

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Lokalisation der K- und L-Zellen im Darm der Ratte

#### 3.1.1 Immunhistochemische Lokalisation der K- und L-Zellen

##### Auswahl der Objektträger

Da unbeschichtete Objektträger im Vergleich zu den Poly-L-Lysin-beschichteten und den Super-Frost-Plus-Gold Objektträgern unter dem Mikroskop die klarsten Bilder ermöglichten, wurden sie für die folgenden Färbungen ausgewählt.

##### Auswahl des Epithelzellmarkers

Weil Tests mit dem Cytokeratin-Antikörper (Sigma, Deisenhofen) im Vergleich zu den Versuchen mit Antikörpern gegen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin die optisch schönsten Ergebnisse, d.h. die leuchtendsten und klarsten Bilder, erbrachten, wurde dieser für alle weiteren Versuche zur Epithelzellmarkierung eingesetzt.

##### Auswahl geeigneter Fluoreszenzfarbstoffe

Die Fluoreszenzfarbstoffe Carbocyanin (Cy2) und Indocarbocyanin (Cy3) erzeugten Färbungen, die strahlender als vergleichbare FITC- oder TRITC-Färbungen waren und bei denen Details besser zu erkennen waren. Auch die Haltbarkeit der Schnitte war um mehrere Tage verlängert, somit konnten sie besser untereinander verglichen werden. Aus diesem Grund wurden für weitere Färbungen ausschließlich Antikörper verwendet, an die die Farbstoffe Cy2 bzw. Cy3 gekoppelt waren.

##### Negativkontrollen

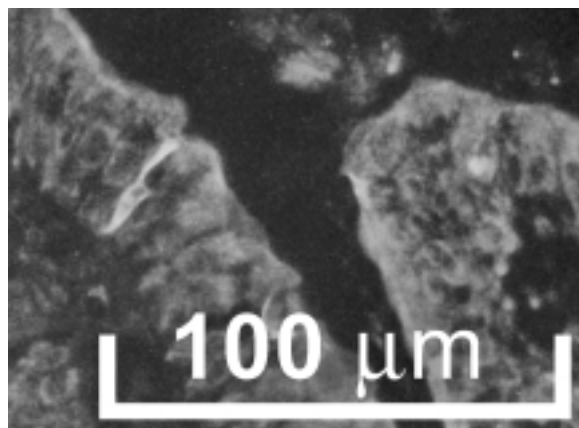
Alle Negativkontrollen verliefen ordnungsgemäß: ein Weglassen des primären Antikörpers resultierte in minimaler, diffuser Immunfluoreszenzfärbung. Ohne den sekundären, farbstoffgekoppelten Antikörper blieb die Färbung ganz aus. Weder

die ausgewählten Objektträger noch die unbehandelten Gefrierschnitte zeigten eine Eigenfluoreszenz.

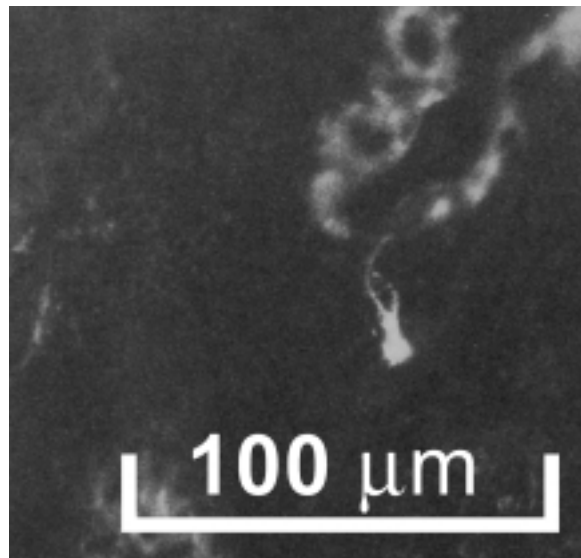
#### Aussehen der K- und L-Zellen

Auf Abbildung 3-1 erkennt man die mit Cy2 angefärbten, endokrinen Zellen, die zwischen Epithelzellen eingelagert sind und mit einem Cytoplasmaausläufer das Darmlumen erreichen. Sowohl K- als auch L-Zellen sind endokrine Zellen vom offenen Typ.

a)



b)

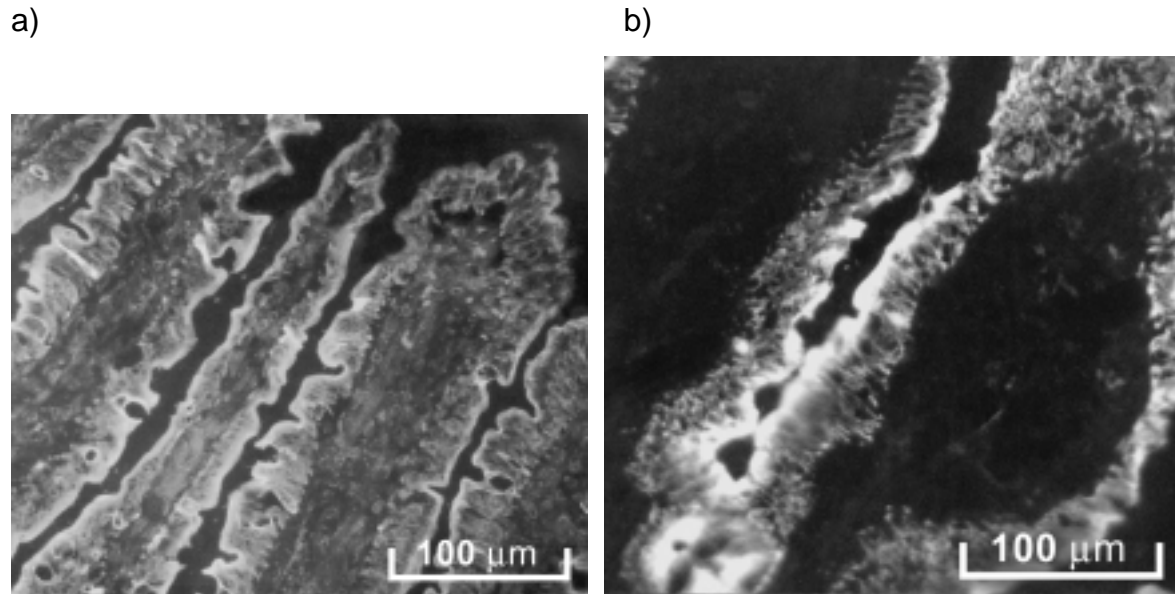


**Abbildung 3-1:** a) K-Zelle aus dem Duodenum der Ratte, mit einem GIP- Antikörper (1:500) markiert und mit Cy2 angefärbt. Vergrößerung 1:320.  
b) L-Zelle aus dem Ileum der Ratte, mit einem GLP-1-Antikörper (1:200) markiert und mit Cy2 angefärbt. Vergrößerung 1:320.

