

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
Direktor: Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer



Beiträge zur Charakterisierung eines
diabetischen Tiermodells:
die New Zealand obese-Maus (NZO)

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Erik Chankiewitz
geboren am 11. Juli 1977 in Halle (Saale)

Betreuer: Prof. Dr. E. Peschke

Gutachter:

1. Prof. Dr. E. Peschke
2. PD Dr. D. Weinert
3. Prof. em. Dr. Dr. L. Herberg

verteidigt am: 05.10.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000009344

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009344>]

Meinem Vater

Referat

Die New Zealand obese-Maus (NZO) ist charakterisiert durch hereditäre Obesitas und Typ2-Diabetes mit Insulinresistenz, Hyperinsulinämie und Glukoseintoleranz. Der durch Inzucht vermehrte Mausstamm ist ein in der Diabetologie etabliertes Tiermodell, bei dem zwischen den einzelnen Kolonien die spezifischen Merkmale differieren können. Vergleichend zu Literaturdaten wurden parallel die Hallesche Kolonie der NZO-Mäuse und der metabolisch unauffällige NMRI-Mausstamm morphologisch, physiologisch und molekularbiologisch untersucht. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Erfassung von spezifischen Veränderungen an den β -Zellen der LANGERHANSschen Inseln gelegt. Im Rahmen von Immunfluoreszenzmarkierungen der Inselhormone Insulin, Glukagon und Somatostatin wurde eine β -Zell-Hyperplasie und die damit im Zusammenhang stehende Veränderung der Inselanatomie deutlich. Bestimmungen des Blutglukose- und des Insulinspiegels in vier verschiedenen Altersgruppen veranschaulichten einen altersabhängigen Kompensationsmechanismus, der von geringer Hyperglykämie und exzessiver Hyperinsulinämie gekennzeichnet war. In Perifusionsuntersuchungen konnte eine verminderte Glukosetoleranz an separierten Inseln neonater NZO-Mäuse nachgewiesen werden. Es wurden Immunmarkierungen des GLUT2-Transporters und GLUT2-mRNS-Expressionsbestimmungen durchgeführt. Schon bei jungen NZO-Mäusen ist der zum Glukose-Sensor-Komplex gehörende GLUT2-Transporter statt in der Zellmembran im Inneren der β -Zellen lokalisiert, bei seneszenten NZO-Mäusen war er kaum noch nachweisbar. Wenn auch das GLUT2-Expressionsniveau sowohl bei NZO- als auch bei NMRI-Mäusen abnahm, so war lediglich bei NZO-Mäusen die Abnahme der GLUT2-mRNS-Expression zwischen den Altersgruppen statistisch signifikant. Der Nachweis einer nächtlich erhöhten Melatoninsynthese wurde für beide Mausstämme mittels HPLC-Technik nach Derivatisierung erbracht. Tagesrhythmische Untersuchungen zeigten keine deutlichen Unterschiede zwischen den Stämmen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Hallesche NZO-Mauskolonie in ihren diabetestypischen Eigenschaften mit denen anderer NZO-Mauskolonien gut übereinstimmt. Eine Erweiterung der Kenntnisse zur NZO-Maus stellen die Befunde bezüglich des GLUT2 dar. Weiterhin wurde die Grundlage für chronoendokrinologische Untersuchungen am diabetischen Tiermodell der Halleschen NZO-Maus gelegt.

Chankiewicz, Erik: Beiträge zur Charakterisierung eines diabetischen Tiermodells: Die New Zealand obese-Maus (NZO). Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 79 S., 2005

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Physiologie des Glukosestoffwechsels	1
1.2	Anatomie und Funktion der LANGERHANSschen Insel	3
1.2.1	β -Zelle und Insulin	5
1.2.2	α -Zelle und Glukagon	7
1.2.3	D-Zelle und Somatostatin	8
1.2.4	Weitere endokrine Inselzellen und ihre Hormone	9
1.3	Diabetisch-metabolische Entgleisungen beim Labortier	9
1.4	Melatonin und Kohlenhydratstoffwechsel	12
2	Zielstellung	13
3	Material und Technik	14
3.1	Herkunft und Haltung der Versuchstiere	14
3.2	Blutentnahme und Gewebepräparation	14
3.3	Untersuchungen zur Morphologie	15
3.3.1	Licht- und Fluoreszenzmikroskopie	15
3.3.2	Elektronenmikroskopie	17
3.4	Untersuchungen zur Physiologie	17
3.4.1	Perifusionsuntersuchungen	17
3.4.2	Quantitative Insulinbestimmung	19
3.5	Untersuchungen zur Molekularbiologie	19
3.5.1	RNS-Extraktion	19
3.5.2	Reverse Transkriptase-Reaktion	20
3.5.3	Polymerase-Ketten-Reaktion	20
3.6	Derivatisierung und HPLC	22
3.7	Statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse	23
4	Ergebnisse	24
4.1	Habitus	24
4.1.1	Allgemeine Charakteristik	24
4.1.2	Körpergewicht	26
4.2	Morphologische Befunde am Pankreas	28

4.2.1	Immunhistochemische Befunde	28
4.2.2	Elektronenmikroskopische Befunde	37
4.3	<i>In vivo</i> -Befunde	38
4.3.1	Blutglukosespiegel	38
4.3.2	Insulinspiegel	39
4.4	<i>In vitro</i> -Befunde zur β -Zell-Physiologie	42
4.5	Nachweis der GLUT2-mRNS-Expression	47
4.6	Melatoninnachweis	49
5	Diskussion	50
6	Zusammenfassung	62
7	Literaturverzeichnis	64
8	Thesen	77

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatcyclase
AFMK	N ¹ -Acetyl-N ² formyl-5-methoxykynuramin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNS	<i>copy</i> Desoxyribonukleinsäure
Ct	<i>cycle time</i>
DAB	Diaminbenzoat
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
F _x	Filial-Generation (mit Zahlenangabe)
GLUT2	Glukosetransporter 2
GTT	Glukosetoleranztest
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
ICF	Immunzytofluoreszenz
IP ₃	Inositol-Triphosphat
K _M	Michaelis-Konstante
L _{an}	Licht an
L : D	Licht zu Dunkel-Verhältnis
M	mol/l
MG	Molekulargewicht
MODY	<i>Maturity onset type diabetes in young people</i>
mRNS	<i>Messenger</i> Ribonukleinsäure
MT ₁	Melatoninrezeptortyp 1
MLT	Melatonin
MW	Mittelwert
n	Stichprobenumfang
NMRI-Maus	<i>Naval Medical Research Institute-Maus</i>
NZO-Maus	<i>New Zealand obese-Maus</i>
OD	optische Dichte

p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphatpuffer nach SÖRENSEN
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
QTL	<i>Quantitative trait locus</i>
rER	raues Endoplasmatisches Retikulum
RIA	<i>Radioimmunoassay</i>
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
± s	Standardabweichung
sec	Sekunden
± SEM	<i>Standard error of mean</i> oder Standardfehler
τ	Periodenlänge
TAE	<i>Tris-acetate buffer</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
U	Umdrehungen
ZNS	Zentralnervensystem

Feststehende fremdsprachige Ausdrücke sind *kursiv* gedruckt.

1 Einleitung

1.1 Physiologie des Glukosestoffwechsels

Die chronische Stoffwechselerkrankung Diabetes mellitus äußert sich in einer Erhöhung des Blutglukosespiegels infolge eines absoluten oder relativen Insulinmangels. Die fehlende Insulinproduktion ist beim Typ1-Diabetes Folge eines autoimmunen β -Zell-Zerstörungsprozesses. Beim Typ2-Diabetes führt ein zunehmender Insulinbedarf durch Insulinresistenz zum Dekompensieren der Insulinproduktion. Durch die voneinander abweichende Symptomatik wurden schon im Altertum zwei Diabetes-Formen unterschieden (BERGER, 1995). Das Nahrungsüberangebot, Fehlernährung, mangelnde körperliche Bewegung und eine zunehmend älter werdende Population haben vor allem in Europa und Amerika zu einem rasanten Anstieg der Inzidenz des Typ2-Diabetes geführt (ZIMMET et al., 2001; JANKA und MICHAELIS, 2002; WINER und SOWERS, 2004). Intensive Bemühungen mehrerer Generationen von Klinikern, Biochemikern und Genetikern galten der Erforschung von Wechselwirkungen zwischen angeborener Prädisposition und Umwelteinflüssen bei der Pathogenese des Diabetes. Chronischer Diabetes führt mit Akut- und Spätkomplikationen zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität. Diabetes und seine Folgeerkrankungen an Auge, Extremitäten, Nieren, Herz und vielen anderen Organen bedingen eine lebenslange Therapie, eine erhebliche Einschränkung der Lebensqualität und die Inanspruchnahme einer Vielzahl von Gesundheitsleistungen (JANKA und MICHAELIS, 2002; PRISANT, 2004).

Weltweit ist die Anzahl der Diabetiker von 30 Mio. (1985) auf 135 Mio. (1995) angestiegen und wird im Jahr 2025 schätzungsweise 300 Mio. betragen (ZIMMET et al., 2001; WINER und SOWERS, 2004). In Deutschland gibt es inzwischen ca. 4,6 Mio. Diabetiker, davon sind ca. 80 bis 85 % dem Typ2 zuzuordnen (JANKA und MICHAELIS, 2002). In erschreckendem Maße nimmt in den letzten Jahren auch die Anzahl der an Typ2-Diabetes erkrankten Kinder und Adoleszenten zu (KIESS et al., 2003).

Die mit der Nahrung zugeführten Kohlenhydrate haben eine außerordentliche Bedeutung bei der Deckung des Energiehaushaltes und beim Auf- und Umbau körpereigener Substanzen. Der ständige Wechsel zwischen Nahrungsaufnahme, Ruhezustand und körperlicher Aktivität, aber auch Extremsituationen wie Hunger und Postaggressionszustände zwingen den Organismus zur ständigen Kontrolle des Glukosestoffwechsels.

Diese Notwendigkeit einer konstanten Regulation des Zuckerstoffwechsels erkannte erstmals CLAUDE BERNARD im Jahre 1849. Vergleichend zum Pflanzenstoffwechsel untersuchte er die Physiologie der inneren Sekretion und der chemischen Blutzusammensetzung bei Mensch und Tier (STARKE, 1995a). Er war der Annahme, dass die ständige Abgabe von Glukose („Deassimilation“) in das „*milieu intérieur*“ und die Aufnahme von Glukose in die periphere Körperzelle („Assimilation“) einer übergeordneten Kontrolle des Gehirns unterliegt. Eine konstante arterielle Blutglukosekonzentration wird jedoch durch das fein abgestimmte Spiel der in den LANGERHANSschen Inseln des Pankreas gebildeten Hormone gewährleistet. Dabei nehmen Insulin und das antagonistisch wirkende Glukagon eine zentrale Stellung ein. Sie bilden durch permanente „Messung“ einen adäquaten, bedarfsorientierten Regulationsmechanismus, welcher in der Lage ist, den Blutzuckerspiegel innerhalb schmalere Grenzen zwischen 3,3 und 10 mmol/l unter möglichst allen Lebensbedingungen konstant zu halten. So wird einerseits eine unabdingbare Mindestversorgung des Zentralnervensystems (ZNS) gewährleistet, andererseits der Organismus vor der pathogenen nicht-enzymatischen Proteinglycierung geschützt.

Für das Gehirn stellt Glukose die Hauptenergiequelle dar. Zur Aufrechterhaltung vitaler Funktionen werden zwischen 5 und 6 g Glukose pro Stunde benötigt. Nur in schweren hypoglykämischen Ausnahmefällen kann die Fähigkeit zum Ketonstoffwechsel induziert werden. Das ZNS kann seinerseits auf die Blutglukoseregulation über adrenerge, cholinerge und peptiderge Fasern des autonomen Nervensystems auf das endokrine Pankreas Einfluss nehmen. Die Insulin-produzierenden β -Zellen und die Glukagon-produzierenden α -Zellen des Pankreas werden aber nicht ausschließlich durch die zentralnervöse Kontrolle gesteuert. Vielmehr tragen eine Vielzahl von Einflüssen, wie Nahrungssubstrate und ihre Metaboliten (z. B. Glukose, Aminosäuren, Fettsäuren) (UNGER et al., 1978), Hormone (z. B. Insel-, Nebennieren-, Hypophysen- und Epiphysenhormone) (STARKE, 1995a; PESCHKE et al., 1997, 2000), Schilddrüsen- und Enterohormone, Leptin u. a. (KIEFFER et al., 1996) sowie Neurotransmitter (MILLER, 1981; GILON und HENQUIN, 2001) zur Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase *via* Insulin- oder Glukagonsekretion bei. In Insulin-abhängigen Geweben wirkt Insulin anabol durch Förderung der Aufnahme, Verstoffwechsellung und Speicherung von Glukose. Glukagon besitzt vor allem in der Leber katabole Wirkungen über die Reaktivierung von Glukose aus Energiespeichern oder über die Metabolisierung von Lipiden und Aminosäuren.

1.2 Anatomie und Funktion der LANGERHANSschen Insel

Phylogenetisch betrachtet ist das Pankreas ein „junges“ Organ, dessen Entstehung unmittelbar an die Entwicklung der Wirbeltiere vor 400 Mio. Jahren gekoppelt war (BRUNNER und WARICH-EITEL, 1994). Bis auf wenige Ausnahmen ist bei Vertebraten die exokrine Verdauungsdrüse mit dem aus *Ductūs* und *Ductuli* bestehendem Gangsystem sowie die endokrinen Inselapparate zu einer kompakten Struktureinheit zusammengefasst. Diese entstammt in onto- und phylogenetischer Hinsicht einem Derivat der Wand des Mitteldarms. Die unterschiedliche äußere Form des Pankreas ist von LEGOUIS im Jahre 1873 bei verschiedenen Spezies klassifiziert worden (zit. nach BRUNNER und WARICH-EITEL, 1994). Während bei Mensch, Hund, Schwein und Rind ein kompakter Drüsenkörper (*Pancreas compactum*) in sekundär (tertiär) retroperitonealer Lage angeordnet ist, findet man bei Nagetieren eine diffus flächig ausgebreitete Drüse (*Pancreas diffusum*) und bei Fischen grüppchenförmig verteilte Drüsenkörper (*Pancreas disseminatum*) oder sogar ein „Hepatopankreas“ mit Inselanlagen innerhalb des Leberparenchyms.

Das menschliche Pankreas wiegt ca. 100 g und ist 20 cm lang. Es wird in einen dem Duodenum nahen Pankreaskopf (*Caput pancreatis*), in ein milznahes Ende, den Pankreasschwanz (*Cauda pancreatis*) und in einen beide Enden verbindenden Pankreaskörper (*Corpus pancreatis*) unterteilt. Ferner findet sich ein abgrenzbarer Kopfabschnitt, der als *Tuber omentale* bezeichnet wird und ein *Processus uncinatus*, der ebenfalls kopfnah ausgebildet wird und nach kaudal weist. Die über alle Komponenten verteilten, meistens *Ductuli*-nahen Inselorgane sind in der *Cauda pancreatis* ungleich häufig herausgebildet (dorsale Pankreasanlage). Insgesamt wird ihre Anzahl beim Menschen zwischen 100.000 und 2,5 Mio. angegeben. Die „rundlichen Häuflein“ des Pankreas sind erstmals 1869 in der medizinischen Dissertation des Deutschen PAUL LANGERHANS beschrieben und 1893 von LAGUESSE nach ihm benannt worden (zit. nach DITTRICH und HAHN VON DORSCH, 1978). Diese „îlots de Langerhans“, bestehend aus bis zu 3.000 hormonproduzierenden Zellen, sind im Durchmesser zwischen 75 und 500 µm groß (COSSEL, 1989). Insbesondere vier Haupttypen endokriner Zellen bauen die Insel auf: die Insulin-produzierende β -Zelle, die Glukagon-produzierende α -Zelle, die Somatostatin-produzierende D-Zelle und die das pankreatische Polypeptid sezernierende PP-Zelle, auch F-Zelle genannt. Die besonders bei Nagetieren anzutreffende Anordnung der Zellen mit einem β -Zell-Zentrum, einem sich nach peripher anschließenden α -Zell-reichen Ring sowie randständigen, vor allem aber disseminiert vorkommenden D-Zellen, ist in

der humanen Insel weniger deutlich (COSSEL, 1989; COOK und TABORSKY, 1990). Die Anordnung der Inselzellen variiert in den verschiedenen Pankreasanteilen, so ist ein α -Zellring vor allem im ventralen Pankreasanteil (Schwanz, Körper und teilweise Kopf) zu finden, während im dorsalen Pankreas an dessen Stelle ein PP-Zellring tritt (UNGER et al., 1978; MILLER, 1981; ALLEN, 1987; BONNER-WEIR, 1991; WIECZOREK et al., 1998). Offensichtlich besteht ein großer Unterschied im Inselaufbau bei den einzelnen Tierspezies (ELAYAT et al., 1995), z. B. ist beim Pferd um ein α -Zell-Zentrum ein β -Zell-Mantel vorhanden (HELMSTAEDTER et al., 1976). Die Anordnung der Inselzellarten ist für die Funktion der einzelnen Insel nicht unbedeutend, da die einzelnen Inselhormone sich gegenseitig regulieren und parakrine Wirkungen entfalten. So wirkt Insulin aktivierend auf die D-Zelle und hemmend auf die Glukagonsekretion, während Glukagon die Sekretion von Insulin und Somatostatin fördert und Somatostatin auf α - und β -Zellen inhibierend wirkt. Sowohl benachbarte homologe als auch heterologe Inselzellen (ORCI et al., 1975) bilden vorrangig zwei verschiedene Arten von Zell-Zellkontakten aus: 1. werden Zellen teilweise durch *gap junctions* verbunden, so entsteht ein „funktionelles Synzytium“ (UNGER et al., 1978; MEDA et al., 1982), welches über Ionen- oder Nukleotid austausch eine Kommunikation benachbarter Zellen ermöglicht; 2. einige Nachbarzellen bilden mittels *tight junctions* Kompartimentierungen aus, was eine gewisse parakrine Beeinflussung sowie einen gerichteten venösen Abstrom gewährleistet (ORCI, 1976; PIPELEERS, 1984).

Die Mikrovaskularisation der Insel wird kontrovers diskutiert. Nach FUJITA et al. (1985) erfolgt der Blutstrom vom α -Zell-Ring in Richtung des β -Zell-reichen Inselinneren. Die Untersuchungen aus dem Jahre 1982 von BONNER-WEIR und ORCI aber zeigten an perfundierten Korrosionspräparaten, welche eine dreidimensionale Auswertung zuließen, dass ein oder zwei afferente Arteriolen die Pseudokapsel der LANGERHANSschen Insel durchdringen und sich erst im Zentrum glomerulumartig in feinste fenestrierte Kapillaren aufteilen. Die Kapillaren durchqueren das β -Zell-Zentrum, bevor sie das nun Insulin-reiche Blut zentrifugal-radiär nach außen in den α - und D-Zell-reichen Randsaum führen (MURAKAMI et al., 1997). Mittels mikrovaskulärer Antikörperperfusionen konnten SAMOLS et al. im Jahre 1988 diese morphologischen Befunde auch funktionell bestätigen. Das ausgeschüttete Insulin der β -Zellen erreicht somit distal die α -Zellen und hemmt die Sekretion des antagonistisch wirkenden Hormons Glukagon. Die Somatostatinsekretion erfolgt wahrscheinlich noch weiter distal von der Glukagonsekretion (β -Zellen \rightarrow α -Zellen \rightarrow D-Zellen) (SAMOLS und STAGNER, 1990). Eine Glukagonwirkung

auf die β -Zelle könnte sich somit lediglich nach Passage des Leberkreislaufes und der zentralen systemischen Blutzirkulation entfalten. Die tonisch-hemmende Insulinwirkung auf die α -Zellen ist von so außerordentlicher Bedeutung für die Regulierung des Glukosehaushaltes, dass beim Ausfall der β -Zellen, wie beim Typ1- Diabetes, stets eine begleitende Hyperglukagonämie beobachtet wird (UNGER und ORCI, 1990).

1.2.1 β -Zelle und Insulin

Die β -Zellen, synonym wird auch die Bezeichnung B-Zellen verwendet, stellen mit 60 bis 90 % den Hauptanteil der Inselzellen dar. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass die β -Zellen stoffwechselaktive endokrine Zellen sind. Eine β -Zelle misst im Durchmesser zwischen 10 und 15 μm , sie imponiert durch einen prominenten Zellkern, ein deutlich ausgeprägtes raues Endoplasmatisches Retikulum (rER) sowie ausge dehnte Zisternen des GOLGI-Apparates. Im Zellplasma drängen sich Mitochondrien und die zwischen 250 und 300 nm großen β -Granula. In diesen ist Insulin elektronendicht meistens von einem elektronenhellen Halo umgeben (BONNER-WEIR, 1991).

Erstmals gelang es DE MEYER 1909 eine fragliche Substanz aus dem Pankreas zu isolieren, der er den Namen „Insulin“, nach dem lateinischen Wort für Insel: *insula*, gab. Das Einsetzen eines Pankreasextraktes bei Diabetes scheiterte zunächst an der proteolytischen Aktivität des exokrinen Anteils. Erst 1921 konnte bei diabetischen Hunden ein Pankreasextrakt mit aktivem Insulin zur Verringerung der diabetischen Symptomatik eingesetzt werden. Als die Entdecker des Insulins gelten FREDERICK G. BANTING und CHARLES H. BEST. Sie entwickelten 1922 eine Methode zur Pankreasextraktion, welche verfeinert wurde und noch im selben Jahr erfolgreich zur Behandlung eines jungen Diabetikers eingesetzt wurde (zit. nach ORCI et al., 1988). In den 50er-Jahren gelang es FREDERICK SANGER die Struktur des Insulins aufzuklären. Präzisiert wurde diese durch die Untersuchungen von BLUNDELL et al. (1971). Die Analysen von STEINER et al. zeigten, dass das Proteohormon Insulin als Bestandteil längerer Polypeptidketten synthetisiert wird, welche „Präproinsulin“ und „Proinsulin“ genannt werden (zit. nach ORCI et al., 1988).

Die Transkriptionsrate des Präproinsulin-Gens wird durch spezifische Transkriptionsfaktoren gesteuert. Nach Entfernung zweier größerer *Introns* wird im rER durch Translation das Vorläufermolekül synthetisiert, welches je nach Spezies aus 104 bis 109 Aminosäuren besteht. Die Signalkette am N-Terminus des Präproinsulins wird nach der Faltung in die Tertiärstruktur unter Ausbildung dreier Disulfidbrücken sehr schnell abgespaltet. Das 86 Aminosäuren lange Proinsulin wird nun in den GOLGI-Apparat trans-

portiert. Die folgende Bildung von Sekretionsvesikeln geht mit der Clathrin-Ummantelung einher. Durch Endopeptidasen wird aus dem Proinsulin das aus 31 Aminosäuren bestehende C-Peptid (*Connecting peptide*) herausgeschnitten. Zusätzlich werden durch proteolytische und tryptische Spaltung je 2 Aminosäuren entfernt. Das fertige Insulin besteht beim Menschen aus einer B-Kette mit 30 Aminosäuren, welche über zwei Disulfidbrücken mit der 21 Aminosäuren langen A-Kette verbunden ist. Die Insuline der verschiedenen Spezies unterscheiden sich oft nur durch Variation weniger Aminosäuren zwischen den Disulfidbrücken der A-Kette. Das Insulin von Hund und Schwein ist identisch und besitzt zum humanen größte Ähnlichkeit. Es unterscheidet sich lediglich durch eine einzige Aminosäure am Carboxy-Ende der B-Kette (ALLEN, 1987). Das C-Peptid ist bei verschiedenen Spezies sehr unterschiedlich. Die sekretorischen Vesikel enthalten ca. 800.000 Moleküle Insulin und äquimolar das C-Peptid, außerdem das Insulinantagonistisch wirkende Amylin und angereicherte Zink- und Kalziumionen. Die Zink-Ionen sind für eine Auskristallisation und Hemmung der tryptischen Verdauung des Insulins essentiell. Die vom GOLGI-Apparat abgeschnürten Vesikel verlieren sodann ihre Clathrin-Ummantelung und werden an Zytoskelettstrukturen wie Mikrotubuli in Richtung Zellmembran transportiert. Für eine frühe und zügige Insulinliberation stehen damit stets neu gebildete β -Granula bereit. Ältere nicht-exozytierte Vesikel akkumulieren und verschmelzen mit Lysosomen zur Wiederverarbeitung (*Recycling*) der Inhaltsstoffe. Die Insulinsekretion wird physiologischer Weise getriggert durch einen Anstieg der intrazellulären Glukosekonzentration, welche die Folge einer Erhöhung der Glukosekonzentration im Extrazellularraum ist (LOGOTHETOPOULOS et al., 1965; DEAN und MATTHEWS, 1968; PIPELEERS et al., 1985a). Jede Körperzelle besitzt Membranproteine, die einen Transport von Glukose entlang oder gegen Konzentrationsgradienten durch die Zellmembran ermöglichen. Von diesen Glukosetransportern (GLUT) gibt es eine Reihe organspezifischer Isoformen. Der in LANGERHANSschen Inseln ausschließlich auf β -Zellen vorkommende GLUT2-Transporter (ORCI et al., 1989) hat eine geringe Affinität zur Glukose. Die Michaeliskonstante (K_M) liegt mit 17 mmol/l weit oberhalb des basalen Blutzuckerspiegels, sodass ein Transport von Glukose erst bei höheren Blutglukosekonzentrationen erfolgt (THORENS, 1996). Eine Sättigung wird jedoch auch bei einer diabetischen Hyperglykämie nicht erreicht (THORENS und WEABER, 1997). Im Vergleich zur Ratte ist der GLUT2-Transporter beim Menschen 100-mal geringer vorhanden (DE VOS et al., 1995). GLUT2-Transporter und Glukokinase bilden gemeinsam den Glukose-Sensor-Komplex der β -Zelle. Wahrscheinlich kommt aber der Glukokinase eine größere Bedeutung in der Vermittlung des „Glukosereizes“ zu (MATSCHINSKY,

1996). Obwohl die Glukokinase eine dem GLUT2-Transporter vergleichbare K_M besitzt, ist der Glukosetransport bis zu 50-mal schneller als die Glukoseverwertung (HEIMBERG et al., 1993). Die Glukokinase katalysiert die Phosphorylierung der Glukose und stellt damit ein Schlüsselenzym am Beginn der Glykolyse dar (MATSCHINSKY, 1990). Die Aktivität der Glukokinase kann über Hormone und Glukose selbst reguliert werden.

Wenn durch Glykolyse ($\text{Glukose} + 2 \text{ P}_i + 2 \text{ ADP} \rightarrow 2 \text{ Laktat} + 2 \text{ ATP}$) der ATP/ADP Quotient kritisch erhöht wird, schließen sich ATP-abhängige Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle), wodurch die Zellmembran depolarisiert wird. Konsekutiv werden membranständige spannungsgesteuerte Kalziumkanäle bei Depolarisation der Zellmembran geöffnet und Kalziumionen strömen in die β -Zelle ein (GILON und HENQUIN, 2001). Eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration bewirkt die Freisetzung von Insulin durch Einfluss auf das Zytoskelett. Diese Art der Signaltransduktion ist wahrscheinlich für die frühe Phase der Insulinsekretion verantwortlich. Die gesamte Insulinsekretion zeigt einen biphasischen Verlauf (GRODSKY, 1989), wobei in der ersten Phase eine kurze aber ausgeprägte Insulinsekretion membrannaher Vesikel erfolgt und in der folgenden zweiten Phase sich vorrangig neu synthetisierte Vesikel entleeren.

Zahlreiche Signalketten unter Beteiligung einer Vielzahl von Mediatoren und elektrochemischen Vorgängen sind beschrieben worden. Eine hohe Bedeutung kommt dabei Signalübermittlern oder *Second messengern* zu. Ein Beispiel ist die Aktivierung der Adenylatcyclase (AC) mit Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) oder die Stimulierung der Phospholipase C mit Bildung von Diacylglycerol (DAG) und Inositol-Triphosphat (IP_3). All diese Signalwege führen letztendlich zu einem Anstieg der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration oder zur Neusynthese von Insulin. Auf jeden Zwischenschritt können Hormone, Neurotransmitter oder Pharmaka modulierend auf die Insulinsekretion einwirken.

1.2.2 α -Zelle und Glukagon

Im Jahre 1907 differenzierte LANE erstmals Inselzellen nach der Alkohollöslichkeit ihrer Granula. Die Zellen, bei denen der Inhalt der Granula präzipitierte, bezeichnete er als „ α -Zellen“. Die Vermutung, dass die α -Zellen der Syntheseort des Glukagons sein könnten (BENCOSME und LIEPA, 1955), kam erst 1962 durch den erfolgreichen Einsatz von Immunmarkierungen des Glukagons auf (BAUM et al., 1962). Die α -Zellen haben einen Anteil von 20 bis 25 % der Inselzellen und sind gut granuliert. Die Sekretionsvesikel sind mit 200 bis 250 nm vergleichsweise kleiner als die β -Granula (BONNER-

WEIR, 1991). Die elektronendichten Vesikelinhalte sind, je nach Tierspezies, von einem schmalen halbmondförmigen „Halo“ umgeben oder gänzlich ohne Saum.

Das Glukagonmolekül ist eine 29 Aminosäuren lange Polypeptidkette, welche bei allen bisher untersuchten Säugetieren außer dem Meerschweinchen gleich ist (SUNDBY, 1976). Ähnlich dem Insulin wird Glukagon über verschiedene Vorläufermoleküle (*Precursor*) synthetisiert. Aus dem Präproglukagon entstehen Polypeptidketten unterschiedlicher Länge und biologischer Wirkung. Das 69 Aminosäuren lange Proglukagon (UNGER und ORCI, 1990), auch als „Glicentin“ bezeichnet, wird nicht vollständig in Glukagon umgesetzt und ist unter anderem für den schmalen Halo um den elektronendichten Vesikelinhalt verantwortlich (RAVAZZOLA und ORCI, 1980). In einigen Zellen der Darmmukosa (L-Zellen) lässt sich Glicentin als „Enteroglukagon“ ebenfalls nachweisen (UNGER et al., 1978). Die Glukagonsekretion wird physiologisch vorrangig über das Absinken der Blutglukosekonzentration stimuliert (UNGER und ORCI, 1981) und kann durch Aminosäuren wie Arginin, Alanin und Glutamin verstärkt werden (PIPELEERS et al., 1985b). Signalmodulierend wirken auch Neurotransmitter und Inselhormone. Die direkte Wirkung des Insulins auf die α -Zelle ist Gegenstand von Diskussionen (RORSMAN et al., 1991).

