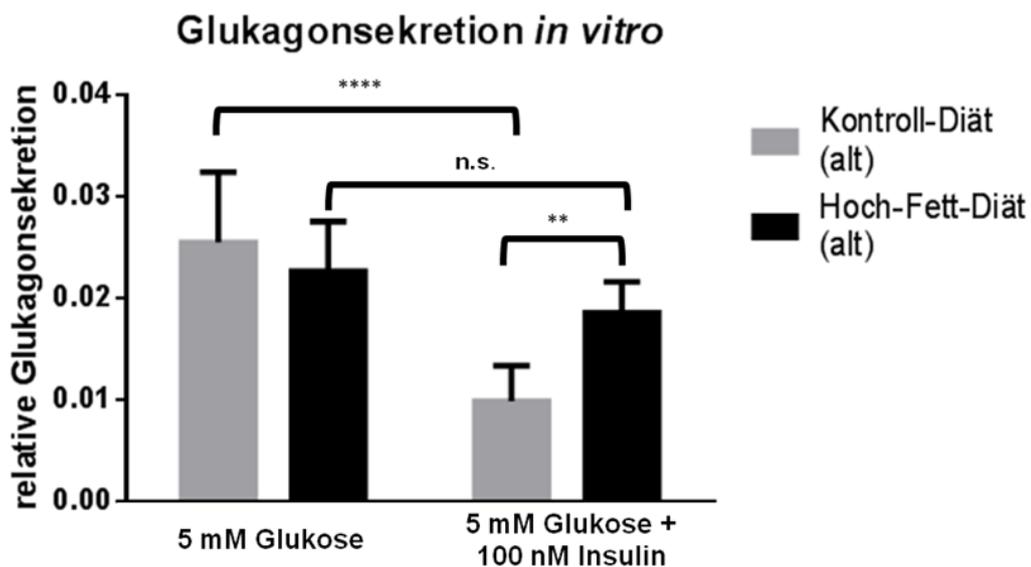


Abbildung 13: Die alpha-Zellen von alten adipösen Mäusen zeigen ein vermindertes Ansprechen auf Insulin im Zellkulturexperiment. Bei Versuchsstart 8 Monate alte C57BL6-Mäuse wurden über einen Zeitraum von 8 Wochen entweder mit einer Hoch-Fett-Diät (60 % der Kalorien aus Fett, D12492, $n = 11$, in 2 Versuchen, Inseln von 2-3 Mäuse wurden gepoolt, Mittelwerte aus Pools in 3-5fach Bestimmung s. 3.2.2) oder einer angepassten Kontroll-Diät (10 % der Kalorien aus Fett; D12450J, $n = 8$, in 2 Versuchen, Inseln von 2-3 Mäuse wurden gepoolt, Mittelwerte aus Pools in 3-5fach Bestimmung, s. 3.2.2) gefüttert. Die Tiere wurden anschließend geopfert, um deren Langerhansschen Inseln zu isolieren (s. 3.2.5). Es wurden jeweils 15 Inseln pro Well angesetzt. Die Glukagonsekretion wurde mit einem basalen Stimulationsmedium (RPMI1640, L-Glutamat, Pen/Strep, 2 % BSA, 5 mM Glukose) oder einem Insulin-haltigem Stimulationsmedium (RPMI1640, L-Glutamat, Pen/Strep, 2 % BSA, 5 mM Glukose + 100 nM Insulin) 4 Stunden lang stimuliert (s. 3.2.6). Die Glukagonkonzentration der Überstände (absolute Sekretion) und der Gesamtglukagongehalt der Langerhansschen Inseln wurden mit dem Glukagon-RIA (GL-32K, s. 3.4.2) der Firma Millipore bestimmt. Die relative Glukagonsekretion wurde ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Prism-Software von GraphPad (n.s. = nicht signifikant, ** $p > 0,01$, **** $p > 0,0001$, two-way ANOVA; $n \geq 3$).

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass eine Insulinresistenz bei murinen, pankreatischen alpha-Zellen aus adipösen Mäusen besteht.

3.4 Anstieg der beta-, jedoch nicht der alpha-Zellmasse, nach Hochfettdiät

Aufgrund des erhöhten Insulinbedarfs von Prädiabetikern steigt die Masse der pankreatischen beta-Zellen an. Durch die von uns nachgewiesene Insulinresistenz der murinen alpha-Zellen kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung des Glukagons. Ob hierdurch ebenfalls die alpha-Zellmasse beeinträchtigt wird ist unklar und wurde daher von uns untersucht.

beta-Zellen

Die beta-Zellmasse von jungen Kontrolltieren betrug durchschnittlich 1,72 mg und war mit der der alten Kontrolltiere (1,77 mg) vergleichbar. Durch die Adipositasinduktion konnte bei jungen Tieren eine signifikante Erhöhung ($p > 0,05$, two-way ANOVA, s. Abb. 14) der beta-Zellmasse auf 2,14 mg beobachtet werden. Auch bei alten Tieren stieg diese als Folge der Adipositas signifikant an (2,38 mg, $p > 0,001$, two-way ANOVA, s. Abb. 14). Die Reaktionen der jungen und alten Tiere auf eine hoch-kaloröse Ernährung waren hingegen vergleichbar.

alpha-Zellen

Die alpha-Zellmasse wurde weder durch das Alter noch durch eine Adipositas signifikant beeinflusst. Diese lag zwischen 0,29 mg (alte Kontrolltiere) und 0,41 mg (alte adipöse Tiere)

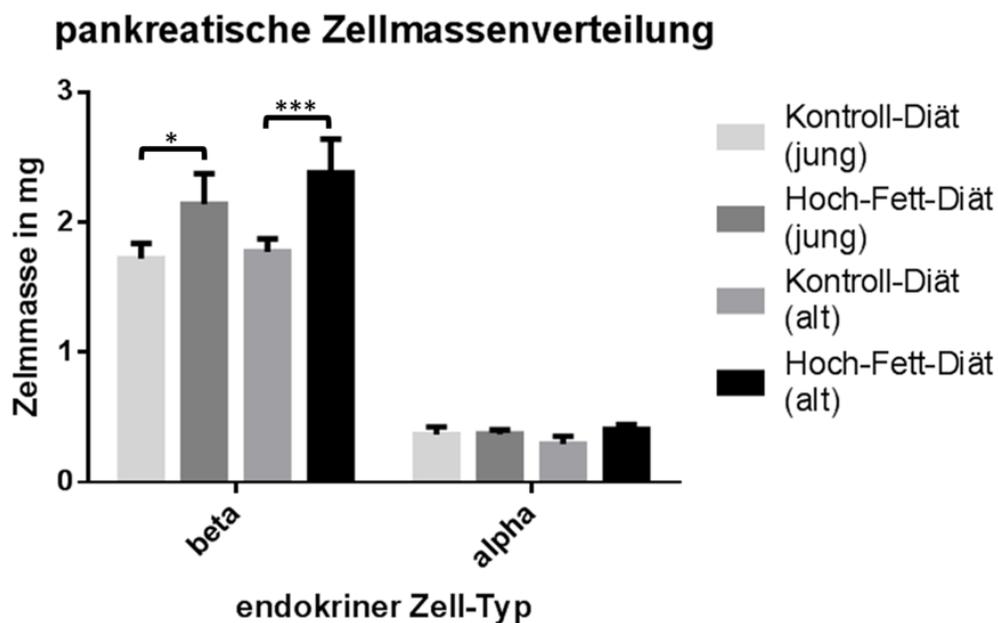


Abbildung 14: 8 Wochen Hochfettdiät bewirken nur einen Anstieg der beta-Zellmasse. Junge (bei Versuchsstart 6 Wochen) und alte (bei Versuchsstart 8 Monate) C57Bl6-Mäuse wurden über einen Zeitraum von 8 Wochen entweder mit einer Kontroll-Diät (D12450J, 10 % der kcal aus Fett, s. 3.2.2) oder einer Hoch-Fett-Diät (D12492, 60 % der kcal aus Fett, s. 3.2.2) *ad libitum* gefüttert. Pro Gruppe wurden drei Pankreata isoliert und kryokonserviert (s. 3.3.1). Die alpha-Zellen wurden durch eine indirekte Antikörperfärbung des Glukagons und die beta-Zellen wurden durch die Färbung des Insulins detektiert (s. 3.3.2). Die gefärbten Objekte wurden mit der Fiji-Software ausgewertet (s. 3.3.3). Die statistische Auswertung erfolgte mit der Prism-Software von GraphPad (* $p > 0,05$, ** $p > 0,01$, **** $p > 0,0001$, two-way ANOVA; $n = 3$).

3.5 Exendin-4 Therapie von jungen und alten C57BL67-Mäusen

Exendin-4 ist bekannt dafür, die Glukosetoleranz zu verbessern, indem es unter anderem die Insulinsekretion der pankreatischen beta-Zellen stimuliert. Weiterhin ist beschrieben worden, dass GLP-1 Rezeptoragonisten die Glukagonsekretion hemmen. Es ist jedoch nicht bekannt, ob dies altersspezifisch ist. Die Arbeiten von Tschen *et al.* (2009) umfassten eine 7 Tage andauernde Exendin-4 Behandlung von jungen und alten C57BL6-Mäusen. Dabei zeigte sich, dass die Behandlung mit Exendin-4 nur die beta-Zellmasse junger Tiere beeinflusste (2-fache Steigerung). Wir untersuchten die Auswirkungen einer 21tägigen Exendin-4 Behandlung von jungen und alten C57BL6-Mäusen auf die beta- und alpha-Zellfunktion.

3.5.1 Exendin-4 wirkt sich nicht auf die Gewichtsentwicklung von C57BL6-Mäusen aus

Erwartungsgemäß nahmen die jungen, noch in der Wachstumsphase befindlichen, Tiere durchschnittlich 3 Gramm zu. Die Exendin-4 Behandlungen zeigten hier keinen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung. Die alten Tiere hielten während der 3 wöchigen Behandlungen ihr Gewicht. Auch hier zeigten sich keine Exendin-4 spezifischen Effekte.

3.5.2 Exendin-4 verbessert die Glukosetoleranz altersunabhängig

Junge Kontrolltiere zeigten eine normale Glukosetoleranz. Zu Versuchsbeginn lag der Blutzucker bei durchschnittlich 83 ± 27 mg/dl ($n = 18$). Innerhalb von 30 Minuten wurde der maximale Blutzucker erreicht (301 ± 57 mg/dl, $n = 18$). Zum Zeitpunkt 120 Minuten hatte sich dieser weitestgehend normalisiert (142 ± 22 mg/dl, $n = 9$; siehe Abbildung 15 a.). Alte Kontrolltiere zeigten ein vergleichbares Glukosetoleranzprofil. Der basale Blutzuckerwert lag durchschnittlich bei 87 ± 26 mg/dl ($n = 18$). 30 Minuten nach der Glukoseapplikation erreichten die alten Kontrolltiere ebenfalls den maximalen Blutzucker (312 ± 47 mg/dl, $n = 16$). Auch dieser normalisierte sich im weiteren Verlauf weitestgehend. Nach 120 Minuten zeigten die Tiere nur noch einen Blutzucker von 148 ± 21 mg/dl ($n = 9$; siehe Abbildung 15 c).