#### Nachweis der K-Zellen im Duodenum und der L-Zellen im Ileum

Mit der Immunfluoreszenztechnik konnten die K-Zellen im Duodenum der Ratte vor allem im oberen und mittleren Teil der Villusspitzen lokalisiert werden (siehe Abbildung 3-2). Vereinzelt kamen Färbungen im unteren Villusbereich vor. Im Ileum konnten keine K-Zellen nachgewiesen werden.

Die L-Zellen der Ratte befanden sich im Ileum vor allem in der unteren Hälfte der Krypten (siehe Abbildung 3-2). In Duodenumschnitten blieb eine Färbung aus.



**Abbildung 3-2:** a) K-Zelle aus dem Duodenum der Ratte (Doppelimmunfluoreszenz), mit einem GIP-Antikörper markiert und mit Cy2 angefärbt, Gegenfärbung der Epithelzellen mit pan-Cytokeratin und Cy3 (mit FITC-Filter). Vergrößerung 1:320.  
b) L-Zelle aus dem Ileum der Ratte, mit einem GLP-1-Antikörper markiert und mit Cy2 angefärbt, Gegenfärbung der Epithelzellen mit pan-Cytokeratin und Cy3 (mit FITC-Filter). Vergrößerung 1: 320.

### 3.1.2 Untersuchung der Verteilung der K- und L-Zellen über die gesamte Darmlänge

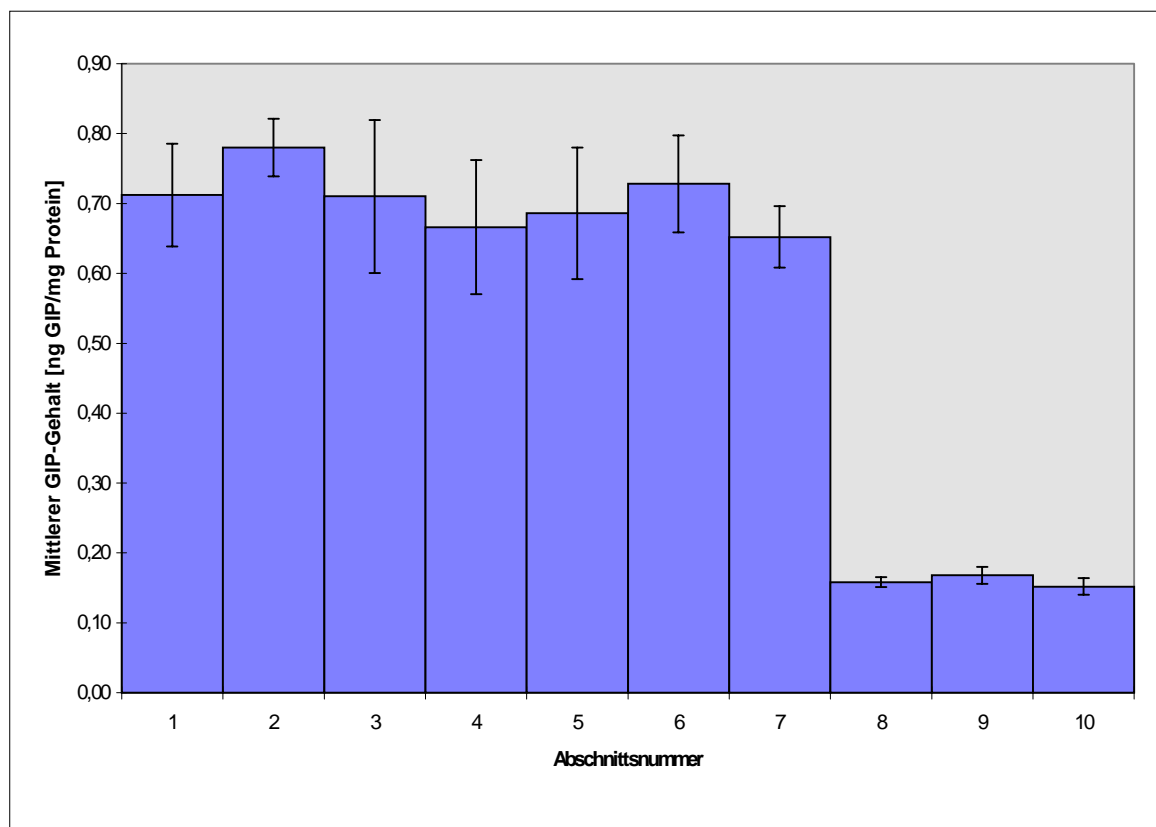
Die Untersuchung des Rattendarms, der in 10 gleich lange Dünndarmabschnitte eingeteilt worden war, ergab folgenden Verlauf für die Konzentrationen an GIP und GLP-1:

#### GIP

Bezieht man den GIP-Gehalt der Darmmucosa auf den entsprechenden Proteingehalt, so ergaben sich für das Duodenum und das proximale Jejunum Werte um 0,7 ng GIP/ mg Protein. Die insgesamt höchste GIP-Konzentration war im 2. (proximales Jejunum) von 10 untersuchten Abschnitten zu finden. Die GIP-Konzentrationen fielen im distalen Jejunum und Ileum auf signifikant niedrigere Werte von etwa 0,15 ng GIP/mg Protein ab (siehe Tabelle 3-1 und Abbildung 3-3).

**Tabelle 3-1:** **GIP-Verteilung über die Darmlänge im Rattendarm.** Angegeben sind die ermittelten GIP-Gehalte bezogen auf die entsprechenden Proteingehalte. n = Anzahl der untersuchten Därme, SD = Standardabweichung, SEM = Standardfehler des Mittelwerts, p = Signifikanzniveau, VGL = Vergleichswert

Abschnitt	n	Mittelwerte	SD	SEM	T-Test
		[ng GIP/mg Prot.]	[ng GIP/mg Prot.]	[ng GIP/mg Prot.]	p
1	5	0,71	0,16	0,07	0,5271
2	4	0,78	0,08	0,04	VGL
3	4	0,71	0,22	0,11	0,6224
4	5	0,67	0,21	0,10	0,4043
5	5	0,69	0,21	0,09	0,4814
6	5	0,73	0,16	0,07	0,6108
7	5	0,65	0,10	0,04	0,1076
8	5	0,16	0,02	0,01	0,0000
9	5	0,17	0,03	0,01	0,0000
10	5	0,15	0,03	0,01	0,0000