1.2.3 D-Zelle und Somatostatin

Eine weitere endokrine Zellart der LANGERHANSschen Insel ist erstmals 1911 vom Histologen BENSLEY ursprünglich als „C-Zelle“ beschrieben worden. Dieser dritte Zelltyp hat einen Anteil zwischen 5 und 10 % und wird heute als D-Zelle bezeichnet (BONNERWEIR, 1991). Diese Somatostatin-produzierenden D-Zellen sind regelmäßig etwas kleiner als β - oder α -Zellen und von dendritischer Form. Die zahlreichen sekretorischen Vesikel sind prall mit unterschiedlichem elektronendichten Inhalt gefüllt. Jedes Granulum, zwischen 200 und 350 nm groß, ist jedoch von homogener Elektronendichte. Hauptsächlich enthalten die Vesikel das erstmals von BRAZEAU (1973) im Hypothalamus entdeckte Hormon Somatostatin. Das Tetradecapeptid Somatostatin konnte wenig später in vielen Zellen des Körpers nachgewiesen werden (UNGER et al., 1978), unter anderem in den β -Zell-armen Randbereichen der Inselapparate (LUFT et al., 1974; DUBOIS, 1975). Das in den D-Zellen synthetisierte Somatostatin beeinflusst sowohl parakrin benachbarte Inselzellen, als auch endokrin verschiedenste Verdauungsfunktionen. Beispielsweise bewirkt es eine Verringerung der Sekretion von HCl, Pepsin, Gastrin und exokrinem Pankreassekret oder wirkt motilitätshemmend für Magen, Gallenblase und Duodenum (UNGER et al., 1978; EFENDIC et al., 1980; SAMOLS und STAGNER,

1990). Glukose, Aminosäuren und sympathische Neurotransmitter stimulieren die pankreatische Somatostatinsekretion (SCHAUDER et al., 1976; ALLEN, 1987), hemmend wirken hingegen Adrenalin und Acetylcholin (ALLEN, 1987).

1.2.4 Weitere endokrine Inselzellen und ihre Hormone

In den LANGERHANSschen Inseln sind noch weitere endokrine Zelltypen vertreten, wovon die F-Zellen (PP-Zellen) am häufigsten sind. Diese sind in ihrer Form sehr variabel. Sie synthetisieren das pankreatische Polypeptid, welches aus 36 Aminosäuren besteht. Die Substanz P-produzierenden EC-Zellen, Gastrin-produzierenden G₁-Zellen und die das vasoaktive intestinale Peptid- (VIP-) produzierenden D₁-Zellen machen je weniger als ein Prozent der Inselmasse aus (BONNER-WEIR, 1991). Die bemerkenswerte Gemeinsamkeit aller Inselzellen besteht in der Koordination des Stoffwechsels.

1.3 Diabetisch-metabolische Entgleisungen beim Labortier

Die Physiologen JOSEPH VON MERING und OSCAR MINKOWSKI zeigten 1889 mit ihren bedeutenden Experimenten erstmalig, dass bei Hunden durch die Entnahme des Pankreas ein Diabetes induzierbar ist (zit. nach DITTRICH und HAHN VON DORSCH, 1978). SSOBOLEW, ein Schüler PAWLOWS, unterband wenig später (1902) bei Hunden den Hauptausführungsgang des Pankreas, mit der Folge einer Degeneration des exokrinen Pankreasanteils. Da diese Tiere keinen Diabetes bekamen, wurde ein antidiabetisches Hormon, welches nur vom unversehrten Inselapparat produziert sein konnte, vermutet. Seit jener Zeit werden Tiere in Studien zum Verständnis des Diabetes mellitus beim Menschen herangezogen. Der tierexperimentelle Insulinmangel wurde bis in die Mitte des 20. Jahrhunderts durch eine chirurgische oder chemo-toxische Ausschaltung der Pankreasfunktion erreicht (HERBERG et al., 1976). Neue Perspektiven wurden mit endokrinologischen und immunologischen Behandlungen, genetischer Manipulation, aber vor allem mit der planmäßigen Züchtung von diabetischen Tieren eröffnet. Zum gezielten Studium von Pathogenese, Pathophysiologie und Therapie des humanen Diabetes standen damit Tiermodelle zur Verfügung, welche entweder dem beginnenden menschlichen Altersdiabetes mit Adipositas oder dem Typ des jugendlichen Insulinmangeldiabetes ähnelten (HERBERG et al., 1976; SHAFRIR, 1990).

Die komplexen Wechselwirkungen beim Typ2-Diabetes zwischen erblicher Disposition und exogenen Faktoren lassen sich beim Menschen nicht befriedigend untersuchen, da der genetische Hintergrund zu vielfältig und die Umweltbedingungen über lange Zeit-

räume kaum zu beurteilen sind (STAUFFACHER et al., 1971). Bei Tiermodellen mit spontanem Diabetes lassen sich Genetik und Umwelt unter Laborbedingungen nahezu konstant halten und können adäquat getrennt voneinander untersucht werden. Diese Vorteile, in Verbindung mit einer kurzen Generations- und Lebenszeit und nicht zuletzt ökonomischen Gesichtspunkten, ließen das Interesse vor allem an stoffwechselgestörten Nagetieren (*Rodentia*) ansteigen (RENOLD, 1968). In der experimentellen Diabetologie werden aber auch andere Tierspezies verwendet, beispielsweise der mongolische Gerbil (*Meriones unguiculatus*), der Tuco tuco (*Ctenomys talarum*), das Spitzhörnchen (*Uro-gale Everetti*) und der Celebesaffe (*Macaca nigra*) (HERBERG et al., 1976; HUNT et al., 1976; SHAFRIR, 1990; HAHN VON DORSCHKE et al., 1994). Es existiert allerdings kein Tiermodell, welches die gesamte Vielfalt an Störungen oder Komplikationen des humanen Diabetes mellitus repräsentiert (SHAFRIR, 1990). Dennoch ist den oben erwähnten Tierspezies gemeinsam, dass sie unter passenden äußeren Bedingungen in bestimmten Entwicklungsphasen einen erhöhten Blutzuckerspiegel, erhöhte Insulinwerte sowie eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Fettsucht entwickeln. Einige Tiermodelle, beispielsweise mehrere Hamsterspezies, neigen zur Bildung von Ketonkörpern.

Der von MARIANNE und FRANZ BIELSCHOWSKY 1948 an der University of Otago Medical School in Neuseeland (BIELSCHOWSKY und GOODALL, 1970) gezüchtete New Zealand obese-Mausstamm (NZO) weist metabolische Störungen sowohl im Kohlenhydrat- als auch im Fettmetabolismus auf (BIELSCHOWSKY und BIELSCHOWSKY, 1956; PROIETTO und LARKINS, 1993). Durch selektive Inzucht, zeigten einige Tiere ab der 10. Generation erhöhte Körpergewichte.

Erste Untersuchungen der BIELSCHOWSKYS zum NZO-Stamm befassten sich mit Gewichtsveränderungen, den Blutzuckerspiegeln, Effekten von Stilböstrol und Insulin sowie morphologischen Veränderung der LANGERHANSschen Inseln (BIELSCHOWSKY und BIELSCHOWSKY, 1956). Bislang ist die pathomorphologische Entwicklung von NZO-Mäusen wenig untersucht (BIELSCHOWSKY und BIELSCHOWSKY, 1953; BIELSCHOWSKY und BIELSCHOWSKY, 1956; CROFFORD und DAVIS, 1965; UPTON und MAGUIRE, 1981). So existieren bislang keine ultrastrukturellen Beschreibungen der β -Zellen von NZO-Mäusen. Vielmehr wurde die Beeinflussbarkeit von Obesitas und Glukosestoffwechsel in *in vivo*- (BIELSCHOWSKY und BIELSCHOWSKY, 1956; LARKINS und MARTIN, 1972; LARKINS, 1973a; CAMERON et al., 1974) und einigen *in vitro*-Versuchen (HERBERG et al., 1970a; LOVELL-SMITH, 1971; GATES et al., 1972; HUCHZERMAYER und STAIB, 1973; LARKINS, 1973b; LARKINS et al., 1980) untersucht. Außerdem beschäftigten sich um-

fangreiche Untersuchungen mit Störungen in Leber- und Fettzelle auf Enzymebene (BROLIN et al., 1964; SNEYD, 1964; STAUFFACHER et al., 1967; ANDRIKOPOULOS et al., 1993, 1996).

Neuere Untersuchungen haben bereits eine Vielzahl von Genloci identifiziert, die so genannten „*Quantitative trait loci*“ (QTL), welche für die spontane Entstehung der Stoffwechsellibalancen verantwortlich sind (LEITER und HERBERG, 1997; KLUGE et al., 2000; ORTLEPP et al., 2000). Aus den bisherigen Untersuchungen lässt sich konstatieren, dass beobachtete Defekte bei Schlüsselfunktionen der Glukosehomöostase denen der Pathogenese des Typ2-Diabetes entsprechen (STARKE, 1995b). Mindestens drei gravierende Defekte bestehen: 1. eine abnorme Insulinsekretion auf einen Glukosestimulus (GATES et al., 1972; LARKINS, 1973a,b); 2. eine reduzierte Fähigkeit des peripheren Gewebes Insulin-stimuliert Glukose aufzunehmen (HUCHZERMAYER et al., 1973; BAXTER und LAZARUS, 1975; VERONI und LARKINS, 1986) und 3. eine gesteigerte oder vermindert hemmbare hepatische Glukoseproduktion (VERONI et al., 1991; ANDRIKOPOULOS und PROIETTO, 1995). Die Glukosetransporter sind bei der Regulation des Glukosehaushaltes von so außerordentlicher Bedeutung, dass Störungen des Glukosetransportes für alle drei genannten Pathomechanismen denkbar wären (STARKE, 1995b). Bislang ist beim NZO-Mausstamm lediglich eine frühe Verminderung des Glukosetransporters 4 (GLUT4) im braunen und weißen Fettgewebe sowie in der Muskulatur nachgewiesen worden (FERRERAS et al., 1994).

Die Ausprägung der metabolischen Störungen ist zwischen den weltweit verteilten NZO-Maus-Kolonien sehr unterschiedlich (RENOLD, 1968; SHAFRIR, 1990). Spezielle Merkmale von Inzuchtstämmen können von Spontanmutationen betroffen sein und sich ändern. Außerdem ist ein Einfluss spezieller Diäten auf die vorhandenen Stoffwechsellibalancen nachgewiesen worden (HUCHZERMAYER und STAIB, 1973; LARKINS, 1973a).

Ein erhöhter Insulinspiegel, eine gestörte Glukosetoleranz und leicht erhöhte Blutglukosespiegel bei Entwicklung einer hypertrophischen Fettsucht prädestinieren die NZO-Maus zu vergleichenden Untersuchungen mit einem beginnenden menschlichen Diabetes vom Erwachsenentyp (WILLMS et al., 1970; HERBERG et al., 1976; HERBERG und COLEMAN, 1977; COLEMAN, 1982; LEITER und HERBERG, 1997).

1.4 Melatonin und Kohlenhydratstoffwechsel

Alle biologischen Systeme unterliegen koordinierten, sich ständig wiederholenden Abläufen. Unter anderem variieren regelmäßig unter Synchronisation des Lichtes bestimmte Stoffwechselfparameter im Tagesgang. Im Falle des Säugetierorganismus wird ein endogener *circadianer* Rhythmus vom *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) generiert und sowohl durch den photischen Input *via retinohypothalamischen* Trakt als auch über die als neuroendokriner *Transducer* wirkende *Epiphysis cerebri* transduziert. Während der Dunkelzeit noradrenerg stimuliert, kommt es in der *Epiphysis cerebri* zu einer erhöhten Produktion und Ausschüttung des Indolamins Melatonin (N-Acetyl-5-methoxytryptamin). Die Wirkung von Melatonin entfaltet sich aber nicht nur im SCN, vielmehr konnten Einflüsse auf zahlreiche periphere Gewebe nachgewiesen werden. Die Diskussion über die Bedeutung von Melatonin im Kohlenhydratstoffwechsel wurde über mehrere Jahrzehnte kontrovers geführt. An isolierten LANGERHANSschen Inseln neonater Ratten sowie an der Ratten-Insulinomazelle INS-1 konnte in jüngerer Zeit die Rezeptor-vermittelte, hemmende Wirkung des Melatonins auf die Glukose-, KCl- und Forskolinstimulierte Insulinsekretion durch Perifusionsexperimente belegt werden (PESCHKE et al., 1997; CSERNUS et al., 1998; PESCHKE et al., 2000, 2002). Weiterführende Untersuchungen zur Bedeutung von Melatonin im diabetischen Organismus sind äußerst rar. Tagesrhythmische Stoffwechselveränderungen fanden bei Studien an diabetischen Tierstämmen, wie dem NZO-Stamm, bislang wenig oder keine Berücksichtigung.

2 Zielstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten metabolische Störungen bei der Halleschen NZO-Mauskolonie im Vergleich zu einem Kontrollmausstamm untersucht werden. Dabei sollten Pathogenese und Pathophysiologie der β -Zellen von LANGERHANSschen Inseln im Mittelpunkt der Betrachtungen stehen. Im Einzelnen wurde auf folgende Schwerpunkte orientiert:

1. Erfassung allgemeiner und typischer Kennzeichen der Mauskolonie NZO
2. Charakterisierung von Stoffwechselveränderungen beim Mausmodell NZO
3. Befunderhebung unter Einbeziehung von Alter und Tageszeit
4. Veränderungen am Pankreas: morphologische, physiologische und molekularbiologische sowie licht-, fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Untersuchungen am Pankreas
 - Beurteilung von Anzahl, Größe und Anatomie der LANGERHANSschen Inseln
 - Verteilung und Anzahl der wichtigsten Inselzellarten
 - Lokalisation des GLUT2-Transporters
 - Beurteilung von Zellorganellen der β -Zelle

Perifusionsuntersuchungen zur Überprüfung des Sekretionsvermögens der β -Zellen als Reaktion auf ausgewählte Stimuli

 - Dauer- und Kurzzeitstimulation mit Glukose und unter dem Einfluss von Melatonin
 - Dauer- und Kurzzeitstimulation mit Arginin und unter dem Einfluss von Melatonin

Ermittlung des Expressionsniveaus der GLUT2-mRNS

 - *real-time* RT-PCR von Pankreata verschiedener Altersstadien
5. Erfassung der Melatoninbildung im Tagesgang

3 Material und Techniken

3.1 Herkunft und Haltungsbedingungen der Versuchstiere

Untersucht wurden Tiere des Stammes New Zealand obese-Maus (NZO) und die Naval Medical Research Institute-Maus (NMRI). Die Tiere wurden nach dem Alter zu folgenden Gruppen zusammengefasst:

Gruppe	Altersstadien	Alter
1	junvenile Tiere (Jungtiere)	3 bis 7 Wochen
2	adoleszente Tiere	4 bis 6 Monate
3	adulte Tiere	7 bis 10 Monate
4	seneszente Tiere (Alttiere)	ab 12 Monaten

Die NZO-Ausgangszuchtpaare entstammten dem Diabetes Forschungsinstitut an der HEINRICH-HEINE-UNIVERSITÄT in Düsseldorf (Frau Prof. Dr. Dr. L. Herberg). Diesen Tieren wurde der metabolisch unauffällige NMRI-Mausstamm als Kontrollgruppe gegenübergestellt. Die NMRI-Tiere wurden aus der geschlossenen Auszuchtkolonie des Zentrums für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT Halle-Wittenberg bezogen. Die NMRI-Mäuse erhielten pelletiertes Zucht- bzw. Haltungsfutter Altromin 1314 bzw. 1324 (Altromin GmbH, Lage, Deutschland) und die NZO-Mäuse eine Spezialdiät (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). Futter und Wasser standen beiden Mausstämmen *ad libitum* zur Verfügung. Das Lichtregime wurde über Zeitschaltuhren gesteuert (L:D = 12:12, L_{an} 06:00 Uhr). Haltung und Zucht erfolgten in klimatisierten Räumen (24 ± 1 °C, rel. Luftfeuchte zwischen 48 und 58 %). Die Tiere, welche zwischen 06:00 und 18:00 Uhr untersucht wurden, werden im Folgenden als „Tagtiere“ und die zwischen 18:00 und 06:00 Uhr untersuchten als „Nachttiere“ bezeichnet.

3.2 Blutentnahme und Gewebepräparation

Sofort nach Narkose wurden die Tiere zunächst hinsichtlich ihres allgemeinen körperlichen Zustandes charakterisiert. Bei den Nachttieren erfolgte die Äthernarkose im Dunkeln. Eine kleine Rotlichtlampe wurde zur Orientierung für den Experimentator benutzt.

Die Äthernarkose wurde in einem abgedunkelten Schliffglas mittels medizinischem Diethylether durchgeführt. In tiefer Narkose wurden Geschlecht, Ernährungszustand und Fellläsionen erfasst. Danach wurde die Blutglukose im kapillären Vollblut der Schwanzspitze mit einem amperometrischen Blutzuckermessgerätes MediSense® Precision Xtra™ Plus (Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) bestimmt. Anschließend wurden die Tiere auf einer Wachsplatte fixiert, und mittels Medianschnitt wurde vom Unterbauch über den *Processus xiphoideus* und längs bis zum *Manubrium sterni* die Leibeswand eröffnet und der *Thorax* aufgespreizt. Mit einer feinen Kanüle wurde nun der rechte Herzventrikel punktiert. In Abhängigkeit vom Alter konnten so zwischen 1 und 2,2 ml Vollblut mittels einer zuvor mit Liquemin® (Hoffmann La Roche AG, Grenzach-Whylen, Deutschland) heparinisierten Spritze gewonnen werden. So dann erfolgte die schnelle Entnahme des Pankreas. Dazu wurden der Magen nach kranial verschoben, das Darmpaket etwas nach kaudal gedrängt und die Milz mit einer anatomischen Pinzette nach ventral gezogen. Das *Pancreas diffusum* wurde im Weiteren dargestellt und entnommen. Einigen Tieren wurden zusätzlich Leber, Niere, Duodenum, *Musculus quadriceps femoris*, weißes und braunes Fettgewebe, Gehirn oder Epiphyse für weiterführende Untersuchungen entnommen. Die Organe wurden anschließend in unterschiedliche Fixierlösungen oder in flüssigen Stickstoff überführt (siehe spezieller Methodenteil).

Die Vollblutproben wurden in 2,0 ml Eppendorfgefäßen für 5 min bei 10.000 U/min zentrifugiert. Das Blutplasma wurde abgenommen, mit Trockeneis in Ethanol schockgefroren und bis zur Analyse bei -80 °C aufbewahrt.

3.3 Untersuchungen zur Morphologie

3.3.1 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Die entnommenen Organe wurden für ca. 48 h mit 4 %igem Paraformaldehyd in 0,1 M PBS (pH 7,4) bei 4 °C fixiert. Danach erfolgte eine Entwässerung über eine aufsteigende alkoholische Reihe sowie Isopropanol, Methylbenzoat und Toluol. Es folgte die Einbettung in Paraffin und die Herstellung von 5 µm dicken Paraffinschnitten. Zur Übersichtsfärbung diente Hämatoxylin-Eosin (HE).

Zur Immunfluoreszenzmarkierung wurden die Schnitte nach Entparaffinierung dreimal 15 min in PBS (pH 7,4) eingebracht. Zum Blockieren der nichtspezifischen Epitope wurden die Schnitte 1 h mit 5 %igem Ziegen-Normalserum (DIANOVA, Hamburg, Deutschland) in PBS und 0,3 %igem Triton bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach

Aufschluss der Zellmembran mittels Triton wurde jeweils der spezifische, polyklonale, primäre Antikörper aufgetragen.

Angewendet wurden zum Nachweis von

- Insulin: Meerschweinchen-anti-Schweineinsulin (DAKO, Hamburg, Deutschland), 1:100;
- Glukagon: Kaninchen-anti-Humanglukagon (DAKO, Hamburg, Deutschland), 1:100;
- Somatostatin: Kaninchen-anti-Humansomatostatin (DAKO, Hamburg, Deutschland), 1:300 und
- GLUT2: Kaninchen-anti-GLUT2 (CHEMICON, Temecula, CA, USA), 1:100.

Nach 16 bis 24 h wurden durch wiederholte PBS-Spülungen nichtgebundene Antikörper entfernt, bevor der sekundäre, Zyanin-konjugierte (Cy-3) Ziege-anti-Kaninchen Antikörper (DIANOVA, Hamburg, Deutschland) 1:100 aufgetragen wurde. Dieser Antikörper ist zuvor mit einer Lösung von 2 % Rinderserumalbumin (BSA) in PBS versetzt, auf eine Endkonzentration von 20 µl/ml gebracht worden. Einer einstündigen Inkubation folgten wiederholte Spülungen mit PBS und Trocknung bei RT. Bei den meisten Präparaten erfolgte außerdem eine DAPI-(4',6-Diamidino-2'-phenylindol-dihydrochlorid) Kernfärbung. Zur Verminderung von Luftbläschen bei der Eindeckung in Entelan (MERCK, Darmstadt, Deutschland) wurden die Präparate vorher kurz in Xylol getaucht.

Bei einer kleineren Serie von ca. 50 histologischen Pankreasschnitten wurde Diaminobenzoat (DAB) als Chromogen genutzt. Für diese immunhistochemischen Kontrollen wurde bis zum Auftragen des Sekundärantikörper in geschilderter Weise verfahren. Bei den Antikörpermarkierungen von Insulin, Glukagon und Somatostatin wurde ein biotinylierter Esel-anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (Jackson Immunoresearch Lab., West Grove, PA, USA) verwendet. Zur GLUT2-Markierung diente ein verdünnter, Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (DAKO, Hamburg, Deutschland).

Immunhistochemisch wurden Insulin, Glukagon, Somatostatin und GLUT2 dargestellt, wobei sowohl NZO- und NMRI-Mäusen in gleicher Weise berücksichtigt, als auch zwischen Tag- und Nachtzeit unterschieden wurde. Durch das Mitführen von Kontrollen ist der Beurteilbarkeit von Qualität und Quantität der Immunmarkierungen zwischen (*inter*) und innerhalb (*intra*) der einzelnen Serien ausreichend Rechnung getragen worden. Am Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) wurden die Schnitte bei verschiedenen Vergrößerungen beurteilt. Zur Bilddokumentation wurden Übersichtsauf-

nahmen mit der Digitalkamera AxioCam (Zeiss, Jena, Deutschland) bei einer Vergrößerung von 1:200 und 1:400 aufgenommenen. Die Bilder wurden im Format 1.300 x 1.030 Pixel (interpoliert) durch das Programm Axio Vision 2.0 (Zeiss, München-Hallbergmoos, Deutschland) als bmp-Datei abgespeichert.

3.3.2 Elektronenmikroskopie

Zur Einbettung in Durcupan wurden die Pankreata mindestens 8 h nach KARNOWSKY fixiert. Nachdem die Präparate jeweils eine Stunde in einem 6,8 %igen Saccharosepuffer und in 0,1 M PBS gespült worden sind, erfolgte eine Nachfixierung mit 1 %igem Osmiumtetroxid für eine weitere Stunde und eine Spülung in 0,1 M PBS. Anschließend wurde mit Aceton entwässert und in Durcupan eingebettet. Die Polymerisation erfolgte nach Einbettung in Beem-Kapseln bei 70 °C für ca. 64 h. Mittels Ultramikrotom wurden Semidünnschnitte angefertigt. In regelmäßigen Abstand wurden einzelne Präparate mit Toluidinblau zur lichtmikroskopischen Kontrolle gefärbt. Eine Doppelkontrastierung der Ultradünnschnitte erfolgte mit Uranylacetat und einem Bleizitrat-Gemisch. Die Auswertung fand am Elektronenmikroskop EM 900 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) direkt statt. Die Ultrastrukturen wurden bei Vergrößerungen zwischen 1:3.400 und 1:13.000 beurteilt.

3.4 Untersuchungen zur Physiologie

3.4.1 Perifusionsuntersuchungen

In Vorbereitung auf die Perifusionsuntersuchungen wurden 13 bis 20 Tage alte NMRI- und NZO-Mäuse decapitiert und umgehend die Pankreata entnommen. Diese wurden von Fettanteilen befreit und in ca. 1 mm lange Stücke geschnitten. Sieben Pankreata wurden in etwa 4 °C kalter und mit 0,1%igem Albumin (SERVA, Heidelberg, Deutschland) versetzter HANKS'scher Lösung gegeben. Die Separierung der LANGERHANS'schen Inseln erfolgte nach der bereits 1967 von LACY und KOSTIANOVSKY vorgestellten und durch HAHN (1978) modifizierten Technik. Zur enzymatischen Inselfreisetzung wurde das Gewebe in ein 5 ml Borosilikatröhrchen überführt, welches 2 mg Kollagenase Nr. 17449 aus *Clostridium histolyticum* (SERVA, Heidelberg, Deutschland) in 2 ml gekühlter HANKS'scher Lösung enthielt. In der warmen Hand wurde das verschlossene Reagenzglas kräftig für etwa 5 min geschüttelt. Unter optischer Kontrolle wurde das kollagene Gerüst der Drüse derart angedaut, dass nach Stoppen der Reaktion mit 30 ml etwa 4 °C kalten HANKS'scher Lösung unter dem Stereomikroskop Stemi SV 6 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) die Inseln sichtbar waren. Sodann wurden die Inseln separiert.

Auf diese Weise konnten pro Durchgang (á 7 Tiere) ca. 200 Inseln gewonnen und nachfolgend mit Sephadex G-10 (Sartorius, Göttingen, Deutschland) in die Reaktionssäule der Perifusionsanlage eingebettet werden.

Das Perifusionssystem ist eine Modifikation der 1991 von Csernus und Schally entwickelten Apparatur zur *in vitro*-Stimulation und eignet sich hervorragend zur Erfassung der Sekretionskinetik endokriner Gewebe. Eine ausführliche Beschreibung der Technik ist bereits erfolgt (PESCHKE et al., 1997; CSERNUS et al., 1998; HAMMER, 1998).

Über eine 4-Rollen-Pumpe (Fa. Ismatec, Glattbrugg, Schweiz) wird kontinuierlich Medium, mit einer Flussrate von 1 ml/3min durch die Reaktionssäule transportiert. Dieses Nährmedium setzt sich hauptsächlich aus Medium 199 (Sigma, St. Louis, MO, USA), Gentamycin (Sigma-Aldrich GmbH, Seelze, Deutschland) und BSA zusammen. Das Medium enthielt bei diesen Perifusionsexperimenten grundsätzlich mindestens 5,6 mmol/l Glukose.

Mittels 4-Wege-Ventil (Rheodyne, Typ 50), ist es möglich, die Reaktionssäule mit Nährmedium oder bestimmten Stimulationslösungen durchströmen zu lassen. Sowohl die Reaktionssäulen, als auch das Nährmedium und die zu applizierenden Lösungen wurden durch einen Wassermantel auf 37 °C temperiert.

Ein automatischer Fraktionssammler Retriever II (Fa. Isco, Lincoln, NJ, USA) sorgte mit einer Transportrate von einem Röhrchen in 3 min für ein lückenloses Auffangen des Eluates in die durchnummerierten Borsilikatröhrchen. Die Proben wurden in einem Ethanol-CO₂-Gemisch kältegefroren und danach bis zur Insulinbestimmung bei -20 °C gelagert.

Nach einer ca. 6-stündigen Erholungsphase zur Stabilisierung der Insulinsekretionsleistung auf eine Basissekretion wurden die Inseln folgendem Stimulationsschema unterzogen. Zunächst erfolgte eine 75-minütige Dauerstimulation mit Glukose [25 mM] oder Arginin [25 mM]. Danach schlossen sich eine 45-minütigen Erholungsphase sowie mehrere 3-minütige Kurzzeitstimulationen an. Dabei wurde Glukose [30 mmol/l] oder Arginin [30 mmol/l] abwechselnd mit Forskolin [2 µmol/l] im Abstand von je 30 min eingesetzt. Im Vergleich zu den Inseln des Kontrollstammes sollte unter diesen Kurzzeit- oder Dauerstimulationen das Reaktionsmuster der Insulinfreisetzung am *in vitro*-System bei NZO-Inseln überprüft werden.

3.4.2 Quantitative Insulinbestimmung

Ein konfektionierter „Coat-A-Count“ Radioimmunoassay diente der Bestimmung des Insulins im Blutplasma und Perifusat. Die Polypropylenteströhrchen waren mit dem im Kaninchen erzeugten polyklonalen Anti-Insulin-Antikörper (Primärantikörper) beschichtet. Nach Probenzugabe konkurrieren im Röhrchen das Mausinsulin mit ¹²⁵I-markiertem Insulin um die Bindungsstellen am Primärantikörper. Nach Einstellung des dynamischen Gleichgewichtes wurde der Sekundärantikörper aufgetragen.

Die Radioaktivität wurde in einer Gamma-Counter-Messeinheit (DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim, Deutschland) indirekt proportional zu der im Untersuchungsmedium vorhandenen Insulinkonzentration gemessen. Der verwendete Kit (DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim, Deutschland) ist für den humanen Bereich vorgesehen und ist deshalb hinsichtlich der Erstellung der Eichkurve speziesspezifisch modifiziert worden. Die Insulinkonzentrationen wurden durch ein in den Gamma-Counter integriertes Rechenprogramm (Fa. Berthold, Bad Wildbad, Deutschland) anhand der Standardkurve berechnet und in ng/ml ausgegeben. Die bei den Messungen mitgeführten Kontrollstandards erfüllten die *Intra-* und *Interassay*-Qualitätskontrollen.

3.5 Untersuchungen zur Molekularbiologie

3.5.1 RNS-Extraktion

Bis zur Extraktion wurden die Organe bei -20 °C in 4 ml RNAlater™ (Ambion Inc., Austin, TX, USA) aufbewahrt. Die folgende Ausführung entspricht einer Modifikation der von CHOMCZYNSKI und SACCHI (1987) beschriebenen Methode zur RNS-Extraktion. Der Gewebeaufschluss erfolgte mit Zugabe von 1 ml TRIzol® Reagent (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) pro 100 mg des jeweiligen Organs und unter Einsatz des ULTRA-TURRAX® T25 basic (IKA® Werke GmbH, Staufen, Deutschland) bei 15.000 U/min. Anschließend wurde mittels Chloroform (0,2/ml Trizol) die Gesamt-RNS von den restlichen Gewebsbestandteilen wie Proteinen und Membranlipiden getrennt. Die Phasenbildung wurde durch Zentrifugation bei 2 bis 8 °C und 8.450 U/min für 15 min unterstützt. In die zuvor abgenommene wässrige Phase wurden 1,5 ml Isopropanol pro ml Trizol zur Fällung der Nukleinsäure pipettiert und nach 10-minütiger Inkubation unter den gleichen Bedingungen wie zur Phasenbildung zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das RNS-Pellet mit 70 %igem Alkohol gewaschen.

Nach einer weiteren Zentrifugation und Dekantierung wurde das *Pellet* ca. 10 min bei Raumluft getrocknet. Schließlich wurde das Gesamt-RNS-*pellet* mit RNase-freiem Diethylpyrocarbonat-(DEPC)-Wasser rekonstituiert.

Der RNS-Gehalt wurde im UV-Photometer SPECORD S100 (Analytik Jena AG, Jena, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Konzentration korreliert dabei zur optischen Dichte (OD), wobei einer OD-Einheit 40 µl/ml RNS entsprechen. Zusätzlich wurde eine gelelektrophoretische Auftrennung jeder Probe zur Qualitätskontrolle durchgeführt.

3.5.2 Reverse Transkriptase-Reaktion

Jeder RT-Reaktion ging eine DNase-Verdauung mit einem Kit DNA-freeTM (Ambion Inc., Austin, TX, USA) voraus, um die verbliebene DNS zu eliminieren. Je 1 µg der DNS-freien Gesamt-RNS wurde im Folgenden in den RT-Ansatz des Kitsystems der Firma Promega (Mannheim, Deutschland) eingebracht. Dieser arbeitet nach dem Prinzip des *Random priming*, das bedeutet, dass ein willkürlicher Mix an DNS-Einzelstrangfragmenten (Hexamere) als *Primer*-Vorlage dient. Damit wird theoretisch die gesamte RNS der Probe in cDNS umgeschrieben.