Die Glukosetoleranz wurde durch Exendin-4 bei jungen und alten Versuchstieren verbessert (siehe Abbildung 15 a. und b.). Junge Tiere zeigten basale Blutzuckerwerte von 91 ± 21 mg/dl ($n = 17$). Im Gegensatz zu den entsprechenden Kontrolltieren wurde der maximale Blutzucker bereits nach 15 Minuten erreicht (228 ± 28 mg/dl, $n = 7$). Im weiteren Verlauf normalisierte sich der Blutzucker vollständig (120 min = 71 ± 7 mg/dl, $n = 7$). Hervorzuheben ist die Tatsache, dass die mit Exendin-4 behandelten Tiere bereits nach 30 Minuten Blutzuckerwerte (149 ± 25 mg/dl, $n = 16$) zeigten, die die entsprechenden Kontrolltiere erst nach 120 Minuten erreichten (142 ± 22 mg/dl, $n = 9$). Von der 30. Minute an war der Blutzucker dieser Tiere gegenüber den Kontroll-Tieren signifikant reduziert (120 min = $p > 0,001$, 30 u. 60 min = $p > 0,0001$, two-way ANOVA, $n \geq 7$; siehe Abb. 15 a.).

Die Glukosetoleranz von alten Tieren wurde durch Exendin-4 ebenfalls verbessert. *De facto* konnten keine altersspezifischen Unterschiede zwischen jungen und alten behandelten Tieren festgestellt werden (siehe Abb. 15 d.). Alte Tiere zeigten ebenfalls einen basalen Blutzuckerspiegel von 98 ± 22 mg/dl ($n = 17$). Sie erreichten ebenfalls ihren höchsten Blutzucker (209 ± 25 mg/dl, $n = 7$) 15 Minuten nach der Glukoseapplikation. Ab der 30. Minute konnten auch bei den alten therapierten Tieren Blutzuckerwerte (141 ± 35 mg/dl,

n = 16) festgestellt werden, die die entsprechenden Kontrolltiere erst 90 Minuten später erreichten (148 +/- 21 mg/dl, n = 9). Bei diesen Tieren konnte eine signifikante Reduzierung des Blutzuckers gegenüber der Kontrolle schon ab der 15. Minute beobachtet werden (15 min = $p > 0,001$, 30, 60 u. 120 min = $p > 0,0001$, two-way ANOVA, $n \geq 7$; siehe Abb. 15 b.).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Glukosetoleranz von C57BL6-Mäusen durch Exendin-4 altersunabhängig verbessert wird.

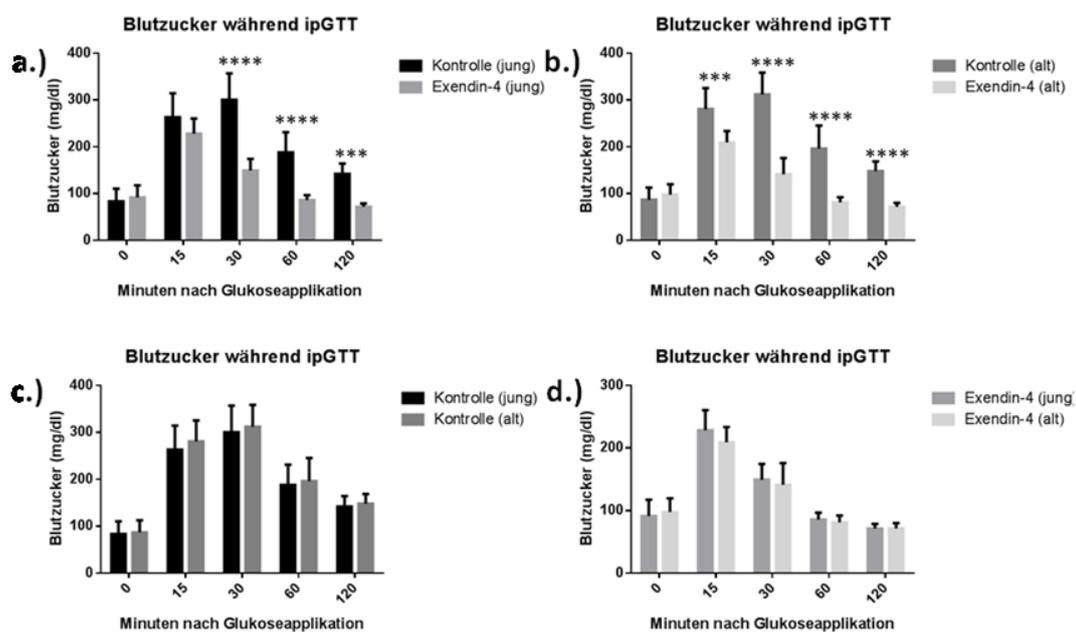


Abbildung 15: Exendin-4 verbessert die Glukosetoleranz von C57BL6-Mäusen altersunabhängig. Junge (bei Versuchsstart 6 Wochen) und alte (bei Versuchsstart 8 Monate) C57BL6-Mäuse wurden über einen Zeitraum von 3 Wochen entweder mit Exendin-4 (10 nM/g Körpergewicht, s. 3.2.1) oder einer 0,9 %igen Kochsalzlösung intraperitoneal gespritzt ($n = n \geq 7$). Intraperitoneale Glukosetoleranztests (1,5 mg Glukose/g Körpergewicht) wurden durchgeführt (s. 3.2.3). Die Blutzuckerläufe der a.) jungen Tiere, b.) der alten Tiere, c.) der Kontrolltiere und d.) der mit Exendin-4 behandelten Tiere wurden gegenüber gestellt, um altersspezifische und/oder durch Exendin-4 hervorgerufene Veränderungen in der Glukosetoleranz zu untersuchen. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Prism-Software von GraphPad (* $p > 0,05$, ** $p > 0,01$, *** $p > 0,001$, **** $p > 0,0001$, two-way ANOVA; $n \geq 7$).

3.5.3 Schnellere Insulinreaktion unter Exendin-4

Die Plasmainsulinspiegel der jungen Kontrolltiere stiegen innerhalb von 30 Minuten nach der Glukoseapplikation von 430 +/- 170 auf 610 +/- 110 pg/ml (n = 17) an. Anschließend sank der Plasmainsulinspiegel zunächst leicht (60 = 490 +/- 80 pg/ml, n = 8), erreichte aber ein weiteres Maximum nach 120 Minuten (740 +/- 210 pg/ml, n = 8). Zu zwei Zeitpunkten war der Insulinspiegel der jungen Kontrolltiere gegenüber den jungen therapierten Tieren signifikant erhöht (30 min = $p > 0,05$, 120 min = $p > 0,01$, two-way ANOVA, $n \geq 8$; siehe Abb. 16 a.).

Der Verlauf des Plasmainsulinspiegels der alten Kontrolltiere war mit dem der jungen Tiere vergleichbar, obwohl diese keinen deutlichen zweiten Insulinpeak zeigten (siehe Abb. 16 c.). Der basale Insulinspiegel der alten Kontrolltiere lag bei 370 +/- 100 pg/ml (n = 17). Dieser stieg nach der Glukoseapplikation innerhalb von 30 Minuten auf 550 +/- 160 pg/ml (n = 16) an. Zwei Stunden nach der Glukoseapplikation wurden immer noch Insulinspiegel in Höhe von 500 +/- 210 pg/ml (n = 8) beobachtet. Im Gegensatz zu den jungen Kontrolltieren, zeigten diese eine signifikante Erhöhung des Insulinspiegels gegenüber den alten behandelten Tieren zum Zeitpunkt 60 Minuten ($p > 0,01$, two-way ANOVA, $n = 7$; siehe Abb. 16 b.).

Junge, mit Exendin-4 behandelte Tiere zeigten einen modifizierten Verlauf des Plasmainsulinspiegels während der ipGTTs. Die basalen Plasmainsulinspiegel (310 +/- 100 pg/ml, n = 14) der Tiere waren etwas niedriger als die der entsprechenden Kontrolltiere, unterschieden sich jedoch nicht signifikant voneinander. Nach der Glukoseapplikation stieg das Plasmainsulin jedoch drastisch an und erreichte innerhalb von 15 Minuten einen Wert von 1.130 +/- 520 pg/ml (n = 6). Zu diesem Zeitpunkt war das Insulin gegenüber der Kontrolle hoch-signifikant erhöht ($p > 0,0001$, two-way ANOVA, siehe Abb. 16 a.) Bereits 15 Minuten später hatte sich der Plasmainsulinspiegel wieder weitestgehend normalisiert (430 +/- 110 pg/ml, n = 15), blieb jedoch bis zur 120. Minute leicht erhöht (400 +/- 130 pg/ml, n = 8).

Die Verläufe des Plasmainsulins von jungen und alten mit Exendin-4 behandelten Tieren waren nahezu identisch. Die alten Tiere zeigten einen basalen Plasmainsulinspiegel von 300 ± 110 pg/ml ($n = 15$). Innerhalb der ersten 15 Minuten des ipGTT stiegen diese auf ein Maximum von 1.320 ± 340 pg/ml ($n = 7$) an. Gegenüber der Kontrolle ($n = 7$) war der Plasmainsulinspiegel zu diesem Zeitpunkt ebenfalls hoch-signifikant erhöht ($p > 0,0001$, two-way ANOVA, vgl. junge Tiere; siehe Abb. 16 b.). Bis zur 60. Minute sank der Insulinspiegel (250 ± 100 pg/ml, $n = 7$) der Tiere rapide, stieg anschließend allerdings wieder leicht an ($120 \text{ min} = 420 \pm 300$ pg/ml, $n = 7$).

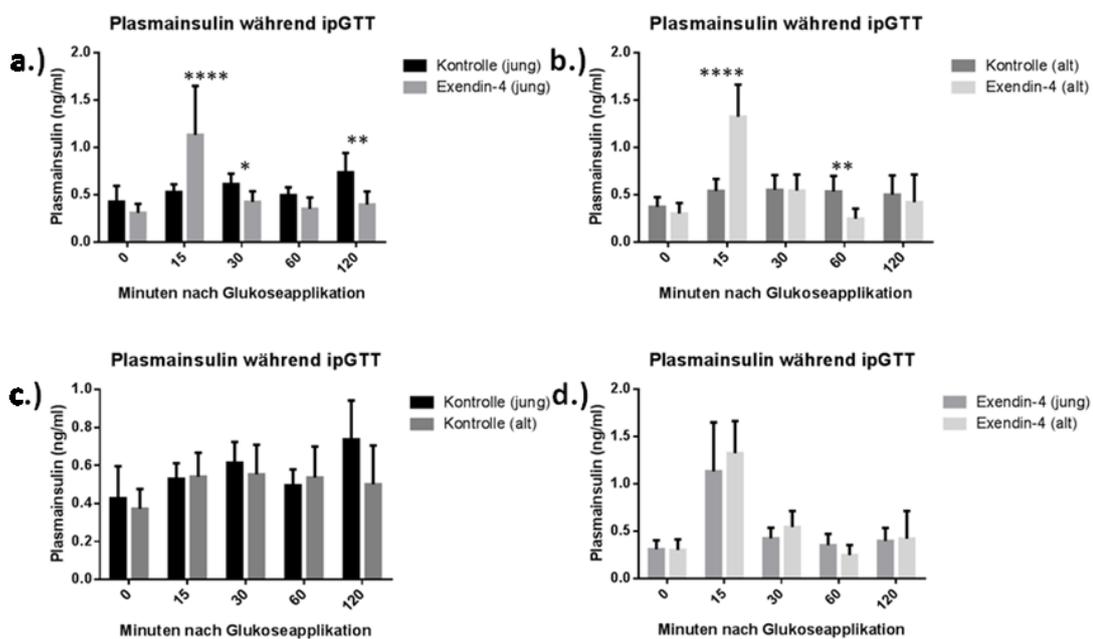


Abbildung 16: Schnellere Insulinreaktion bei jungen und alten Mäusen durch Exendin-4.