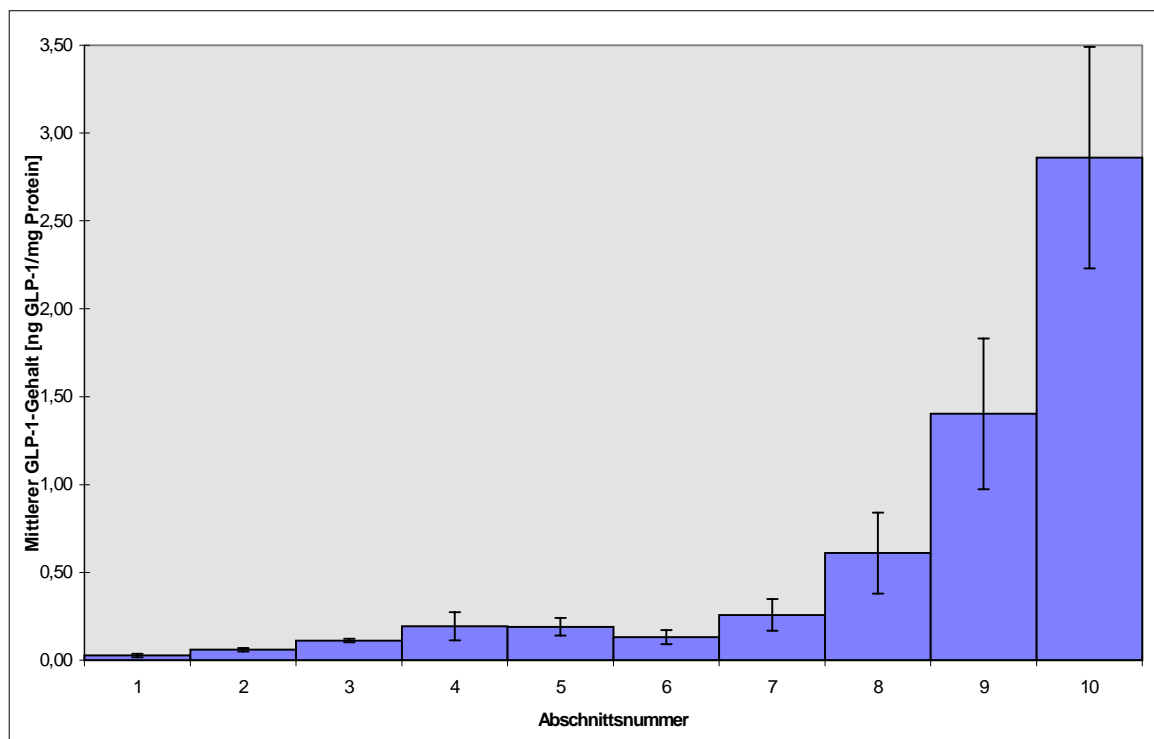
**Abbildung 3-3:** **GIP-Verteilung über die Darmlänge.** Dargestellt ist der Verlauf des mittleren GIP-Gehalts bezogen auf den Proteingehalt (in ng GIP/mg Protein) in der Dünndarmmucosa der Ratte (n = 5) über die gesamte Darmlänge (Abschnitte 1-10). Die zusätzlichen Linien markieren den Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

## GLP-1

Ein ausgeprägter Gradient wurde bei den Untersuchungen zum Verlauf der GLP-1-Konzentration über die Darmlänge gefunden. Vom Duodenum bis zum proximalen Jejunum waren nur minimale GLP-1-Konzentrationen nachweisbar

**Tabelle 3-2: GLP-1-Verteilung über die Darmlänge im Rattendarm.** Angegeben sind die ermittelten GLP-1-Gehalte bezogen auf die entsprechenden Proteingehalte. n = Anzahl der untersuchten Därme, SD = Standardabweichung, SEM = Standardfehler des Mittelwerts, p = Signifikanzniveau, VGL = Vergleichswert

Abschnitt	n	Mittelwerte	SD	SEM	T-Test
		[ng GLP-1/mg Prot.]	[ng GIP/mg Protein]	[ng GIP/ mg Protein]	p
1	5	0,03	0,01	0,01	0,004
2	4	0,06	0,01	0,01	0,010
3	4	0,11	0,03	0,01	0,011
4	5	0,19	0,18	0,08	0,006
5	5	0,19	0,11	0,05	0,006
6	5	0,13	0,09	0,04	0,005
7	5	0,26	0,21	0,09	0,007
8	5	0,61	0,52	0,23	0,017
9	5	1,40	0,96	0,43	0,127
10	5	2,86	1,41	0,63	VGL



**Abbildung 3-4: GLP-1-Verteilung über die Darmlänge.** Dargestellt ist der Verlauf des mittleren GLP-1-Gehalts bezogen auf den Proteingehalt (in ng GIP / mg Protein) in der Dünndarmmucosa der Ratte (n = 5) über die gesamte Darmlänge (Abschnitte 1-10). Die zusätzlichen Linien markieren den Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

(um 0,1 ng GLP-1/mg Protein). Im distalen Jejunum stieg der Wert signifikant an und erreichte im Ileum mit einer Konzentration von 2,9 ng GLP-1/mg Protein ein Maximum (siehe Tabelle 3-2 und Abbildung 3-4).

### **3.1.3 Lokalisation der K- und L-Zellen entlang der Villus-Krypt-Achse**

#### Fraktionsweises Abtragen der Zellen

Die Zellen aus der Mucosa des Rattendarms wurden schichtweise abgetragen. Zu Beginn der Schüttelversuche lagen noch intakte Villusspitzen vor, diese wurden Schritt für Schritt abgetragen, bis schließlich auch Kryptzellen aus dem Zellverband gelöst werden konnten (nicht dargestellt). Die Zellen in den gesammelten Fraktionen lagen meist nicht als Einzelzellen, sondern als kleine Zellverbände in Form von Villuszellagen oder Kryptorganoiden vor.