3.5.3 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die zuvor aus den Internetdatenbanken von Medline ausgewählten Primersequenzen wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin, Deutschland) synthetisiert. Das Primerpaar für den GLUT2 der Maus hatte folgende Sequenzen:

Primer vorwärts (*upstream Primer*): 5'-AGCCAAGGACCCCGTCCTA-3'

Primer rückwärts (*downstream Primer*): 5'-GTGAAGACCAGGACCACCCC-3'.

Zur besseren Vergleichbarkeit der einzelnen PCR-Läufe wurde ein kommerzieller PCR Master Mix (Promega Inc., Madison, WI, USA) verwendet, welcher das Enzym: Taq DNS Polymerase (50 units/ml), die Basen dATP, dGTP, dCTP, dTTP (je 400 µM) und MgCl₂ (3 mM) enthält. Bei der *real-time* RT-PCR wurde jeder Probe *Sybr-green* (Biozym Diagnostic GmbH, Hessisch-Oldendorf, Deutschland) ein intercalierender Farbstoff in einer Verdünnung von 1:1.000 hinzugefügt. Dieser wird nach Bildung des komplementären DNS-Stranges mit Licht der Wellenlänge 470 nm angeregt. Mit Hilfe des Photomultipliers wird nun die von der Probe ausgesandte Fluoreszenzenergie bei 570 nm registriert. Der *Thermocycler* Rotor-Gene 2000 (Corbett Research Inc., Mortlake, NSW, Australien) übermittelt nach jeder Elongation die aktuellen Daten an einen PC. Die Quantifizierung erfolgte anhand der Korrelation zwischen emittierter Gesamtenergie und der Anzahl amplifizierter Kopien. Mit Hilfe der Software Rotorgene V 4.4. (Corbett Research Inc., Mortlake, NSW, Australien) wurde *online* eine grafische und tabellarische Auswertung ausgegeben.

Zur Berechnung des relativen Expressionsniveaus wurden so genannte *Cycle-time*-(Ct-) Werte (MORRISON et al., 1998; PFAFFL, 2001) herangezogen. Im Auswertungsbild wird logarithmisch die Fluoreszenzenergie auf der Ordinate und die Anzahl der Zyklen auf der Abszisse dargestellt. Ein Schwellenwert wird im Bereich der exponentiell anwachsenden Fluoreszenzenergie (Amplifikationsprodukte) bei optimaler Standardkurve festgelegt. Jeder Probe wurde beim Erreichen des Schwellenwertes nun ein Ct-Wert zugeordnet.

Um ideale Bedingungen für den mRNS-Expressionsvergleich des GLUT2 zu erhalten, war eine aufwendige Optimierung notwendig. Die besten Ergebnisse wurden mit folgendem Protokoll erreicht, welches den Standard für alle durchgeführten PCR-Läufe darstellte:

1. Denaturierung (95 °C für 2 min)
2. Amplifikation (40 Zyklen)
 - a) Denaturierung (94 °C für 30 sec)
 - b) Primeranlagerung (*Annealing*) (64 °C für 30 sec)
 - c) DNS-Polymerisation (Elongation) (72 °C für 30 sec)
 - d) Messung (85 °C für 15 sec)
3. 1. Halt (Abkühlung) (40 °C für 2 min)
4. 2. Halt (Erwärmung) (50 °C für 1 min)
5. Schrittweise Denaturierung und Messung (von 50 °C mit 1 °C/min auf 99 °C)

Zur relativen Konzentrationsbestimmung wurde eine Leber-cDNS-Verdünnungsreihe herangezogen. Die Lebereichkurve wurde mit den Verdünnungsstufen: 1:1, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 von 40 ng cDNS aus der Gesamt-RNS einer Mausleber hergestellt. Die Leberverdünnungsreihe eignet sich besonders zum Vergleich verschiedener Ansätze, setzt jedoch voraus, dass die Qualität der einzelnen Proben gleich gut ist. In den 18 ausgewerteten RT-PCR-Läufen wurde jeweils mindestens ein Leberstandard mitgeführt, sodass mit der Software Rotor-Gene Version 5 (Corbett Research Inc., Mortlake, NSW, Australien) die gespeicherte Eichkurve eingepasst werden konnte.

Mit Hilfe der Gleichung:

$$\text{conc} = 10^{(M * Ct + B)}$$

wurden für jede Einzelprobe die Konzentrationen berechnet.

Die Qualität des Amplikons konnte anhand der Schmelzcharakteristik und mittels DNS-Gelelektrophorese beurteilt werden. Am Ende eines jeden Laufes wurden durch schrittweise Temperaturerhöhung (1 °C/min) die entstandenen Produkte entsprechend ihrer

Länge und Basenverhältnisse aufgeschmolzen. Anhand der Abnahme der Fluoreszenzenergie konnte somit jedes Amplikons charakterisiert werden.

Zur Gelelektrophorese wurden die Proben mit 2,5 µl *Blue-juice* versetzt und in die Kavitäten eines 3 %igen Agarose-Gels pipettiert. Im TAE-Puffer (pH 8,0) wanderten die DNS-Fragmente entsprechend ihren Längen bei 40 V zwischen 3 und 5 h. Ein 100 bp Längenstandard *DNA-Ladder* (Promega, Madison, WI, USA) mit DNS-Fragmentlängen zwischen 100 bp und 1.500 bp wurde auf jedes Gel parallel aufgetragen, um die Banden zuordnen zu können. Das GLUT2-Amplikon hat eine Länge von 149 bp und kann somit zwischen den 100 bp- und 200 bp-Banden des *DNA-Ladders* sicher identifiziert und qualitativ beurteilt werden.

3.6 Derivatisierung und HPLC

Die Verwendung konfektionierter oder selbstetablierter Melatonin-Radioimmunoassays (RIA) erwies sich für die Bestimmung von Melatonin aus Blutplasma der Maus oder aus Epiphysenextrakten als nicht geeignet. Mit Hilfe der *High-performance liquid chromatography* (HPLC) war eine Bestimmung von Melatoninkonzentrationen aus Epiphysenextrakten jedoch möglich. Um den notwendigen Sensitivitätsbereich zu erweitern wurden die Proben derivatisiert. Das Melatonin der Proben sollte dabei in einen stärker fluoreszierenden Metaboliten umgewandelt werden. Dazu wurde jeweils eine Epiphyse sofort nach Entnahme in 500 µl Methanol homogenisiert und anschließend bei 4.500 x g für 5 min zentrifugiert. Vom Überstand wurden 100 µl abgenommen und unter Vakuum bis zur Trockne eingengt. Das Lyophilisat wurde in 30 µl *Aqua dest.* aufgenommen, und mit 5 µl Na₂CO₃ [2 mol/l] wurde die Probe alkalisiert. Nach Zugabe von 5 µl H₂O₂ [50 mmol/l] erfolgte die Derivatisierung für 30 min bei 100 °C. Das HPLC-System, Serie 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland), wurde auf 40 °C und isokratische Laufbedingungen mit der Flussrate von 0,5 ml/min eingestellt. Zur Auftrennung wurde eine Vorsäule LiChroCart 4/4 und eine Analysensäule LiCroCart 125/4 RP-select B (Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Das Laufmittel bestand aus PBS [0,1 mol/l] und wurde mit 10 % (v/v) Acetonitril auf einen pH-Wert von 6,95 eingestellt. Bei einer Anregungswellenlänge von Ex = 245 nm und einer Emissionswellenlänge von Em = 380 nm wurde das derivatisierte Melatonin mittels Fluoreszenzdetektor (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) registriert und anhand seiner Retentionszeit beziehungsweise seines Fluoreszenzspektrums identifiziert. Die beschriebene

Methode stellt eine Modifikation der von INUMA et al. (1999) und HAMASE et al. (2000) publizierten Techniken dar.

3.7 Statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse

Für eine statistische Auswertung wurden die unabhängigen Stichproben gruppiert und Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (s) und Standardfehler (SEM) berechnet.

Der Vergleich von Mittelwerten erfolgte mittels t-Test. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit (p) kleiner als 5 % ($p < 0,05$) wurden die Ergebnisse als statistisch signifikant angesehen.

Die Tagesmuster wurden als Mittelwertskurven \pm SEM grafisch dargestellt.

Die von der Gamma-Counter-Software ausgegebenen Rohdaten der Perifusionsexperimente (s. o.) wurden mit Hilfe eines von Csernus (Universität Pécs, Ungarn) entwickelten und zur Verfügung gestellten Programms weiterberechnet. Die zugrunde liegenden mathematischen Grundlagen dieser quantitativen Auswertung sind publiziert (CSERNUS und SCHALLY, 1991).

Zur weiteren Berechnung und Darstellung wurden die Softwareprogramme Microsoft[®] Excel 2000, Microsoft[®] Word 2000, Microsoft[®] PowerPoint[®] 2000, SigmaPlot für Windows Version 5.00, Micrografx Picture Publisher 9 und Endnote 7[®] verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Habitus

4.1.1 Allgemeine Charakteristik

Grundlage der vorliegenden Untersuchungen waren wie beschrieben NZO- und NMRI-Mäuse.

Die Tiere wurden definierten Altersabschnitten zugeordnet und zu bestimmten Tageszeiten untersucht. Damit wurde versucht, Alters- und tageszeitlichen Stoffwechselvariabilitäten hinreichend Rechnung zu tragen. Zwischen den Geschlechtern traten oft keine signifikanten Unterschiede bei den untersuchten Tieren auf.

NZO-Mäuse, in der Nähe der „Ein-Jahres-Schwelle“ oder darüber, zeigten häufig tumoröse Veränderungen (Abb. 3). In der untersuchten Gesamtpopulation waren Wucherungen an der Leber in 1,58 % der Fälle zu finden, daneben traten Tumore auch an Pankreas, Fettgewebe oder am Ovar auf. Eine histologische Sicherung der Tumorentität fand nicht statt. Kaum ein Tier erreichte die 2-Jahres-Schwelle.

Bei 1,15 % der untersuchten NZO-Mäuse waren altersunabhängig einseitig Zysten an den Nieren und an den Ovarien zu finden. Bei 1 % der Fälle waren Pankreatitiden, Hepato- und Splenomegalien mit und ohne Aszites anzutreffen. Derartige Alterationen gingen oft mit erheblichen Störungen des Allgemeinzustandes und Verringerung des Körpergewichtes einher, sodass auf weitere Untersuchungen der Tiere beziehungsweise Einbeziehung in die Versuche prinzipiell verzichtet wurde. NZO-Mäuse mit Auffälligkeiten, welche mit den Stoffwechselveränderungen nicht direkt im Zusammenhang stehen, wurden in die Auswertungen einbezogen. So gilt bei den NZO-Mäusen beispielsweise das Fehlen der Gallenblase oder stark vergrößerte Bläschendrüsen (*Glandulae seminales*) als nicht krankhaft. Die Mäuse des NMRI-Stammes zeigten makroskopisch generell keine derartigen pathologischen Veränderungen. Beide Stämme wurden in regelmäßigen Abständen hinsichtlich parasitologischer Erkrankungen untersucht.

Bereits äußerlich imponieren die älteren NZO-Mäuse durch die nahezu dreieckige Körperform (Abb. 1). Diese ist Resultat großer abdomineller Fettgewebmassen, welche sich sowohl im Retroperitoneum als auch mesenterial und parametrial ausbreiten (Abb. 2). Die Eingeweide und Thoraxorgane sind ebenfalls stark verfettet. So zeigt beispielsweise der Herzbeutel häufig größere Fettgewebsansammlungen. Eine geringere Verfettung zeigen gravide NZO-Weibchen. Bei NZO-Mäusen sind sowohl Körperlänge als auch andere Skelettmerkmale mit denen des NMRI-Stammes vergleichbar.



Abb. 1: Die für NZO-Mäuse typische Körperform einer 358 Tage alten männlichen Maus (Gewicht: 75,2 g, Blutglukose 8,5 mmol/l).

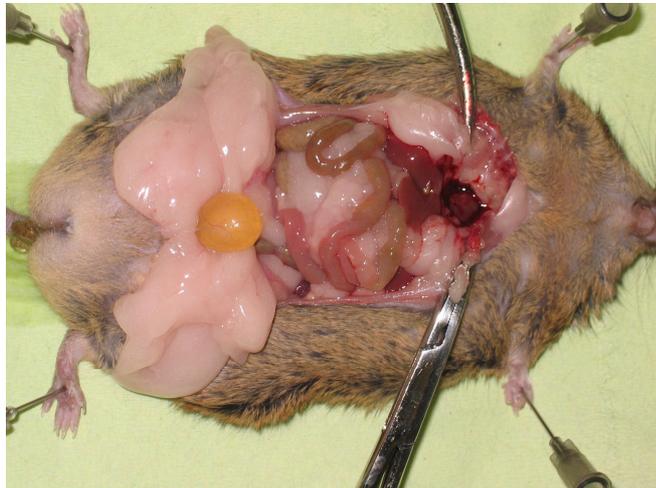


Abb. 2: Situs einer NZO-Maus (männlich, 358 Tage alt, Gewicht: 75,2 g) mit massiver Eingeweideverfettung.



Abb. 3: Situs eines 271 Tage alten NZO-Weibchens mit raumfordernden Lebertumor und deutlicher Tumorkachexie (Gewicht: 39,1 g).

Die NZO-Mäuse sind bis in die Seneszenz trotz ihres hohen Gewichtes vergleichbar den stoffwechselgesunden Kontrolltieren agil und lokomotorisch aktiv. In einen Käfig gesperrt, liefern sich vor allem geschlechtsreife männliche NZO-Mäuse erbitterte Rankämpfe, welche bis zum Tod des Gegners ausgetragen werden können.

Bei Unruhe im Tierstall oder anderen Stresssituationen kann es zum Kannibalismus durch Muttertiere am eigenen Wurf kommen. Außerdem lässt die Reproduktionsfreudigkeit schon bei geringer äußerlicher Störung nach. Durch eine verminderte Anzahl an Würfen, meist nur drei, und einer geringeren Anzahl an Jungtieren pro Wurf ist die Nachzucht des Inzuchtstammes NZO häufig in Gefahr. Nicht selten wurde überhaupt kein einziger Wurf erzielt.

4.1.2 Körpergewicht

Aus der Abbildung 4 wird ersichtlich, dass die Gewichtsentwicklungen von NMRI und NZO-Mäusen in den ersten beiden Monaten weitgehend parallel verlaufen. Im Vergleich der beiden juvenilen Altersgruppen ist das Gewicht des Kontrollstammes NMRI mit einem Mittelwert von 30,0 g signifikant höher als das der NZO-Mäuse 25,6 g (Tab. 1 und Abb. 5). Ab dem Alter von vier Monaten nimmt das Körpergewicht bei NMRI-Mäusen nur noch gering zu, bei NZO-Mäusen hingegen erhöht sich die Körpermasse noch deutlich im 5. Lebensmonat und bewegt sich danach auf höherem Niveau. Die Gewichte der einzelnen NZO-Mäuse können stark variieren, geschlechtsspezifische Unterschiede sind jedoch nicht signifikant (hier nicht gezeigt). Ein Maximalgewicht von 88 g erreichte eine 340 Tage alte männliche NZO-Maus.

Tab. 1: Vergleich der Körpergewichte [g] von NZO- und NMRI-Mäusen.

Altersgruppe	NZO				NMRI				t-Test	
	n	MW	s	SEM	n	MW	s	SEM	p-Wert	
1.	25	25,584	4,770	0,954	15	29,953	5,669	1,463	0,0127	*
2.	40	53,605	9,007	1,424	22	40,577	7,164	1,527	0,0000	***
3.	23	59,061	9,482	1,977	10	46,100	5,280	1,669	0,0003	***
4.	24	66,996	9,188	1,876	7	51,857	5,640	2,132	0,0003	***

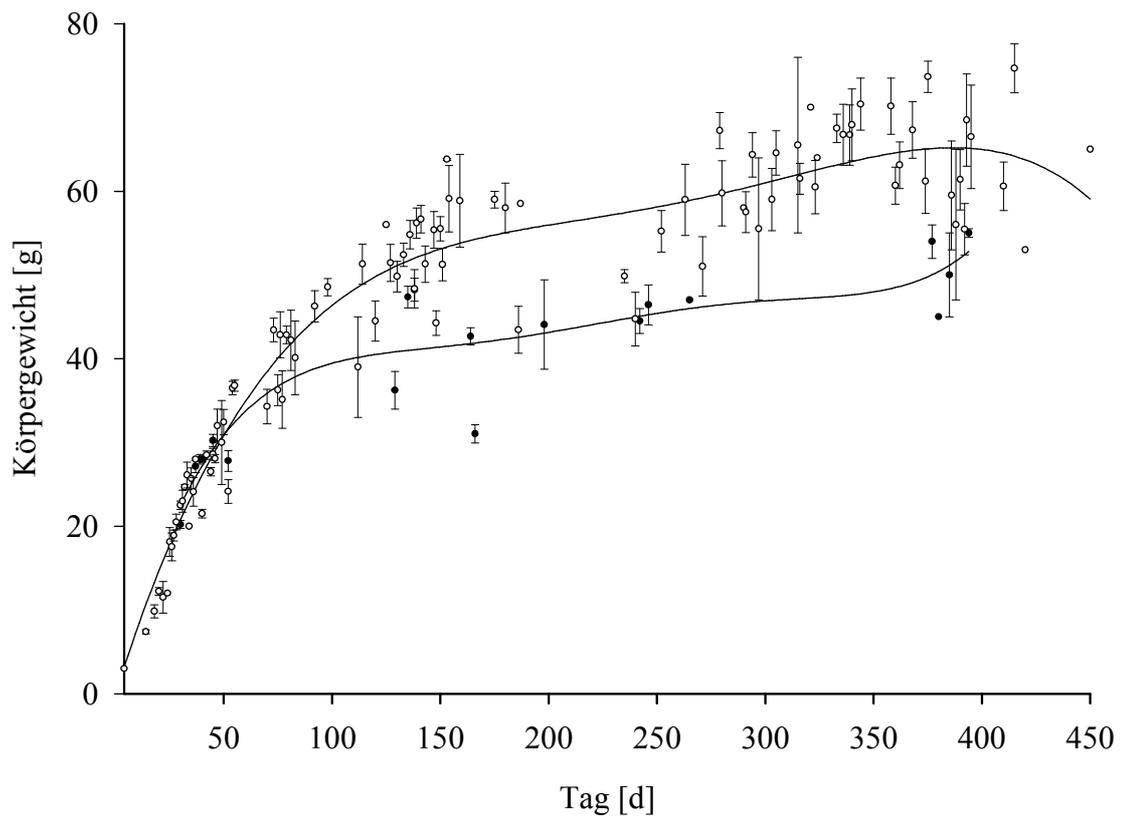


Abb. 4: Gewichtsentwicklung im Laufe der Ontogenese bei den Mausstämmen NZO (o) und NMRI (●). Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SEM von Tieren gleichen Alters.

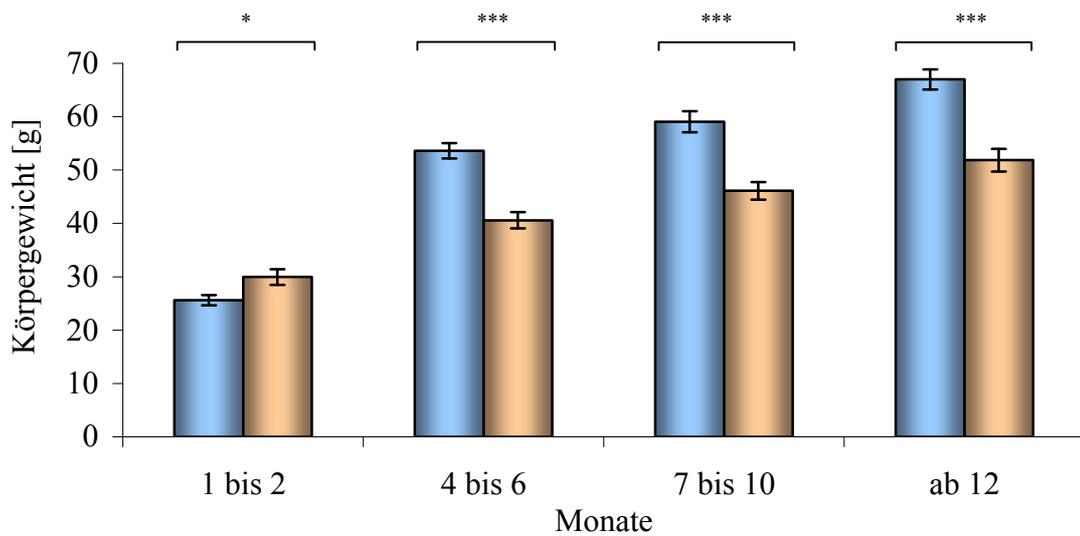


Abb. 5: Körpergewicht bei (■) NZO- und (■) NMRI-Mäusen.

4.2 Morphologische Befunde am Pankreas

Bereits makroskopisch lassen Pankreata von NZO-Mäusen Veränderungen erkennen. Die für *Rodentia* typische filigrane Gliederung des Pankreas wirkt bei älteren NZO-Mäusen deutlich verplumpt und vergrößert. Das Pankreas von gesunden Mäusen hat eine gelbliche Färbung, während das der NZO-Mäuse mit starken Fetteinlagerungen weißlich ist. Lichtmikroskopisch lässt sich zeigen, dass sich mit steigendem Alter bei NZO-Mäusen verstärkt Fettgewebe um das Pankreas ansammelt. Sowohl bei den NZO-Altieren als auch deutlich geringer bei alten NMRI-Mäusen sind innerhalb des exokrinen Anteils isoliert Fettgewebsformationen zu finden (Abb. 6a). Zudem beobachtet man bei alten NZO-Mäusen verstärkt kollagenes Bindegewebe (Abb. 6b) sowie Rundzellinfiltrate mit Lymphozyten und Makrophagen in deutlicher Abgrenzung zum exokrinen Pankreasanteil (Abb. 6e und 6f).

In den Übersichten finden sich drastische Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen hinsichtlich der LANGERHANSschen Inseln. Bei den NZO-Mäusen imponiert die erhöhte Anzahl vergrößerter Inseln (Abb 6c). Einzelne Rieseninseln sind länglich oval oder mäanderförmig um Gefäße oder *Ductuli* gebogen. Entlang der *Ductūs* und kleinerer *Ductuli* finden sich in NZO-Pankreata häufig Konglomerate mit drei bis acht Inseln unterschiedlicher Größe. Die Durchmesser der Inseln in der juvenilen Altersgruppe sind zwischen den Stämmen gleich. Eine deutliche Größenzunahme zeigen hingegen die Inseln der NZO-Altieren im Vergleich zur Kontrollgruppe. In den Übersichtsfärbungen sind bei NZO-Mäusen häufiger Mitosen zu finden (Abb. 6d). Die Inseln der NZO-Mäuse sind auffallend stark mit Kapillaren durchzogen.

4.2.1 Immunhistochemische Befunde

a) Insulin

Alle β -Zellen einer LANGERHANSschen Insel lassen sich bei NMRI-Mäusen mit dem Fluorochrom gleichmäßig markieren (Abb. 7a und 9a), wobei bei einzelnen β -Zellen feingranulierte Aggregationen des immunhistochemischen Reaktionsproduktes unter höherer Vergrößerungen sichtbar werden können. Mit Glukagon- und Somatostatinmarkierten Folgeschnitten lässt sich zeigen, dass die Hauptmasse der Inseln von NMRI-Mäusen aus β -Zellen aufgebaut ist, welche das Zentrum der Insel bilden. Unter Berücksichtigung der Tageszeit fällt eine kräftigere Markierung bei den Nachttieren in drei von fünf Fällen auf. Kein Unterschied ist im Vergleich zwischen jungen und alten NMRI-Mäusen erkennbar.

Bei den NZO-Mäusen hingegen sind die Insulinmarkierungen der β -Zellen innerhalb einer Insel stark heterogen, mit einer teilweise kräftigeren meistens aber schwächeren Markierung im Vergleich zu den Kontrollpankreaten der NMRI-Mäuse. Während die kleineren Inseln (unter 50 μm) kräftig und weitgehend einheitlich markiert sind, tritt der Effekt bei den Rieseninseln sehr deutlich hervor (Abb. 8a und 10a). Die hypertrophierten Insulin-produzierenden Zellen weisen fein granulierte Markierungen im Zellinneren auf. Das Verhältnis von „Nicht- β -Zelle“ zu β -Zelle ist bei den großen Inseln eindeutig in Richtung der β -Zellen verschoben. Es besteht eine Tendenz (zwei von drei Schnitten) zu einer stärkeren Markierung in den Nachtgruppen, welche im letzten Altersstadium nicht mehr nachzuweisen war. Die Abnahme des markierbaren Insulins im Alter ist beträchtlich.

b) Glukagon

Das Reaktionsprodukt lagerte sich innerhalb von Inselzellen an, die deutlich kleiner waren als β -Zellen.

Bei den NMRI-Mäusen zeigte die Gegenüberstellung verschiedener Altersstadien sowie von Tag- und Nachtpräparaten keine auffallende Differenz. Stets sind die α -Zellen regelrecht als zusammenhängender, einzelliger Ring in der Inselperipherie angeordnet (Abb. 7b und 9b).

Zwischen den Maus-Stämmen jedoch sind Unterschiede in der Anordnung der α -Zellen innerhalb der LANGERHANSschen Inseln durch die Immunmarkierungen von Glukagon recht deutlich. Mit steigendem Alter der NZO-Mäuse wandern die Glukagon-produzierenden Zellen scheinbar aus der Peripherie ins Zentrum der Inseln. Bereits bei einigen Inseln der jüngsten Altersgruppe kann ein lückenhafter α -Zell-Ring beobachtet werden (Abb. 8b). Bei den Alttieren ist die Anordnung der α -Zellen in mindestens 75 % der untersuchten Inseln auffällig. Teils durchziehen sie die Insel radspeichenartig oder liegen diffus im Zentrum (Abb. 10b). Die beschriebenen Veränderungen können nicht durch einen differierenden Inselaufbau in den verschiedenen Pankreasteilen erklärt werden, da die Pankreasschnitte ausreichend groß waren und verschiedene Anteile miteinander verglichen wurden.

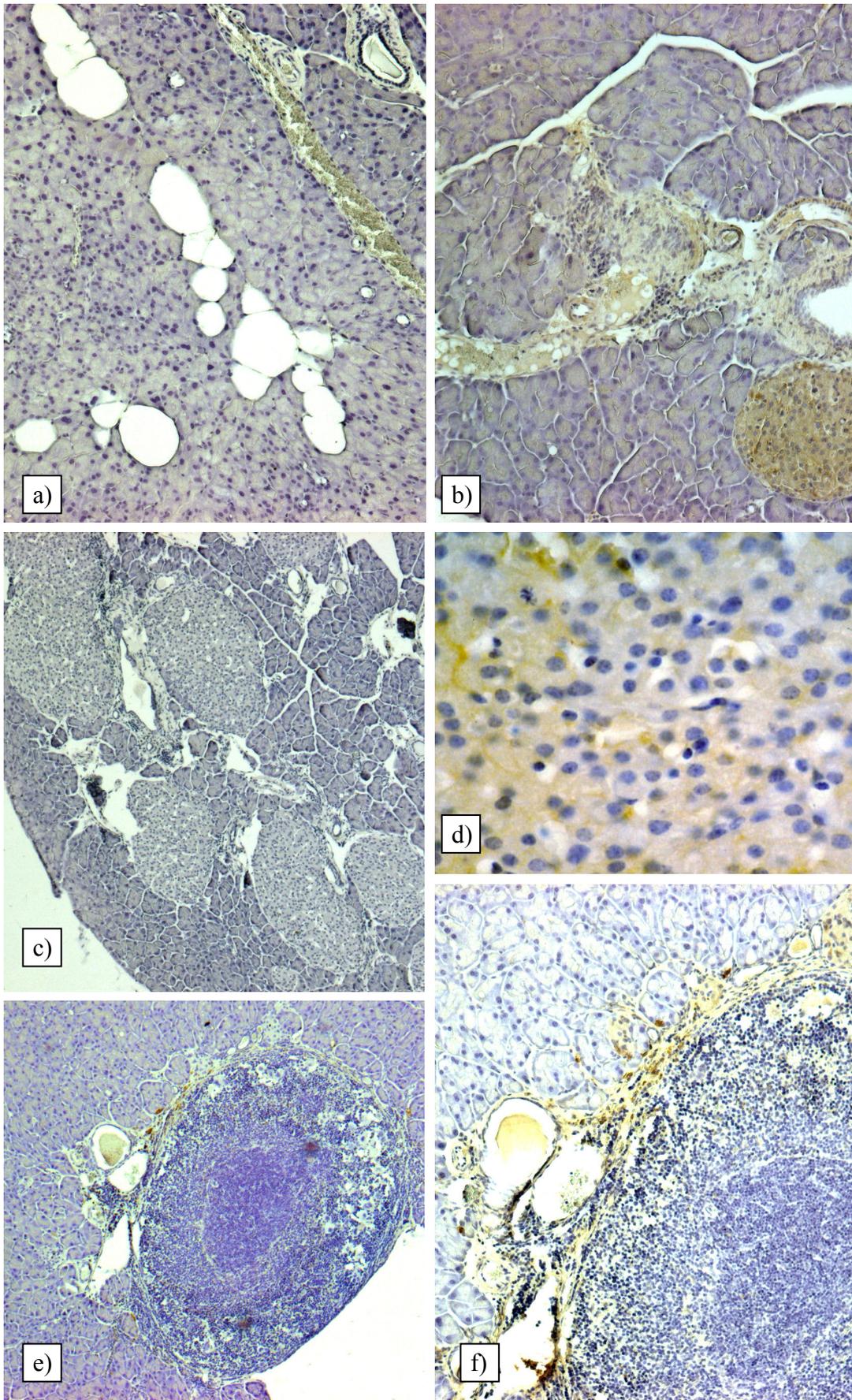


Abb. 6: Morphologische Veränderungen bei älteren NZO-Mäusen: a) Fettzellen innerhalb der Drüse, x100; b) Fibrose, x100; c) Inselvergrößerung/-Vermehrung, x50; d) Mitose, x400; e) und f) Lymphknoten, x50 bzw. x100

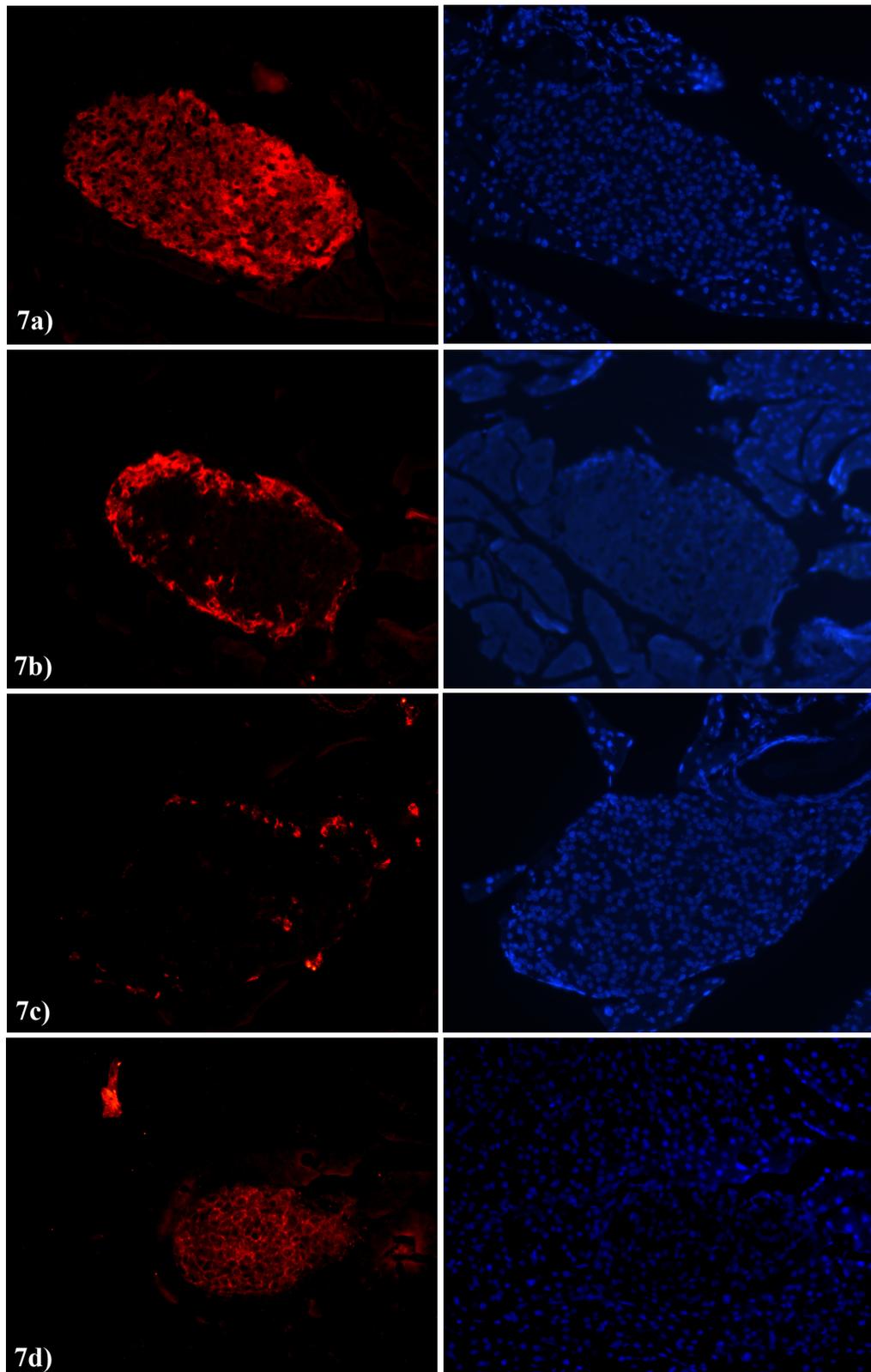


Abb. 7: Immunfluoreszenzmarkierungen mit Cy-3 (linke Seite) und korrespondierende DAPI-Kernfärbungen (rechte Seite) von a) Insulin; b) Glukagon; c) Somatostatin; d) GLUT2 bei der juvenilen NMRI-Maus (x200).