Junge (bei Versuchsstart 6 Wochen) und alte (bei Versuchsstart 8 Monate) C57Bl6-Mäuse wurden über einen Zeitraum von 3 Wochen entweder mit Exendin-4 (10 nM/g Körpergewicht, s. 3.2.1) oder einer 0,9 %igen Kochsalzlösung intraperitoneal gespritzt ($n \geq 7$). Intraperitoneale Glukosetoleranztests (1,5 mg Glukose/g Körpergewicht) wurden durchgeführt (s. 3.2.3). Das Plasmainsulin der a.) jungen Tiere, b.) der alten Tiere, c.) der Kontrolltiere und d.) der mit Exendin-4 behandelten Tiere wurden gegenüber gestellt um altersspezifische und/oder durch Exendin-4 hervorgerufene Veränderungen der Insulinspiegel zu untersuchen. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Prism-Software von GraphPad (***) $p > 0,001$, ****) $p > 0,0001$, two-way ANOVA; $n \geq 7$).

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass Exendin-4 die Insulinreaktion der beta-Zellen auf steigende Blutzuckerwerte altersunabhängig beschleunigt.

3.5.4 Tendenziell niedrigere basale Glukagonspiegel unter Exendin-4

Junge Kontrolltiere zeigten einen basalen Glukagonspiegel von 61 +/- 16 pg/ml (n = 9), der nach der Glukoseapplikation innerhalb von 30 Minuten auf 34 +/- 13 pg/ml (n = 6) sank. Zum Zeitpunkt 120 Minuten hatte sich dieser wieder vollständig normalisiert (58 +/- 18 pg/ml, n = 6; siehe Abb. 17 a.).

Alte Kontrolltiere zeigten vergleichbare basale Glukagonspiegel (56 +/- 8 pg/ml, n = 7). Diese sanken infolge der Glukoseadministration ebenfalls innerhalb von 30 Minuten auf 34 +/- 10 pg/ml (n = 8), normalisierten sich innerhalb der nächsten 90 Minuten jedoch kaum (36 +/- 9 pg/ml, n = 6). Somit unterschieden sich diese zum Zeitpunkt 120 Minuten signifikant von denen der jungen Kontrolltiere ($p > 0,05$, two-way ANOVA; siehe Abb. 17 c.).

Junge, mit Exendin-4 über 21 Tage behandelte Tiere zeigten etwas niedrigere basale Glukagonspiegel (46 +/- 15 pg/ml, n = 9) als die entsprechenden Kontrolltiere (61 +/- 16 pg/ml, n = 9). Sie zeigten jedoch eine vergleichbare Glukagonkonzentration im Blut zum Zeitpunkt 30 Minuten (34 +/- 14 pg/ml, n = 7) und normalisierten den Glukagonspiegel innerhalb der folgenden 90 Minuten ebenfalls vollständig (siehe Abb. 17 a.).

Der Verlauf des Plasmaglukagons von alten, mit Exendin-4 behandelten Tieren unterschied sich gegenüber der Kontrolle kaum (siehe Abb. 17 b.). Sie zeigten niedrigere basale Glukagonspiegel (44 +/- 6 pg/ml, n = 8), erreichten jedoch 30 Minuten nach der Glukoseapplikation ebenfalls Plasmaglukagonwerte von durchschnittlich 34 +/- 5 pg/ml (n = 6). Das Plasmaglukagon erholte sich in den folgenden 90 Minuten etwas schneller als bei den Kontrolltieren und erreichte zu Zeitpunkt 120 Minuten einen Wert von 38 +/- 9 pg/ml (n = 6). Gegenüber den jungen therapierten Tieren konnten keinerlei signifikante Unterschiede beobachtet werden (siehe Abb. 17 d.).

Unsere Daten zeigen, dass die basalen Glukagonspiegel der mit Exendin-4 behandelten Tiere tendenziell niedriger sind als die der Kontroll-Tiere. Es konnten während des ipGTT keine weiteren, regulatorischen Effekte des

Exendin-4 auf die Glukagonsekretion festgestellt werden. Es zeigt sich zudem kein altersspezifischer Effekt.

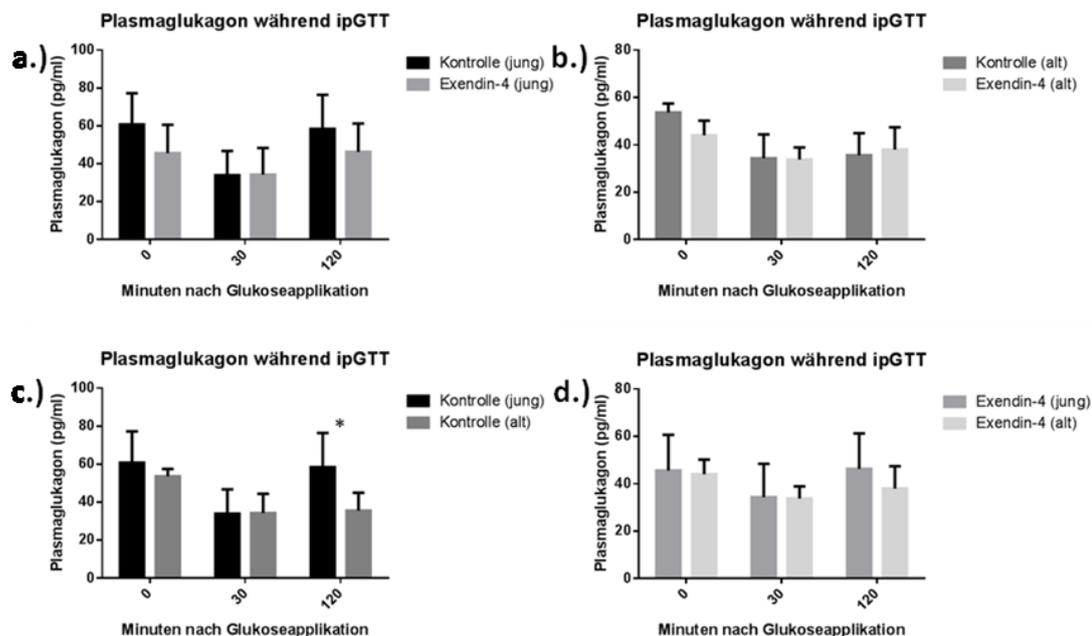


Abbildung 17: Exendin-4 zeigt keinen Effekt auf die Glukagonspiegel "junger" und "alter" Mäuse *in vivo*. Junge (bei Versuchsstart 6 Wochen) und alte (bei Versuchsstart 8 Monate) C57Bl6-Mäuse wurden über einen Zeitraum von 3 Wochen entweder mit Exendin-4 (10 nM/g Körpergewicht, s. 3.2.1) oder einer 0,9 %igen Kochsalzlösung intraperitoneal gespritzt ($n \geq 7$). Intraperitoneale Glukosetoleranztests (1,5 mg Glukose/g Körpergewicht) wurden durchgeführt (s. 3.2.3). Das Plasmainsulin der a.) jungen Tiere, b.) der alten Tiere, c.) der Kontrolltiere und d.) der mit Exendin-4 behandelten Tiere wurden gegenüber gestellt um altersspezifische und/oder durch Exendin-4 hervorgerufene Veränderungen der Glukagonspiegel zu untersuchen. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Prism-Software von GraphPad (***) $p > 0,001$, ****) $p > 0,0001$, two-way ANOVA; $n \geq 7$).

3.6 Verminderte beta- jedoch unveränderte alpha-Zellmasse nach 3 wöchiger Exendin-4 Behandlung

beta-Zellen

Die beta-Zellmasse von jungen Kontrolltieren betrug durchschnittlich 1,72 mg und war signifikant niedriger als die der alten Kontrolltiere (1,92 mg, $p > 0,05$, two-way ANOVA, $n = 3$; siehe Abb. 18). Durch die 3 wöchige Exendin-4 Therapie konnte bei jungen Tieren eine signifikante, leichte Reduzierung der beta-Zellmasse auf 1,47 mg ($p > 0,01$, two-way ANOVA, $n = 3$) beobachtet werden. Auch bei alten Tieren sank diese als Folge der Exendin-4 Therapie signifikant (1,47 mg, $p > 0,0001$, two-way ANOVA, $n = 3$). Die Exendin-4 Behandlung zeigte jedoch keine altersspezifischen Effekte.

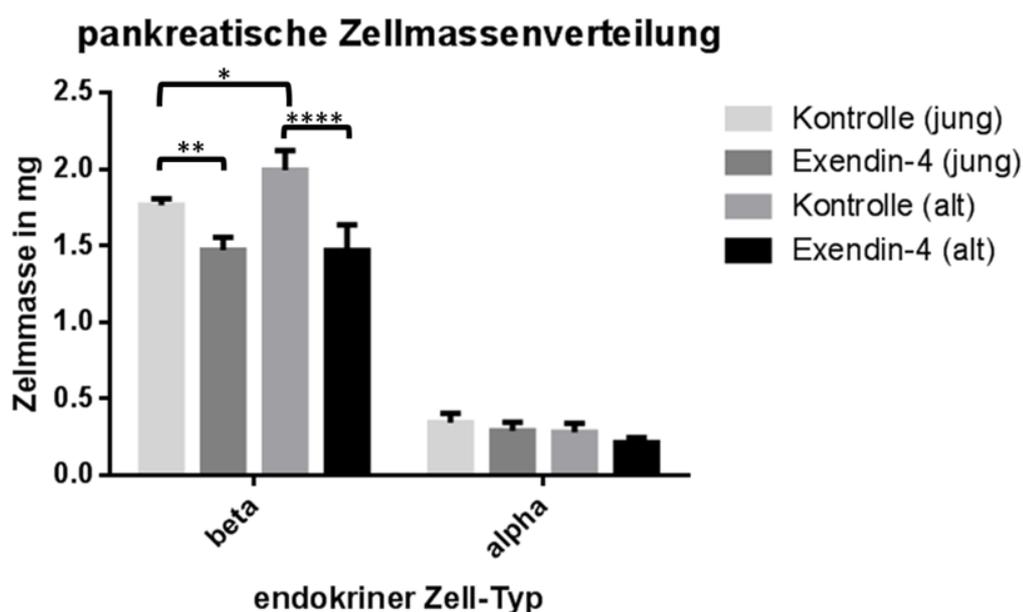


Abbildung 18: Chronische erhöhte Exendin-4 Spiegel senken die beta-Zellmasse von "jungen" und "alten" C57BL6-Mäusen. Junge (bei Versuchsstart 6 Wochen) und alte (bei Versuchsstart 8 Monate) C57BL6-Mäuse wurden über einen Zeitraum von 3 Wochen entweder mit Exendin-4 (10 nM/g Körpergewicht, s. 3.2.1) oder einer 0,9 %igen Kochsalzlösung intraperitoneal gespritzt. Pro Gruppe wurden drei Pankreata isoliert und kryokonserviert (s. 3.3.1). Die alpha-Zellen wurden durch eine indirekte Antikörperfärbung des Glukagons und die beta-Zellen wurden durch die Färbung des Insulins detektiert (s. 3.3.2). Die gefärbten Objekte wurden mit der Fiji-Software ausgewertet (s. 3.3.3). Die statistische Auswertung erfolgte mit der Prism-Software von GraphPad (* $p > 0,05$, ** $p > 0,01$, **** $p > 0,0001$, two-way ANOVA; $n = 3$).

alpha-Zellen

Die alpha-Zellmasse wurde weder durch das Alter noch durch die Exendin-4 Behandlung signifikant beeinflusst. Diese lag zwischen 0,21 mg (alte behandelte Tiere, n = 3) und 0,34 mg (junge Kontrolltiere, n = 3).