#### Lokalisation der spezifischen Aktivitäten von Alkalischer Phosphatase und Thymidinkinase im kompletten Dünndarm

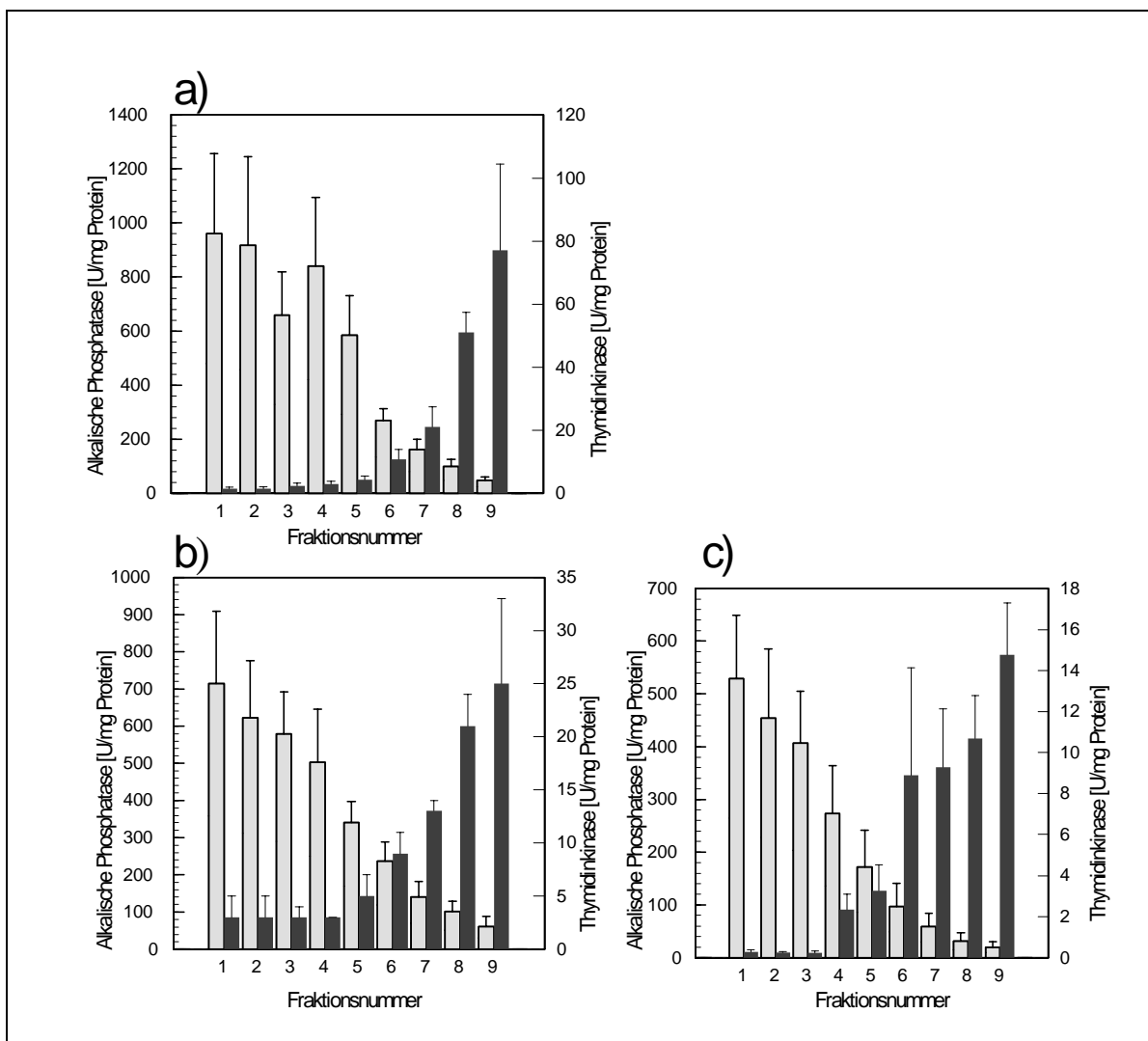
Die Methode erlaubte eine gute Trennung der Zellen aus den Villi von den Zellen aus den Krypten. Die spezifische Aktivität an Alkalischer Phosphatase sank im Verlauf der Fraktionen bis auf nahezu 0 U/mg Protein in der letzten Fraktion. Im Gegensatz dazu war die spezifische Aktivität der Thymidinkinase in den ersten Fraktionen kaum meßbar und stieg in den weiteren Fraktionen stark an. Die höchsten spezifischen Aktivitäten an Alkalischer Phosphatase befanden sich in den ersten Fraktionen (bis zu 960 U/mg Protein), die höchsten spezifischen Aktivitäten an Thymidinkinase (bis zu 75 U/mg Protein) jeweils in den letzten Fraktionen (siehe Abbildung 3-5).

#### Lokalisation der spezifischen Aktivitäten von Alkalischer Phosphatase und Thymidinkinase im proximalen und im distalen Dünndarm

Eine nahezu gleiche relative Verteilung ergab sich für die spezifischen Aktivitäten an Alkalischer Phosphatase und Thymidinkinase, wenn nur der proximale oder der distale Teil des Dünndarms untersucht wurden: die spezifische Aktivität an

Alkalischer Phosphatase nahm im Verlauf der Fraktionen signifikant ab, während die der Thymidinkinase signifikant zunahm (siehe Abbildung 3-5).

Durch den Nachweis der Markerenzyme Alkalische Phosphatase und Thymidinkinase konnte somit gezeigt werden, daß in den zuerst gesammelten Fraktionen, die aus dem Abbau der Villusspitzen resultierten, vor allem differenzierte Zellen aus dem Zellverband gewonnen wurden. Die undifferenzierten, proliferierenden Zellen aus dem Kryptbereich befanden sich in den letzten Fraktionen.



**Abbildung 3-5: Verlauf der spezifischen Aktivitäten an Alkalischer Phosphatase (AP) und Thymidinkinase (TK) entlang der Villus-Krypt-Achse** a) im kompletten Dünndarm (n = 8), b) im proximalen Teil (Duodenum und proximales Jejunum) (n = 4) und c) im distalen Teil des Rattendarms (distales Jejunum und Ileum) (n = 4) (Angaben jeweils in U/mg Protein). In hellen Säulen dargestellt ist der Verlauf der spezifischen AP-Aktivitäten, in den dunklen Säulen der der spezifischen TK-Aktivitäten; die zusätzlichen Linien beziehen sich auf die Standardfehler der Mittelwerte (SEM).

### Lokalisation von GIP entlang der Villus-Krypt-Achse

Ein ähnlicher Gradient wie für die spezifische Aktivität der Alkalischen Phosphatase ergab sich für den spezifischen GIP-Gehalt. Im kompletten Rattendünndarm konnten in den ersten Fraktionen Konzentrationen bis zu  $0,98 \pm 0,14$  ng GIP/mg Protein gemessen werden. Die GIP-Konzentration sank ab der dritten Fraktion auf signifikant geringere Werte ( $0,23 \pm 0,04$  ng GIP/mg Protein in C<sup>3</sup>). Ähnliche Gradienten ergaben sich, wenn anstelle des gesamten Dünndarms die proximalen oder distalen Abschnitte isoliert untersucht wurden (siehe Abbildung 3-6). Bemerkenswert ist die relativ hohe spezifische GIP-Konzentration ( $0,91 \pm 0,21$  ng GIP/mg Protein) in den ersten Fraktionen aus dem distalen Dünndarmabschnitt.