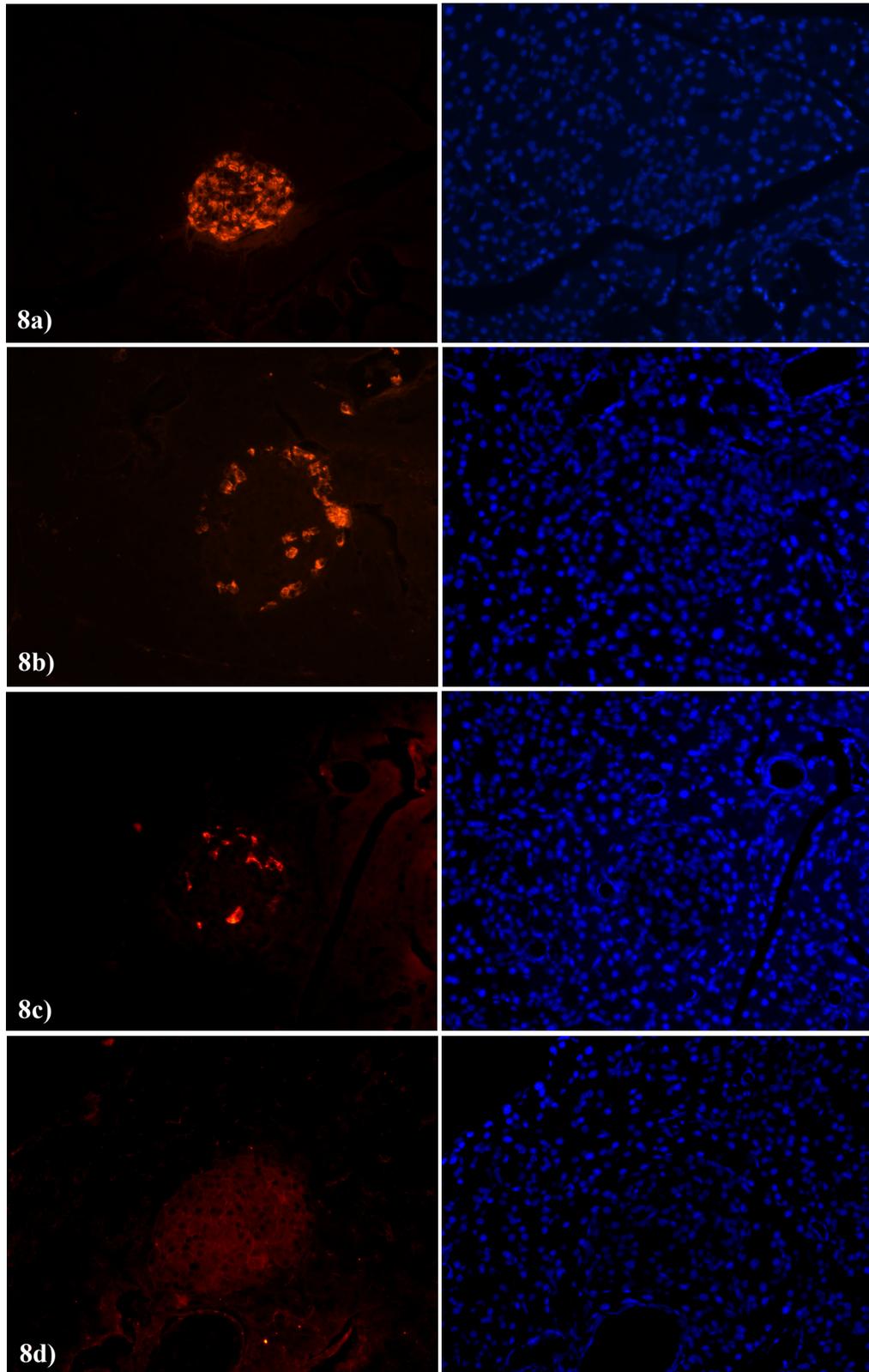


Abb. 8: Immunfluoreszenzmarkierungen mit Cy-3 (linke Seite) und korrespondierende DAPI-Kernfärbungen (rechte Seite) von a) Insulin; b) Glukagon; c) Somatostatin; d) GLUT2 bei der juvenilen NZO-Maus (x200).

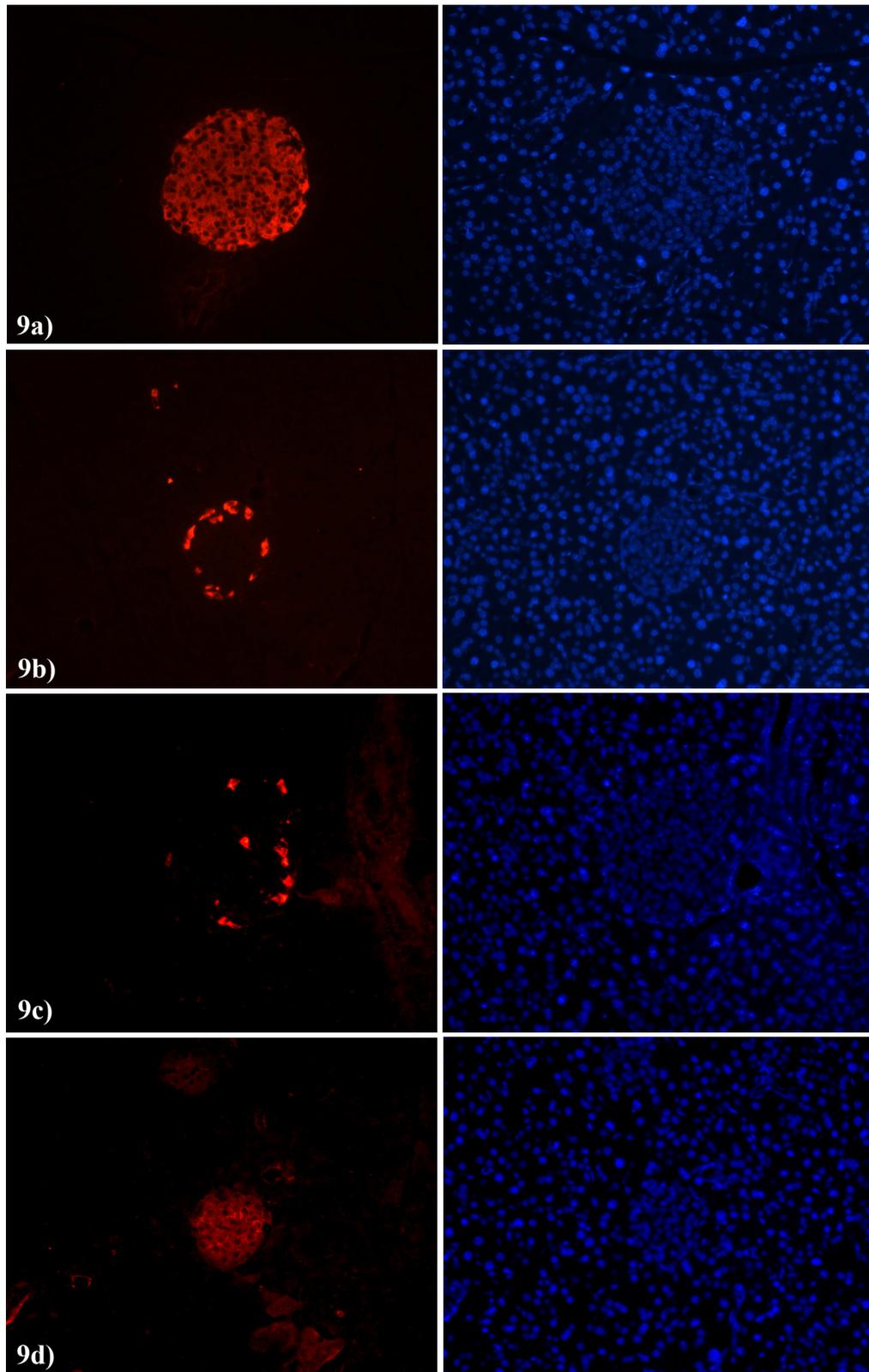


Abb. 9: Immunfluoreszenzmarkierungen mit Cy-3 (linke Seite) und korrespondierende DAPI-Kernfärbungen (rechte Seite) von a) Insulin; b) Glukagon; c) Somatostatin; d) GLUT2 bei der seneszenten NMRI-Maus (x 200).

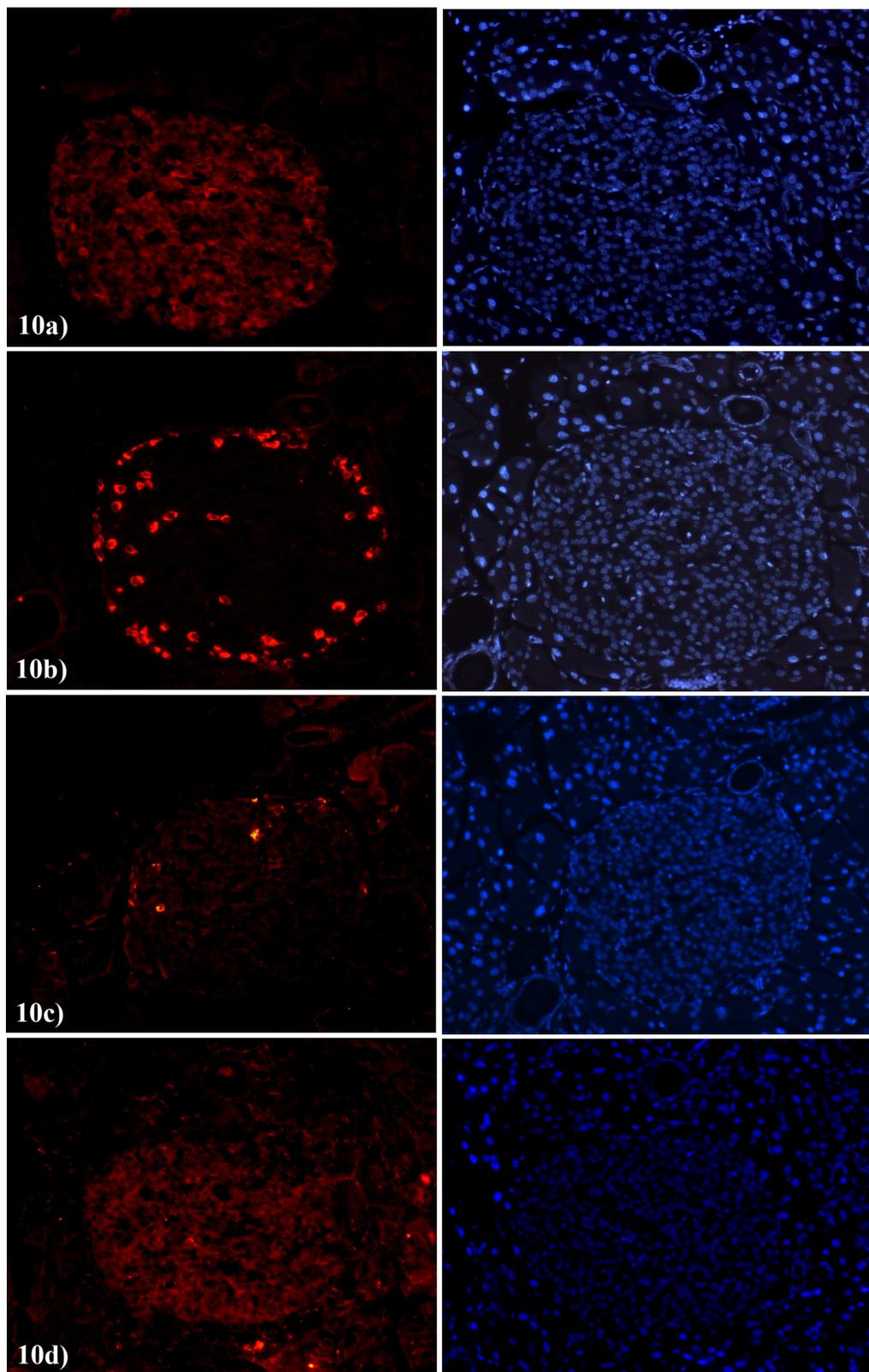


Abb. 10: Immunfluoreszenzmarkierungen mit Cy-3 (linke Seite) und korrespondierende DAPI-Kernfärbungen (rechte Seite) von a) Insulin; b) Glukagon; c) Somatostatin; d) GLUT2 bei der seneszenten NZO-Maus (x200).

c) Somatostatin

Zur Darstellung der dritten Inselzellart wurden Immunfluoreszenzmarkierungen von Somatostatin angefertigt. Die Markierungen von Somatostatin sind beim Kontrollstamm im Zytoplasma großer „dendritischer Zellen“ der LANGERHANSschen Inseln, welche sich in einer Art „zweiten Ring“ anordnen (Abb. 7c und 9c), anzutreffen. Vereinzelt finden sich D-Zellen auch im Zentrum der Inseln. Hinsichtlich Anzahl und Stärke der Markierungen sind die D-Zellen weitgehend homogen. Unterschiede im Altersvergleich oder zwischen verschiedenen Tageszeitpunkten sind nicht feststellbar. Im Vergleich zu NMRI-Inseln finden sich bei NZO-Inseln keine deutlichen Unterschiede hinsichtlich der Anordnung und Anzahl von D-Zellen (Abb. 8c und 10c). Bei einer größeren Anzahl der untersuchten NZO-Inseln war die Stärke der Immunmarkierung von Somatostatin vergleichsweise geringer als beim Kontrollstamm. Tageszeit- oder altersspezifische Unterschiede sind jedoch nicht nachweisbar.

d) Glukosetransporter 2

Frühere immunhistochemische Markierungen des GLUT2 mit DAB zeigten sehr deutlich Veränderungen beim diabetischen NZO-Mausstamm im Vergleich zu stoffwechselgesunden Kontrolltieren (Abb. 11a und 11b). Immunfluoreszenzmikroskopisch wurden anhand größerer Serien (insgesamt ca. 120 Pankreasschnitte) die Befunde gesichert und erweitert. Durch den Vergleich von Folgeschnitten, in welchen parallel gegen Insulin beziehungsweise GLUT2 markiert wurden, lassen sich die β -Zellen genau identifizieren und nachfolgend hinsichtlich des GLUT2 analysieren. Insgesamt sind die GLUT2-Markierungen der β -Zellen von Inseln des NMRI-Stammes einheitlich (Abb. 7d und 9d). Die einzelne β -Zelle weist eine dezente Markierung des Zellinneren auf, während an der Zellmembran sich der Fluoreszenzfarbstoff konzentriert, sodass die aneinander liegenden β -Zell-Membranen einer Insel insgesamt wie „Netze“ imponieren (Abb. 7d). Die filigrane aber scharfe Membranmarkierung ist durch angrenzende Membranen zweier benachbarter β -Zellen verstärkt. In kleineren Inseln (unter 50 μ m) finden sich generell stärkere Markierungen der β -Zellen. Hinsichtlich von Verteilungsmuster und Menge des angelagerten Reaktionsproduktes bestehen keine Altersunterschiede beim NMRI-Stamm. Bis in die Seneszenz zeigen sie die charakteristische Markierung in allen untersuchten Inseln. Ein deutlicher tageszeitlicher Unterschied besteht nur innerhalb der juvenilen NMRI-Altersgruppe. In vier von fünf Fällen fällt eine insgesamt stärkere Markierung bei den Tagtieren auf.

Die Inseln der NZO-Pankreata zeigen hingegen ein heterogenes Fluoreszenzbild bei Immunmarkierung des GLUT2. Innerhalb eines Schnittes sind kleinere Inseln stärker und größere Inseln schwächer markiert. Es findet sich im Vergleich zu Kontrollpankreatata keine adäquate Markierung des GLUT2 bei den β -Zellen der NZO-Mäuse. Innerhalb einer LANGERHANSschen Insel existieren Areale stark eingeschränkter Markierung, sodass ein fleckartiger Eindruck entsteht (Abb. 8d und 10d). Der Fluoreszenzmarker findet sich bei den NZO-Mäusen vor allem im Inneren der β -Zellen. In einigen β -Zellen ist das Reaktionsprodukt stark aggregiert. Eine sehr schwache Membranmarkierung der meisten β -Zellen kann nachgewiesen werden. Große Inseln, über 150 μm im Durchmesser, weisen oft kleine Konglomerate von β -Zellen mit hauchdünner Membranmarkierung auf, sodass teilweise ein netzartiges Fluoreszenzmuster entsteht (Abb. 8d). Bei ca. einem Drittel der Inseln juveniler NZO-Mäuse ist keine Membranmarkierung vorhanden. Ab einem Alter von 6 Monaten treten die Veränderungen besonders hervor. Bei der seneszenten Altersgruppe fehlten in jedem der 14 untersuchten Pankreasschnitte klare, über die gesamte Insel verteilte, Membranmarkierungen. Zu verschiedenen Tageszeiten konnten keine unterschiedlichen Fluoreszenzmuster nachgewiesen werden.

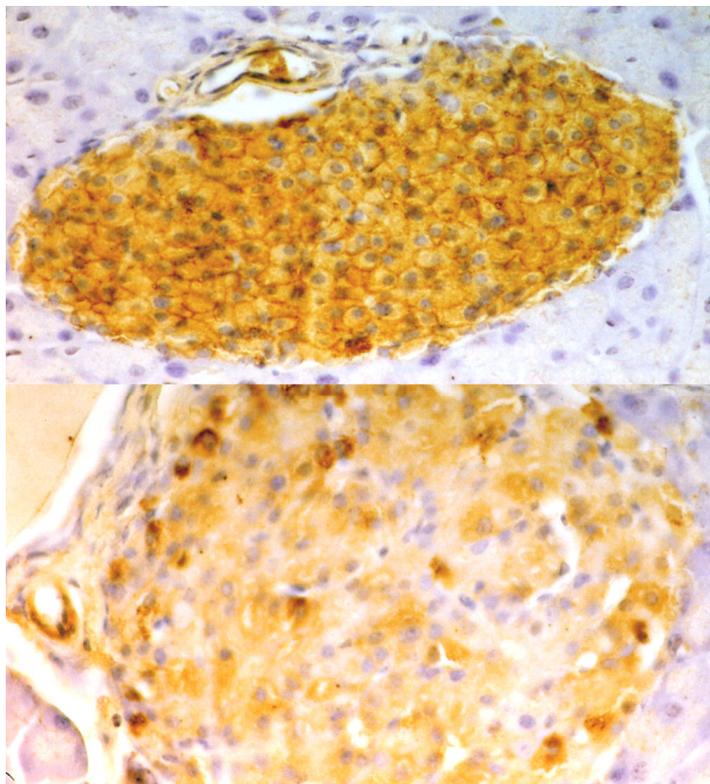


Abb. 11: Immunhistochemie mit DAB-Markierung des GLUT2 von a) oben: NMRI-Maus und b) unten: NZO-Maus (x400).

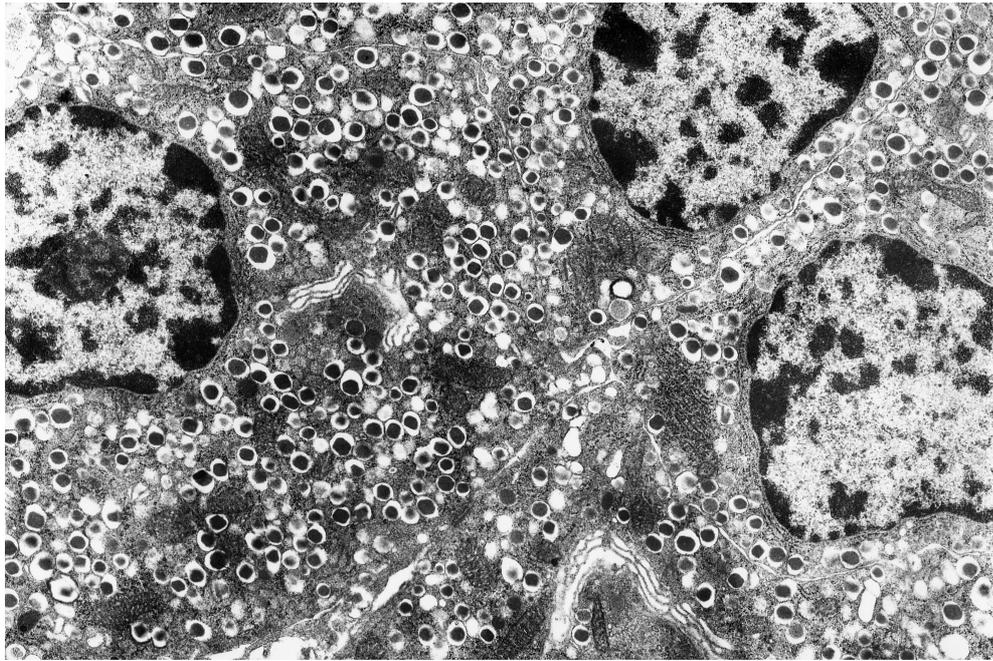


Abb. 12: β -Zellen einer NMRI-Maus (x7.000).

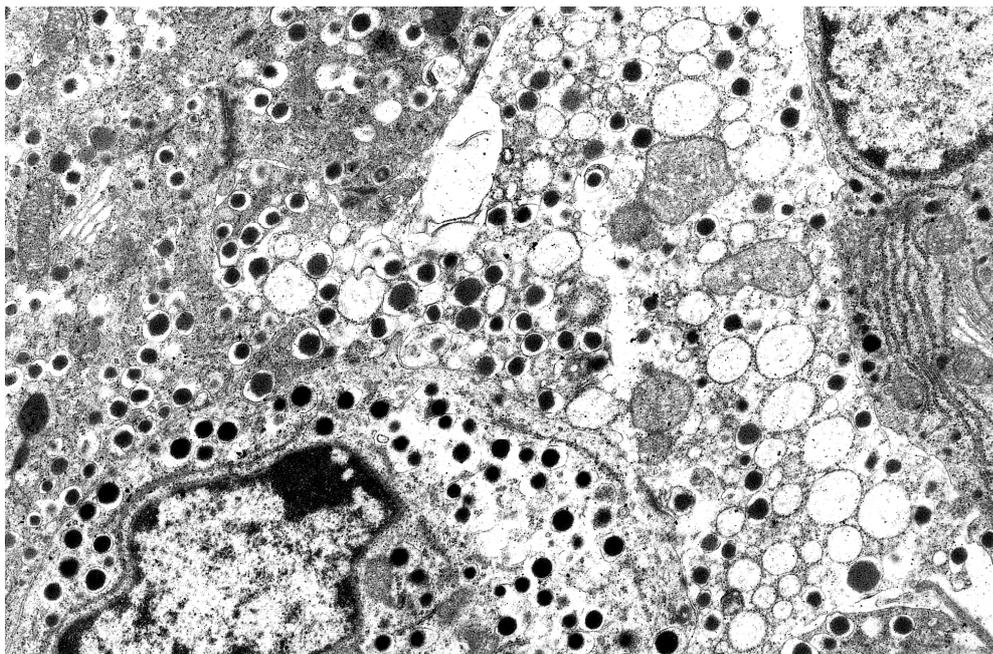


Abb. 13: β -Zellen einer NZO-Maus (x7.000).

4.2.2 Elektronenmikroskopische Befunde

Die einzelnen Zellarten können anhand der charakteristischen Sekretionsvesikel unterschieden werden (siehe Kapitel 1.2). Die Granula der β -Zellen zeichnen sich durch runde oder polygonale Insulinkristalloide aus, welche von einem breiten Saum (Halo) umgeben sind (Abb. 12). Die Dünnschnitte der NMRI-Inseln zeigen β -Zellen und „Nicht- β -Zellen“ mit unauffälligen Zellorganellen. Sie lassen das typische Bild endokrin akti-

ver Zellen erkennen: ein großer *Nucleus* mit reichlich Euchromatin, ein gut ausgebildetes granuliertes Endoplasmatisches Retikulum und ein ausgedehntes GOLGI-System mit zahlreichen Vesikelvorstufen. Des Weiteren lassen sich keine nekrotischen oder apoptotischen Umbauvorgänge nachweisen.

Die Dünnschnitte von Pankreata jüngerer NZO-Mäuse entsprechen den Beschreibungen beim Kontrolltier. Ab dem Alter von 6 Monaten jedoch nehmen morphologische Veränderungen der β -Zellen von NZO-Mäusen dramatisch zu. Eine Hypertrophie der β -Zellen wird begleitet von einer massiven Ausdehnung des rER. Dicht gepackte Felder des rER bestimmen weite Teile der Dünnschnitte. Auffälligkeiten bestehen außerdem in dilatierten Zisternen des GOLGI-Apparates, geschwollenen Mitochondrien und einer hohen Anzahl an Vakuolisierungen besonders in der seneszenten Altersgruppe (Abb. 13). Weitere Zeichen, welche auf eine Nekrose hindeuten, sind jedoch nicht zu beobachten. Die Zellkerne sind bis auf wenige Ausnahmen regelrecht.

Eine stärkere Granulierung der α -Zellen im Vergleich zum altersgleichen Kontrollstamm deutet sich an. Die anderen Insel-Zelltypen zeigen keine ultrastrukturellen Auffälligkeiten. Das Kapillarsystem der Inseln wirkt erweitert. Ansonsten sind die Gefäß- und vegetative Nervenanschnitte sowie die exokrinen Anteile ohne pathomorphologische Veränderungen. Inmitten des exokrinen Pankreas finden sich häufig rundlich-fettige Degenerationen und bindegewebige Strangbildungen.

4.3 *In vivo*-Befunde

4.3.1 Blutglukosespiegel

Der Mittelwert, gebildet aus allen erhobenen Blutglukose-Einzelwerten der vier Altersgruppen beträgt bei NMRI-Mäusen $7,76 \pm 1,254$ mmol/l ($n = 52$) und bei NZO-Mäusen $8,49 \pm 2,747$ mmol/l ($n = 112$). Der Mittelwert für den Blutglukosespiegel der NZO-Mäuse unterscheidet sich statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$) von der Kontrollgruppe. Lediglich die 2. Altersgruppe der NZO-Maus zeigt einen signifikant erhöhten Mittelwert für den Blutglukosespiegel gegenüber dem der Kontrollmäuse. Alle anderen NZO-Altersgruppen weisen keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich mit den entsprechenden NMRI-Altersgruppen auf (Tab. 2). Bei der 3. Altersgruppe des NMRI-Stammes liegt der Mittelwert nicht-signifikant höher als bei der entsprechenden NZO-Gruppe (Abb. 14). Insgesamt hatten 10,02 % der NZO-Mäuse und 0,74 % der NMRI-Mäuse einen Blutglukosespiegel über 11 mmol/l. Zwei deutlich untergewichtige NZO-Mäuse zeigten Werte über 30 mmol/l. Es besteht bei NZO-Männchen die Tendenz zu

höheren Blutglukosewerten gegenüber NZO-Weibchen, diese ist aber statistisch nicht signifikant (hier nicht gezeigt).

Um tagesrhythmischen Veränderungen, wie unterschiedlichen Aktivitäts- und Fresszeiten Rechnung zu tragen, sind Tagesmuster aufgenommen worden. Die Tagesmuster wurden in den Monaten November und Dezember erstellt. Im 4-h-Raster kann innerhalb von 24 h ($\tau = 24$) ein zweigipfliger Verlauf mit Maxima am späten Nachmittag und in der zweiten Nachthälfte (Abb. 15) gezeigt werden. Der NMRI-Stamm zeigt Minima um 12:00 und 20:00 Uhr sowie ein drittes Minimum um 04:00 Uhr, wobei die niedrigsten Werte in der Mitte der Hellzeit ($5,82 \pm 1,2$ mmol/l) registriert werden. Bei der altersgleichen (3. Altersgruppe) NZO-Gruppe beträgt der Mittelwert zur gleichen Zeit $6,83 \pm 0,614$ mmol/l. Die NZO-Maus weist einen unauffälligen Glukose-Tagesrhythmus auf, wenngleich die einzelnen Werte stets erhöht zum Kontrollstamm sind.

4.3.2 Insulinspiegel

Im Gegensatz zu den Glukose-Werten sind die Insulinspiegel bei NZO-Tieren statistisch signifikant erhöht (Abb. 16). Bei der NMRI-Maus ist die Höhe des Insulinspiegels bei allen Altersstadien nahezu gleich. Die juvenile Altersgruppe zeigt die niedrigsten Insulinwerte (MW = $0,821$ nmol/l). Bei den NZO-Mäusen ist ein Ansteigen des Insulinspiegels zur 2. Altersgruppe zu verzeichnen, während sich diese Altersgruppe zur 3. Altersgruppe nicht signifikant unterscheidet ($p > 0,05$). Die NZO-Alttiere fallen durch ein weiteres Ansteigen des Insulinspiegels auf (Tab. 3). Aus der Abbildung 16 wird ersichtlich, dass in allen vier Altersgruppen die Plasmaspiegel des Insulins bei NZO-Mäusen gegenüber denen der entsprechenden Kontrolltieren signifikant erhöht sind.