4 Diskussion

Der Typ 2 Diabetes mellitus tritt vor allem in höherem Lebensalter auf. Die molekularen und pathophysiologischen Mechanismen, die zu diesem gehäuften Auftreten im Alter führen, sind jedoch unvollständig verstanden (Zimmet *et al.*, 2001, 6. IDF Diabetes Atlas). Die bei Diabetikern auftretende Hyperglykämie wird hauptsächlich durch eine Insulinresistenz der Leber, der Skelettmuskulatur und der Fettzellen, sowie durch das beta-Zellversagen hervorgerufen. Eine Insulinresistenz der pankreatischen alpha-Zellen wird auf der Basis von *in vitro*-Studien diskutiert, jedoch wurde diese nie *in vivo* vollständig untersucht (González *et al.*, 2008).

Insulin ist ein zentraler Inhibitor der Glukagonfreisetzung. Beim Menschen kommt es beim Diabetes mellitus zu einer Hyperglukagonämie, was ebenfalls die Hypothese einer Insulinresistenz von alpha-Zellen stützt (Unger und Orci, 1975; Reaven *et al.*, 1987; Baron *et al.*, 1987). Während intraperitonealer Glukosetoleranztests untersuchten wir deshalb neben den üblichen Parametern (Blutzucker und Plasmainsulin) auch das Plasmaglukagon, von 6 Wochen jungen und 8 Monate alten C57BL6-Mäusen im Kontext einer Adipositas oder Exendin-4 Behandlung. Des Weiteren führten wir Zellkulturexperimente mit isolierten murinen Langerhansschen Inseln aus alten adipösen Mäusen durch, in denen wir die Supprimierbarkeit der Glukagonsekretion durch Insulin untersuchten.

4.1 Mit steigendem Lebensalter verschlechtert sich die Glukosetoleranz adipöser Tiere

Das von uns verwendete Mausmodell (C57BL6) kann leicht in einen adipösen Zustand überführt werden und sollte daraufhin einen Typ 2 Diabetes entwickeln. Es sollte in dieser Arbeit zum einen untersucht werden, ob eine Gewichtszunahme zunächst zur Ausbildung einer Insulinresistenz mit einhergehender Hyperglykämie führt, welche sich im Alter deutlicher ausprägen sollte. Die diagnostischen Parameter aus der Humanmedizin sind nicht direkt

auf die Versuchstierforschung übertragbar, doch bedient man sich auch hier der Erfassung der Glukosetoleranz durch orale oder intraperitoneale Glukosetoleranztests. Unsere während ipGTTs gesammelten Daten zeigten eine vergleichbar gute Metabolisierung der Glukose bei jungen und alten Kontrolltieren, wodurch wir altersbedingte Effekte bei gesunden Tieren ausschließen konnten. Im Gegensatz zu jungen gesunden Tieren zeigten junge adipöse Tiere eine schlechtere Metabolisierung der intraperitoneal dargebotenen Glukose. Die Anstiege der Blutzuckerwerte waren bei beiden Gruppen bis zur 30. Minute vergleichbar. Während gesunde Tiere ihren Blutzucker innerhalb von 90 Minuten fast vollständig normalisierten, blieb dieser bei adipösen Tieren bis zum Zeitpunkt 120 Minuten deutlich erhöht. Ein signifikanter Unterschied ($p > 0,0001$) im Blutzucker zeigte sich jedoch nur zum Zeitpunkt 60 Minuten.

Junge Tiere befanden sich während unserer Versuchsvorhaben noch in der Wachstumsphase und nahmen gegenüber den entsprechenden Kontrolltieren nur etwa 30 % an Gewicht zu. Bei den alten Tieren war hingegen eine Gewichtszunahme von durchschnittlich 37,5 % zu verzeichnen. Der Blutzucker der alten adipösen Tiere stieg bis zur 60. Minute an, bei allen anderen Gruppen stieg der Blutzucker jedoch nur bis zur 30. Minute. Alte, adipöse Tiere zeigten gegenüber den entsprechenden Kontrolltieren signifikant erhöhte Blutzuckerwerte zu den Zeitpunkten 30, 60 und 120 Minuten (30 min $p > 0,01$; 60 u. 120 min = $p > 0,0001$).

Unsere Daten zeigen, dass sich die Glukosetoleranz von adipösen C57BL6-Mäusen mit steigendem Lebensalter verschlechtert. Bei gesunden Mäusen fanden wir hingegen keine altersspezifischen Veränderungen in der Glukosetoleranz. Dies ist in Übereinstimmung mit Vorbefunden anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls eine Adipositas induzierbare Insulinresistenz fanden, die im höheren Lebensalter deutlicher auftrat (Storlien *et al.*, 1986; Tschén *et al.*, 2009).

4.2 Die beta-Zellen adipöser Tiere zeigen abnormale Insulinsekretionsmuster

Die von uns induzierte Adipositas führte erwartungsgemäß zu einer gestörten Glukosetoleranz bei den Versuchstieren. Da diese ein Indiz für eine vorangeschrittene Insulinresistenz der Insulin-responsiven Gewebe ist, sollten adipöse Versuchstiere ebenfalls eine gestörte Insulinsekretion zeigen. Dieser Effekt sollte altersbedingt unterschiedlich stark ausgeprägt sein.

Erwartungsgemäß zeigten junge und alte Kontrolltiere ähnliche Insulinsekretionsmuster. Zwar erreichten alte Kontrolltiere etwas höhere Insulinspiegel nach 30 und 120 Minuten, doch waren die Unterschiede nicht signifikant.

Bei jungen adipösen Tieren konnten während der ersten 90 Minuten des Glukosetoleranztests nur minimale Unterschiede in der Insulinkonzentration beobachtet werden. Erst 120 Minuten nach der Glukoseapplikation sorgte die Insulinsekretion der beta-Zellen für einen massiven Anstieg der Insulinkonzentration im Plasma dieser Tiere, obwohl der Blutzucker zu dieser Zeit bereits deutlich gesunken war. Zu dieser Zeit war das Plasmainsulin der jungen adipösen Tiere gegenüber der Kontrolle um den Faktor 2,4 hochsignifikant erhöht ($p > 0,0001$). Obwohl sich die Glukosetoleranz von jungen und alten adipösen Tieren deutlich voneinander unterschied, waren die Unterschiede auf Insulinsekretionsebene vor allem am Ende der 2 stündigen Beobachtungsphase festzustellen. Hier erreichten alte Tiere nach Hochfettdiät signifikant höhere Plasmainsulinkonzentrationen als junge Tiere ($p > 0,0001$). Alte adipöse Tiere zeigten gegenüber den entsprechenden Kontrolltieren signifikant erhöhte Insulinlevel zu den Zeitpunkten 0, 15 und 120 Minuten ($p > 0,001$ bis $p > 0,0001$).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine Adipositas-induzierte Hyperinsulinämie sowohl bei jungen als auch bei alten Tieren vorliegt. Diese ist bei alten Tieren jedoch stärker ausgeprägt und zeigt sich vor allem am Ende der 2 stündigen Beobachtungsphase während der ipGTTs. Auch zeigt sich bei unseren Daten

ein Verlust der biphasischen Insulinsekretion, wie sie unter anderem von Rorsman *et al.* (2000) beschrieben wurde.

4.3 Pankreatische alpha-Zellen von alten, adipösen Tieren zeigen Anzeichen einer Insulinresistenz

Eine Hyperglukagonämie gehört zum Krankheitsbild des Typ 2 Diabetes mellitus (Unger und Orci, 1975). Durch diese wird in der Leber eine dysregulierte Gluconeogenese begünstigt, wodurch die bei Diabetikern auftretende Hyperglykämie verstärkt wird (Reaven *et al.*, 1987 und Baron *et al.*, 1987). Als Auslöser der postprandialen Hyperglukagonämie wird eine Insulinresistenz der pankreatischen alpha-Zellen vermutet. Arbeiten von Gonzales *et al.* (2008) konnten bereits zeigen, dass innerhalb von 48 Stunden Dauereexposition *in vitro* die Insulinwirkung auf die Glukagonsekretion von InR1-G9-Zellen nachlässt. Wir vermuteten ebenfalls eine Insulinresistenz der pankreatischen alpha-Zellen bei adipösen Mäusen aufgrund einer chronischen Hyperinsulinämie. Diese Hypothese wurde im Folgenden geprüft.

Die Plasmaglukagonspiegel der jungen Versuchstiere waren zu jedem Zeitpunkt deutlich niedriger als die Glukagonspiegel der alten Tiere. Allerdings zeigte sich dieser Trend nicht in allen Versuchsreihen.

Die basalen Plasmaglukagonspiegel der alten, gesunden und adipösen Tiere waren miteinander vergleichbar. Die Plasmaglukagonspiegel der gesunden Tiere sanken erwartungsgemäß mit steigenden Blutzucker- und Plasmainsulinspiegeln (Zeitpunkt 30 min). Im weiteren Verlauf der ipGTTs normalisierten sich die gemessenen Parameter weitestgehend. Die Plasmainsulinspiegel der adipösen Tiere erreichten schon nach 15 Minuten ihr erstes Maximum. Die erhöhten Plasmainsulin- und Blutzuckerspiegel zu Zeitpunkt 30 Minuten waren nicht in der Lage die Glukagonsekretion der alpha-Zellen zu supprimieren. Zu diesem Zeitpunkt unterschieden sich die Plasmaglukagonspiegel von gesunden und adipösen Tieren signifikant voneinander ($p > 0,01$). Erst nach 2 Stunden konnten gesunkene Plasmaglukagonspiegel beobachtet werden. Da der Blutzucker zu dieser Zeit

mit dem zu Zeitpunkt 30 Minuten vergleichbar war, konnte nur der parakrine Wirkmechanismus für diesen Effekt verantwortlich gewesen sein. Da die Insulinkonzentration bei den alten adipösen Tieren 2,5 fach höher sein musste um die Glukagonsekretion der alpha-Zellen zu supprimieren, scheint hier tatsächlich eine Insulinresistenz zu bestehen (vgl. Abb. 11).

Zur Abklärung des oben beschriebenen Befundes, mussten wir die Glukagonsekretion der pankreatischen alpha-Zellen unter kontrollierten Bedingungen *in vitro* untersuchen. Die relative Glukagonsekretion von isolierten Langerhansschen Inseln aus gesunden und adipösen Tieren waren im Kontrollmedium vergleichbar hoch, doch wirkte sich eine 4 stündige Insulinstimulation auf die Inseln der beiden Gruppen unterschiedlich stark aus. Die Inseln aus gesunden Tieren zeigten eine hoch signifikante (ca. 60%, $p > 0,0001$) Reduzierung der Glukagonsekretion, die Inseln aus adipösen Tieren zeigten hingegen nur eine nicht signifikante Reduzierung der Glukagonsekretion von ca. 20 %.