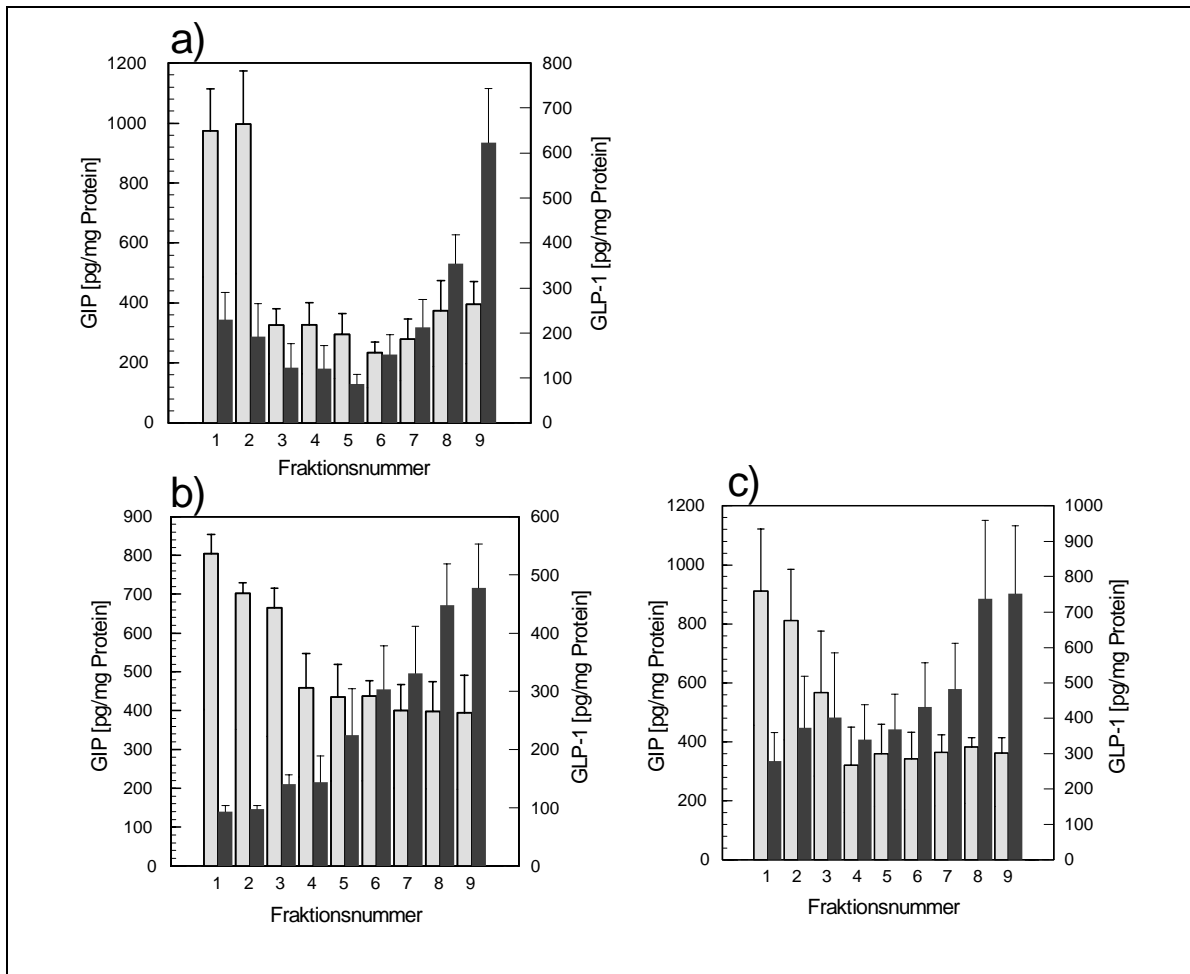
Die GIP-produzierenden K-Zellen konnten also im gesamten Dünndarm der Ratte auf den Villusspitzen und in villusnahen Regionen nachgewiesen werden.

### Lokalisation von GLP-1 entlang der Krypt-Villus-Achse

Bei der Untersuchung des kompletten Dünndarms trat die mit Abstand höchste spezifische GLP-1-Konzentration ( $0,62 \pm 0,08$  ng GLP-1/mg Protein) in der zuletzt gesammelten Fraktion (Kryptregion) auf. Auch wenn der proximale oder distale Abschnitt des Dünndarms alleine untersucht wurde, ergab sich die höchste GLP-1-Konzentration für die jeweils zuletzt gesammelte Fraktion. In allen Versuchen stieg die Konzentration des Peptids an, je weiter die Zellen in Richtung der Krypten abgetragen wurden. Die insgesamt höchste GLP-1-Konzentration trat in der letzten Fraktion des distalen Dünndarms auf ( $0,75 \pm 0,19$  ng GLP-1/mg Protein) (siehe Abbildung 3-6).

Im gesamten Dünndarm wurde demnach die höchste Dichte an GLP-1-produzierenden L-Zellen in den Krypten und kryptennahen Regionen gefunden.





**Abbildung 3-6: Verlauf der spezifischen GIP- und GLP-1-Konzentrationen entlang der Villus-Krypt-Achse** a) im kompletten Dünndarm (n = 8), b) im proximalen Teil (Duodenum und proximales Jejunum) (n = 4) und c) im distalen Teil des Rattendarms (distales Jejunum und Ileum) (n = 4) (Angaben jeweils in pg Hormon / mg Protein). In hellen Säulen dargestellt ist der Verlauf der GIP-Gehalte, in den dunklen Säulen der der GLP-1-Gehalte; die zusätzlichen Linien beziehen sich auf die Standardfehler der Mittelwerte (SEM). GIP = Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide, GLP-1 = Glucagon-like Peptide 1

## 3.2 Isolation der K-Zellen

### 3.2.1 Isolation von K-Zellen aus Duodenum

#### 3.2.1.1 Ergebnisse der mechanischen Zellisoliationsversuche

Eine mechanische Isolation der Zellen (angelehnt an die Methode von SAIFIA et al. [62]) erbrachte viele Zelltrümmer und wenige Zellen, deren Intaktheit zudem niedrig war. Auf die in der Anleitung angegebenen weiteren Schritte wurde daraufhin verzichtet und die Methode verworfen. Allerdings war es auch nicht

möglich, die Methode technisch identisch nachzuarbeiten, da kein vergleichbarer Schüttelapparat eingesetzt werden konnte, weil die Herstellerfirma nicht mehr existierte.