Der Verlauf der Tagesmuster ist bei NZO- und NMRI-Mäusen abweichend. Geradezu gegenläufig sind die gemessenen Werte zum 00:00 Uhr-Zeitpunkt (Abb. 17). Generell liegen die Insulin-Mittelwerte zu den einzelnen Zeitpunkten beim NZO-Mausstamm um ein Vielfaches höher als beim NMRI-Stamm. Bei den NZO-Mäusen ist eine erhebliche interindividuelle Schwankungsbreite der Insulinwerte im Blutplasma festzustellen.

Tab. 2: Vergleich der Blutglukosespiegel [mmol/l] von NZO- und NMRI-Mäusen.

Altersgruppe	NZO				NMRI				t-Test	
	n	MW	S	SEM	n	MW	S	SEM	p-Wert	
1.	25	8,668	1,512	0,302	15	8,340	1,137	0,294	0,4729	n. s.
2.	40	8,969	3,943	0,632	20	7,115	1,403	0,314	0,0470	*
3.	23	8,044	1,605	0,335	10	8,160	0,973	0,308	0,8334	n. s.
4.	24	7,942	2,147	0,438	7	7,800	1,512	0,172	0,8651	n. s.

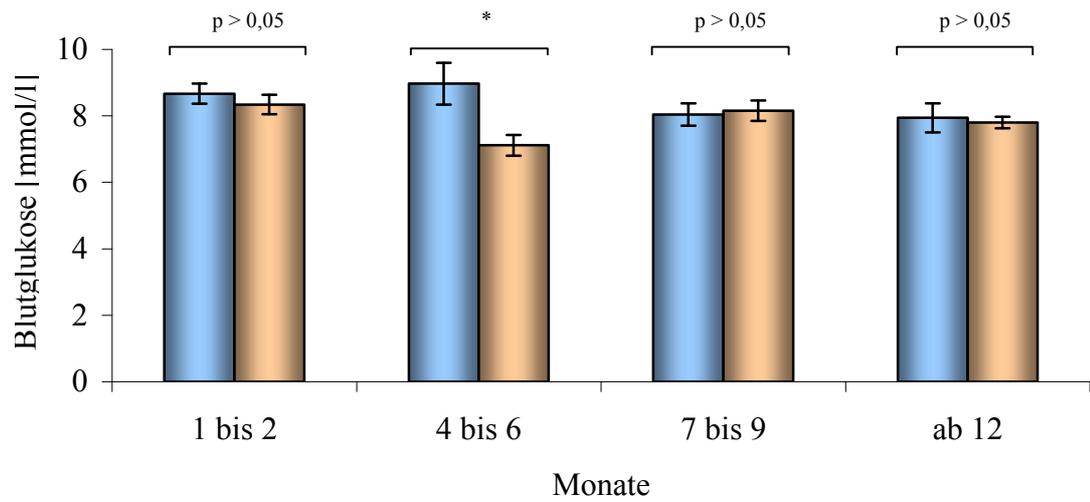


Abb. 14: Blutglukosespiegel bei (■) NZO- und (■) NMRI-Mäusen.

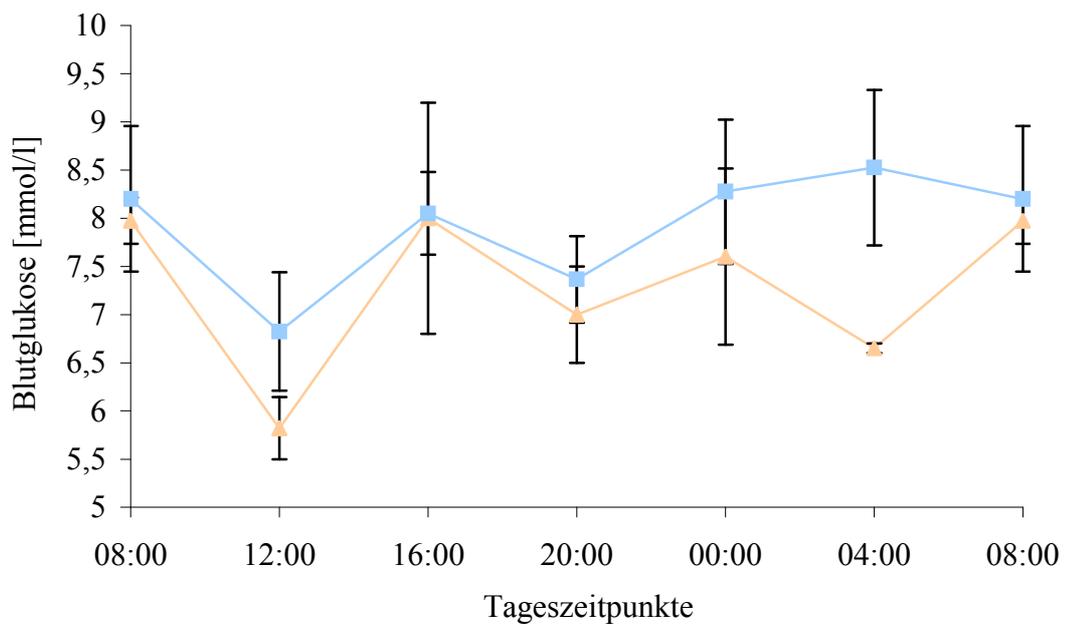


Abb. 15: Glukose-Tagesmuster als Mittelwertskurven \pm SEM der 2. Altersgruppe von (■) NZO- und (▲) NMRI-Mäusen.

Tab. 3: Vergleich der Insulinspiegel im Blutplasma [nmol/l] von NZO- und NMRI-Mäusen.

Altersgruppe	NZO				NMRI				t-Test	
	n	MW	S	SEM	n	MW	S	SEM	p-Wert	
1.	25	5,449	5,913	1,183	15	0,821	0,919	0,237	0,0048	**
2.	40	21,197	21,066	3,331	22	1,486	2,767	0,590	0,0001	***
3.	23	18,130	19,316	4,028	10	0,955	1,535	0,485	0,0091	**
4.	24	36,501	30,568	6,240	7	1,756	1,851	0,700	0,0059	**

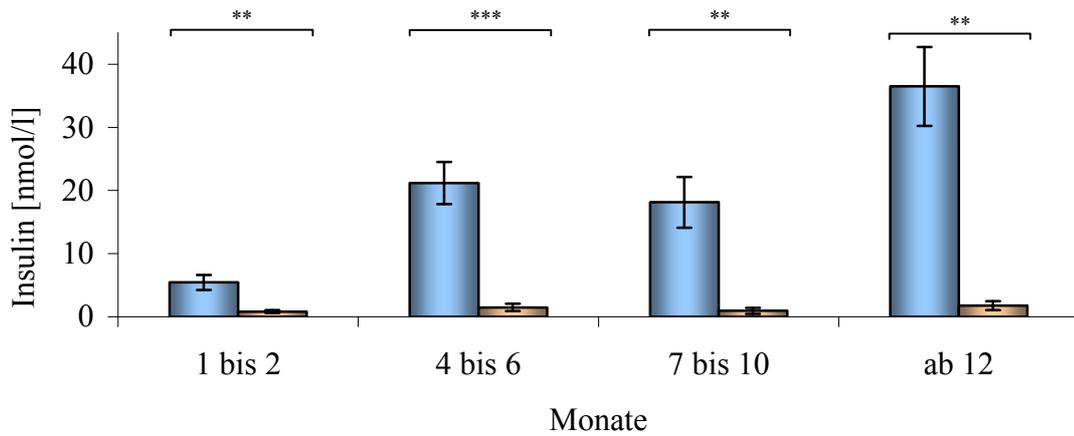


Abb. 16: Insulinspiegel bei (■) NZO- und (■) NMRI-Mäusen.

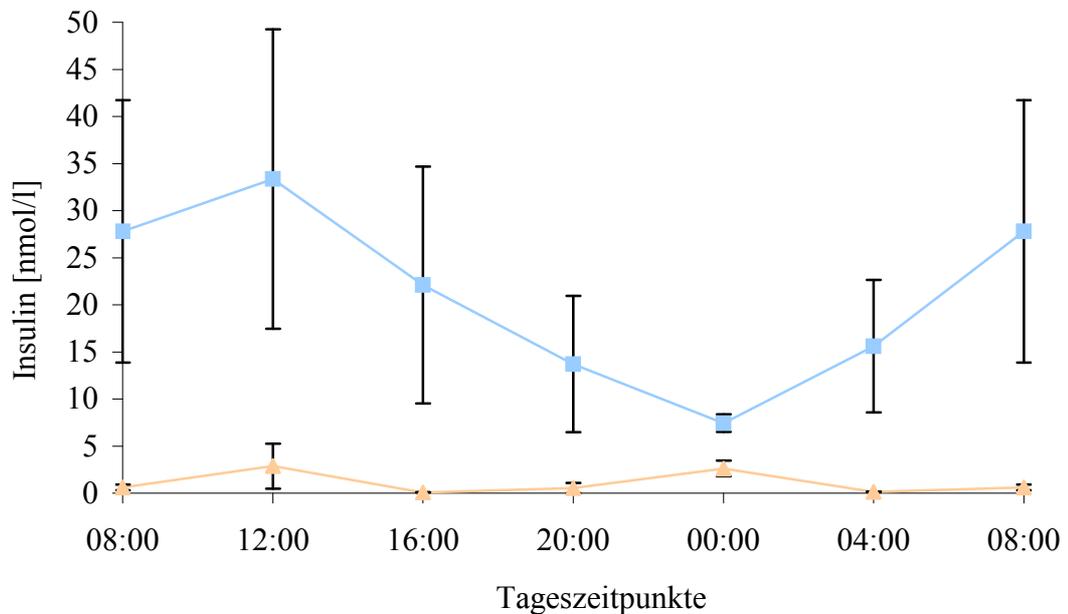


Abb. 17: Insulin-Tagesmuster als Mittelwertskurven ± SEM der 2. Altersgruppe von (■) NZO- und NMRI- (▲) Mäusen.

4.4 *In vitro*-Befunde zur β -Zell-Physiologie

Sowohl für den Typ1- als auch für den Typ2-Diabetes sind Beeinträchtigungen der Insulinproduktion oder/und Insulinliberation charakteristisch (siehe Kapitel 1.3). Die Perfusionstechnik stellt ein Verfahren dar, mit der sich diese Funktionsstörungen an separierten, stimulierten LANGERHANSschen Inseln und exakter zeitlicher Fraktionierung des Eluates geeignet untersuchen lassen (Beschreibung der Technik siehe Kap. 3.4.1). In den Laboratorien der Arbeitsgruppe Peschke ist diese Methode seit langem etabliert und standardisiert.

a) Sekretionsmuster unter einer kontinuierlichen Glukosestimulation [25 mmol/l]

NMRI: Die Insulinkonzentrationen der ersten zehn ausgewerteten Eluat-Fractionen geben die anfängliche Basissekretion [MW = 1,83 nmol/l] nach einer Erholungsphase von 6 bis 8 Stunden wieder. Nach Beginn der Dauerstimulation werden ab der zweiten Fraktion Insulinfreisetzen bei den NMRI-Inseln registriert (Abb. 18). Mit der folgenden Fraktion (6 bis 9 min nach Beginn) wurde der 1. Gipfel der Insulinfreisetzung durch einen Anstieg der Insulinkonzentration auf das 5,5fache der Basislinie erreicht. Die Insulinkonzentration im Eluat fiel anschließend wieder leicht auf das 3,8fache der Basislinie ab und stieg dann erneut, um 63 min nach Beginn der Dauerstimulation das Maximum zu erreichen, das dem 7,7fachen der Basislinie betrug (2. Gipfel). Diese hohe Insulinfreisetzung wurde bis zum Ende der Glukosestimulation beibehalten. Innerhalb von 15 min nach Beendigung der Stimulation fiel die Insulinsekretion auf ein Plateau ab, welches dem 3fachen der Ausgangs-Basissekretion entsprach.

NZO: Die Höhe der Basissekretion von Insulin erreichte bei den NZO-Inseln ein vergleichbares Niveau wie bei den NMRI-Inseln. Der Mittelwert der ersten zehn Fraktionen betrug 1,57 nmol/l. Auf die Glukosestimulation reagierten die separierten NZO-Inseln mit einer verzögerten und deutlich reduzierten Insulinliberation (Abb. 19). In der dritten Fraktion (6 bis 9 min nach Stimulationsbeginn) war eine Zunahme der Insulinfreisetzung erkennbar. Ein erster Gipfel (3,6fache Höhe der Basislinie) wurde 9 min nach Beginn der Stimulation erreicht. Ähnlich der NMRI-Insel-Antwort ging die Insulinliberation der NZO-Inseln kurzzeitig leicht zurück, bevor ein erneutes Ansteigen auf das 4fache (Fraktion 20) der Basissekretion zu verzeichnen war. Es folgten geringere Schwankungen mit einer Tendenz zur ständigen Reduktion der Insulinsekretion bei anhaltendem Glukosereiz. Das typische biphasische Sekretionsmuster war allenfalls schwach angedeutet. Nach Beendigung der Glukosestimulation sank die Insulinsekre-

tion innerhalb von 15 min auf ein Plateau ab, welches dem 1,5fachen des Ausgangsniveaus entspricht.

b) Sekretionsmuster unter einer kontinuierlichen Argininstimulation [25 mmol/l]

NMRI: Die Inseln reagierten stets 3 min nach Argininzugabe. Eine heftige Erste-Phase-Reaktion, wie auf den Glukosereiz, blieb nach Beginn der Argininstimulation aus (Abb. 18). Ohne anfänglichen *Peak* stieg die Insulinliberation in 18 min auf das 10fache der Basislinie und erreichte ein Plateau mit nur wenigen kleineren Spitzen. Der Maximalwert lag beim 14,1fachen der Basislinie und wurde nach 48 min erreicht. 9 min nach Beendigung der Stimulation erreichte die Insulinsekretion Werte, welche dem 7,1fachen der Ausgangsbasis entsprechen. Die Basalsekretion fiel auch nach 45 min nicht wieder ab.

NZO: Die unstimulierte Sekretion im Argininversuch lag um das 4,65fache höher als im Versuch mit der Glukose (Abb. 19). Auf Arginin reagierten NZO-Inseln stets mit 3-minütiger Verzögerung. Zu Beginn der 75-minütigen Argininstimulation erfolgte nach 9 min ein heftiger aber kurzer *Peak* (3,9fache Höhe der Basislinie). Danach sank die Insulinliberation auf das 2,7fache ab, um erneut auf das 3,39fache anzusteigen. Danach fiel die Sekretion erneut auf das 2,1fache der Basislinie ab und blieb auf diesem Niveau bis zum Ende der Stimulation. 12 min nach Beendigung der Argininstimulation sank die Sekretion auf ein Niveau unterhalb der Ausgangslinie ab (0,8fache), die Basissekretion wurde nach 42 min Erholung wieder erreicht.

c) Repetitive Kurzzeit-Stimulationen mit Glukose, Arginin oder Forskolin

NMRI: Auf den kurzen Glukosestimulus reagierten die Inseln nach 3 min mit einer 6 bis 12-minütigen Insulinliberation, welche im Mittel einen Maximalwert vom 5,5fachen \pm 0,492 der Basissekretion erreichte. Nach Arginingabe reagierten die NMRI-Inseln mit einer 6-minütigen Sekretionssteigerung (Amplitude: 1,7fache \pm 0,321) und auf Forskolin folgte eine heftige 12- bis 18-minütige Insulinsekretion, wobei Maximalwerte vom 9,4 beziehungsweise 7,4fachen der Basislinie erreicht wurden. Während auf die Glukose und die Argininstimuli das Maximum sofort erreicht wurde und danach wieder abfiel, erfolgte auf den Forskolinreiz ein schrittweises Ansteigen bis zum Maximum.

NZO: Auf den Glukosereiz erfolgte in zwei von drei Fällen eine um 6 min verzögerte Sekretion. Die Maxima reichten vom 3,0fachen bis zum 6,3fachen der Basislinie. Die 6- bis 9-minütige Insulinfreisetzung ist durch einen schnellen Anstieg auf das Maximum charakterisiert. Nach den Argininstimulationen erreichte die Insulinsekretion um 3 bis 6 min verzögert das 2,6fache der Basislinie. Die Insulinsekretion nach Forskolinstimulation hatte eine Dauer von 15 bis 18 min. Die schrittweise ansteigenden *Peaks* erreichten

das 4,5 und 3,6fache der Basislinie nach Glukosestimulation und das 2,1 bis 2,2fache nach Argininstimulation (hier nicht gezeigt).

d) Sekretionsmuster unter einer kontinuierlichen Glukosestimulation [25 mmol/l] bei Melatonininkubation [100 nmol/l]

Einer Vorinkubation von 4 bis 6 Stunden mit 100 nmol/l Melatonin, welches dem Nährmedium zugegeben wurde, folgten Stimulationen nach dem gleichen Schema wie oben beschrieben.

NMRI: Werden unter dem Einfluss von Melatonin Inseln dauerhaft mit 25mmol/l Glukose stimuliert, zeigt sich eine deutlich reduzierte Insulinantwort (Abb. 20). Dem 1. *Peak* der Insulinantwort 3 min nach Stimulationsbeginn (3,5fache Höhe der Basislinie) folgte ein starker Rückgang der Insulinfreisetzung (1,8fache Höhe der Basislinie). Danach stieg die Insulinsekretion erneut zum 2. *Peak* kontinuierlich an. Dieser wurde 66 min nach begonnener Glukosestimulation erreicht und betrug das 4,3fache der Basis. 15 min nach Beendigung der Dauerstimulation fiel die Insulinsekretion auf das Basisniveau zurück.

NZO: Die Insulinliberation erreichte den ersten *Peak* 6 min nach begonnener Glukosestimulation (2,8fache der Basislinie), gefolgt von einem zweiten 6-minütigen *Peak* mit 4,1facher Erhöhung der Basislinie. Die Insulinfreisetzung kehrte 15 min nach dem Ende der Glukosestimulation zur Ausgangsbasis zurück (Abb. 21).

e) Sekretionsmuster unter einer kontinuierlichen Argininstimulation [25 mmol/l] bei Melatonininkubation [100 nmol/l]

NMRI: Unter dem Melatonineinfluss war die Insulinsekretion auf den Argininstimulus ebenfalls deutlich reduziert. Nach 3 min erfolgte ein Ansteigen auf das 3,4fache der Basis mit sofortigem Abfall auf das 1,8fache, gefolgt von einem langsamen Anstieg bis zum 3,76fachen der Basis. 45 min nach Beendigung lag die Insulinsekretion noch doppelt so hoch wie die ursprüngliche Basislinie (Abb. 20).

NZO: Die Inseln reagierten unter Melatonin- und Argininstimulation ebenfalls mit einer nach 3 min einsetzenden Insulinsekretion mit einem ersten Maximum beim 2,72fachen der Basislinie. Dieses Niveau wurde für 15 min gehalten und fiel danach auf das 1,5fache der Basislinie zurück. Unterbrochen von kurzzeitigen Spitzen sank die Insulinsekretion bis zum Ende der Argininbelastung ab. Am Ende der Stimulation mit Arginin war die Insulinsekretion bereits auf Basisniveau abgefallen (Abb. 21).

Die repetitiven Kurzzeit-Stimulationen mit Glukose, Arginin oder Forskolin unter Melatonininkubation [100 nmol/l] waren deckungsgleich zu den Versuchen ohne Melatonin.

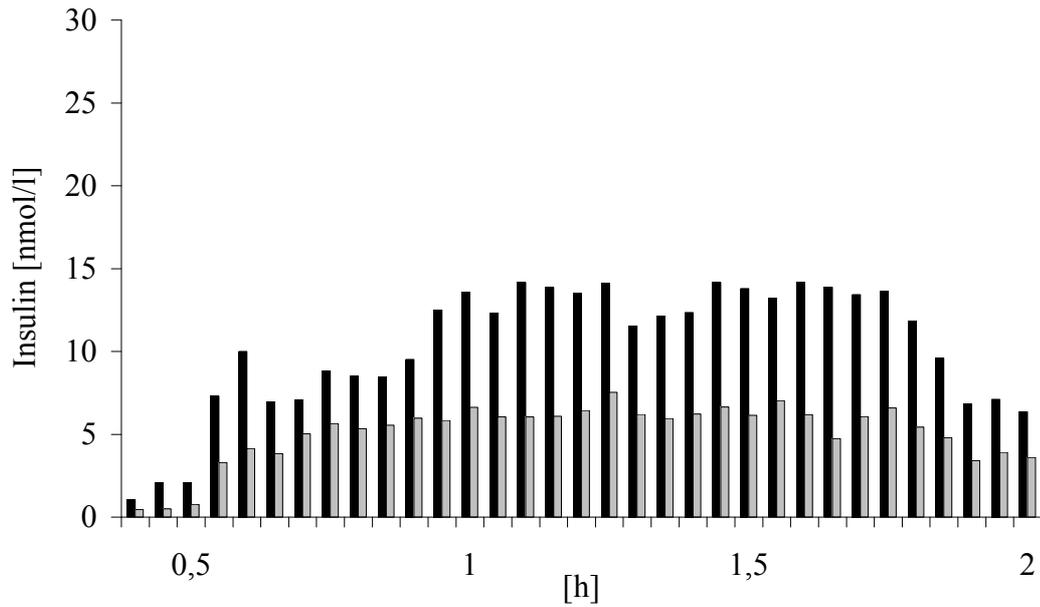


Abb. 18: Perfusion separierter Inseln neonater NMRI-Mäusen ohne Melatonin; schwarze Säulen: Stimulation mit Glukose [25 mmol/l], graue Säulen: Stimulation mit Arginin [25 mmol/l].

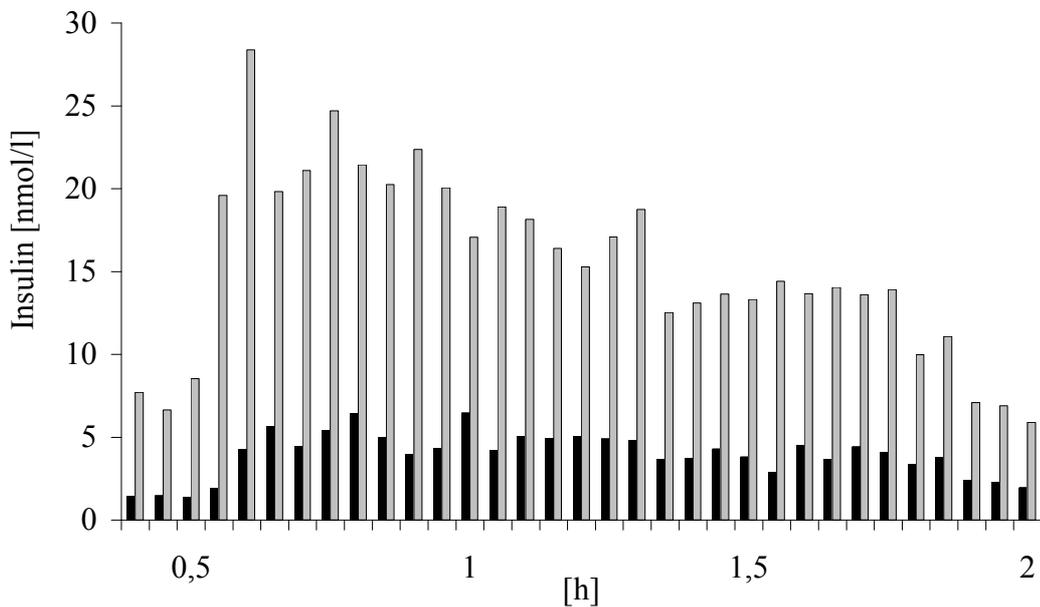


Abb. 19: Perfusion separierter Inseln neonater NZO-Mäusen ohne Melatonin; schwarze Säulen: Stimulation mit Glukose [25 mmol/l], graue Säulen: Stimulation mit Arginin [25 mmol/l].

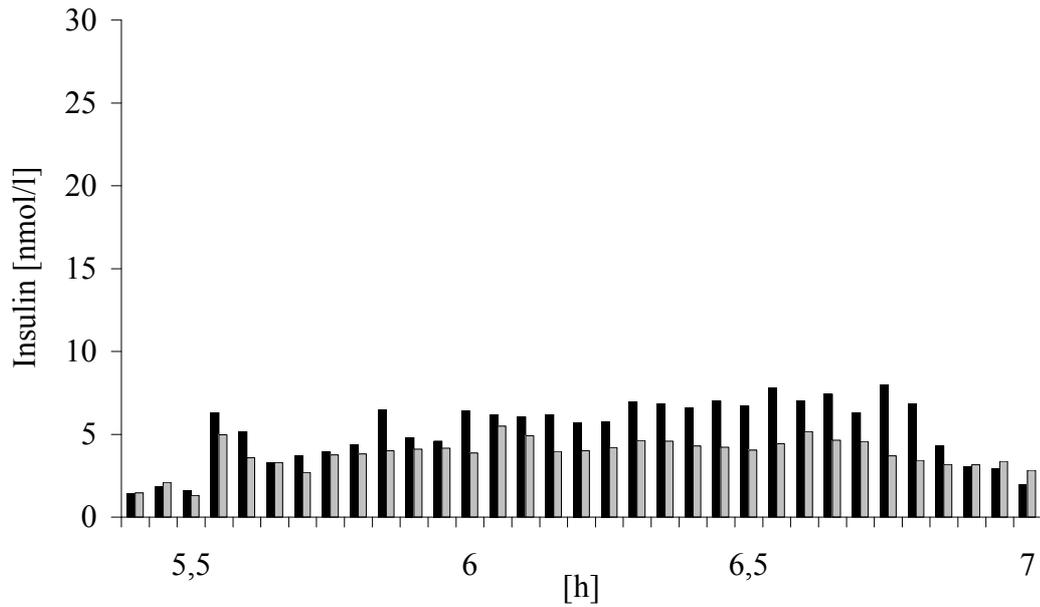


Abb. 20: Perifusion separierter Inseln neonater NMRI-Mäusen mit Melatonin; schwarze Säulen: Stimulation mit Glukose [25 mmol/l], graue Säulen: Stimulationen mit Arginin [25 mmol/l].

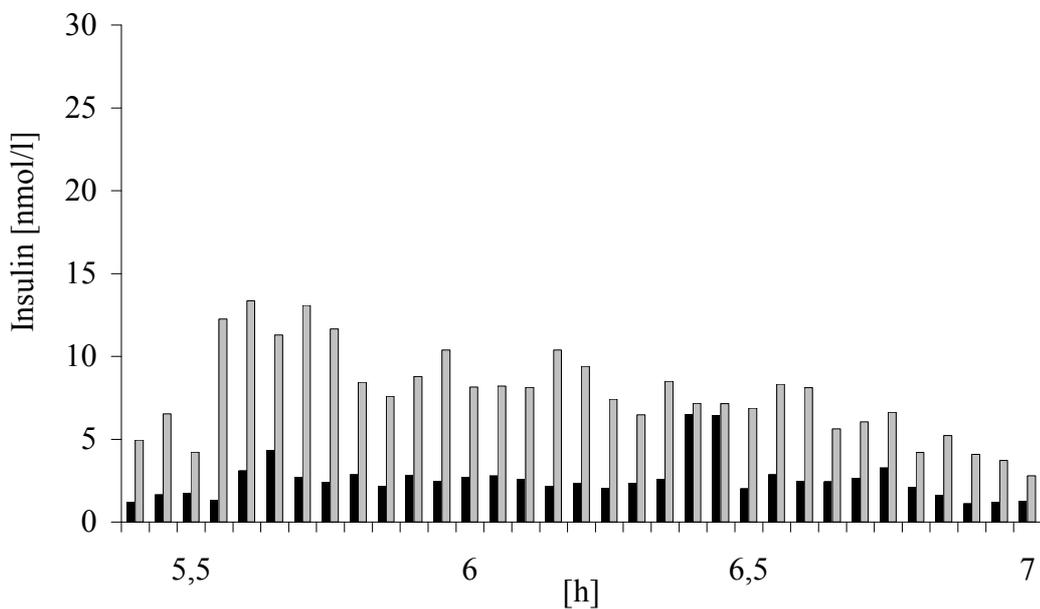


Abb. 21: Perifusion separierter Inseln neonater NZO-Mäusen mit Melatonin; schwarze Säulen: Stimulation mit Glukose [25 mmol/l], graue Säulen: Stimulationen mit Arginin [25 mmol/l].

4.5 Nachweis der GLUT2-mRNS-Expression

Die Ergebnisse aus 18 *real-runs* wurden anhand der Eichkurve basierend auf einem Leberstandard (dargestellt in Abb. 23) wie folgt zusammengefasst: von wiederholten Bestimmungen der gleichen Probe wurden Mittelwerte gebildet. Diese wurden im Weiteren als Einzelwert betrachtet. Die Übertragung der Standardkurve auf die einzelnen Läufe wurde bereits im Kapitel 3.5.3 beschrieben.

Für jede Probe konnte die Konzentration anhand der Formel:

$$\text{conc} = 10^{(-3,26 * Ct + 5,11)}$$

bestimmt werden.

Zum Vergleich beider Mausstämme wurden die Altersgruppen 1, 2 und 4 untersucht. Die Mittelwerte der einzelnen Gruppen bilden minimal 4 und maximal 32 Einzelergebnisse ab (siehe Tab. 4).

Alle untersuchten Maus-Pankreata weisen eine detektierbare mRNS-Expression des GLUT2 auf (Abb. 22). Die relative Höhe dieser Expression nimmt bei den untersuchten Mausstämmen im Alter ab (siehe Abb. 24). Die GLUT2-mRNS Expressionen in den NMRI-Pankreata der Altersgruppe 1 ist im Mittelwert 0,0134 und unterliegt einer relativ hohen Schwankungsbreite. Im Vergleich zur 2. Altersgruppe ist der Unterschied nicht signifikant ($p > 0,05$). Auch zwischen der 2. und 4. Altersgruppe besteht kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$).

Die relative Expression in den NZO-Pankreata der 1. Altersgruppe beträgt 0,263 und ist damit gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Der Unterschied zur 2. NZO-Altersgruppe ist nicht signifikant ($p > 0,05$), jedoch besteht zwischen der 2. und der 3. Altersgruppe ein hoher (signifikanter) Unterschied ($p < 0,01$).

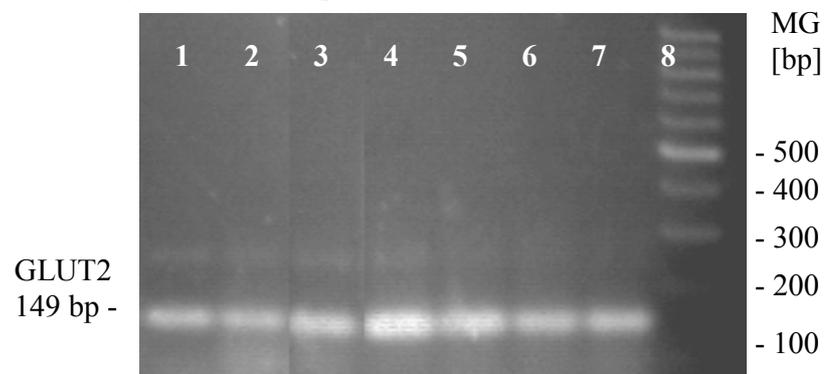


Abb. 22: Nachweis von GLUT2-mRNS im Pankreas von 1.) 1. Altersgruppe NZO; 2.) 2. Altersgruppe NZO; 3.) 1. Altersgruppe NMRI-Kontrolle; 4. bis 7.) Verdünnung 40 ng Leber-cDNS (s. o.); 8.) 100 bp Laufstandard.