Auch unter kontrollierten *in vitro* Bedingungen zeigten die alpha-Zellen von adipösen Tieren ein vermindertes Ansprechen auf Insulin. Unsere Daten bestätigen somit die Hypothese einer Insulinresistenz von alpha-Zellen im Mausmodell *in vivo* und *in vitro* nach Adipositasinduktion. Sehr interessant ist zudem, dass das Alter des Organismus hierbei eine wesentliche Rolle in der Entstehung der Insulinresistenz spielt.

4.4 Die Adipositas bewirkt eine Zunahme der beta-Zellmasse, jedoch keine Veränderung der alpha-Zellmasse

Pathophysiologische Überlegungen legen nahe, dass die beta-Zellmasse aufgrund eines höheren Insulinbedarfs diabetischer Mäuse steigt.

Da zum Krankheitsbild des Typ 2 Diabetes auch eine Hyperglukagonämie zählt, ist ebenfalls eine Zunahme der pankreatischen alpha-Zellmasse denkbar.

Junge und alte Kontrolltiere zeigten vergleichbare beta-Zellmassen. Erwartungsgemäß war diese bei adipösen Tiere signifikant erhöht. Alte adipose Tiere zeigten die höchste Zunahme in der beta-Zellmasse, der Unterschied zu jungen adipösen Tieren war jedoch nicht signifikant. Der Anstieg der beta-Zellmasse bei Adipositas ist in Übereinstimmung mit den Daten anderer Arbeitsgruppen (Golson *et al.*, 2010; Peyot *et al.*, 2010). Allerdings konnten Tschen *et al.* (2009) eine stärkere Zunahme der beta-Zellmasse bei jungen adipösen Tieren (von ~1,5 auf ~5 mg) feststellen.

Die alpha-Zellmassen der verschiedenen Gruppen veränderten sich jedoch weder mit steigendem Alter, noch aufgrund einer Adipositas. Die Mehrsekretion von Glukagon bei alten Tieren unter Hochfett-Diät (gegenüber normalgewichtigen Tieren) im Glukosetoleranztest ist somit am ehesten funktionell (mangelnde Hemmung der Glukagonfreisetzung durch Insulin) und nicht durch eine Zunahme der alpha-Zellmasse erklärbar.

4.5 Exendin-4 verbessert altersunabhängig die Glukosetoleranz von Mäusen

Exendin-4 ist ein GLP-1 Rezeptoragonist. Es löst ebenfalls einen Inkretineffekt aus und bewirkt hierdurch eine schnellere Abnahme des Blutzuckers.

Wir untersuchten zunächst die Glukosetoleranz von Mäusen nach 3 wöchiger Exendin-4 Behandlung im ipGTT.

Unbehandelte Kontrolltiere zeigten eine normale Glukosetoleranz. Die behandelten Tiere reagierten während des ipGTT auf das, zur gleichen Zeit verabreichte, Exendin-4 mit einer deutlichen Verbesserung der Glukosetoleranz. Hier zeigte sich eine schnellere Metabolisierung des Blutzuckers bei beiden Altersklassen. Bereits 30 Minuten nach der Glukoseapplikation erreichten junge sowie alte, mit Exendin-4 behandelte Tiere Blutzuckerwerte, die die Kontrolltiere erst 90 Minuten später erreichten. Eine durch das Alter bedingte schlechtere Reaktion auf den GLP-1 Rezeptoragonist konnte somit ausgeschlossen werden. Auch führte eine 3 Wochen lange Behandlung nicht zur Ausbildung einer Resistenz.

Wie die Arbeiten von Mondragon *et al.* (2014) zeigten, wird eine Resistenz gegen chronisch erhöhte Exendin-4 Spiegel bei Mäusen jedoch innerhalb von 75 Tagen ausgebildet. Nach dieser Zeit konnten Mondragon *et al.* keine verbesserte Glukosetoleranz durch Exendin-4 mehr feststellen.

4.6 Exendin-4 bewirkt nach einem 3 wöchigen Behandlungszeitraum noch einen Inkretineffekt

Die Behandlung mit Exendin-4 führt zu einer gesteigerten Insulinausschüttung. Chronisch erhöhte Exendin-4 Level könnten daher zur Ausbildung eines Resistenzmechanismus bei pankreatischen beta-Zellen führen.

Hier zeigten alte Kontrolltiere ein normales Insulinsekretionsmuster. Die jungen Tiere erreichten allerdings erst nach 120 Minuten ihre maximalen Plasmainsulinkonzentrationen. Da der Unterschied zu den alten Kontrolltieren hier jedoch nicht signifikant war, gehen wir hier nicht von einer Störung der Insulinsekretion durch die anstelle des Exendin-4 dargereichte Kochsalzlösung aus. Bei den behandelten Tieren wurde die höchste Blutzuckerkonzentration zu Zeitpunkt 15 Minuten erreicht und nach 30 Minuten waren die Blutzuckerwerte bereits weitestgehend normalisiert. Auf der Ebene des Insulins zeigten sich daher erwartungsgemäß stark erhöhte Plasmainsulinspiegel. Diese waren zwischen jungen und alten, mit Exendin-4 behandelten Tieren vergleichbar, gegenüber den entsprechenden Kontrolltieren jedoch signifikant erhöht. Auch hier konnten wir keinen altersspezifischen Effekt beobachten. Ebenfalls zeigten die beta-Zellen von jungen und alten Tiere keinerlei Anzeichen für eine Resistenz gegenüber dem Exendin-4 nach 3 wöchiger Behandlung. Mondragon *et al.* (2014) zeigten, dass eine 75 Tage lange Exendin-4 Behandlung jedoch zur Ausbildung einer Resistenz führt. Sie zeigten dies anhand einer unveränderten Glukosetoleranz nach Exendin-4 Gabe während ipGTTs. Da diese von Exendin-4 über eine Stimulierung der Insulinsekretion (Inkretineffekt) beeinflusst wird, könnte dies durch eine Resistenz auf Ebene der beta-Zellen begründet sein.

4.7 Exendin-4 hat keinen zusätzlichen Effekt auf die Glukagonsekretion im ipGTT

Exendin-4 führt zu einer Hemmung der Glukagonsekretion. Ob dies über einen direkten oder indirekten Mechanismus funktioniert, ist bis heute unbekannt. Da wir keinerlei altersspezifische Effekte von Exendin-4 auf den Blutzucker und das Plasmainsulin beobachten konnten, gingen wir auch nicht davon aus, dass solche Effekte auf Ebene des Plasmaglukagons auftreten würden.

Wie sich zeigte, waren die basalen Glukagonspiegel bei mit Exendin-4 behandelten Tieren tendenziell niedriger als bei den Kontrolltieren. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Im weiteren Verlauf des ipGTT gab es zwischen den behandelten und den Kontrolltieren keine auffälligen Unterschiede. Junge Kontrolltiere zeigten lediglich eine signifikant schnellere Normalisierung der Glukagonspiegel als alte Kontrolltiere ($p > 0,05$).

In unseren Experimenten zeigte Exendin-4 keine eindeutige Wirkung auf die Glukagonsekretion. Da die beta-Zellen in unseren Experimenten keinerlei Anzeichen für ein vermindertes Ansprechen auf Exendin-4 zeigten, gehen wir auch bei alpha-Zellen nicht von einer Resistenz aus. Die Wirkung von Exendin-4 auf pankreatische alpha-Zellen wird kontrovers diskutiert. Die gängige Meinung - auch beim Menschen - ist, dass GLP-1 die Glukagonsekretion hemmt. Wenn das bei uns nicht so ist, dann vielleicht, weil die Glukagonspiegel ohnehin schon niedrig waren, da die Tiere nicht dick oder diabetisch waren.

4.8 3 wöchige Behandlung mit Exendin-4 führt zu einer Reduzierung der beta-Zellmasse, die alpha-Zellmasse verändert sich hingegen nicht

Die Gabe von Exendin-4 löst in der Maus einen Inkretineffekt aus. Hierdurch wird die Insulinsekretion der pankreatischen beta-Zellen erhöht. GLP-1 und dessen Rezeptoragonisten wirken sich zudem proliferationsfördernd auf pankreatischen beta-Zellen aus (Xu *et al.*, 1999; Garber, 2011). Die Wirkung

des Exendin-4 auf die pankreatische alpha-Zellmasse ist weitestgehend unbekannt. In unseren Versuchen beobachteten wir bei den mit Exendin-4 behandelten Mäusen tendenziell niedrigere basale Glukagonspiegel. Hierdurch könnte der allgemeine Glukagonbedarf gesunken und die alpha-Zellmasse reduziert worden sein.

In unseren Experimenten zeigten die jungen Kontrolltiere eine tendenziell niedrigere beta-Zellmasse als ihre älteren Artgenossen. Durch die 3-wöchige Exendin-4 Behandlung sank die beta-Zellmasse von jungen und alten Tieren jeweils auf ca. 1,5 mg ab. Die Arbeiten von Tschen *et al.* (2009) beschrieben jedoch eine deutliche Steigerung der beta-Zellmasse bei normalgewichtigen Mäuse nach 7 Tage lang erhöhten Exendin-4 Spiegel. Mondragon *et al.* (2014) zeigten hingegen keinerlei Veränderung der beta-Zellmasse bei Mäusen nach 75-tägiger Exendin-4 Behandlung. Die Arbeiten von Arakawa *et al.* (2009) liefern einen Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Beobachtungen. Ihre Ergebnisse zeigen, dass Exendin-4 nur dann eine proliferationsfördernde Wirkung auf die pankreatischen beta-Zellen ausübt, wenn ein erhöhter metabolischer Insulinbedarf besteht. In ihren Experimenten führte eine chronische Exendin-4 Behandlung von adipösen Mäusen zu einer verbesserten Insulinsensivität, wodurch die beta-Zellmasse, sehr wahrscheinlich aufgrund des verminderten Insulinbedarfs, sank.

Die alpha-Zellmassen der Kontrolltiere und der mit Exendin-4 behandelten Tiere unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Chronisch erhöhte Exendin-4 Spiegel führten lediglich zu einer tendenziellen Verminderung der alpha-Zellmasse bei alten Tieren. Ob es sich hierbei um einen substantiellen Effekt handelt, muss in weiteren Studien geklärt werden. Wir schließen zunächst einen altersspezifischen Effekt der chronisch erhöhten Exendin-4 Spiegel auf die alpha-Zellmasse aus. Dies wird durch die Arbeiten von Mondragon *et al.* (2014) unterstützt, da diese ebenfalls keine Veränderung in der alpha-Zellmasse nach 75 tägiger Exendin-4 Behandlung beobachten konnten. Brom *et al.* (2014) schlossen ebenfalls einen proliferationsregulatorischen Effekt des Exendin-4 auf pankreatische alpha-Zellen aus.

4.9 Vor- und Nachteile des verwendeten Modellorganismus

Wir entschieden uns für die Verwendung von wildtypischen C57BL6-Mäusen, um grundlegende Aspekte der alpha-Zellfunktion im Krankheitsbild des Typ 2 Diabetes mellitus zu untersuchen. C57BL6-Mäuse können leicht in einen prä-diabetischen Zustand mit einhergehender Hyperinsulinämie überführt werden und eignen sich von daher hervorragend für die Beantwortung der Frage, ob pankreatische alpha-Zellen eine Insulinresistenz entwickeln können. Um Nebeneffekte durch Schwankungen in anderen hormonellen Systemen möglichst gering zu halten, entschieden wir uns für die Verwendung von männlichen Mäusen.