#### 3.2.1.2 Ergebnisse der enzymatischen Zellisolationsversuche

Die enzymatische Isolation der Zellen erbrachte mit beiden getesteten Collagenase-Typen und unabhängig von der eingesetzten Enzymkonzentration und den Inkubationszeiten eine geringe Zellausbeute. Die Intaktheit der isolierten Zellen betrug in der Regel weniger als 20 %. Die Fraktionen enthielten sehr viele Trümmer und außerdem viele mittelgroße zellartige Gebilde. Durch Kontrolle mittels einer Hämalaun-Eosin-Färbung konnte ausgeschlossen werden, daß es sich hierbei um Zellen handelte. Zur weiteren Verarbeitung waren die mit dieser Methode gewonnenen Suspensionen nicht geeignet.

#### 3.2.1.3 Ergebnisse der Versuche mit hyperosmolarem Chelatpuffer

##### Aussehen der isolierten Zellen

Unter dem Mikroskop waren längliche und runde Zellen sichtbar, die meist als Einzelzellen, zum Teil jedoch auch in Form von kleinen Zellverbänden vorkamen (diese wurden nicht in die Zellzahlberechnung eingeschlossen). In der Regel waren wenige Zelltrümmer, aber einige isolierte Zellkerne oder Bakterien zu beobachten.

##### Zellzahlen und Intaktheiten

Mit der hier beschriebenen Methode wurden durchschnittlich  $3,1 \pm 0,3 \times 10^6$  Zellen isoliert. Die mittlere Intaktheit betrug  $81 \pm 1$  %.

### Variationen

- a) Wurde die Inkubationszeit von 30 auf 60 min heraufgesetzt, so sank die Intaktheit der Zellen auf rund 60 %. Eine geringere Inkubationszeit resultierte in deutlich geringeren Zellausbeuten (kleiner  $1 \times 10^6$ ).
- b) Den gleichen Effekt hatte das Absenken der Inkubationstemperatur auf 0 °C. Die mittlere Zellausbeute sank auf  $0,7 \pm 0,3 \times 10^6$  Zellen und die durchschnittliche Intaktheit auf  $28 \pm 9$  %.
- c) Ein Glutaminzusatz erbrachte in Bezug auf die Intaktheit der isolierten Zellen keinen positiven Effekt.
- d) Wurde die Begasung weggelassen, so sanken die Intaktheiten der isolierten Zellen.
- e) Auch ein Absenken der Osmolarität von etwa 380 mosm/l auf einen physiologischen Wert von etwa 290 mosm/l erbrachte keinen Vorteil bezüglich der Intaktheit der Zellen bei geringerer Zellausbeute (Ergebnisse nicht dargestellt).

Unter den getesteten Methoden ist die unter Punkt 0 beschriebene Methode am besten zur Isolation der K-Zellen geeignet. Diese Methode ergab eine ausreichend hohe Anzahl morphologisch intakter Zellen.

## **3.3 Anreicherung der K-Zellen**

Zur Anreicherung der K-Zellen aus der gewonnenen Zellsuspension wurden das Magnetic Cell Sorting (MACS) und die immunomagnetische Trennung durch Dynabeads getestet. Die zu isolierenden Zellen wurden mit verschiedenen Antikörpern (siehe Tabelle 2-6) markiert und ihr Anreicherungsfaktor nach der immunomagnetischen Separation kontrolliert.

### **3.3.1 Zellanreicherung durch Magnetic Cell Sorting (MACS)**

Weder mit der Trennsäule Typ AS (für bis zu  $3 \times 10^7$  markierte Zellen) noch mit der Säule Typ RS (speziell für die Isolation seltener Zellen) konnte eine ausreichende Trennung der K-Zellen aus der Zellsuspension erreicht werden. Die Proben

flossen schlecht durch beide getesteten Säulentypen, bei Anwendung von Druck verschlechterte sich die Trenngenauigkeit. Zudem sank die mittlere Intaktheit der eluierten Zellen auf Werte unter 20 %.

Da vermutet wurde, daß die schlechten Fließeigenschaften durch eine zu hohe Viskosität (verursacht durch einen relativ hohen Schleimgehalt) der Proben entstand, wurden die Einzelzellsuspensionen enzymatisch mit Hyaluronidase vorbehandelt. Eine derartige Vorbehandlung blieb jedoch ohne den gewünschten Erfolg. Zudem sank die Intaktheit der Zellen durch diese Behandlung noch weiter.

Im Gegensatz zu Darmzellsuspensionen, die nach dem Auflösen des Zellverbandes nicht komplett aus Einzelzellen bestehen, funktionierte das "MACS"-Verfahren für Einzelzellgemische gut. Eine Anreicherung eosinophiler Granulozyten (1-3 % der Leukocyten) aus Vollblut gelang mit CD 16-gekoppelten Microbeads durch die Depletion neutrophiler Granulozyten nahezu vollständig.

Da mit dem „Magnetic Cell Sorting“ keine nennenswerte Anreicherung der K-Zellen (Anreicherungsfaktor  $<2$ ) erreicht werden konnte und somit kein Fortschritt gegenüber der bereits existierenden Elutriationsmethode erzielt werden konnte, wurde sie verworfen.

### **3.3.2 Zellanreicherung mit Dynabeads**

Die Trennung mittels Dynabeads erfolgt nicht in einer Säulenmatrix und wurde daher anschließend getestet. Die zu isolierenden K-Zellen sollten mit magnetischen Dynabeads markiert und in einem Magnetfeld von den restlichen Zellen getrennt werden.

#### **3.3.2.1 Auswahl des primären Antikörpers**

Unter standardisierten Bedingungen (siehe Versuchsdurchführung unter Punkt 2.3.2.1) wurde zunächst getestet, welcher der zur Verfügung stehenden Antikörper am besten zur Markierung der K-Zellen geeignet war.

Die Versuchsreihen zeigten, daß die Auswahl des verwendeten, primären Antikörpers großen Einfluß auf die Anreicherung der K-Zellen hatte. Antikörper gegen die Oberflächenantigene Syntaxin, Synaptophysin und N-CAM (siehe Tabelle 2-6) führten zu einer nur geringfügigen Anreicherung der K-Zellen (siehe Tabelle 3-3). Im Vergleich zu den Zahlen, die mittels der Elutriationstechnik erzielt werden konnten, konnte mit den Antikörpern gegen Syntaxin und gegen N-CAM keine deutliche Verbesserung der Anreicherung von K-Zellen erzielt werden. Die Anreicherung gelingt mit dem Syntaptophysin-Antikörper (Anreicherungsfaktor  $22 \pm 8$ ) besser als mit der Elutriationstechnik, mit der für K-Zellen ein maximaler Anreicherungsfaktor von rund 3 erzielt wurde [25].