Tab. 4: Relatives GLUT2-mRNS-Expressionsniveau im Altersvergleich.

Altersgruppe	NZO				NMRI			
	N	MW	s	SEM	n	MW	s	SEM
1.	32	0,0263	0,0402	0,0071	8	0,0134	0,0164	0,0058
2.	23	0,0176	0,0213	0,0044	16	0,0066	0,0056	0,0013
4.	22	0,0043	0,0073	0,0015	4	0,0029	0,0007	0,0004

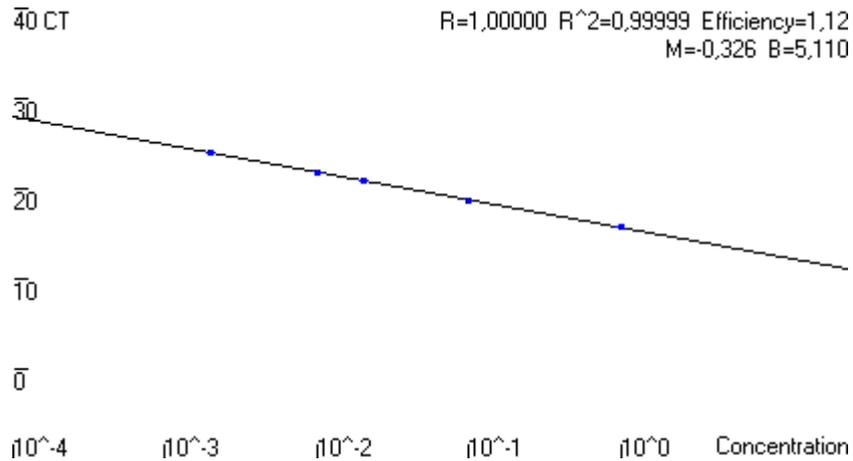


Abb. 23: Leberstandardkurve mit den Verdünnungsschritten der 40 ng cDNS aus Mausleber: 1:1, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500. Grafik erstellt mit Software: Rotor-Gene 5 (Corbett Research Inc., Mortlake, NSW, Australien).

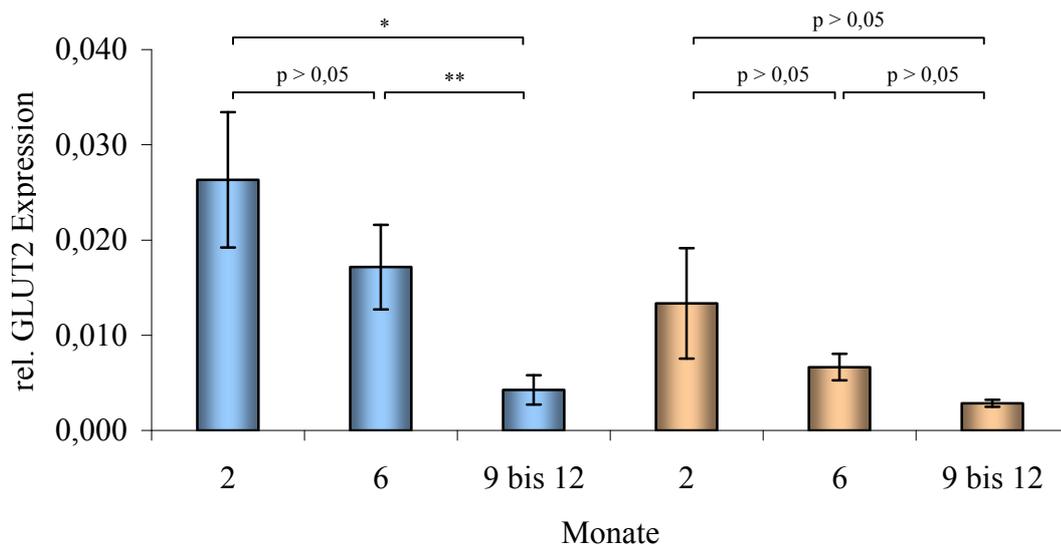


Abb. 24: GLUT2-mRNS-Expressionsniveau in Relation zur Leberverdünnung, dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von (■) NZO- und (■) NMRI-Mäusen verschiedenen Alters.

4.6 Melatoninnachweis

Mit einer Retentionszeit von 12,5 min wurde das derivatisierte Melatonin von der Trennsäule eluiert. Anhand der Eichkurve (Abb. 25) wurde die Konzentration mit dem berechneten Integral des Flächeninhaltes unter der Fluoreszenzkurve bestimmt. Proben mit Konzentrationen unter 100 pmol/l konnten durch Erreichen der Nachweisgrenze nicht gemessen werden, sodass die Tagwerte von NMRI und NZO-Mäusen nicht ermittelt werden konnten. Bei den nachts (Mitte der Nachtzeit) gewonnenen Proben von NMRI bzw. NZO-Mäusen wurden Werte von $0,26 \pm 0,01$ bzw. $0,37 \pm 0,03$ pmol/Pineal gemessen. Damit konnte für die beide Mausstämme der eindeutige Nachweis einer nächtlichen Melatoninproduktion in der *Epiphysis cerebri* erbracht werden, wobei die NZO-Mäuse eine höhere Melatoninkonzentration aufwiesen.

Auf Grund weiterführender HPLC-Untersuchungen zur Identifikation des Derivatisierungsproduktes wird angenommen, dass es sich dabei um eine vom N¹-Acetyl-N²formyl-5-methoxykynuramin (AFMK) abgeleitete Verbindung handelt, die der Bestimmung des Melatonins auf indirekter Weise (gemessen wurde das Ausgangsprodukt) diente.

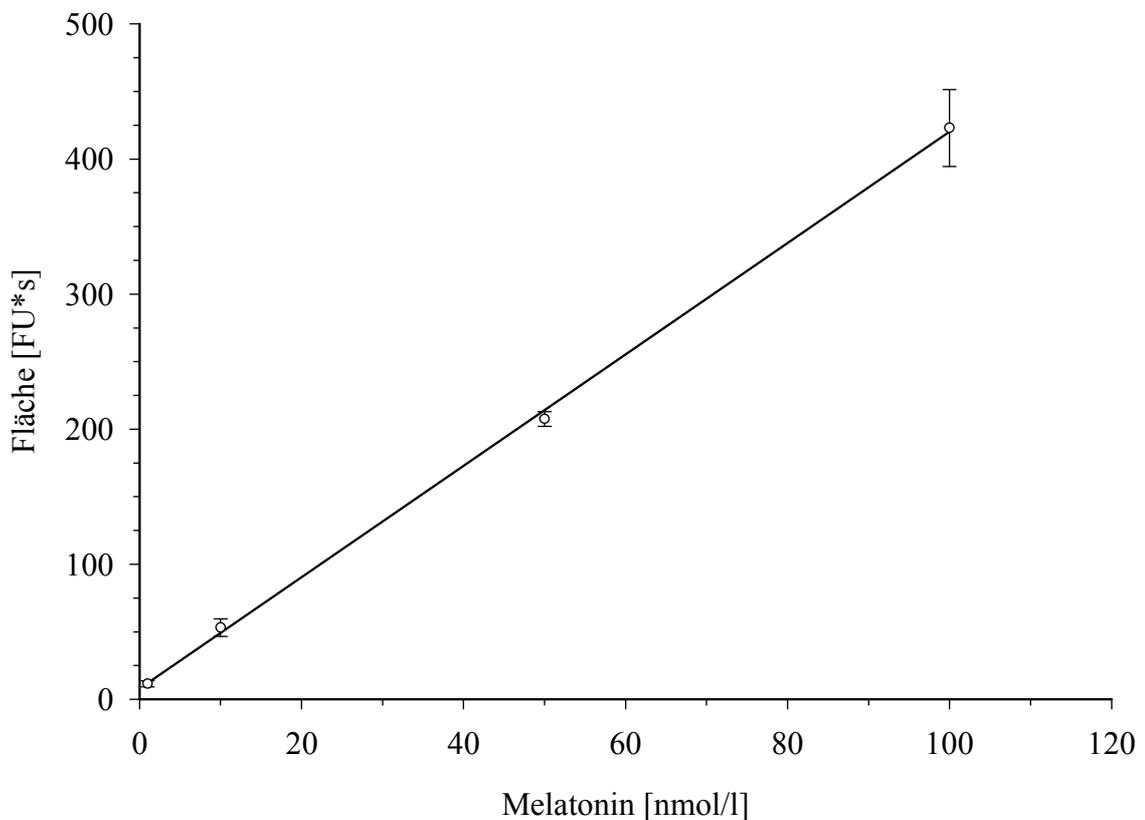


Abb. 25: Eichkurve mit derivatisiertem Melatonin (1 bis 100 nM Melatonin);
Gleichung der Regressionsgerade: $y = 7,75 + 4,12 * x$, $r^2 = 0,9994$.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der diabetische NZO-Mausstamm hinsichtlich allgemeiner und β -Zell-spezifischer Charakteristika untersucht. Die Ergebnisse sollen nun dem metabolisch unauffälligen NMRI-Stamm gegenübergestellt und anhand der umfangreichen Veröffentlichungen diskutiert werden.

Ein prinzipielles Problem stellt der Vergleich zwischen einem durch Inzucht vermehrten Tiermodell mit einem Vergleichsstamm dar. Ein „ideales“ Paar („*matched pairs*“) bilden Gruppen, welche sich nur in dem zu betrachtenden Merkmal unterscheiden, um verbundene Variablen möglichst zu vermeiden. Ideal für Untersuchungen an den NZO-Mäusen sind verwandte, neuseeländische Linien, zum Beispiel die New Zealand black-Maus (NZB), welche sich in der F₃-Generation von der NZO-Linie abspaltete (BIELSCHOWSKY und GOODALL, 1970). Diese Mauslinien standen der Studie jedoch nicht zur Verfügung. Der NMRI-Mausstamm ist dennoch ein zum Vergleich tauglicher Auszuchtstamm mit einer Verwandtschaft zum NZO-Stamm, wie durch Restriktionslängenbestimmungen von mitochondrialer DNS nachgewiesen werden konnte (FERRIS et al., 1983).

Die Vermehrung der NMRI-Mäuse stellt kein Problem dar; bei den NZO-Mäusen hingegen mussten im Laufe der Studie längere Engpässe überbrückt werden. Für NZO-Mäuse sind geringe Nachkommenanzahlen typisch (BIELSCHOWSKY und BIELSCHOWSKY, 1956). Durch eine reduzierte Anzahl von Tieren pro Wurf (4 bis 5) und wenigen Würfen überhaupt, entstanden oft derartige Nachzuchtprobleme, dass die gesamte Zucht in Gefahr geriet. Einige Weibchen bleiben infertil. Fertile Weibchen haben einen Östrus von 4 bis 5 Tagen (BIELSCHOWSKY und BIELSCHOWSKY, 1956) und vermehren sich ab einem Alter von 6 bis 8 Wochen (CROFFORD und DAVIS, 1965). Saisonbedingte Schwankungen in der Reproduktion sind innerhalb des Versuchszeitraumes von knapp 4 Jahren nicht erkennbar gewesen.

Zur Alterscharakterisierung und hinreichenden Erfassung der diabetischen Progredienz wurden die NZO- und die NMRI-Mäuse in die vier folgenden Altersklassen eingeteilt:

- juvenile Tiere (vor Eintritt in die Geschlechtsreife),
- junge ausgewachsene, geschlechtsreife Tiere (im ersten Lebenshalbjahr),
- ältere ausgewachsene, geschlechtsreife Tiere (im zweites Lebenshalbjahr) und
- seneszente Tiere mit deutlicher Manifestation der Adipositas.

Seit der F₁₇-Generation ist für NZO-Mäuse eine ausgeprägte Fettsucht kennzeichnend (BIELSCHOWSKY und GOODALL, 1970). Die Geburtsgewichte unterscheiden sich von denen der Kontrolltieren statistisch nicht signifikant (CROFFORD und DAVIS, 1965). Die Körpermassen zwischen den jüngsten Altersgruppen differieren bei NZO- vs. NMRI-Mäusen um 4,37 g ($p < 0,05$), wobei die NMRI-Mäuse das höhere Gewicht aufweisen. Wie in der Abbildung 4 dargestellt, kann bei den NZO-Mäusen eine erhöhte Gewichtszunahme erst ab dem zweiten Lebensmonat festgestellt werden. Während das Gewicht ab dem 3. Monat bei dem metabolisch unauffälligen Kontrollstamm NMRI nur noch sehr gering anwächst, ist der Gewichtszuwachs bei NZO-Mäusen bis zum Alter von einem Jahr nahezu kontinuierlich. Danach bleibt das Gewicht zunächst konstant. In der höchsten Altersgruppe sind die NZO-Mäuse im Mittel 15,14 g schwerer als die NMRI-Mäuse ($p < 0,001$). Der Gewichtsabfall nach 18 Monaten ist möglicherweise auf eine erhöhte Tumorinzidenz zurückzuführen (BIELSCHOWSKY und BIELSCHOWSKY, 1956). Im Vergleich zu Publikationen anderer Autoren differieren diese Befunde lediglich durch die Verwendung verschiedener Kontrollmausstämmen (siehe Tab. 5).

Tab. 5: Vergleich von Körpergewichten unterschiedlicher Mausstämmen anhand einer kleinen Literaturliste.

Quelle	Alter	Mausstamm	Gewicht [g]
CROFFORD und DAVIS (1965)	adulte Mäuse	Ha/ ICR (m)	48,5
	adulte Mäuse	NZO (m)	58,3
HERBERG et al. (1970b)	ca. 9 Monate	ob/ ob (m)	70,0
	ca. 9 Monate	NZO (m)	60,0
HUCHZERMAYER und STAIB (1973)	6 Monate	Swiss alb. M. (m)	42,4
	6 Monate	NZO (m)	55,0
LEITER et al. (1998)	6 Monate	NON (m)	44,1
	6 Monate	NZO (m)	56,7
	9 Monate	NON (m)	47,5
	9 Monate	NZO (m)	62,0
SNEYD (1964)	6 bis 11 Monate	NZY	31,7
	6 bis 11 Monate	NZO	50,0
VERONI und LARKINS (1986)	12 Monate	Balb c (w)	25,8
	12 Monate	NZO (w)	51,0
eigene Untersuchungen	7 bis 10 Monate	NMRI (m)	42,1
	7 bis 10 Monate	HAZ: ICR (m)	50,0
	7 bis 10 Monate	NZO (m)	57,0

Geschlechtsspezifische Unterschiede wurden nicht berücksichtigt, sind aber in der Literatur mehrfach beschrieben worden. Die Weibchen sind während der Geschlechtsreife durch geringere Körpermassen und unauffällige Blutglukosewerte gekennzeichnet, nach dem Erlöschen der Fertilität im Alter gleichen sich die Körpermassen weitgehend an die der männlichen Tiere an (HUCHZERMAYER und STAIB, 1973; KLUGE et al., 2000; ORTLEPP et al., 2000). Offenbar haben die weiblichen Sexualhormone einen Gewichtsreduzierenden Einfluss (BIELSCHOWSKY und BIELSCHOWSKY, 1956). Außerdem zehrt die Austragung der Nachkommenschaft in aller Regel erheblich an den Energiereserven. Die Fettgewebsansammlungen im Retroperitonealraum und Eingeweideraum der untersuchten NZO-Mäuse sind beträchtlich und vergleichbar mit den bereits publizierten Beobachtungen (BIELSCHOWSKY und BIELSCHOWSKY, 1956; JOHNSON und HIRSCH, 1972; HUCHZERMAYER und STAIB, 1973). Die Fettverteilungsform entspricht der ungünstigeren androiden Fettverteilungsform beim Menschen. HERBERG et al. (1970a) ordneten die Fettgewebsvermehrung der hypertrophischen Form zu, bei der das Volumen einer einzelnen Fettzelle sich bis zum 17fachen vergrößern kann. MEADE et al. (1979) beschrieben hingegen eine hypertrophisch-hyperplastische Form im gonadalen Fettgewebe von NZO-Mäusen. Unter spezieller Kostform, beispielsweise einer fettreichen Ernährung, ist ebenfalls eine Vervielfachung der Fettzellen zu beobachten (HERBERG et al., 1974).

Als eine Ursache der Hyperphagie, welche zur ausgeprägten Adipositas bei NZO-Mäusen beiträgt, wird u. a. die Schädigung eines der hypothalamischen Fresszentren, des *Nucleus ventromedialis*, vermutet (HERBERG und COLEMAN, 1977). Im Rahmen dieser Studie wurde keine Bilanzierung der Nahrungsaufnahme durchgeführt. Jüngere Studien haben bei erhöhten Serumleptinspiegeln und ausreichender mRNS-Leptinrezeptor-Expression im Hypothalamus (IGEL et al., 1997a,b; RIZK et al., 1998) einen verminderten Transport des Fettzellhormons Leptin durch die Blut-Hirn-Schranke nachweisen können (HALAAS et al., 1997). An Adipozyten junger NZO-Mäuse konnte mittels *in vitro*-Versuch eine Verminderung der stimulierbaren Lipolyse festgestellt werden (WINAND et al., 1968; LOVELL-SMITH, 1971; LOVELL-SMITH und SNEYD, 1973; UPTON et al., 1979). Eine Insulinresistenz ist für Leberzellen (RUDORFF et al., 1970), weiße und rote Muskelfasern (VERONI und LARKINS, 1986; VERONI et al., 1991) sowie weißes und braunes Fettgewebe (HUCHZERMAYER et al., 1973; LARKINS, 1973a) belegt. Es wurden sowohl Insulin-Postrezeptordefekte am Adipozyten (MACAULAY und LARKINS, 1988) als auch eine frühe Verminderung (4. bis 6. Woche postpartal) des für die Glukoseaufnahme in Fett- und Muskelzelle unerlässlichen Glukosetransporters 4 für braunes Fettgewebe

nachgewiesen (FERRERAS et al., 1994). Weitere Arbeitsgruppen berichten über die Existenz von Autoantikörpern gegen Insulinrezeptoren bei NZO-Mäusen (HARRISON und ITIN, 1979; MELEZ et al., 1985).

An der Entwicklung einer Adipositas ist beim Menschen unter anderem die körperliche Inaktivität maßgeblich beteiligt, andererseits kann eine Adipositas zur Inaktivität führen (siehe Kapitel 1.1). Aus diesem Grunde sollte auch bei obesen Tiermodellen der lokomotorische Aktivität Rechnung getragen werden. Die jungen NZO-Mäusen sind nicht auffallend inaktiver als die Kontrolltiere, bei älteren hingegen kann jedoch eine Verlangsamung der Regsamkeit beobachtet werden (subjektive Beobachtungen). Eine Registrierung der lokomotorischen Aktivität war nicht Gegenstand und wurde nicht vorgenommen. Es wird vermutet, dass die Aktivitätsminderung Folge der Obesitas ist und sich die Fettsucht nicht vor dem Hintergrund einer Bewegungsarmut entwickelt (BIELSCHOWSKY und BIELSCHOWSKY, 1956; SUBRAHMANYAM, 1960; CROFFORD und DAVIS, 1965; YEN und ACTON, 1972). Eine gesteigerte Agilität können männliche Tiere bei heftigen Rivalitätskämpfen oder in Fluchtsituationen entwickeln.

ORTLEPP et al. (2000) konnten bei der NZO-Maus weitere wesentliche Charakteristika des metabolischen Syndroms wie systolische Hypertension, erhöhte Serumcholesterin- und Triglyceridspiegel nachweisen.

Die Hyperglykämie als ein Hauptcharakteristikum des Diabetes mellitus ist bei den untersuchten NZO-Mäusen gering ausgeprägt. Die Untersuchungsergebnisse zum Blutzuckerspiegel des Halleschen NZO-Stammes für sich genommen, würden die Zuordnung zu einem „diabetischen Mausmodell“ nicht rechtfertigen. Die geringe Erhöhung der Blutglukose war bei den untersuchten Tieren, von wenigen NZO-Mäusen abgesehen, nur bei der 2. Altersgruppe signifikant erhöht gegenüber der Vergleichsgruppe (Abb. 14). Bei hoher interindividueller Varianz war die Blutglukose insgesamt um 0,73 mmol/l erhöht. CROFFORD und DAVIS fanden (1965), verglichen mit dem Mausstamm Ha/ICR, eine ähnliche Erhöhung um 1,11 mmol/l. Die Angaben zur Prägnanz und zum Manifestationszeitpunkt der Hyperglykämie differieren in den Veröffentlichungen geringfügig. BIELSCHOWSKY und BIELSCHOWSKY verzeichneten (1956) einen deutliche Blutzuckerzunahme ab einem Alter von 4 Monaten, während VERONI und LARKINS bereits ab der 4. Woche erhöhte Glukosewerte registrierten. Im Gegensatz zu CROFFORD und DAVIS (1965) beobachteten HERBERG et al. (1970b) eine Korrelation zwischen der

Zunahme des Körpergewichtes und der Blutglukose. Aufgrund der eigenen Messdaten konnte jedoch dieser Zusammenhang nicht bestätigt werden.

Die im humanen Bereich geltende Schwelle eines *post prandialen* Blutzuckerspiegels von 11 mmol/l ist auch für *ad libitum* gefütterte Labortiere unter Einschränkungen anwendbar. Rund 10 % der untersuchten NZO-Mäuse überschritten diesen Schwellenwert. Die Tiere wurden in dieser Studie nicht auf das Vorhandensein einer ketotischen Stoffwechsellage überprüft, da in den ausgewiesenen Publikationen eine Ketonkörperbildung nur unter Fettdiäten erreicht worden ist (CREUTZFELDT et al., 1970; HUCHZERMEYER und STAIB, 1973).

Die Bestimmung des Blutzuckers zu mehreren Tageszeitpunkten ist sinnvoll, da Nahrungsaufnahme, lokomotorische Aktivität, Hormonstoffwechsel und andere Einflüsse bekanntlich tagesrhythmischen Veränderungen unterliegen (siehe Kapitel 1.5). WEINERT und SCHUH (1984) stellten an Mäusen fest, dass sich im Laufe der Ontogenese der Tageszeitpunkt für Futteraufnahme und konsekutiv der Blutzuckertagesrhythmus ändern. Sie zeigten bei 18-wöchigen Mäusen im 2-h-Raster ein polymodales Blutzuckertagesmuster mit einer unterschiedlichen Anzahl an Maxima. Die eigenen im 4-h-Raster aufgenommenen Tagesmuster der Blutglukose lassen keine Störungen des Stoffwechselrhythmus bei NZO- und NMRI-Mäusen erkennen. Die große Streuung der Messergebnisse könnte zum einen durch die je Tier nur einmalige Bestimmung bedingt sein und zum anderen könnte die *ad libitum*-Fütterung eine größere interindividuelle Schwankungsbreite verursachen. Die Abbildung 15 zeigt exemplarisch das Glukose-Tagesmuster der 2. Altersgruppen. Bis auf das Minimum um 04:00 Uhr bei den NMRI-Mäusen verlaufen die Kurven weitgehend parallel. Ein Großteil, der in der Literatur beschriebenen Studien fand in den Vormittagsstunden statt. Der starke Blutglukoseabfall in den Vormittagsstunden könnte diesen Zeitpunkt für metabolisch orientierte tierexperimentelle Untersuchungen eventuell ungeeignet machen.

Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist bei NZO-Mäusen der Blutglukosespiegel durch die exzessive Insulinproduktion der LANGERHANSschen β -Zellen kompensiert. Die signifikant zu den Kontrollen höheren Insulinkonzentrationen im Blutplasma sind in jeder Altersgruppe nachzuweisen. Bis in die Seneszenz hinein nimmt die Hyperinsulinämie zu, sodass in dieser Altersgruppe mit einem Mittelwert von $30,5 \pm 6,24$ nmol/l gegenüber des Kontrollstammes $1,76 \pm 0,7$ nmol/l nicht der Eindruck einer dekompensierten, reduzierten Insulinproduktion entsteht. Die absoluten Insulinkonzentrationen lassen sich nur schwer mit den in der Literatur angegebenen Werten vergleichen, da dieser Studie

kein Mausinsulinstandard zur Verfügung stand. Das Verhältnis beider Stämme zueinander und die Steigerung der Insulinproduktion im Alter bei NZO-Mäusen ist jedoch mit den publizierten Daten anderer Autoren übereinstimmend (SNEYD, 1964; WILLMS et al., 1970; CAMERON et al., 1974).

In Abbildung 17 wurden Insulintagesprofile der 2. Altersgruppen verglichen. NZO-Mäuse weisen einen unimodalen Verlauf mit einem Maximum um 12:00 Uhr und einem Minimum um 00:00 Uhr auf, während bei den NMRI-Mäusen das Tagesmuster zwei Gipfel um 12:00 und um 00:00 Uhr zeigt. Eine Störung des Tagesmusters lässt sich aus den Befunden jedoch nicht ableiten. Vielmehr liegt bei den NZO-Mäusen im Vergleich dieser Altersgruppe zum Kontrollstamm ($p < 0,001$) insgesamt eine massive Erhöhung des Plasmainsulinspiegels vor. Ebenfalls unter Berücksichtigung möglicher tagesrhythmischer Veränderungen wurden immunhistologische Insulinmarkierungen von Tag- und Nachttieren angefertigt. Die Insulinmarkierung sind bei jüngeren Tieren beider Stämme in der Nacht stärker als am Tag. Die Markierung vom GLUT2 hingegen ist am Tag deutlicher. In Verbindung mit den Plasmainsulinspiegeln sind diese Beobachtungen im Sinne einer Speicherung von Insulin in der ersten Nachthälfte zu deuten. Die vorliegenden Befunde zu den Tagesmustern sprechen insgesamt für einen ausgereiften und noch intakten Regelmechanismus der nachtaktiven Nagetiere.

SNEYD erfasste 1964 bei NZO-Mäusen im Gegensatz zur Kontrollmauslinie NZY eine altersabhängige Gewichtszunahme des Pankreas und Erhöhung des zu extrahierenden Insulins. Die massive Hyperinsulinämie geht mit morphologischen und physiologischen Veränderungen der LANGERHANSschen Inseln und speziell der β -Zellen einher. Nur dadurch ist es dem Organismus möglich, erfolgreich einer andauernden Hyperglykämie zu begegnen (WEIR et al., 2001). Einer peripheren Insulinresistenz wird mit einer Überproduktion an Insulin begegnet. Die adaptierende β -Zell-Masse steht im Gleichgewicht mit β -Zell-Neogenese, -Replikation, -Hypertrophie, -Apoptose und -Nekrose (GEPTS et al., 1960; FINEGOOD et al., 1995; WEIR et al., 2001). Einige dieser Formen der β -Zell-Anpassung sind bei NZO-Maus-Inseln anzutreffen. Die Inseln sind vermehrt und so ausge dehnt, dass sie als „*giant islets*“ bezeichnet worden sind (BIELSCHOWSKY und BIELSCHOWSKY, 1953; CROFFORD und DAVIS, 1965). Die Übersichtsansichten von Pankreasschnitten älterer NZO-Mäuse imponieren durch Konglomerate von Inseln um Ganganteile oder durch mäanderförmige Rieseninseln. Neben diesen, auch als „Polynesie“ und „Makronesie“ bezeichneten Formen der Inselhyperplasie und -hypertrophie, finden sich kleine Inseln mit auffällig intakter Immunmarkierung (s. u.).

Die Immunmarkierungen von Insulin zeigen, dass die Inselgrößenzunahme durch die β -Zellen bedingt ist, was für eine Replikation sprechen würde, bei der aus einer β -Zelle durch mitotische Zellteilung zwei Tochterzellen entstehen. Derartige Vorgänge sind mehrfach in der Literatur beschrieben worden (COSSEL, 1989; BONNER-WEIR, 1994), obwohl, bedingt durch den hohen Differenzierungsgrad zur endokrin aktiven β -Zelle, der Mechanismus schwer vorstellbar bleibt. Als ein Indiz werden beispielsweise Mitosefiguren innerhalb der Inseln angesehen, welche in den untersuchten Schnitten oft zu beobachten waren. Die β -Zell-Zentren wachsen im Laufe der Entwicklung derart stark an, dass sie in der Peripherie den α -Zell-Ring sprengen und auch die anderen „Nicht- β -Zellen“ aus ihren Positionen gedrängt werden. Die Veränderungen waren teilweise schon in der jüngsten Altersgruppe erkennbar. Bei älteren NZO-Mäusen sind die α -Zellen innerhalb der Inseln ungeordnet oder durchziehen die Inseln radspeichenartig. Die absolute Anzahl der Glukagon-markierten α -Zellen war gleich bleibend (ca. 50 pro Inselquerschnitt), damit veränderte sich in größeren Inseln das Verhältnis von „Nicht- β -Zellen“ zu Gunsten der β -Zellen. Weniger Relevanz hat vermutlich die abnehmende Markierung von Somatostatin bei älteren NZO-Mäusen. Diese Befunde sprechen für eine β -Zell-spezifische Anpassungsreaktion.

Die Pankreata der seneszenten NZO-Tiere wiesen ein diabetestypisches Bild auf: Verfettung des gesamten Organs, teilweise fettige Degenerationsherde innerhalb der Drüsenläppchen, bindegewebige Umbauprozesse (Fibrose) und ein dilatiertes Inselkapillarsystem sind Indizien pathomorphologischer Prozesse. Eine Hyalinose (perisinusidale Ablagerungen hyaliner Substanzen) konnte mit den durchgeführten Färbemethoden nicht beurteilt werden. Innerhalb der Drüsenläppchen finden sich bei den Pankreata der seneszenten NZO-Mäuse oft umschriebene Lymphozytenaggregationen, welche möglicherweise Endstadien von Insel-Untergängen darstellen könnten.

Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Betrachtungen lassen sich die Aussagen zum Zustand der Inselapparate und besonders der β -Zellen spezifizieren. Die verstärkte Synthese von Insulin wird durch die sehr gut entwickelten Zellorganellen gewährleistet. Morphologischer Ausdruck einer hochgradig gesteigerten Insulinsynthese sind bei älteren NZO-Mäusen ein dichtes, lamelläres rER und die dilatierten Zisternen des GOLGI-Apparates. Die stark geschwollenen Mitochondrien sowie die ausgeprägte Vakuolisierung sind wahrscheinlich Folge einer β -Zell-Erschöpfung. Die intakten Zellkerne deuten eher auf ein nekrotisches als auf apoptotisches Zellsterben hin.

Mikroskopisch fassbare Veränderungen des Inselaufbaues könnten Ursache verheerender Funktionsstörungen sein, beispielsweise durch hormonelle Fehlbeeinflussung der einzelnen Inselzellspezies untereinander oder durch Änderungen der kapillären Zirkulation (vgl. Kapitel 1.2).

In den Perifusionsexperimenten konnten Insulinsekretionsstörungen an separierten Inseln des NZO-Stammes festgestellt werden, welche bereits bei neonaten Tieren vorhanden sind. Auf den Glukosestimulus [25 mmol/l] reagieren die β -Zellen der NZO-Mäuse mit einer verzögerten, allenfalls angedeuteten biphasischen und insgesamt reduzierten Insulinliberation. Unter Umgehung des Glukosetransportes in die β -Zelle und der folgenden glykolytischen ATP-Produktion, kann mit der geladenen Aminosäure Arginin (ebenfalls 25 mmol/l) die Insulinfreisetzung drastisch gesteigert werden. Die 75-minütige Arginin-stimulierte Insulinsekretion ist zunächst überschießend, um dann über die gesamte Dauer abzufallen. Das Absinken der Insulinfreisetzung könnte einer Schwäche der Syntheseleistung sein. Die zum Ende des Experimentes mit HCl durchgeführte hypotone Rupturierung der Zellmembranen zeigte jedoch, dass nach Abschluss des Experimentes noch erhebliche Insulinreserven in den β -Zellen vorhanden sind.

