

Christina Reers
Dr. sc. hum.

Bedeutung des Betazell-Turnovers für die Pathophysiologie des Diabetes mellitus Typ 2

Geboren am 5.3.1981 in Münster

Diplom der Fachrichtung Biotechnologie am 29.11.2005 an der Universität Münster

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Robert A. Ritzel

Der Diabetes mellitus Typ 2 ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, die durch eine verminderte Insulinsensitivität, eine Einschränkung der Betazellfunktion und ein Betazelldefizit gekennzeichnet ist. Das humane Pankreas vermag zunächst auf eine erhöhte Insulinresistenz kompensatorisch mit einer verstärkten Insulinsekretion der Betazellen und Zunahme der Betazellmasse zu reagieren. Durch genetisch determinierte und erworbene Störungen der Betazellfunktion und ein progredientes Betazelldefizit, wahrscheinlich in erster Linie durch Betazellapoptose, können die Betazellen den erhöhten Insulinbedarf nicht mehr ausreichend kompensieren. Es entwickelt sich eine gestörte Glukosetoleranz und ein manifester Diabetes mellitus Typ 2. Die Prävalenz des Diabetes mellitus Typ 2 nimmt mit steigendem Alter zu und wird von der WHO bei den über 65-Jährigen auf ca. 20% geschätzt. Die Inselmorphologie bei Personen mit Diabetes mellitus Typ 2 ist charakterisiert durch lichtmikroskopisch sichtbare Amyloidablagerungen. Während des Prozesses der Amyloidbildung aus humanem Inselamyloid-Polypeptid (hIAPP) entstehen intermediäre hIAPP-Oligomere, die betazelltoxische Eigenschaften besitzen. In der vorliegenden Arbeit sollen daher folgende Fragen bearbeitet werden: 1. Welchen Einfluss hat das Alter auf die Inselmorphologie und den Betazell-Turnover in humanen Spenderpankreatata von nicht-diabetischen Personen? 2. Welchen Einfluss haben die im Kontext eines Diabetes mellitus Typ 2 typischen proapoptotischen Bedingungen wie hohe Glukose- bzw. FFA-Konzentrationen oder die Anwesenheit cytotoxischer, zu Amylin aggregierender hIAPP-Oligomere auf Betazellen und welche Mechanismen der Apoptoseinduktion werden jeweils aktiviert?

Humane Pankreatata von n=20 nicht-diabetischen Organspendern, 11 Frauen und 9 Männern, im Alter zwischen 7 und 66 Jahren (Durchschnittsalter $50,2 \pm 3,5$ Jahre) und einem BMI zwischen $17,2$ und $33,1 \text{ kg/m}^2$ (durchschnittlicher BMI $25,7 \pm 0,9 \text{ kg/m}^2$) wurden morphometrisch analysiert, um das relative Beta- und Alphazellvolumen (Insulin + Glukagon), die Inselgröße und -dichte, die Betazellreplikation (Ki-67) und -apoptose (TUNEL) sowie die Inselneogenese (Insulin-positive dukta Zellen), also den sogenannten Betazell-Turnover, zu bestimmen. Außerdem wurde die PDX-1 Expression untersucht. Es wurden jeweils Gewebeschnitte der verschiedenen anatomischen Lokalisationen des humanen Pankreas, dem Kopf, Korpus und Schwanz, ausgewertet und die erhaltenen Ergebnisse mit dem jeweiligen Alter der Spender korreliert. Als Betazellmodell wurden INS-1 Zellen für 48h mit 11 bzw. 40mM Glukose, 0,8mM Palmitat und/ oder 20 μM hIAPP inkubiert und die Aktivität der Caspasen 3, 8, 9 und 12 fluorometrisch bestimmt. Außerdem wurden Kontrollexperimente mit dem nicht amyloidogenen murinen IAPP (rIAPP) durchgeführt, mit Hilfe derer zwischen tatsächlich durch hIAPP induzierter Apoptose und Toxizität durch *protein overload* der Zellen unterschieden werden sollte. Die Ergebnisse aus jeweils n=6 Ansätzen statistisch ausgewertet.

Die Bearbeitung von Pankreasgewebe der verschiedenen Organlokalisationen ergab regionale Unterschiede bezüglich des relativen Betazellvolumens. Der relative Insulingehalt war im Schwanzbereich signifikant höher, da in dieser Region die Inseln sowohl durchschnittlich

größer als auch ihre Dichte höher waren. Lineare Regressionsanalysen zeigten, dass die Replikationsrate der Betazellen mit steigendem Spenderalter abnahm, während kein signifikanter Zusammenhang zwischen Spenderalter und Betazellapoptose bzw. Inselneogenese bestand. Auch der relative PDX-1 Gehalt des Pankreasgewebes nahm mit dem Alter ab. Des Weiteren bestand ein direkter linearer Zusammenhang zwischen der Betazellreplikation und dem relativen PDX-1 Gehalt. So stieg die Replikationsrate in Betazellen mit zunehmendem relativem PDX-1 Gehalt, während die Betazellapoptose und der relative PDX-1 Gehalt nicht korrelierten. In INS-1 Zellen kam es nach 48h unter allen Kultivierungsbedingungen zu einer signifikanten Apoptoseinduktion durch Aktivierung der zentralen Effektor-Caspase 3. Die Kombination von hohen Glukose- und FFA-Konzentrationen und hIAPP hatte einen synergistischen Effekt auf die INS-1 Zellen, da hIAPP die Betazelltoxizität von Glukose und FFA potenzierte. Bei physiologischen Glukosekonzentrationen waren FFA untoxisch. Hohe Glukosekonzentrationen induzierten in INS-1 Zellen sowohl den extrinsischen als auch den intrinsischen Apoptoseweg.

Ein reduzierter relativer PDX-1 Gehalt der Betazellen ist wahrscheinlich eine wichtige Ursache für die Einschränkung des Betazell-*Turnovers* mit zunehmendem Alter. Demnach ist die Fähigkeit der Betazellen, auf einen veränderten Insulinbedarf mit einer kompensatorischen Zunahme der Betazellmasse zu reagieren, mit steigendem Alter eingeschränkt, da die Betazellreplikation der primäre Mechanismus der Betazellneubildung ist. Diese Einschränkung des Betazell-*Turnovers* mit steigendem Alter vermindert die Anpassungsfähigkeit des humanen endokrinen Pankreas an längerfristige Veränderungen des Insulinbedarfs und erhöht die Prävalenz des Diabetes mellitus Typ 2 bei älteren Personen. Bei Manifestation eines Diabetes mellitus Typ 2 wird diese Dysbalance des Betazell-*Turnovers* durch Potenzierung der toxischen Einflüsse auf die Langerhans'schen Inseln weiter verstärkt. Die synergistische Wirkung von Glukose, FFA und hIAPP auf Betazellen resultiert in einer vermehrten Apoptoseinduktion und trägt damit zur Akzeleration des Betazelldefizits bei. Therapieprinzipien des Diabetes mellitus Typ 2 können daher den chronisch progredienten Verlauf dieser Erkrankung nur dann aufhalten, wenn langfristig sowohl die Betazellapoptose reduziert als auch die Neubildung von Betazellen gefördert wird.