Im Gegensatz zu den Analyseverfahren für die Bestimmung des Blutzuckers und des Plasmainsulins (z.B. ultra sensitive mouse-insulin ELISA von Crystal Chem) sind die Analyseverfahren für die Bestimmung des Plasmaglukagons noch sehr unausgereift (Quoix *et al.*, 2007). Für die Doppelbestimmung einer Plasmaglukagonprobe mit dem von uns verwendeten RIA (GL-32k, Millipore) werden ca. 500 µl Vollblut benötigt. Die Entnahme solch hoher Probenvolumina ist nicht aus lebenden Tieren zulässig, da es einen Blutverlust von mehr als 10 % darstellt, bei dem das Versuchstier ein erhebliches Leid erfährt. Zudem würde sich ein solch großer Blutverlust negativ auf das Blutzuckersystem auswirken (Hoff und Rlagt, 2000). Aufgrund dieser Tatsachen konnten wir keine fortlaufenden Messungen des Plasmaglukagons während der ipGTTs durchführen.

Obwohl Ratten ein größeres Blutvolumen haben und sich dadurch die oben angesprochenen Probleme bei der Messung des Plasmaglukagons nicht ergeben hätten, sind diese weniger gut für die alpha-Zellforschung geeignet. Der Grund hierfür ist, dass sich die alpha-Zellfunktion von Ratten deutlicher von der des Menschen unterscheidet, als es die der Mäuse tut (Wendt *et al.*, 2004; Franklin *et al.*, 2005; Olsen *et al.*, 2005; MacDonald *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2007).

Aufgrund ihrer Eigenschaften und charakteristischen alpha-Zellfunktion war die C57BL6-Maus ein idealer Modellorganismus für die Beantwortung unserer Fragestellungen. Eine bessere Auflösung des Plasmaglukagonverlaufs während der ipGTTs wäre trotzdem wünschenswert gewesen. Dies sollte jedoch nicht durch einen Wechsel des Modellorganismus realisiert werden, sondern vielmehr durch die Verbesserung der Analyseverfahren. Eine Möglichkeit hierfür könnte in Zukunft das Multiplex-Verfahren darstellen.

5 Schlussfolgerung

Unsere Ergebnisse stellen die Erstbeschreibung einer Insulinresistenz von murinen, pankreatischen alpha-Zellen *in vivo* und *in vitro* dar. Wir konnten zeigen, dass die Insulinresistenz der alpha-Zellen durch eine ausgeprägte Adipositas induziert werden kann und dass ihre Entstehung durch ein höheres Lebensalter begünstigt wird. Unsere Daten liefern somit einen Erklärungsansatz für die bei Typ 2 Diabetikern oftmals als Begleiterscheinung auftretende Hyperglykämie, trotz Insulintherapie. Die alpha-Zellen tragen somit zur Pathophysiologie des Typ 2 Diabetes mellitus bei.

Des Weiteren zeigten unsere Ergebnisse, dass die Wirkung von Exendin-4 auch mit steigendem Lebensalter erhalten bleibt. Obwohl wir in unseren Arbeiten keinerlei Beeinträchtigung der ohnehin schon niedrigen Glukagonspiegel durch Exendin-4 beobachten konnten, wurde eine Hemmung der Glukagonfreisetzung durch GLP-1 Rezeptoragonisten an anderer Stelle beschrieben (Drucker, 2002). Exendin-4 könnte somit ein möglicher Therapieansatz für die, vermutlich durch die Insulinresistenz der alpha-Zellen verursachte und trotz Insulintherapie bestehende, Hyperglykämie bei Diabetikern sein.

6 Literaturverzeichnis

- Ahren B.: Autonomic regulation of islet hormone secretion – implications for health and disease. *Diabetologia* 43 393–410, 2000
- Alessi DR, Cohen P.: Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Genet Dev*8(1):55-62, 1998
- Andersen B., Rassov A., Westergaard N. & Lundgren K.: Inhibition of glycogenolysis in primary rat hepatocytes by 1, 4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol. *Biochemical Journal* 342 545–550, 1999
- Arakawa M., Ebato C., Mita T., Hirose T., Kawamori R., Fujitani Y., Watada H.: Effects of exendin-4 on glucose tolerance, insulin secretion, and beta-cell proliferation depend on treatment dose, treatment duration and meal contents. *Biochem Biophys Res Commun.* 390(3):809-14, 2009
- Atkinson M. A. PhD, Eisenbarth G. S. MD.: Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *The Lancet*, Volume 358, Issue 9277, Pages 221 - 229, 2001
- Avogaro A, de Kreutzenberg SV, Fadini GP: Insulin signaling and life span. *Pflugers Arch.* 459(2):301-14., 2010
- Baetens D, Malaisse-Lagae F, Perrelet A, Orci L.: Endocrine pancreas: three-dimensional reconstruction shows two types of islets of langerhans. *Science* 206(4424):1323-5, 1979
- Band GC, & Jones CT,; Functional activation by glucagon of glucose 6-phosphatase and gluconeogenesis in the perfused liver of the fetal guinea pig. *FEBS Letters* 119 190–194, 1980
- Banting FG. & Best CH.: Pancreatic extracts. 1922. *J.Lab Clin.Med.*, 115: 254-272.
- Baron AD, Schaeffer L, Shragg P, Koltermann OG: Role of hyperglucagonemia in maintenance of increased rates of hepatic glucose output in type II diabetics. *Diabetes* 36:274–283, 1987
- Bell GI, Polonsky KS.: Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function. *Nature* 414(6865):788-91, 2001

- Bratusch-Marrain P, Waldhäusl W.: Hepatische und periphere Insulinresistenz als Ursache der Hyperglykämie bei nichtinsulinabhängigen (Typ-2)-Diabetes mellitus. Wiener klinische Wochenschrift 99:211-217, 1987
- Brom M., Joosten L., Frielink C., Boerman O. and Gotthardt M.: 111In-exendin uptake in the pancreas correlates with the beta cell mass but not with the alpha cell mass. Diabetes published ahead of print doi:10.2337/db14-1212, 2014
- Buteau J, Roduit R, Susini S, Prentki M: Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells. Diabetologia 42 : 856 –864,1999
- Buteau J., Spatz ML., Accili D.: Transcription factor FoxO1 mediates glucagon-like peptide-1 effects on pancreatic beta-cell mass. Diabetes.55(5):1190-6, 2006
- Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC: Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. Diabetes. 52:102–110, 2003
- Ciudad C., Camici M., Ahmad Z., Wang Y., DePaoli-Roach AA. & Roach PJ.: Control of glycogen synthase phosphorylation in isolated rat hepatocytes by epinephrine, vasopressin and glucagon. European Journal of Biochemistry 142 511–520, 1984
- Creutzfeldt W.: The entero-insular axis in type 2 diabetes - incretins as therapeutic agents. Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes, 109 Suppl 2: S288-S303, 2001
- de Heer J, Rasmussen C, Coy DH, Holst JJ. Glucagon-like peptide-1, but not glucose-dependent insulinotropic peptide, inhibits glucagon secretion via somatostatin (receptor subtype 2) in the perfused rat pancreas. Diabetologia 51:2263–2270. doi: 10.1007/s00125-008-1149-y, 2008
- De Marinis YZ, Salehi A, Ward CE, Zhang Q, Abdulkader F, Bengtsson M, Braha O, Braun M, Ramracheya R, Amisten S, Habib AM, Moritoh Y, Zhang E, Reimann F, Rosengren AH, Shibasaki T, Gribble F, Renström E, Seino S, Eliasson L, Rorsman P.: GLP-1 inhibits and adrenaline stimulates glucagon release by differential modulation of N- and L-type Ca²⁺ channel-dependent exocytosis. Cell Metab.11(6):543-53. doi: 10.1016/j.cmet.2010.04.007, 2010

-
- DeFronzo RA.: The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. 37(6):667-87, 1988
 - Derewenda U., Derewenda Z., Dodson GG., Hubbard RE. & Korber F.: Molecular structure of insulin: the insulin monomer and its assembly. Br.Med.Bull., 45: 4-18, 1989
 - Diao J., Asghar Z., Chan CB. & Wheeler MB.: Glucose-regulated glucagon secretion requires insulin receptor expression in pancreatic α -cells. Journal of Biological Chemistry 280 33487–33496, 2005
 - Ding WG., Renström E., Rorsman P., Buschard K., Gromada J.: Glucagon-like peptide I and glucose-dependent insulinotropic polypeptide stimulate Ca^{2+} -induced secretion in rat α -cells by a protein kinase A-mediated mechanism. Diabetes. 46(5):792-800, 1997
 - Drucker D.J.: Biological actions and therapeutic potential of the glucagon-like peptides. Gastroenterology 122(2):531-44, 2002
 - Drucker DJ., Philippe J., Mojsov S., Chick WL. and Habener JF.: Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. Proc Natl Acad Sci U S A. 84(10): 3434–3438, 1987
 - Drucker DJ.: Minireview: the glucagon-like peptides. Endocrinology. 142(2):521-7, 2001
 - Dunning BE., Foley JE. & Ahre'n B.: Alpha cell function in health and disease: influence of glucagon-like peptide-1. Diabetologia 48 1700–1713, 2005
 - Fehmann HC., Strowski M. & Goke B.: Functional characterization of somatostatin receptors expressed on hamster glucagonoma cells. American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism 268 E40–E47, 1995
 - Franklin I., Gromada J., Gjinovci A., Theander S. & Wollheim CB.: β -cell secretory products activate α -cell ATP-dependent potassium channels to inhibit glucagon release. Diabetes 54 1808–1815, 2005
 - Franklin I., Gromada J., Gjinovci A., Theander S. & Wollheim CB.: β -cell secretory products activate α -cell ATP-dependent potassium channels to inhibit glucagon release. Diabetes 54 1808–1815, 2005
 - Furuta M, Carroll R, Martin S, Swift HH, Ravazzola M, Orci L, Steiner DF.: Incomplete processing of proinsulin to insulin accompanied by elevation of