Beide Mausstämme zeigen ein reduziertes Antwortverhalten auf die Stimuli in Kombination mit dem Indolamin Melatonin. Der hemmende Einfluss auf die Insulinfreisetzung konnte bereits an Ratteninseln sowie an der Ratten Insulinoma-Zelllinie INS-1 nachgewiesen werden (PESCHKE et al., 1997, 2000, 2002). Melatonin wirkt mutmaßlich über Bindung an den G_i -Protein gekoppelten MT_1 -Rezeptor hemmend auf die AC und senkt so den cAMP-Gehalt. Die inhibierende Wirkung von Melatonin wird besonders bei den Inseln von NZO-Mäusen deutlich. Auf den Glukosereiz [25 mmol/l] erfolgt unter Melatoningabe eine unbedeutende, kaum über die Basislinie hinausgehende Insulinsekretion. Drastischer reagieren die Inseln unter Arginin [25 mmol/l]: noch während der Dauerstimulation fällt die Sekretion wieder auf das Basisniveau zurück. Der Insulin-suppressive Effekt von Melatonin konnte infolgedessen für beide Mausstämme nachgewiesen werden.

Auf den AC-Aktivator Forskolin reagieren die NZO- β -Zellen mit und ohne Melatonin weitgehend regelrecht. Die Perifusionsbefunde, ausgenommen die Stimulationen mit Melatonin, stellen in hohem Maße eine Bestätigung der bisherigen Ergebnisse aus *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen dar. So konnte bei NZO-Mäusen mit intravenösen Injektionen oder mit *batch*-Inkubationen eine reduzierte Insulinresponsivität auf Glukose, Tolbutamid, Glukagon und eine verstärkte Insulinantwort auf Arginin bereits gezeigt werden (GATES et al., 1972; LARKINS und MARTIN, 1972;

LARKINS, 1973b; CAMERON et al., 1974; LARKINS et al., 1980). Die verringerte Glukosetoleranz soll dabei mit zunehmendem Alter und mit voranschreitender Obesitas korrelieren (CROFFORD und DAVIS, 1965; HERBERG et al., 1970b; UPTON, 1984). Defekte an den NZO-Inseln selbst konnten indirekt erstmals durch allogene und xenogene Inseltransplantation von metabolisch gesunden Mäusen oder von Wistar-Ratten nachgewiesen werden. Nach den Transplantationen konnten Verminderung des Blutzuckerspiegels, Normalisierung der Glukosetoleranz sowie eine Senkung der Insulinspiegel und verringerte Körpergewichte registriert werden (GATES et al., 1972; BAXTER und LAZARUS, 1975; BARKER et al., 1977).

Die Tatsache, dass besonders die erste Phase der Insulinsekretion bei Diabetes beeinträchtigt ist, ließ einige Autoren einen Defekt bei der Übermittlung des „Signals“ der erhöhten extrazellulären Glukosekonzentration in die β -Zelle vermuten (VERONI et al., 1991). Verschiedene Störungen des Signalvermittlers (Glukose-Sensor-Komplexes) betreffen den Glukosetransporter 2 und/oder das erste Enzym der Glykolyse, die Glukokinase (THORENS et al., 1988; JOHNSON et al., 1990; ORCI et al., 1990; UNGER, 1991). ANDRIKOPOULOS et al. konnten 1993 durch umfassende Studien an der Leber von NZO-Mäusen eine Erhöhung der Enzymaktivitäten von Glukokinase und anderen Glykolyseenzymen nachweisen. Sollte die Aktivität der Glukokinase der β -Zelle in Analogie zur Leberzelle ebenfalls erhöht sein, würde sie als ursächlicher Faktor einer gestörten Glukosetoleranz nicht in Frage kommen. Bei anderen Tiermodellen ist der Verlust des GLUT2 in Verbindung mit der Manifestation eines Typ2-Diabetes intensiv untersucht worden. So konnten beispielsweise JOHNSON et al. (1990) bei der ZDF-Ratte (*Zucker diabetic fatty rat*), THORENS et al. (1992) bei der db/db-Maus und JÖRNS et al. beim Chinesischen Hamster (1996) und bei der Sandratte (*Psammomys obesus*) (2002) eine Verminderung von GLUT2 nachweisen. Bemerkenswert ist, dass die beschriebenen Störungen ausschließlich an der pankreatischen β -Zelle auftreten und nicht an anderen GLUT2-aufweisenden Geweben, wie Niere, Dünndarm oder Leber (THORENS et al., 1993). GUILLAM et al. konnten im Jahre 2000 an β -Zellen der GLUT2-null-Maus, einem *knock out*-Modell des GLUT2-Transporters, zeigen, dass die erste Phase, jedoch nicht die zweite Phase der Insulinsekretion, gestört ist. Die Bedeutung des GLUT2-Transporters für eine regelgerechte Insulinsekretion auf Glukose wurde durch diese Studien eindrucksvoll belegt.

Durch die beschriebenen Untersuchungen zur Physiologie der β -Zellen von NZO-Mäusen sowie durch eigene Perifusionsergebnisse ist ein gestörtes Antwortverhalten auf

einen Glukosestimulus, also eine erhöhte Glukosetoleranz, eindeutig belegbar. Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Arbeit sollte nun eine Identifizierung der vermuteten GLUT2-Schädigung bei der NZO-Maus sein. Dazu wurde das Expressionsniveau der GLUT2-mRNS in verschiedenen Altersstufen bestimmt und der GLUT2-Transporter mittels Immunhistochemie dargestellt.

Die Immunmarkierungen verdeutlichten eine Verminderung und Fehlverteilung des GLUT2-Transporters bei NZO-Mäusen mit Zunahme der metabolischen Störungen im Laufe der Ontogenese. Dabei nimmt die typische membranständige Markierung des GLUT2 ab und das Reaktionsprodukt ist stattdessen eher im Zellinneren zu finden. Markierungen mit Immuno-Gold scheiterten an der Spezifität des verwendeten Antikörpers, sodass der GLUT2 innerhalb des Zytosols bzw. Zellorganellen nicht näher lokalisiert werden kann.

Wenngleich die juvenilen NZO-Inseln bereits die beschriebenen Störungen aufweisen, so ist bei den Inseln seneszenter NZO-Mäuse die Markierung insgesamt deutlich reduziert oder nicht mehr vorhanden, sodass von einem verstärkten Verlust des GLUT2 mit steigendem Alter ausgegangen werden kann. Auffällig ist auch hier, dass kleinere Inseln durchaus eine regelrechte Markierung aufweisen. Diese kleineren Inseln sind nicht im Sinne einer Atrophie oder „Pseudoatrophie“ zu interpretieren, sondern stellen vielmehr neugebildete völlig intakte Inseln dar, welche sich in Analogie zur Neonatalzeit durch Differenzierung von *periductulären* Zellen zu Inselzellen entwickeln können. Diese Art der Inselneubildung wird als Nesidioblastose bezeichnet (COSSEL, 1989).

Nach den Untersuchungen von THORENS et al. aus dem Jahre 1993 an isolierten Ratteninseln und dem Insulinoma-Zellstamm INS-1 findet keine Speicherung von GLUT2 vor dem Einbau in die Membran und kein *Recycling* von bereits an der Zellmembran vorhandenen GLUT2-Transportern statt. Als wesentlichster Unterschied zum GLUT4 der Adipozyten und Myozyten werden vielmehr die ständig neugebildeten GLUT2-Moleküle auf direktem Wege aus dem *trans*-GOLGI-Netzwerk zur Zellmembran transportiert (THORENS et al., 1993). Aus dieser Kenntnis heraus muss die stärkere Markierung des GLUT2 im Zellinneren statt auf der Zelloberfläche als „echter“ β -Zell-Schaden angesehen werden. Ob dieser Defekt bei NZO-Mäusen pathogenetischer oder pathophysiologischer Natur ist, bleibt unklar. ORCI et al. (1990) bewiesen mit Experimenten an ZDF-Rattenpankreatata, dass sich die beschriebenen Defekte weder induzieren noch durch Diabetesprävention verhindern lassen.

Bei Syndromen, wie dem Diabetes, findet stets eine Zuordnung der beobachteten Defekte in Ursache und Wirkung statt. Der Zeitpunkt, wann ein Merkmal auftritt spielt da-

bei eine entscheidende Rolle. Die bereits bei jungen NZO-Mäusen zu beobachtende Fehlverteilung an immunreaktivem GLUT2 und der Verlust der 1. Phase der Insulinsekretion bei Inseln neonater Mäuse weist somit eher auf einen ursächlichen Defekt bei der Entstehung des Diabetes hin.

Messungen der GLUT2-mRNS-Expressionshöhe stellen Ansätze zur Klärung der morphologisch beobachteten Verminderung des GLUT2 im Altersvergleich dar. Für beide Stämme wurden dazu die Gesamtpankreata von Mäusen aus drei Altersstufen aufgearbeitet. Wie der Abbildung 24 entnommen werden kann, nimmt die GLUT2-mRNS-Expression bei beiden Mausstämmen im Alter ab. Während aber bei den NMRI die Abnahme zwischen den einzelnen Altersstufen nicht signifikant ist, reduziert sich die Expression der GLUT2-mRNS bei den NZO-Mäusen zwischen der 2. und 4. Altersgruppe signifikant. Die Verringerung des GLUT2-mRNS-Niveaus lässt auf einen translationalen oder posttranslationalen Defekt schließen. Bemühungen, das Translationsprodukt des GLUT2-Genes über *Western-blot*-Technik darzustellen und zu quantifizieren, scheiterten am Bindungsverhalten des verwendeten Antikörpers. Zur weiteren Abklärung könnten Screening-Untersuchungen nach Mutationen (Sequenzierungen) des GLUT2-Transportergenes dienen. Derartige Mutationen des GLUT2-Genes als Ursache eines gestörten Glukosemetabolismus konnten beim Menschen bereits identifiziert werden (KLEPPER et al., 2000). Eine andere Möglichkeit der frühen Beeinträchtigung der Glukosehomöostase könnte in der mütterlichen Hyperglykämie liegen. Zur Abklärung wären beispielsweise Versuche mit Embryonentransfer denkbar, bei denen NZO-Embryonen in metabolisch gesunde Muttertiere implantiert werden könnten.

Da in der Arbeitsgruppe Peschke der Einfluss von Melatonin auf die Insulinsekretion und die Bedeutung für die Diabetogenese im Vordergrund steht, wurden Melatoninnachweise angestrebt. Versuche, mittels konfektionierter RIA-Kits Melatonin im Blutplasma von NZO- und NMRI-Mäusen nachzuweisen, scheiterten vermutlich an unerwünschten Antikörperkreuzreaktionen. Damit blieb die endogene Melatoninproduktion bei diesen Mausstämmen lange ungeklärt. In Epiphysenextrakten von Nachttieren beider Stämme gelang jedoch HPLC-technisch der Nachweis einer Melatoninsynthese. Durch die zu geringe Sensitivität des Untersuchungsverfahrens musste die Nachweisgrenze mit Hilfe eines Derivatisierungsschrittes von ca. 1.000 auf 100 pmol/l verringert werden. Tag-Werte waren jedoch nicht bestimmbar. Mit RIA-Systemen sind bei verschiedenen in Inzucht vermehrten Mausstämmen keine Melatoninagesprofile bestimm-

bar gewesen, was zur Annahme eines völligen Fehlens einer endogenen Melatoninproduktion geführt hat (KENNAWAY et al., 2002). Durch methodisch-andere biochemische Nachweisverfahren muss die Existenz einer möglichen Melatoninsynthese bei einzelnen Mausstämmen erneut untersucht und diskutiert werden (CONTI und MAESTRONI, 1996).

Bei der Halleschen Kolonie des NZO-Mausstammes konnten eine Vielzahl von Störungen der β -Zelle identifiziert werden. Die frühzeitige Glukoseintoleranz geht mit hoher Wahrscheinlichkeit mit frühzeitigen Veränderungen des GLUT2-Transporters einher. Eine verminderte mRNS-Expression und verringerte membranständige Markierung sowie der spätere (Total-)Verlust sind hiermit erstmals für den NZO-Stamm beschrieben worden. Tagesrhythmen von Glukose und Insulin und der Nachweis erhöhter Melatoninwerte in der Nacht sind ebenfalls zum ersten Mal untersucht worden.

6 Zusammenfassung

Die 1948 von MARIANNE und FRANZ BIELSCHOWSKY auf Neuseeland begonnene Zucht des NZO-Stammes legte den Grundstein zur Erforschung eines obesen Mausmodells. Neben der erheblichen Fettsucht gehört zur weiteren Charakteristik der New Zealand obese-Mäuse die Symptomatik eines sich entwickelnden Typ2-Diabetes. Infolge der deutlichen Zunahme des humanen Erwachsenendiabetes in den industrialisierten Staaten wuchs das Interesse an obesen und diabetischen Tiermodellen in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts. Weltweit sind Kolonien des ursprünglichen NZO-Stammes verteilt. Durch Spontanmutationen und/oder möglicher Zuchtunregelmäßigkeiten können sich die einzelnen Kolonien in bestimmten Merkmalen voneinander unterscheiden. Eine Standarduntersuchung ist deshalb bei Übernahme einer Zucht unerlässlich.

Der 1999 aus dem Diabetesforschungsinstitut in Düsseldorf übernommene NZO-Stamm von Frau Prof. Herberg ist im Hinblick auf weiterführende Untersuchungen zum Einfluss von Indolaminen (insbesondere des Melatonins) auf einen diabetischen Organismus untersucht worden. Mit Konzentration auf die LANGERHANSsche Insel und ihre Funktion dienten morphologische, physiologische und molekularbiologische Techniken zur Klärung offener Fragen. Die Versuche sind unter Berücksichtigung tageszeitlicher Schwankungen und der Progredienz der Diabetessymptomatik im Alter durchgeführt worden. Dabei wurde dem NZO-Mausstamm stets ein metabolisch unauffälliger Kontrollstamm gegenübergestellt, die NMRI-Maus. Die diabetesspezifischen Merkmale wurden aber auch mit den angegebenen Daten aus der sehr umfangreichen Literatur verglichen und diskutiert.

Die Untersuchungen zeigten, dass der Hallesche NZO-Mausstamm in allen wichtigen nicht-metabolischen und metabolischen Merkmalen mit dem ursprünglich beschriebenen NZO-Mausstamm übereinstimmt. So sind besonders Merkmale wie Ausprägungsgrad der Fettsucht, Fettverteilung und Gewichtsentwicklung als Hauptkennzeichen des NZO-Stammes sehr konstant. Durch die Bruder-/Schwesterverpaarung fixiert, konnten nun auch die Eigenschaften bezüglich des Zuckerstoffwechsels und der Veränderungen an der LANGERHANSschen β -Zelle bestätigt werden. Mit den heute zur Verfügung stehenden Methoden und Techniken, wie Immunfluoreszenz, Perfusion und Molekularbiologie war eine Erweiterung der bisherigen Aussagen möglich.

Während beim NZO-Stamm bislang überwiegend der grundsätzlicher Aufbau LANGERHANSscher Inseln beschrieben wurde, sind in der vorliegenden Arbeit die Stoffwechsel-

störungen und pathomorphologische Veränderungen der Inseln systematischen Untersuchungen unterzogen worden.

Die bereits bei juvenilen NZO-Mäusen vorhandene und mit zunehmendem Alter sich verstärkende Hyperinsulinämie ist ein Bemühen der β -Zell-Masse, die sich entwickelnde periphere Insulinresistenz durch Insulinsynthesesteigerung zu kompensieren. Die zur Hypertrophie und Hyperplasie fähigen β -Zellen sezernieren exzessiv Insulin zur Verhinderung einer Hyperglykämie, welche in einem *circulus vitiosus* die β -Zell-Funktion (im Sinne einer Überforderung) wiederum negativ beeinflusst. Aufgrund von bislang unklaren Effekten wird nach der „Glukose-Toxizitätstheorie“ durch eine Hyperglykämie das Glukose-*Sensing* der β -Zelle gestört. Andererseits besteht bei NZO-Mäusen keine verstärkte Hyperglykämie, sodass die frühesten Störungen hinsichtlich der β -Zelle eher als ursächlich angesehen werden müssen. Die Insulinfreisetzung auf einen Glukosereiz ist deutlich beeinträchtigt. In den Perifusionsuntersuchungen zeigten die isolierten Inseln (β -Zellen) von NZO-Mäusen eine verzögerte, reduzierte und nicht-biphasische Insulinsekretion auf den Glukosereiz, während nach Gabe der Aminosäure Arginin die Insulinliberation ungestört hoch war. Ein teilweiser Verlust des zum Glukose-Sensor-Komplex gehörenden Glukosetransporters 2 führt zu einem verminderten Glukosemetabolismus innerhalb der β -Zelle und damit zur reduzierten Reaktion auf die erhöhte extrazelluläre Glukosekonzentration. In den immunhistochemischen Untersuchungen kann tatsächlich eine Verminderung des GLUT2 nachgewiesen werden. Bereits bei 1 bis 2 Monate alten NZO-Mäusen ist eine beginnende pathologische Fehllokalisierung im Zellinneren, anstatt am Funktionsort der Zelloberfläche, zu beobachten. Der GLUT2 ist bei einjährigen NZO-Mäusen fast nicht mehr nachweisbar. Molekularbiologisch kann eine drastische Verringerung der GLUT2-mRNS-Expression mit zunehmendem Alter festgestellt werden. Im Gegensatz zu anderen diabetischen Tiermodellen waren diese Befunde am NZO-Mausstamm bislang nicht beschrieben worden.

Insgesamt ergaben die Untersuchungen zur Tagesrhythmik keine wesentlichen Unterschiede in den Blutzucker- oder Insulinspiegeln oder der morphologischen Charakteristik. Die Perifusionsexperimente konnten einen die Insulinsekretion hemmenden Effekt des Indolamins Melatonin sowohl bei NZO- als auch bei NMRI-Mäusen zeigen. Erste Melatonin-Bestimmungen mittels HPLC-Technik ermöglichten den Nachweis bei beiden Mausstämmen zur Nachtzeit. Auf Grund der niedrigen Tagwerte und zu geringer Sensitivität konnten mittels HPLC keine Tagesprofile ermittelt werden. Die vorliegende Arbeit liefert dennoch die Grundlage für weitere chronoendokrinologische Untersuchungen an diabetischen Tiermodellen.

7 Literaturverzeichnis

1. ALLEN TA: The endocrine pancreas. In: DRAZNER FH (ed.): Small Animal Endocrinology. Churchill Livingstone, New York, Edinburgh, London, Melbourne, Tokyo, 1987, pp. 161-199
2. ANDRIKOPOULOS S, ROSELLA G, GASKIN E, THORBURN A, KACZMARCZYK S, ZAJAC JD, PROIETTO J: Impaired regulation of hepatic fructose-1,6-bisphosphatase in the New Zealand obese mouse model of NIDDM. *Diabetes* **42** (1993) 1731-1736
3. ANDRIKOPOULOS S, PROIETTO J: The biochemical basis of increased hepatic glucose production in a mouse model of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* **38** (1995) 1389-1396
4. ANDRIKOPOULOS S, ROSELLA G, KACZMARCZYK SJ, ZAJAC JD, PROIETTO J: Impaired regulation of hepatic fructose-1,6-bisphosphatase in the New Zealand obese mouse: an acquired defect. *Metabolism* **45** (1996) 622-626
5. BARKER CF, FRANGIPANE LG, SILVERS WK: Islet transplantation in genetically determined diabetes. *Ann Surg* **186** (1977) 401-410
6. BAUM J, SIMONS BE, JR., UNGER RH, MADISON LL: Localization of glucagon in the alpha cells in the pancreatic islet by immunofluorescent technics. *Diabetes* **11** (1962) 371-374
7. BAXTER D, LAZARUS NR: The control of insulin receptors in the New Zealand obese mouse. *Diabetologia* **11** (1975) 261-267
8. BENCOSME SA, LIEPA E: Regional differences of the pancreatic islet. *Endocrinology* **57** (1955) 588-593
9. BENSLEY RR: Studies on the pancreas of the guinea pig. *Am J Anat* **12** (1911/1912) 389-400
10. BERGER M: Definition und Klassifikation des Diabetes mellitus. In: BERGER M (Ed.): Diabetes mellitus. Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 1995, S. 12-14
11. BERNARD C: Du soc pancréatique et de son rôle dans les phénomènes de la digestion. *Mem Soc Biol* **1** (1849) 99-115
12. BIELSCHOWSKY F, BIELSCHOWSKY M: The New Zealand strain of obese mice; their response to stilboestrol and to insulin. *Aust J Exp Biol Med Sci* **34** (1956) 181-198

13. BIELSCHOWSKY M, BIELSCHOWSKY F: A new strain of mice with hereditary obesity. *Proc Univ Otago Med School* **31** (1953) 29-31
14. BIELSCHOWSKY M, GOODALL CM: Origin of inbred NZ mouse strains. *Cancer Res* **30** (1970) 834-836
15. BLUNDELL TL, CUTFIELD JF, DODSON GG, DODSON E, HODGKIN DC, MERCOLA D: The structure and biology of insulin. *Biochem J* **125** (1971) 50-51
16. BONNER-WEIR S, ORCI L: New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat. *Diabetes* **31** (1982) 883-889
17. BONNER-WEIR S: Anatomy of the islet of Langerhans. In: SAMOLS E (ed.): *The Endocrine Pancreas*. Raven Press, New York, 1991, pp. 15-27
18. BONNER-WEIR S: Regulation of pancreatic beta-cell mass in vivo. *Recent Prog Horm Res* **49** (1994) 91-104
19. BRAZEAU P, VALE W, BURGUS R, LING N, BUTCHER M, RIVIER J, GUILLEMIN R: Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* **179** (1973) 77-79
20. BROLIN SE, BORGLUND E, OHLSSON A: On the enzymatic activity of the pancreatic islets and acini in the New Zealand obese mice. *Metabolism* (1964) 289-294
21. BRUNNER P, WARICH-EITEL S: Das ductale Pankreasepithel und seine Texturstörungen: Vergleichende morphologische Analyse an Fischen, Amphibien, Vögeln und Säugern. In: DOERR W und LEONHARDT H (Ed.): *Normale und Pathologische Anatomie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1994, S. 1-214
22. CAMERON DP, OPAT F, INSCH S: Studies of immunoreactive insulin secretion in NZO mice in vivo. *Diabetologia* **10** (1974) 649-654
23. CHOMCZYNSKI P, SACCHI N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162** (1987) 156-159
24. COLEMAN DL: Other potentially useful rodents as models for the study of human diabetes mellitus. *Diabetes* **31** (1982) 24-25
25. CONTI A, MAESTRONI GJ: HPLC validation of a circadian melatonin rhythm in the pineal gland of inbred mice. *J Pineal Res* **20** (1996) 138-144
26. COOK DL, TABORSKY GL, JR.: B-cell function and insulin secretion. In: RIFKIN H and PORTE D, JR. (Eds.): *Ellenberg and Rifkin's diabetes mellitus: theory and practice*. 4. Ed. Elsevier, New York, Amsterdam, London, 1990, pp. 89-103

27. COSSEL L: Morphologie und Pathomorphologie des Inselorgans. In: BIBERGEIL H (Ed.): Diabetes mellitus. G. Fischer Verlag, Jena, 1989, S. 61-107
28. CREUTZFELDT W, MENDE D, WILLMS B, SOLING HD: Vascular basement membrane thickness in muscle of spiny mice and activities of glycolysis and gluconeogenesis in the liver of animals with spontaneous and experimental diabetes and of untreated human diabetics. *Diabetologia* **6** (1970) 356-360
29. CROFFORD OB, DAVIS CK, JR.: Growth characteristics, glucose tolerance and insulin sensitivity of New Zealand obese mice. *Metabolism* **14** (1965) 271-280
30. CSERNUS VJ, SCHALLY AV: The dispersed cell superfusion system. In: GREENSTEIN BD (ed.): *Neuroendocrine Research Methods*. Harwood Acad Publ, London, 1991, pp. 71-109
31. CSERNUS VJ, HAMMER T, PESCHKE D, PESCHKE E: Dynamic insulin secretion from perfused rat pancreatic islets. *Cell Mol Life Sci* **54** (1998) 733-743
32. DE MEYER J: Action de la sécrétion interne du pancréas sur différents organes et en particulier sur la sécrétion rénale. *Arch Fisiol Firenze* **7** (1909) 96-99
33. DE VOS A, HEIMBERG H, QUARTIER E, HUYPENS P, BOUWENS L, PIPELEERS DG, SCHUIT F: Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *J Clin Invest* **96** (1995) 2489-2495
34. DEAN PM, MATTHEWS EK: Electrical activity in pancreatic islet cells. *Nature* **219** (1968) 389-390
35. DITTRICH HM, HAHN VON DORSCH H: Die anatomisch-histologische Erforschung des Pankreas vom Beginn des 19. Jahrhunderts bis zur Entdeckung des Insulins durch Banting und Best (1921) unter Berücksichtigung physiologischer Aspekte. 4. Die Pankreasforschung nach der Entdeckung des Pankreas-Diabetes (1889) bis zur Entdeckung des Insulins. *Anat Anz* **144** (1978) 260-272
36. DUBOIS MP: Immunoreactive somatostatin is present in discrete cells of the endocrine pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72** (1975) 1340-1343
37. EFENDIC S, LINS PE, LUFT R, UVNÄS-WALLENSTEN K, SZECÒWKA J: Somatostatin paracrine or endocrine substance? *Front Horm Res* **7** (1980) 41-51
38. ELAYAT AA, EL-NAGGAR MM, TAHIR M: An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets. *J Anat* **186** (1995) 629-637
39. FERRERAS L, KELADA AS, MCCOY M, PROIETTO J: Early decrease in GLUT4 protein levels in brown adipose tissue of New Zealand obese mice. *Int J Obes Relat Metab Disord* **18** (1994) 760-765

40. FERRIS SD, RITTE U, LINDAHL KF, PRAGER EM, WILSON AC: Unusual type of mitochondrial DNA in mice lacking a maternally transmitted antigen. *Nucleic Acids Res* **11** (1983) 2917-2926
41. FINEGOOD DT, SCAGLIA L, BONNER-WEIR S: Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. *Diabetes* **44** (1995) 249-256
42. FUJITA T: Morphology of islet blood supply. In: LARNER J and POHL SL (Eds.): *Methods in diabetes research*. John Wiley and Sons, New York, 1985, pp. 325-332
43. GATES RJ, HUNT MI, SMITH R, LAZARUS NR: Return to normal of blood-glucose, plasma-insulin, and weight gain in New Zealand obese mice after implantation of islets of Langerhans. *Lancet* **2** (1972) 567-570
44. GEPTS W, CHRISTOPHE J, MAYER J: Pancreatic islets in mice with the obese-hyperglycemic syndrome: lack of effect of carbutamide. *Diabetes* **9** (1960) 63-69
45. GILON P, HENQUIN JC: Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. *Endocr Rev* **22** (2001) 565-604
46. GRODSKY GM: A new phase of insulin secretion. How will it contribute to our understanding of beta-cell function? *Diabetes* **38** (1989) 673-678
47. GUILLAM MT, DUPRAZ P, THORENS B: Glucose uptake, utilization, and signaling in GLUT2-null islets. *Diabetes* **49** (2000) 1485-1491
48. HAHN HJ: Die isolierte Langerhanssche Insel, ein Modell zur Untersuchung der Insulinsekretion in vitro. *Endokrinologie* **71** (1978) 308-324
49. HAHN VON DORSCH H, SCHAFFER H, TITLBACH M: Histophysiology of the obesity-diabetes syndrome in sand rats. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **130** (1994) 1-95
50. HALAAS JL, BOOZER C, BLAIR-WEST J, FIDAHUSEIN N, DENTON DA, FRIEDMAN JM: Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** (1997) 8878-8883
51. HAMASE K, TOMITA T, KIYOMIZU A, ZAITSU K: Determination of pineal melatonin by precolumn derivatization reversed-phase high-performance liquid chromatography and its application to the study of circadian rhythm in rats and mice. *Anal Biochem* **279** (2000) 106-110

52. HAMMER T: Langerhanssche Inseln neonater Wistar-Ratten im Perfusionsystem – funktionelle Charakterisierung und Indolaminbeeinflussung der B-Zelle. Med. Dissertation, MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT Halle-Wittenberg (1998)
53. HARRISON LC, ITIN A: A possible mechanism for insulin resistance and hyperglycaemia in NZO mice. *Nature* **279** (1979) 334-336
54. HEIMBERG H, DE VOS A, VANDERCAMMEN A, VAN SCHAFTINGEN E, PIPELEERS DG, SCHUIT F: Heterogeneity in glucose sensitivity among pancreatic beta-cells is correlated to differences in glucose phosphorylation rather than glucose transport. *Embo J* **12** (1993) 2873-2879
55. HELMSTAEDTER V, FEURLE GE, FORSSMANN WG: Insulin-, glucagon-, and somatostatin-immunoreactive endocrine cells in the equine pancreas. *Cell Tissue Res* **172** (1976) 447-454
56. HERBERG L, GRIES FA, HESSE-WORTMANN C: Effect of weight and cell size on hormone-induced lipolysis in New Zealand obese mice and American obese hyperglycemic mice. *Diabetologia* **6** (1970a) 300-305
57. HERBERG L, MAJOR E, HENNIGS U, GRÜNEKLEE D, FREYTAG G, GRIES FA: Differences in the development of the obese-hyperglycemic syndrome in obob and NZO mice. *Diabetologia* **6** (1970b) 292-299
58. HERBERG L, BERGER M, GRIES FA: Comparative investigation on lipolysis and re-esterification in adipose tissue of man and various species of mice. *Comp Biochem Physiol* **48A** (1974) 163-173
59. HERBERG L, BERGER M, BUCHANAN KD, GRIES FA, KERN H: Tiermodelle in der Diabetesforschung: metabolische und hormonelle Besonderheiten. *Z Versuchstierkd* **18** (1976) 91-105
60. HERBERG L, COLEMAN DL: Laboratory animals exhibiting obesity and diabetes syndromes. *Metabolism* **26** (1977) 59-99
61. HUCHZERMAYER H, RUDORFF KH, STAIB W: Tierexperimentelle Untersuchungen zum Problem der Insulinresistenz bei Adipositas und Diabetes mellitus. Pathogenese des fettsüchtigen-hyperglycämischen Syndroms. *Z Klin Chem Klin Biochem* **11** (1973) 249-256
62. HUCHZERMAYER H, STAIB W: Investigations on carbohydrate and fat metabolism of the New Zealand obese mice under the influence of various diets. *Environ Physiol Biochem* **3** (1973) 41-52
63. HUNT CE, LINDSEY JR, WALKLEY SU: Animal models of diabetes and obesity, including the PBB/Ld mouse. *Fed Proc* **35** (1976) 1206-1217