Die Antikörper gegen humanspezifisches HLA I und HLA II, sowie gegen rattenspezifisches MHC-1 und MHC-2 führten zu keiner effizienten Abreicherung von Epithelzellen. Der Anteil der Zellen in der Fraktion mit den K-Zellen betrug immer noch zwischen 23 und 60 % aller zu Beginn isolierten Zellen. Formal ließ sich nur eine marginale Anreicherung der K-Zellen errechnen (siehe Tabelle 3-4).

Sehr viel effektiver konnten die K-Zellen mit dem Kaninchen anti-Mensch GIP-Antikörper (siehe Tabelle 2-6) markiert werden (siehe Tabelle 3-3). Hierfür ergab sich ein durchschnittlicher relativer K-Zellgehalt von 0,3 % und ein spezifischer Anreicherungsfaktor von  $209 \pm 32$ .

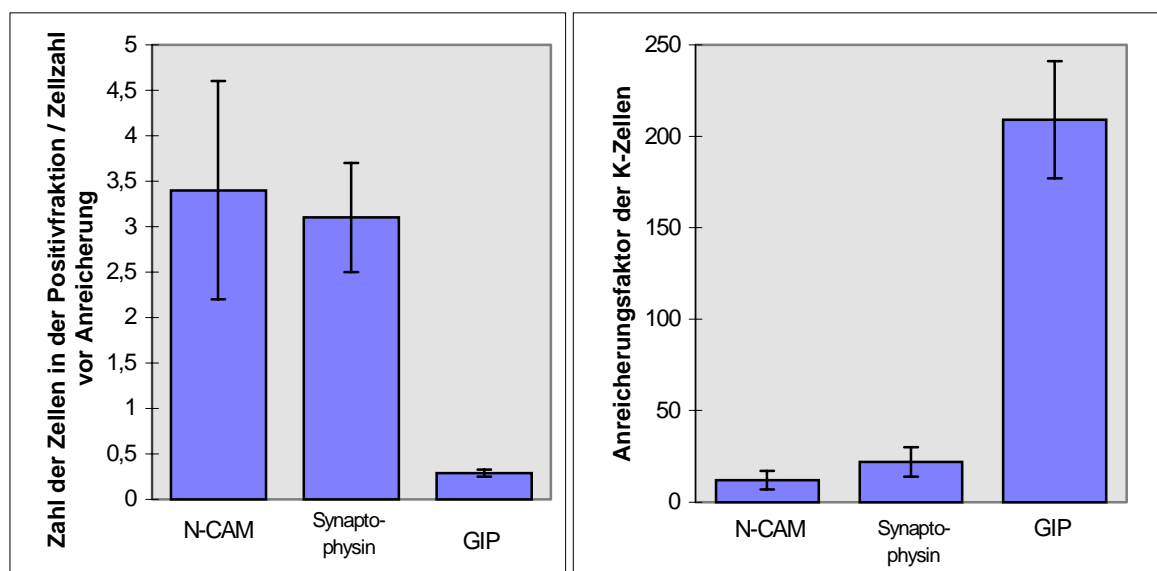
In den Versuchen ergab sich ein umgekehrt proportionales Verhältnis zwischen dem durchschnittlichen relativen K-Zellgehalt und dem entsprechenden spezifischen Anreicherungsfaktor (siehe Abbildung 3-7).

**Tabelle 3-3: Anreicherungsfaktoren für K-Zellen bei der Verwendung verschiedener primärer Antikörper. N-CAM = Neural Cell Adhesion Molecule**

Antikörper	Typ	Anzahl der Versuche	Verhältnis der Zellzahlen Positivfraktion/ Zellzahl vor Anreicherung	Spezifischer Anreicherungsfaktor
Syntaxin	monoklonaler Maus anti-Ratte IgG <sub>1</sub>	7	3,8 ± 0,8	6 ± 3
Synaptophysin	monoklonaler Maus anti-Ratte IgG <sub>1</sub>	10	3,1 ± 0,6	22 ± 8
N - CAM	monoklonaler Maus anti-Ratte IgG <sub>1</sub>	8	3,4 ± 1,2	12 ± 5
GIP	polyklonaler Kaninchen anti-Mensch IgG	7	0,29 ± 0,04	209 ± 32

**Tabelle 3-4: Ergebnisse der Versuche zur Anreicherung der K-Zellen durch Abreicherung von Epithelzellen. MHC-1 = Major Histocompatibility Complex I, MHC-2 = Major Histocompatibility Complex II, HLA I = Human Leucocyte Antigen I, HLA II = Human Leucocyte Antigen II**

Antikörper	Typ	Anzahl der Versuche	Verhältnis der Zellzahlen Positivfraktion/ Zellzahl vor Anreicherung	Spezifischer Anreicherungsfaktor
MHC-1	monoklonaler Maus anti-Ratte IgG <sub>1</sub>	3	23 ± 6	1,8 ± 0,4
MHC-2	monoklonaler Maus anti-Ratte IgG <sub>1</sub>	6	27 ± 4	1,5 ± 0,2
HLA I	Dynabead-gekoppelter anti-Mensch IgG <sub>1</sub>	7	31 ± 8	2,2 ± 0,3
HLA II	Dynabead-gekoppelter anti-Mensch IgG <sub>1</sub>	11	60 ± 7	1,5 ± 0,2



**Abbildung 3-7: Relativer K-Zellgehalt im Vergleich zum Anreicherungsfaktor.** Dargestellt ist links der relative Gehalt an K-Zellen in der Ausgangsfraction, der sich nach Anreicherung mit den drei verschiedenen Antikörpern ergibt; rechts der mit den entsprechenden Antikörpern erzielte Anreicherungsfaktor. N-CAM = Neural Cell Adhesion Molecule, GIP = Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide. Die zusätzlichen Linien stellen den Standardfehler der Mittelwerte (SEM) dar.

Da mit dem oben genannten GIP-Antikörper die mit Abstand höchsten Anreicherungsfaktoren erzielt wurden, wurde er für alle weiteren Anreicherungsversuche als primärer Antikörper benutzt.

#### 3.3.2.2 Optimierung der Standardbedingungen

##### Auswahl zwischen direktem und indirektem Trennverfahren

Bei Tests mit den HLA I und II Antikörpern, die vom Hersteller aus direkt an die Dynabeads gekoppelt waren, konnte nur die direkte Technik eingesetzt werden.