- Des-31,32 proinsulin intermediates in islets of mice lacking active PC2. *J Biol Chem.* 273(6):3431-7, 1998
- Furuta M, Zhou A, Webb G, Carroll R, Ravazzola M, Orci L, Steiner DF.: Severe defect in proglucagon processing in islet A-cells of prohormone convertase 2 null mice. *J Biol Chem.* 276(29):27197-202, 2001
 - Garber A.J.: Incretin effects on β -cell function, replication, and mass: the human perspective. *Diabetes Care.* 2:S258-63, 2011
 - González M, Böer U, Dickel C, Quentin T, Cierny I, Oetjen E, Knepel W.: Loss of insulin-induced inhibition of glucagon gene transcription in hamster pancreatic islet alpha cells by long-term insulin exposure. *Diabetologia* 51(11):2012-21, 2008
 - Gosmain Y., Masson MH., Philippe J.: Glucagon: the renewal of an old hormone in the pathophysiology of diabetes. *J Diabetes.* 5(2):102-9, 2013
 - Gromada J., Hoy M., Buschard K., Salehi A. & Rorsman P.: Somatostatin inhibits exocytosis in rat pancreatic a-cells by Gi2-dependent activation of calcineurin and depriming of secretory granules. *Journal of Physiology* 535 519–532, 2001
 - Gromada J., Ma X., Hoy M., Bokvist K., Salehi A., Berggren PO. & Rorsman P.: ATP-sensitive KC channel-dependent regulation of glucagon release and electrical activity by glucose in wild-type and SUR1K/K mouse alpha-cells. *Diabetes* 53 (Suppl 3) S181–S189, 2004
 - Guerre-Millo M.: Adipose tissue and adipokines: for better or worse. *Diabetes Metab.* 30(1):13-9, 2004
 - Guney M. A. und Gannon M.: Pancreas Cell Fate. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 87(3): 232–248, 2009
 - Gyulxhandanyan AV., Lu H., Lee SC., Bhattacharjee A., Wijesekara N., Fox JE., MacDonald PE., Chimienti F., Dai FF. & Wheeler MB.: Investigation of transport mechanisms and regulation of intracellular Zn²⁺ in pancreatic cells. *Journal of Biological Chemistry* 283 10184–10197, 2008
 - Herzig S., Long F., Jhala US., Hedrick S., Quinn R., Bauer A., Rudolph D., Schutz G., Yoon C., Puigserver P. *et al.*: CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 413 179–183, 2001
 - Hien P. & Böhm B.: *Diabetes-Handbuch - Eine Anleitung für Praxis und Klinik.* Springer, 5. Auflage: 91-117, 2007

- Hoehn KL., Salmon AB., Hohnen-Behrens C., Turner N., Hoy AJ., Maghzal GJ., Stocker R., Van Remmen H., Kraegen EW., Cooney GJ., Richardson AR. and Jamesa DE.: Insulin resistance is a cellular antioxidant defense mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(42): 17787–17792, 2009
- Hoff J., Rlagt LV.: Methods of blood collection in the mouse. *Lab animals.* 29:47–53, 2000
- Hunyady B., Hipkin RW., Schonbrunn A. & Mezey E.: Immunohistochemical localization of somatostatin receptor SST2A in the rat pancreas. *Endocrinology* 138 2632–2635, 1997
- Ishihara H., Maechler P., Gjinovci A., Herrera PL. & Wollheim CB.: Islet beta-cell secretion determines glucagon release from neighbouring alphacells. *Nature Cell Biology* 5 330–335, 2003
- Jelinek LJ, Lok S, Rosenberg GB, Smith RA, Grant FJ, Biggs S, Bensch PA, Kuijper JL, Sheppard PO, Sprecher CA, et al.: Expression cloning and signaling properties of the rat glucagon receptor. *Science* 259(5101):1614-6, 1993
- Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM: Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444:840–846, 2006
- Kahn SE.: The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 46(1):3-19, 2003
- Kaneko K., Shirotani T., Araki E., Matsumoto K., Taguchi T., Motoshima H., Yoshizato K., Kishikawa H. & Shichiri M.: Insulin inhibits glucagon secretion by the activation of PI3-kinase in In-R1-G9 cells. *Diabetes Research and Clinical Practice* 44 83–92, 1999
- Kerner W., Brückel J., Böhm B.O.: Evidenzbasierte Leitlinie der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG) - Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus, 2006
- Kieffer TJ., Habener JF.: The glucagon-like peptides. *Endocr Rev.* 20(6):876-913, 1999
- Kieffer TJ., McIntosh CH., Pederson RA.: Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology.* 136(8):3585-96, 1995

- Kurland IJ. & Pilkis SJ.: Covalent control of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: insights into autoregulation of a bifunctional enzyme. *Protein Science* 4 1023–1037, 1995
- Lee J, Pilch PF.: The insulin receptor: structure, function, and signaling. *Am J Physiol.* 266(2 Pt 1):C319-34, 1994
- Leibiger IB, Leibiger B, Berggren PO.: Insulin signaling in the pancreatic beta-cell. *Annu Rev Nutr.* 28:233-51, 2008
- Liang Y, Cushman SM, Whitesell RR, Matschinsky FM.: GLUT1 is adequate for glucose uptake in GLUT2-deficient insulin-releasing beta-cells. *Horm Metab Res.* 29(6):255-60, 1997
- Liu Y.Q., Jetton T.L. and Leahy J.L.: beta-Cell adaptation to insulin resistance. Increased pyruvate carboxylase and malate-pyruvate shuttle activity in islets of nondiabetic Zucker fatty rats. *J Biol Chem.* 277(42):39163-8, 2002
- Liu Z. and Habener JF.: Glucagon-like Peptide-1 Activation of TCF7L2-dependent Wnt Signaling Enhances Pancreatic Beta Cell Proliferation. *J Biol Chem.* 283(13): 8723–8735, 2008
- M.L. Golson, A. Ackermann Misfeldt, U.G. Kopsombut, C.P. Petersen and M. Gannon: High Fat Diet Regulation of β -Cell Proliferation and β -Cell Mass. *Open Endocrinol J.* 4: 10.2174, 2010
- Ma X., Zhang Y., Gromada J., Sewing S., Berggren PO., Buschard K., Salehi A., Vikman J., Rorsman P. & Eliasson L.: Glucagon stimulates exocytosis in mouse and rat pancreatic alpha-cells by binding to glucagon receptors. *Molecular Endocrinology* 19 198–212, 2005
- MacDonald PE., De Marinis YZ., Ramracheya R., Salehi A., Ma X., Johnson PR., Cox R., Eliasson L. & Rorsman P.: A K ATP channel-dependent pathway within alpha cells regulates glucagon release from both rodent and human islets of Langerhans. *PLoS Biology* 5 e143, 2007
- Mayo KE., Miller LJ., Bataille D., Dalle S., Goke B., Thorens B. & Drucker DJ.: International Union of Pharmacology. XXXV. The glucagon receptor family. *Pharmacological Reviews* 55 167–194, 2003
- Mondragon A., Davidsson D., Kyriakoudi S., Bertling A., Gomes-Faria R., Cohen P., Rothery S., Chabosseau P., Rutter GA., da Silva Xavier G.: Divergent Effects of Liraglutide, Exendin-4, and Sitagliptin on Beta-Cell

Mass and Indicators of Pancreatitis in a Mouse Model of Hyperglycaemia. PLOS one DOI: 10.1371/journal.pone.0104873, 2014

- Nadal A., Quesada I. & Soria B.: Homologous and heterologous asynchronicity between identified alpha-, beta- and delta-cells within intact islets of Langerhans in the mouse. *Journal of Physiology* 517 85–93, 1999
- Neumiller JJ.: Differential chemistry (structure), mechanism of action, and pharmacology of GLP-1 receptor agonists and DPP-4 inhibitors. *J Am Pharm Assoc* (2003). 49 Suppl. 1:S16-29, 2009
- Olsen HL., Theander S., Bokvist K., Buschard K., Wollheim CB. & Gromada J.: Glucose stimulates glucagon release in single rat alpha-cells by mechanisms that mirror the stimulus-secretion coupling in beta-cells. *Endocrinology* 146 4861–4870, 2005
- Orskov C., Rabenhøj L., Wettergren A., Kofod H., Holst JJ.: Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide I in humans. *Diabetes*. 43(4):535-9, 1994
- Orskov C., Wettergren A., Holst JJ.: Biological effects and metabolic rates of glucagonlike peptide-1 7-36 amide and glucagonlike peptide-1 7-37 in healthy subjects are indistinguishable. *Diabetes*. 42(5):658-61, 1993
- Pan X.R., Li G.W., Hu Y.H., Wang J.X., Yang W.Y., An Z.X., Hu Z.X., Lin J., Xiao J.Z., Cao H.B., Liu P.A., Jiang X.G., Jiang Y.Y., Wang J.P., Zheng H., Zhang H., Bennett P.H. and Howard B.V.: Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance. The Da Qing IGT and Diabetes Study. *Diabetes Care*, 20: 537-544, 1997
- Pansuria M., Xi H., Li L., Yang XF., Wang H.: Insulin resistance, metabolic stress, and atherosclerosis. *Front Biosci (Schol Ed)*. 4:916-31, 2012
- Peyot ML, Pepin E, Lamontagne J, Latour MG, Zarrouki B, Lussier R, Pineda M, Jetton TL, Madiraju SR, Joly E, Prentki M.: Beta-cell failure in diet-induced obese mice stratified according to body weight gain: secretory dysfunction and altered islet lipid metabolism without steatosis or reduced beta-cell mass. *Diabetes*. 59(9):2178-87, 2010
- Porksen,N.: The in vivo regulation of pulsatile insulin secretion. *Diabetologia*, 45: 3-20, 2002

- Porte D.: Clinical importance of insulin secretion and its interaction with insulin resistance in the treatment of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 17:181–188, 2001
- Prentki M.: New insights into pancreatic beta-cell metabolic signaling in insulin secretion. *Eur. J. Endocrinol.* 134:272–286, 1996
- Proshchina AE. and Savel'yev SV.: Immunohistochemical Study of a- and b-Cell Distribution in Human Pancreatic Langerhans Islets of Various Types. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 155(6):798-801, 2013
- Quesada I., Nadal A. & Soria B.: Different effects of tolbutamide and diazoxide in alpha, beta-, and delta-cells within intact islets of Langerhans. *Diabetes* 48 2390–2397, 1999
- Quesada I., Todorova MG., Alonso-Magdalena P., Beltra M., Carneiro EM., Martin F., Nadal A. & Soria B.: Glucose induces opposite intracellular Ca²⁺C concentration oscillatory patterns in identified a- and b-cells within intact human islets of Langerhans. *Diabetes* 55 2463–2469, 2006
- Quesada I., Tudurí E., Ripoll C., Nadal A.: Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J Endocrinol.* 199(1):5-19, 2008
- Quoix N., Cheng-Xue R., Guiot Y., Herrera PL., Henquin JC. & Gilon P.: The GluCre-ROSA26EYFP mouse: a new model for easy identification of living pancreatic alpha-cells. *FEBS Letters* 581 4235–4240, 2007
- Ravier MA. & Rutter GA.: Glucose or insulin, but not zinc ions, inhibit glucagon secretion from mouse pancreatic alpha-cells. *Diabetes* 54 1789–1797, 2005
- Reaven GM, Chen YD, Golay A, Swislocki AL, Jaspan JB.: Documentation of hyperglucagonemia throughout the day in nonobese and obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 64:106–110, 1987
- Reaven GM.: The fourth musketeer--from Alexandre Dumas to Claude Bernard. *Diabetologia* 38(1):3-13, 1995
- Robertson RP., Harmon J., Tran PO., Tanaka Y., Takahashi H.: Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes.* 52(3):581-7, 2003