64. IGEL M, BECKER W, HERBERG L, JOOST HG: Hyperleptinemia, leptin resistance, and polymorphic leptin receptor in the New Zealand obese mouse. *Endocrinology* **138** (1997a) 4234-4239
65. IGEL M, BECKER W, HERBERG L, JOOST HG: Leptin and leptin receptor abnormalities in mouse strains with polygenic obesity. In: BLUM WH, KIESS W and RASCHER W (Eds.): *Leptin - The Voice of Adipose Tissue*. J. A. Barth Verlag, 1997b, pp. 43-49
66. IINUMA F, HAMASE K, MATSUBAYASHI S, TAKAHASHI M, WATANABE M, ZAITSU K: Sensitive determination of melatonin by precolumn derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* **835** (1999) 67-72
67. JANKA HU, MICHAELIS D: Epidemiologie des Diabetes mellitus: Häufigkeit, Pathogenese, Prognose. *Z Ärztl Fortbild Qualitätssich* **96** (2002) 159-165
68. JOHNSON JH, OGAWA A, CHEN L, ORCI L, NEWGARD CB, ALAM T, UNGER RH: Underexpression of beta cell high Km glucose transporters in noninsulin-dependent diabetes. *Science* **250** (1990) 546-549
69. JOHNSON PR, HIRSCH J: Cellularity of adipose depots in six strains of genetically obese mice. *J Lipid Res* **13** (1972) 2-11
70. JÖRNS A, TIEDGE M, SICKEL E, LENZEN S: Loss of GLUT2 glucose transporter expression in pancreatic beta cells from diabetic Chinese hamsters. *Virchows Arch* **428** (1996) 177-185
71. JÖRNS A, TIEDGE M, ZIV E, SHAFRIR E, LENZEN S: Gradual loss of pancreatic beta-cell insulin, glucokinase and GLUT2 glucose transporter immunoreactivities during the time course of nutritionally induced type-2 diabetes in *Psammomys obesus* (sand rat). *Virchows Arch* **440** (2002) 63-69
72. KENNAWAY DJ, VOULTSIOS A, VARCOE TJ, MOYER RW: Melatonin in mice: rhythms, response to light, adrenergic stimulation, and metabolism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **282** (2002) 358-365
73. KIEFFER TJ, HELLER RS, HABENER JF: Leptin receptors expressed on pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* **224** (1996) 522-527
74. KIESS W, BOTTNER A, RAILE K, KAPELLEN T, MULLER G, GALLER A, PASCHKE R, WABITSCH M: Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents: a review from a European perspective. *Horm Res* **59** Suppl 1 (2003) 77-84
75. KLEPPER J, SANTER R, BAETHMANN M, DE VIVO DC, VOIT T: Angeborene Störungen des Glukosetransports. *Monatsschr Kinderheilkd* **148** (2000) 2-11

76. KLUGE R, GIESEN K, BAHRENBERG G, PLUM L, ORTLEPP JR, JOOST HG: Quantitative trait loci for obesity and insulin resistance (Nob1, Nob2) and their interaction with the leptin receptor allele (LeprA720T/T1044I) in New Zealand obese mice. *Diabetologia* **43** (2000) 1565-1572
77. LACY PE, KOSTIANOVSKY M: Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* **16** (1967) 35-39
78. LANE WA: The cytological characters of the areas of Langerhans. *Am J Anat* **7** (1907) 409-412
79. LANGERHANS P: Beiträge zur mikroskopischen Anatomie der Bauchspeicheldrüse. Med. Dissertation, FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITÄT Berlin (1869)
80. LARKINS RG, MARTIN FI: Selective defect in insulin release in one form of spontaneous laboratory diabetes. *Nat New Biol* **235** (1972) 86-88
81. LARKINS RG: Defective insulin secretory response to glucose in the New Zealand obese mouse. Improvement with restricted diet. *Diabetes* **22** (1973a) 251-255
82. LARKINS RG: Defective insulin secretion in the N.Z.O. mouse: in vitro studies. *Endocrinology* **93** (1973b) 1052-1056
83. LARKINS RG, SIMEONOVA L, VERONI MC: Glucose utilization in relation to insulin secretion in NZO and C57Bl mouse islets. *Endocrinology* **107** (1980) 1634-1638
84. LEITER EH, HERBERG L: The polygenetics of diabetes in mice. *Diabetes Reviews* **5** (1997) 131-148
85. LEITER EH, REIFSNYDER PC, FLURKEY K, PARTKE HJ, JUNGER E, HERBERG L: NIDDM genes in mice: deleterious synergism by both parental genomes contributes to diabetogenic thresholds. *Diabetes* **47** (1998) 1287-1295
86. LOGOTHETOPOULOS J, DAVIDSON JK, HAIST RE, BEST CH: Degranulation of Beta Cells and Loss of Pancreatic Insulin after Infusions of Insulin Antibody or Glucose. *Diabetes* **14** (1965) 493-500
87. LOVELL-SMITH CJ: The Control of Lipolysis in Obese Mice. *Proc Univ Otago Med School* **49** (1971) 48-49
88. LOVELL-SMITH CJ, SNEYD JG: Lipolysis and adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in adipose tissue of the New Zealand obese mouse. *J Endocrinol* **56** (1973) 1-11

89. LUFT R, EFENDIC S, HOKFELT T, JOHANSSON O, ARIMURA A: Immunohistochemical evidence for the localization of somatostatin-like immunoreactivity in a cell population of the pancreatic islets. *Med Biol* **52** (1974) 428-430
90. MACAULAY SL, LARKINS RG: Impaired insulin action in adipocytes of New Zealand obese mice: a role for postbinding defects in pyruvate dehydrogenase and insulin mediator activity. *Metabolism* **37** (1988) 958-965
91. MATSCHINSKY FM: Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes* **39** (1990) 647-652
92. MATSCHINSKY FM: Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* **45** (1996) 223-241
93. MEADE CJ, ASHWELL M, SOWTER C: Is genetically transmitted obesity due to an adipose tissue defect? *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **205** (1979) 395-410
94. MEDA P, KOHEN E, KOHEN C, RABINOVITCH A, ORCI L: Direct communication of homologous and heterologous endocrine islet cells in culture. *J Cell Biol* **92** (1982) 221-226
95. MELEZ KA, ATTALLAH AM, HARRISON ET, RAVECHE ES: Immune abnormalities in the diabetic New Zealand obese (NZO) mouse: insulin treatment partially suppresses splenic hyperactivity measured by flow cytometric analysis. *Clin Immunol Immunopathol* **36** (1985) 110-119
96. MILLER RE: Pancreatic neuroendocrinology: peripheral neural mechanisms in the regulation of the Islets of Langerhans. *Endocr Rev* **2** (1981) 471-494
97. MORRISON TB, WEIS JJ, WITTEWIT CT: Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* **24** (1998) 954-962
98. MURAKAMI T, MIYAKE T, TSUBOUCHI M, TSUBOUCHI Y, OHTSUKA A, FUJITA T: Blood flow patterns in the rat pancreas: a simulative demonstration by injection replication and scanning electron microscopy. *Microsc Res Tech* **37** (1997) 497-508
99. ORCI L, MALAISSE-LAGAE F, RAVAZZOLA M, ROUILLER D, RENOLD AE, PERRELET A, UNGER R: A morphological basis for intercellular communication between alpha- and beta-cells in the endocrine pancreas. *J Clin Invest* **56** (1975) 1066-1070

100. ORCI L: The microanatomy of the islets of Langerhans. *Metabolism* **25** (1976) 1303-1313
101. ORCI L, VASSALLI JD, PERRELET A: The insulin factory. *Sci Am* **259** (1988) 85-94
102. ORCI L, THORENS B, RAVAZZOLA M, LODISH HF: Localization of the pancreatic beta cell glucose transporter to specific plasma membrane domains. *Science* **245** (1989) 295-297
103. ORCI L, RAVAZZOLA M, BAETENS D, INMAN L, AMHERDT M, PETERSON RG, NEWGARD CB, JOHNSON JH, UNGER RH: Evidence that down-regulation of beta-cell glucose transporters in non-insulin-dependent diabetes may be the cause of diabetic hyperglycemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87** (1990) 9953-9957
104. ORTLEPP JR, KLUGE R, GIESEN K, PLUM L, RADKE P, HANRATH P, JOOST HG: A metabolic syndrome of hypertension, hyperinsulinaemia and hypercholesterolaemia in the New Zealand obese mouse. *Eur J Clin Invest* **30** (2000) 195-202
105. PESCHKE E, PESCHKE D, HAMMER T, CSERNUS VJ: Influence of melatonin and serotonin on glucose-stimulated insulin release from perfused rat pancreatic islets in vitro. *J Pineal Res* **23** (1997) 156-163
106. PESCHKE E, FAUTECK JD, MUSSHOF U, SCHMIDT F, BECKMANN A, PESCHKE D: Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonate rats: functional, autoradiographic, and molecular investigations. *J Pineal Res* **28** (2000) 156-164
107. PESCHKE E, MÜHLBAUER E, MUSSHOF U, CSERNUS VJ, CHANKIEWITZ E, PESCHKE D: Receptor (MT1) mediated influence of melatonin on cAMP concentration and insulin secretion of rat insulinoma cells INS-1. *J Pineal Res* **33** (2002) 63-71
108. PFAFFL MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29** (2001) e45
109. PIPELEERS DG: Islet cell interactions with pancreatic B-cells. *Experientia* **40** (1984) 1114-1126
110. PIPELEERS DG, SCHUIT FC, IN'T VELD PA, MAES E, HOOGHE-PETERS EL, VAN DE WINKEL M, GEPTS W: Interplay of nutrients and hormones in the regulation of insulin release. *Endocrinology* **117** (1985a) 824-833
111. PIPELEERS DG, SCHUIT FC, VAN SCHRAVENDIJK CF, VAN DE WINKEL M: Interplay of nutrients and hormones in the regulation of glucagon release. *Endocrinology* **117** (1985b) 817-823

112. PRISANT LM: Preventing type II diabetes mellitus. *J Clin Pharmacol* **44** (2004) 406-413
113. PROIETTO J, LARKINS RG: A perspective on the New Zealand Obese mouse. In: SHAFRIR E (ed.): *Lessons From Animal Models of Diabetes*. Schmith-Gordon, London, 1993, pp. 65-73
114. RAVAZZOLA M, ORCI L: Glucagon and glicentin immunoreactivity are topologically segregated in the alpha granule of the human pancreatic A cell. *Nature* **284** (1980) 66-67
115. RENOLD AE: Spontaneous diabetes and/ or obesity in laboratory rodents. *Adv Metab Disord* **3** (1968) 49-84
116. RIZK NM, LIU LS, ECKEL J: Hypothalamic expression of neuropeptide-Y in the New Zealand obese mouse. *Int J Obes Relat Metab Disord* **22** (1998) 1172-1177
117. RORSMAN P, ASHCROFT FM, BERGGREN PO: Regulation of glucagon release from pancreatic A-cells. *Biochem Pharmacol* **41** (1991) 1783-1790
118. RUDORFF KH, HUCHZERMAYER H, WINDECK R, STAIB W: Über den Einfluß von Insulin auf die Alaninglucogenese in der isoliert perfundierten Leber von New Zealand Obese Mice. *Eur J Biochem* **16** (1970) 481-486
119. SAMOLS E, STAGNER JI: Intra-islet regulation. *Am J Med* **85** (1988) 31-35
120. SAMOLS E, STAGNER JI: Islet somatostatin--microvascular, paracrine, and pulsatile regulation. *Metabolism* **39** (1990) 55-60
121. SANGER F: Chemistry of insulin; determination of the structure of insulin opens the way to greater understanding of life processes. *Science* **129** (1959) 1340-1344
122. SCHAUDER P, MCINTOSH C, ARENDS J, ARNOLD R, FRERICHS H, CREUTZFELDT W: Somatostatin and insulin release from isolated rat pancreatic islets stimulated by glucose. *FEBS Lett* **68** (1976) 225-227
123. SHAFRIR E: Diabetes in Animals. In: RIFKIN H und PORTE D, JR. (Eds.): *Ellenberg and Rifkin's diabetes mellitus: theory and practice*. 4. Ed. Elsevier, New York, Amsterdam, London, 1990, pp. 299-340
124. SNEYD JG: Pancreatic and serum insulin in the New Zealand strain of obese mice. *J Endocrinol* **28** (1964) 163-172
125. SSOBOLEV L, W.: Zur normalen und pathologischen Morphologie der inneren Sekretion der Bauchspeicheldrüse. (Die Bedeutung der Langerhansschen Inseln). *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* **168** (1902) 91-128

126. STARKE AAR: Physiologie des Kohlenhydratstoffwechsels und Regulation der Glukose-Homöostase. In: BERGER M (Ed.): Diabetes mellitus. Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 1995a, S. 3-11
127. STARKE AAR: Pathophysiologie, Pathogenese und Genetik des Stoffwechselsyndroms des Typ-II-Diabetes. In: BERGER M (Ed.): Diabetes mellitus. Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 1995b, S. 369-387
128. STAUFFACHER W, LAMBERT AE, VECCHIO D, RENOLD AE: Measurements of insulin activities in pancreas and serum of mice with spontaneous ("obese" and "New Zealand obese") and induced (goldthioglucose) obesity and hyperglycemia, with considerations on the pathogenesis of the spontaneous syndrome. *Diabetologia* **3** (1967) 230-237
129. STAUFFACHER W, ORCI L, CAMERON DP, BURR IM, RENOLD AE: Spontaneous hyperglycemia and/ or obesity in laboratory rodents: an example of the possible usefulness of animal disease models with both genetic and environmental components. In: ASTWOOD EB (ed.): Recent Prog Horm Res. Academic Press, New York, London, 1971, pp. 41-91
130. SUBRAHMANYAM K: Metabolism in the New Zealand strain of obese mice. *Biochem J* **76** (1960) 548-556
131. SUNDBY F: Species variations in the primary structure of glucagon. *Metabolism* **25** (1976) 1319-1321
132. THORENS B, SARKAR HK, KABACK HR, LODISH HF: Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. *Cell* **55** (1988) 281-290
133. THORENS B, WU YJ, LEAHY JL, WEIR GC: The loss of GLUT2 expression by glucose-unresponsive beta cells of db/db mice is reversible and is induced by the diabetic environment. *J Clin Invest* **90** (1992) 77-85
134. THORENS B, GERARD N, DERIAZ N: GLUT2 surface expression and intracellular transport via the constitutive pathway in pancreatic beta cells and insulinoma: evidence for a block in trans-Golgi network exit by brefeldin A. *J Cell Biol* **123** (1993) 1687-1694
135. THORENS B: Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes. *Am J Physiol* **270** (1996) 541-553

136. THORENS B, WEABER G: GLUT2 function, expression and transcriptional regulation in liver and pancreatic β cells. In: GOULD GW (ed.): Facilitative Glucose Transporters. Springer-Verlag, Heidelberg, 1997, pp. 167-182
137. UNGER RH, DOBBS RE, ORCI L: Insulin, glucagon, and somatostatin secretion in the regulation of metabolism. *Annu Rev Physiol* **40** (1978) 307-343
138. UNGER RH, ORCI L: Glucagon and the A cell: physiology and pathophysiology. *N Engl J Med* **304** (1981) 1518-1580
139. UNGER RH, ORCI L: Glucagon. In: RIFKIN H und PORTE D, JR. (Eds.): *Ellenberg and Rifkin's diabetes mellitus: theory and practice*. 4. Ed. Elsevier, New York, Amsterdam, London, 1990, pp. 104-120
140. UNGER RH: Diabetic hyperglycemia: link to impaired glucose transport in pancreatic beta cells. *Science* **251** (1991) 1200-1205
141. UPTON JD, SNEYD JG, RENNIE PI: Insulin resistance in the New Zealand obese mouse (NZO): lipolysis and lipogenesis in isolated adipocytes. *Arch Biochem Biophys* **197** (1979) 139-148
142. UPTON JD, MAGUIRE T: Pancreatic polypeptide-containing cells in the New Zealand strain of obese mice. *Proc Univ Otago Med School* **59** (1981) 99-101
143. UPTON JD: Intravenous glucose tolerance tests in the New Zealand strains of mice. *Horm Metab Res* **16** (1984) 290-292
144. VERONI MC, LARKINS RG: Evolution of insulin resistance in isolated soleus muscle of the NZO mouse. *Horm Metab Res* **18** (1986) 299-302
145. VERONI MC, PROIETTO J, LARKINS RG: Evolution of insulin resistance in New Zealand obese mice. *Diabetes* **40** (1991) 1480-1487
146. WEINERT D, SCHUH J: Untersuchungen zur Entwicklung der Zeitstruktur ausgewählter Parameter im Verlauf der postnatalen Ontogenese. II. Tagesmuster der Blutglucose und des Leberglycogens. *Zool Jb Anat* **111** (1984) 147-153
147. WEIR GC, LAYBUTT DR, KANETO H, BONNER-WEIR S, SHARMA A: Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes* **50** Suppl 1 (2001) 154-159
148. WIECZOREK G, POSPISCHIL A, PERENTES E: A comparative immunohistochemical study of pancreatic islets in laboratory animals (rats, dogs, minipigs, nonhuman primates). *Exp Toxicol Pathol* **50** (1998) 151-172

149. WILLMS B, BEN-AMIN P, SÖLING HD: Hepatic enzyme activities of glycolysis and gluconeogenesis in diabetes of man and laboratory animals. *Horm Metab Res* **2** (1970) 135-141
150. WINAND J, FURNELLE J, GEORIS M, CHRISTOPHE J: Participation du foie et du tissu adipeux épидидymaire a l'obésité de la souris obèse Néo-Zélandaise (NZO) agée d'un an. *Bull Soc Chim Biol (Paris)* **50** (1968) 2069-2081
151. WINER N, SOWERS JR: Epidemiology of diabetes. *J Clin Pharmacol* **44** (2004) 397-405
152. YEN TT, ACTON JM: Locomotor activity of various types of genetically obese mice. *Proc Soc Exp Biol Med* **140** (1972) 647-650
153. ZIMMET P, ALBERTI KG, SHAW J: Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* **414** (2001) 782-787

8 Thesen

1. Die New-Zealand obese-Maus (NZO) ist ein seit über 60 Jahren in der experimentellen Diabetologie verwendetes Tiermodell mit ausgeprägter Obesitas und diabetischer Stoffwechsellage.
2. Obwohl die Blutglukosespiegel nicht deutlich erhöht sind, tritt eine typische Diabetessymptomatik mit zunehmendem Alter auf.
3. Der obesen NZO-Maus kann die stoffwechselunauffällige NMRI-Maus als Kontrolltier gegenübergestellt werden.
4. Während sich bis zu 2 Monate alte NZO-Mäuse in ihrer Körpermasse noch nicht von den Kontrolltieren unterscheiden, ist ab dem 4. Lebensmonat bei NZO-Mäusen ein deutlich erhöhtes Gewicht zu verzeichnen, welches bis zum Alter von einem Jahr ansteigt. Abgesehen von sehr alten ($> 1,5$ Jahre) NZO-Mäusen nehmen Gewicht und Plasmainsulinkonzentration mit zunehmendem Alter zu, während der Blutglukosespiegel nicht entgleist.
5. Die Insulinresistenz der wichtigsten Glukose-metabolisierenden Gewebe wurde für den NZO-Stamm bereits in einer Vielzahl von publizierten Studien nachgewiesen. Einer Hyperglykämie, als natürliche Konsequenz der Insulinresistenz, wirkt eine gesteigerte Insulinsynthese mit konsekutiver Hyperinsulinämie entgegen. Reaktiv sind die β -Zellen der NZO-Mäuse verändert. Folgende pathomorphologische Veränderungen lassen sich an den LANGERHANSschen Inseln aufzeigen:
 - Makronesie; Vergrößerung des Inselvolumens zu Rieseninseln („*giant islets*“)
 - Polynesie; Zunahme der Inselanzahl mit Konglomeratinseln um Ganganteile
 - Nesidioblastose; kleine scheinbar völlig intakte Inseln vermutlich Neubildungen, ähnlich der neonatalen Inselvermehrung
 - Änderungen der zellulären Zusammensetzung; Hyperplasie durch mitotische Teilungen der β -Zellen
 - Veränderungen der Inselanatomie; Verdrängung der A-Zellen aus der Peripherie durch Größenzunahme der zentralen β -Zell-Masse

- dilatierte Inselkapillaren; weitlumiges intrainsuläres Gefäßsystem
- Fibrose und fettige Degenerationen im exokrinen Pankreas; mutmaßliche Restzustände atrophierter Inseln
- β -Zell-Erschöpfung; dichte lamelläre rER-Felder, dilatierte Zisternen des GOLGI-Apparates und Vakuolisierungen innerhalb der β -Zellen

Sämtliche beschriebenen Veränderungen sind auch beim humanen, Adipositas-assoziierten Altersdiabetes anzutreffen.

6. Bereits bei jüngsten NZO-Mäusen ist die physiologische β -Zell-Stimulation eingeschränkt. So konnte *in vitro* an isolierten Inseln neonataler NZO-Mäuse eine gestörte Glukosetoleranz nachgewiesen werden. Die β -Zellen reagierten im Perfusionssystem auf eine 75-minütigen Glukosestimulation [25 mmol/l] mit einer verzögerten, reduzierten und nur andeutungsweise biphasischen Insulinsekretion, während auf einen analogen Argininreiz die β -Zellen plötzlich und überschießend reagierten.
7. Die beschriebene Störung der β -Zell-Physiologie ist mit einem Defekt der Signalübermittlung in die β -Zelle verbunden. Der Glukose-Sensor-Komplex, bestehend aus dem Glukosetransporter 2 (GLUT2) und der Glukokinase, stellt das Bindeglied zwischen extrazellulärer Glukosekonzentration und Insulinsynthese sowie Insulinliberation dar.
8. Der in LANGERHANSschen Inseln nur auf β -Zellen vorkommende GLUT2 ist immunhistochemisch bei sämtlichen NMRI-Mäusen in der Zellmembran markierbar. Bereits die 2- bis 4-monatigen NZO-Mäuse weisen morphologisch eine Reduktion des GLUT2 auf. Anstatt in der Zellmembran ist bei den stoffwechselgestörten NZO-Mäusen der GLUT2-Transporter im Zellinneren zu finden. Das typische netzartige Aussehen, wie bei den NMRI-Kontrollen, war nur noch vereinzelt anzutreffen.
9. Die schon in frühen Stadien beginnende Lokalisation des GLUT2 im Zytoplasma statt in der Zellmembran ist als krankhaftes Erscheinungsbild interpretierbar, da im Vergleich zu anderen Isoformen des Glukosetransporters, beispielsweise GLUT4, der GLUT2 weder vor noch nach der Membranexpression intrazellulär gespeichert oder *recycelt* wird.

10. Mithilfe der *real-time* RT-PCR ist es gelungen, die Expression der GLUT2-mRNS zu quantifizieren. Während bei NZO-Mäusen mit zunehmendem Alter eine signifikante Abnahme des Expressionsniveaus der GLUT2-mRNS gemessen wurde, konnte zwischen den Altersgruppen bei NMRI-Mäusen keine signifikante Reduktion registriert werden.
11. Die Tagesmuster von Blutglukose und Insulin sind bei NZO- und NMRI-Mäusen entsprechend einer *ad libitum* Fütterung regelrecht. Bei den adulten, nachtaktiven Nagetieren findet die Futteraufnahme zur Nachtzeit statt. Der Blutzuckerspiegel steigt in der zweiten Nachthälfte an und fällt bis zur Tagesmitte auf ein Minimum ab. Metabolische Untersuchungen sollten mehrere Tageszeitpunkte berücksichtigen um tagesrhythmischen Schwankungen ausreichend Rechnung zu tragen.
12. Melatoninbestimmungen aus Mausepiphysenextrakten oder aus Mausblutserum mittels radioimmunologischer Bestimmungen misslangen trotz intensiver Bemühungen aus ungeklärten Gründen. Andere Techniken mit einem ähnlichen Sensitivitätsbereich wie mit dem *Radioimmunoassay* standen bisher nicht zur Verfügung. Mit Hilfe der HPLC-Technik und Derivatisierung von Epiphysenextrakten aus NZO- und NMRI-Mäusen ist es gelungen, eine nächtliche Melatoninsynthese für beide Mausstämme nachzuweisen. Das Produkt der Derivatisierung von Melatonin mit Na_2CO_3 und H_2O_2 ist ein Metabolit des N^1 -Acetyl- N^2 -formyl-5-methoxykynuramin (AFMK).
13. Die Hallesche Kolonie der NZO-Mäuse ist mit ihren spezifischen durch Inzucht fixierten Eigenschaften, welche vor über 50 Jahren erstmals beschrieben worden sind, nahezu gleich geblieben. Die erhobenen Befunde lassen sich vorzüglich mit den Erkenntnissen aus einer Vielzahl von Publikationen verbinden. Die Untersuchungen bahnen damit weitere Studien zur Chronoendokrinologie bei einem diabetischen Tiermodell.

Lebenslauf

- 11.07.1977 als zweites Kind der Eheleute Wolfgang und Gisela Chankiewitz in Halle (Saale) geboren
- 01.09.1984 Einschulung an der Polytechnischen Oberschule „JOHANNES R. BECHER“ in Halle-Neustadt
- 01.09.1985 Schulbedingter Wechsel in die Polytechnische Oberschule „GOTTHOLD EPHRAIM LESSING“ in Halle-Neustadt
- 01.09.1991 Aufnahme am „Gymnasium am Reileck“ in Halle
- im Jahr 1995 Anfertigung einer Projektarbeit zum Thema: „Die Wirkung von γ -Strahlung auf die Aminosäure Glutaminsäure“ in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biochemie und der Strahlenklinik der MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT Halle-Wittenberg
- 21.06.1996 Erlangen der allgemeinen Hochschulreife
- 04.11.1996- Grundwehrdienst im 4./Sanitätsregiment 13 in Halle Trotha als
- 31.08.1997 Ausbilder und Gruppenführer im Krankenpflegedienst
- 10.09.1997 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT Halle-Wittenberg
- 15.09.1999 Ablegen der Ärztlichen Vorprüfung
- 14.12.1999 Aufnahme der Arbeit an einer Promotion
- 20.09.2000 Ablegen des Ersten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung
- im Jahr 2000 Hilfsassistent im Neuroanatomiekurs im Institut für Anatomie und Zell- und 2001 biologie der MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT Halle-Wittenberg
- 11.04.2003 Ablegen des Zweiten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung
- 14.04.2003- ‚Praktisches Jahr‘ an der MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT Halle- Wittenberg und dem Diakoniekrankenhaus Halle, innerhalb des PJ Einarbeitung in die Korneaspende bei der DSO Gesellschaft für Gewebetransplantation in der Mitteldeutsche Hornhautbank Halle
- 04.06.2004 Sachkundenachweis nach § 4 des Tierschutzgesetzes
- 25.10.2004 Ablegen des Dritten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung und Studienabschluss
- 01.11.2004 Anstellung am Institut für Anatomie und Zellbiologie der MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT Halle-Wittenberg als Wissenschaftlicher Mitarbeiter

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbst und ohne die Hilfe Dritter verfasst habe. Die aus anderen Quellen wörtlich oder inhaltlich übernommenen Daten und Konzepte sind von mir als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere, dass für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen wurde. Es sind von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen, geleistet worden.

Diese Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde in In- oder Ausland vorgelegt worden.

Erklärung über Promotionsversuche

Ich erkläre, dass ich keinerlei frühere Promotionsversuche unternommen habe und dass an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Promotionsverfahren anhängig ist.

Halle (Saale), Mai 2005

Hinweis auf Publikationen von Ergebnissen dieser Arbeit einschließlich Abbildungsnachweisen

1. Gedruckte Konferenzbeiträge

PESCHKE E, MUBHOFF U, CSERNUS VJ, MÜHLBAUER E, CHANKIEWITZ E, PESCHKE D: Rezeptor (MT₁)-mediierter Einfluss von Melatonin auf cAMP-Spiegel und Insulinsekretion von Glukose-responsiven, Insulin-produzierenden Ratten-Insulinoma-Zellen (INS1). Verh Anat Ges **184** (Suppl.) (2002) 255

PESCHKE E, MÜHLBAUER E, CHANKIEWITZ E, PESCHKE D: Receptor (MT₁) mediated influence of melatonin on cAMP concentration and insulin secretion of pancreatic islets and glucose responsive insulinoma cell line INS-1 of rats. Neuroendocrinol Lett. **23** (Suppl. 2) (2002) 103-104

PESCHKE D, CHANKIEWITZ E, BLUME R, MÜHLBAUER E, LITVAK L, PESCHKE E: Morphologische und physiologische Befunde zur Charakterisierung der NZO-Maus als Modell des Typ2-Diabetes. Verh Anat Ges **185** (Suppl.) (2003) 107 [Abb. 12, 13]

CHANKIEWITZ E, MÜHLBAUER E, PESCHKE D, BAZWINSKY I, PESCHKE E: Functional, morphological and molecular investigations of islets in the diabetic mouse model NZO. Verh Anat Ges **186** (Suppl.) (2004) 90 [Abb. 1, 5, 12 bis 14, 16, 18, 19, 22, 24]

BRÖMME HJ, CHANKIEWITZ E, PESCHKE D, PESCHKE E: Fluoreszenzphotometrische Bestimmung von Melatonin nach Derivatisierung mittels HPLC-Technik. Verh Anat Ges **186** (Suppl.) (2004) 226 [Abb. 25]

CHANKIEWITZ E, PREIB U, FRESE TH, SCHNEYER U, MÜHLBAUER E, PESCHKE D, PESCHKE E: Melatonin-Tagesprofile bei stoffwechselgesunden und diabetischen Versuchstieren sowie Patienten. Verh Anat Ges **187** (Suppl.), 249 (2005)

2. Originalpublikationen

PESCHKE E, MÜHLBAUER E, MÜBHOFF U, CERNUS VJ, CHANKIEWITZ E, PESCHKE D: Receptor (MT₁) mediated influence of melatonin on cAMP content and insulin secretion of rat insulinoma cells INS1. *J. Pineal Res.* **33** (2002) 63-71

PESCHKE E, FRESE T, CHANKIEWITZ E, PESCHKE D, PREIB U, SCHNEYER U, SPESSERT R, MÜHLBAUER E: Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 1- and type 2-diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin receptor status. submitted *Diabetes* (2005)

CHANKIEWITZ E, PESCHKE D, HERBERG L, BAZWINSKY I, MÜHLBAUER E, BRÖMME HJ, PESCHKE E: Did the gradual loss of GLUT2 cause a shift to diabetic disorders in New Zealand obese mouse (NZO)? (2005, zur Einreichung vorbereitet)

Schlusswort und Danksagung

„Der einzige Zweck dieser Entstehungsgeschichte meiner Arbeit ist Motivierung und Entschuldigung ihres geringen Gehaltes.“ So eröffnete PAUL LANGERHANS seine medizinische Doktorarbeit im Jahr 1869. Mit seinen Worten möchte ich nun meine Arbeit schließen, denn auch ich denke: „dass ich in keiner Weise im Stande bin, die abgeschlossenen Resultate einer erfolgreichen Untersuchung vorzulegen, sondern höchstens wenige vereinzelte Beobachtungen beizubringen vermag, welche einen ungleich komplizierten Bau des Objektes ahnen lassen...“.

Hiermit möchte ich all denjenigen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. habil. E. Peschke und Frau Prof. Dr. rer. nat. habil. D. Peschke für die Überlassung des Promotionsthemas und die stets persönliche und sehr liebevolle Hilfestellung bedanken.

Großer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. I. Bazwinsky, Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. habil. H.-J. Brömme, Herrn Dr. rer. nat. Mühlbauer und Herrn Dr. med. R. Blume für die Einführung in Arbeitstechniken sowie wertvolle Hinweise und kritische Diskussionen.

Für die technische Unterstützung bedanke ich mich bei Frau U. Engelhardt, Frau Dr. rer. nat. L. Litvak, A. Hunt, C. Rothgänger und A. Jordan.

Ohne die Unterstützung meiner Mutter und meiner Schwester Katja Bernhardt sowie Christina, Norbert und Kathrin Linke wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke für ihr Verständnis und ihre Geduld.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Verena Dathe bedanken.