- Rorsman P, Eliasson L, Renström E, Gromada J, Barg S, Göpel S.: The Cell Physiology of Biphasic Insulin Secretion. *News Physiol Sci*.15:72-77, 2000
- Rorsman,P. & Renstrom,E.: Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia*, 46: 1029-1045, 2003
- Schinner S., Barthel A., Dellas C., Grzeskowiak R., Sharma SK., Oetjen E., Blume R. und Knepel W.: Protein kinase B activity is sufficient to mimic the effect of insulin on glucagon gene transcription. *J Biol Chem*. 280(8):7369-76, 2005 (2)
- Schinner S., Scherbaum WA., Bornstein SR., Barthel A.: Molecular mechanisms of insulin resistance. *Diabet Med*. 22(6):674-82, 2005 (1)
- Seino S, Bell GI.: Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. *Biochem Biophys Res Commun*.159(1):312-6, 1989
- Slack JM.: Developmental biology of the pancreas. *Development* 121(6):1569-80, 1985
- Sladek R., Rocheleau G., Rung J., Dina C., Shen L., Serre D., Boutin P., Vincent D., Belisle A., Hadjadj S., Balkau B., Heude B., Charpentier G., Hudson T.J., Montpetit A., Pshezhetsky A.V., Prentki M., Posner B.I., Balding D.J., Meyre D., Polychronakos C. and Froguel P.: A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*, 445: 881-885, 2007
- Slavin BG., Ong JM. & Kern PA.: Hormonal regulation of hormonesensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. *Journal of Lipid Research* 35 1535–1541, 1994
- Song WJ., Schreiber WE., Zhong E., Liu FF., Kornfeld BD., Wondisford FE., Hussain MA.: Exendin-4 stimulation of cyclin A2 in beta-cell proliferation. *Diabetes*. 57(9):2371-81, 2008
- Steil GM, Trivedi N, Jonas JC, Hasenkamp WM, Sharma A, Bonner-Weir S, Weir GC.: Adaptation of beta-cell mass to substrate oversupply: enhanced function with normal gene expression. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 280:E788–E796, 2001
- Stoffers DA, Kieffer TJ, Hussain MA, Drucker DJ, Bonner-Weir S, Habener JF, Egan JM: Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes* 49 : 741 –748, 2000

- Storlien LH, James DE, Burleigh KM, Chisholm DJ, Kraegen EW.: Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats. *Am J Physiol.* 251(5 Pt 1):E576-83, 1986
- Strowski MZ., Parmar RM., Blake AD. & Schaeffer JM.: Somatostatin inhibits insulin and glucagon secretion via two receptor subtypes: an in vitro study of pancreatic islets from somatostatin receptor 2 knockout mice. *Endocrinology* 141 111–117, 2000
- Summers SA.: Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res.* 45(1):42-72, 2006
- Thomsen J, Kristiansen K, Brunfeldt K, Sundby F.: The amino acid sequence of human glucagon. *Lett.* 21(3):315-319, 1972
- Tschen S., Dhawan S., Gurlo T. und Bhushan A.: Age-Dependent Decline in β -Cell Proliferation Restricts the Capacity of β -Cell Regeneration in Mice. *Diabetes* 58(6): 1312–1320, 2009
- Unger RH., Orci L.:The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Lancet* 1:14, 1975
- van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG.: Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev* 91(1):79-118. , 2011
- Vieira E., Salehi A. & Gylfe E.: Glucose inhibits glucagon secretion by a direct effect on mouse pancreatic alpha cells. *Diabetologia* 50 370–379, 2007
- Wajchenberg BL.: beta-cell failure in diabetes and preservation by clinical treatment. *Endocr Rev.* (2):187-218, 2007
- Wakelam MJ, Murphy GJ, Hruby VJ, Houslay MD.: Activation of two signal-transduction systems in hepatocytes by glucagon. *Nature.* 323(6083):68-71, 1986
- Waldhäusl W., Gries F.A., Scherbaum W.: *Diabetes in der Praxis.* Springer, Lehrbuch, 3. Auflage, 2004
- Waldhäusl W., Roden M.: Effects of free fatty acids on glucose transport/phosphorylation in skeletal muscle in humans. *Current opinion in Endocrinology and Diabetes* 7: 211-216, 2000
- Wendt A., Birnir B., Buschard K., Gromada J., Salehi A., Sewing S., Rorsman P. & Braun M.: Glucose inhibition of glucagon secretion from rat a-

- cells is mediated by GABA released from neighboring b-cells. *Diabetes* 53 1038–1045, 2004
- Xu E., Kumar M., Zhang Y., Ju W., Obata T., Zhang N., Liu S., Wendt A., Deng S. & Ebina Y.: Intra-islet insulin suppresses glucagon release via GABA-GABAA receptor system. *Cell Metabolism* 3 47–58, 2006
 - Xu G., Stoffers D.A., Habener J.F., Bonner-Weir S.: Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes*. 48(12):2270-6, 1999
 - Yoon J.C., Puigserver P., Chen G., Donovan J., Wu Z., Rhee J., Adelman G., Stafford J., Kahn C.R., Granner D.K. et al.: Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 413 131–138, 2001
 - Yoshimoto Y., Fukuyama Y., Horio Y., Inanobe A., Gotoh M. & Kurachi Y.: Somatostatin induces hyperpolarization in pancreatic islet [alpha] cells by activating a G protein-gated KC channel. *FEBS Letters* 444 265–269, 1999
 - Yoshino J., Mills K. F., Yoon M. J., Imai S.: Nicotinamide mononucleotide, a key NAD(+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell Metab.* 14(4):528-36, 2011
 - Zeggini E., Weedon M.N., Lindgren C.M., Frayling T.M., Elliott K.S., Lango H., Timpson N.J., Perry J.R., Rayner N.W., Freathy R.M., Barrett J.C., Shields B., Morris A.P., Ellard S., Groves C.J., Harries L.W., Marchini J.L., Owen K.R., Knight B., Cardon L.R., Walker M., Hitman G.A., Morris A.D., Doney A.S., McCarthy M.I. and Hattersley A.T.: Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science*, 316: 1336-1341, 2007
 - Zimmet P., Alberti K.G. and Shaw J.: Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 414:782–787, 2000

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Langerhanssche Inseln im Pankreas einer C57BL6-Maus.....	7
Abbildung 2: Wirkung des Insulins über den PI3K/PKB-Signalweg.....	10
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Glukagonsekretion von murinen pankreatischen alpha-Zellen.....	15
Abbildung 4: Einstellung der Helligkeit und des Kontrastes zur Optimierung der Darstellung für das menschliche Auge.....	38
Abbildung 5: Bestimmung der Querschnittsfläche eines murinen Pankreasschnittes.....	39
Abbildung 6: Bestimmung der Querschnittsfläche der beta-Zellen.....	40
Abbildung 7: Bestimmung der Querschnittsfläche der alpha-Zellen.....	41
Abbildung 8: Beispiel zur Berechnung der alpha- und beta-Zellmasse aus murinen Pankreata.....	42
Abbildung 9: Exemplarische Gewichtsentwicklung von "jungen" und "alten" C57BL6-Mäusen.....	49
Abbildung 10: Alte Mäuse zeigten eine gestörte Glukosetoleranz nach Hochfett-diät.....	53
Abbildung 11: Junge und alte Mäuse zeigen eine dysregulierte Insulinsekretion nach Hochfett-diät, die Hyperinsulinämie ist bei alten Mäusen jedoch deutlicher ausgeprägt.....	55
Abbildung 12: Mangelnde Suppression der Glukagonspiegel bei alten Tieren nach Hochfett-diät.....	57
Abbildung 13: Die alpha-Zellen von alten adipösen Mäusen zeigen ein vermindertes Ansprechen auf Insulin im Zellkulturexperiment.....	59
Abbildung 14: 8 Wochen Hochfett-diät bewirken nur einen Anstieg der beta-Zellmasse.....	61
Abbildung 15: Exendin-4 verbessert die Glukosetoleranz von C57BL6-Mäusen altersunabhängig.....	64
Abbildung 16: Schnellere Insulinreaktion bei jungen und alten Mäusen durch Exendin-4.....	66
Abbildung 17: Exendin-4 zeigt keinen Effekt auf die Glukagonspiegel "junger" und "alter" Mäuse <i>in vivo</i>	68
Abbildung 18: Chronische erhöhte Exendin-4 Spiegel senken die beta-Zellmasse von "jungen" und "alten" C57BL6-Mäusen.....	69

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ursachen der Insulinresistenz (Auswahl; Waldhäusl et al.,2004 und Schinner et. al/ 2005)	12
Tabelle 2: Gewichtsspezifische Injektionsvolumina der 2000 nM Exendin-4 Lösung zur täglichen Behandlung von C57BL6 Mäusen.....	27
Tabelle 3: Zusammensetzung der verschiedenen, in den Versuchen verwendeten, Spezial-Diäten.....	29
Tabelle 4: Gewichtsspezifische Injektionsvolumina einer 30 %igen Glukoselösung für die Durchführung eines ipGTT mit 1,5 mg Glukose pro g Körpergewicht.	32
Tabelle 5: Pipettierschema zur Herstellung eines Standards mit verschiedenen Glukagonkonzentrationen.	45
Tabelle 6: Gruppenspezifische Gewichtszunahme von "jungen" und "alten" C57BL6-Mäusen. Die Mittelwerte der einzelnen Versuchsreihen wurden für die Berechnung der gruppenspezifischen Gewichtszunahme verwendet.....	50

Danksagung

Mein Dank gilt vor allem Prof. Dr. med. Sven Schinner und der Else Kröner-Fresenius-Stiftung. Durch sie bekam ich die Gelegenheit an diesem spannenden Projekt zu arbeiten. Über dies hinaus stand mir Prof. Dr. med. Sven Schinner immer helfend zur Seite und konnte mich auch in aussichtslos erscheinenden Zeiten zum Durchhalten motivieren. Er ist ein Chef, wie man ihn sich nur wünschen kann.

Als nächstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Eckhard Lammert für die bereitwillige Übernahme der Co-Korrektur meiner Doktorarbeit bedanken. Mein Dank gilt ihm ebenfalls für die gegebene Möglichkeit des fachlichen Austausches mit dem Kollegium seines Institutes. Hier sind besonders Dr. Daniel Eberhard und Frau Barbara Bartosinska zu nennen.

Nicht weniger Dank gilt den Damen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Matthias Schott. Hier sind Dr. Margret Ehlers, Roswitha Charko und Ursula Dötter besonders hervorzuheben. Sie hatten stets ein offenes Ohr für die Freuden und Leiden des alltäglichen Lebens, gaben Motivation in aussichtslosen Situationen und standen mir mit Rat und Tat zur Seite. Vielen Dank Mädels, ich werde euch vermissen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. A. Gödecke für die Bereitstellung des Keyence BZ-9000E bedanken.

Ein Mensch der an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben darf, ist Paula-Oxana Giesa-Funk. Meine Ehefrau und die Mutter meiner Tochter. Danke für all das, was unsere Beziehung zueinander ausmacht und für all das Gute, das noch kommen wird.

In der Danksagung meiner Diplomarbeit, leider zu unrecht, unerwähnt geblieben ist Thomas Brall. Einer der besten Freunde, die man sich nur vorstellen kann. Vielen Dank für deine unermessliche Geduld mit mir und deinem Beistand in allen Lebenslagen.

Dank gilt ebenfalls meiner Mutter, Ursula Funk, und meinen Geschwistern, Susanne und Robert Funk. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt.

Für ihre Freundschaft und alles was dazu gehört, möchte ich mich bei Nils Blumreiter, Kai Lhyme, Lars Laurisch, Thomas Laufer und Timo Piatchek, sowie Jaqueline Kemper bedanken. Ich hoffe, ihr bleibt mir lange erhalten.

**Eidesstattliche Erklärung zu meiner Dissertation mit dem Titel:
„Pankreatische alpha-Zellfunktion in Abhängigkeit vom Alter
des Organismus im Mausmodell“**

Vor- und Nachname: Benedikt Funk
Geburtsdatum: 30.06.1980
Geburtsort: Heinsberg, NRW, Deutschland

Sehr geehrte Damen und Herren,

ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Ort, Datum

Unterschrift