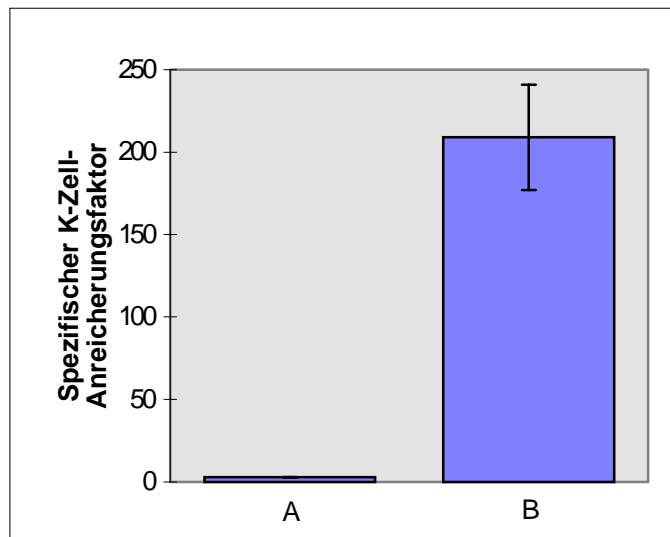
Für alle anderen Antikörper zeigte sich, daß der Einsatz der indirekten Technik im Vergleich zur direkten Technik (siehe Punkt 2.3.2) effektiver war; die spezifischen Anreicherungsfaktoren betrugen bei Einsatz der direkten Technik nahe null im Vergleich zur indirekten Technik mit  $209 \pm 32$ .

##### Dauer der Inkubation mit dem primären Antikörper

Eine 15 bis 30-minütige Inkubationszeit reichte zur Markierung der K-Zellen mit dem primären Antikörper nicht aus. Der spezifische Anreicherungsfaktor lag hierbei unter 2. Hohe Anreicherungsfaktoren ( $209 \pm 32$ ) konnten dagegen bei einer Inkubationszeit von 60 min erzielt werden (siehe Abbildung 3-8). Eine weitere Steigerung der Zeitspanne auf 120 min erbrachte keinen Vorteil; daher wurde die Inkubationszeit bei 60 min belassen.

##### Verhältnis der eingesetzten Antikörpermenge zur Zellzahl

Im Verlauf der Untersuchungen zeigte sich in Übereinstimmung zu den Empfehlungen des Herstellers (siehe Punkt 2.3.2), daß eine Antikörpermenge von etwa  $10 \mu\text{g}$  pro  $10^6$  Zellen für eine optimale Markierung der K-Zellen sorgte.



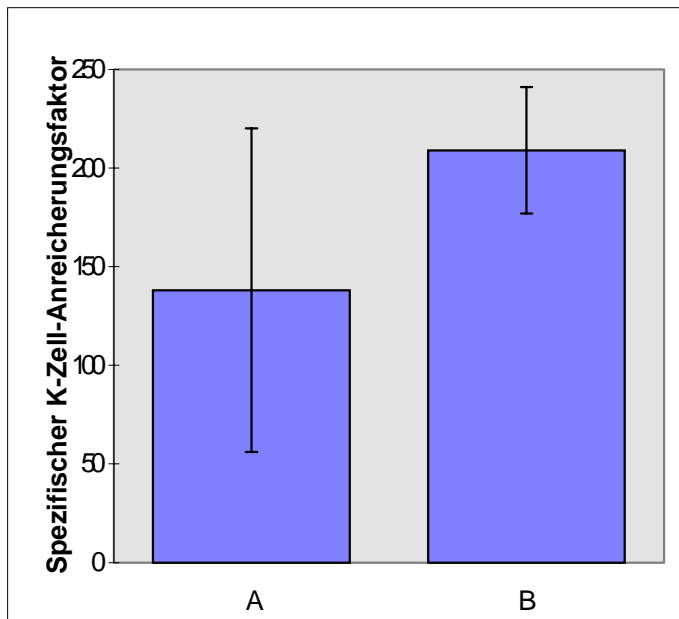
**Abbildung 3-8: K-Zellanreicherung in Abhängigkeit von der Dauer der Inkubation mit dem primären Antikörper.** Eine Inkubationszeit von 60 min mit dem primären GIP-Antikörper erlaubt im Vergleich zu einer Inkubationszeit von 15 min eine signifikant höhere K-Zellanreicherung. Säule A: Inkubation mit dem primären GIP-Antikörper für 15 min, Säule B: Inkubation mit dem primären GIP-Antikörper für 60 min (sonst identische Bedingungen).

#### Dauer der Inkubation des sekundären Antikörpers

Bei einer Inkubationszeit des Dynabead-gekoppelten, sekundären Antikörpers von 1 min konnten zwar schon befriedigende Anreicherungen der K-Zellen erzielt werden, d.h. es konnte eine rund 60 %ige Trennung der markierten von den nicht-markierten Zellen erzielt werden und der spezifische Anreicherungsfaktor betrug durchschnittlich  $138 \pm 82$ , die Anreicherungsfaktoren erhöhten sich jedoch ab einer Inkubationszeit von 2 min nochmals. Die besten Ergebnisse brachten 15-minütige Inkubationen. Hierbei konnte ein durchschnittlicher spezifischer Anreicherungsfaktor von  $209 \pm 32$  erzielt werden (siehe auch Abbildung 3-9). Bei allen weiteren Versuchen wurde die Zellsuspension daher 15 min mit den Dynabeads inkubiert.

Als unverzichtbar zur Erzielung hoher Anreicherungsfaktoren erwiesen sich die zwei Waschschrte der Positivfraktion nach der Inkubation. Dadurch konnten nicht-markierte Zellen entfernt werden, die zunächst durch unspezifische Bindungen an markierten Zellen oder Dynabeads angehaftet hatten und dadurch mit den K-Zellen an den Magneten gezogen worden waren.





**Abbildung 3-9: K-Zellanreicherung in Abhängigkeit von der Dauer der Inkubation mit dem Dynabead-gekoppelten, sekundären Antikörper.** Eine Inkubationszeit von 15 min mit dem Dynabead-gekoppelten, sekundären Antikörper bewirkt im Vergleich zu einer Inkubationszeit von 1 min eine (nicht signifikant) höhere K-Zellanreicherung. Säule A: Inkubation mit dem sekundären Antikörper 1 min, Säule B: Inkubation mit dem sekundären Antikörper 15 min (sonst identische Bedingungen).

#### Verhältnis der Zahl der eingesetzten Dynabeads zur Zellzahl

Für eine ausreichende Markierung der K-Zellen mit den Dynabeads war, wie vom Hersteller angegeben [100], ein Verhältnis von 12:1 optimal.

#### Durchführung des Verfahrens bei Raumtemperatur

Zur Vermeidung unspezifischer Wechselwirkungen zwischen den Antikörpern und den zu markierenden Antigenen sowie zur Verlangsamung des Zellmetabolismus wurde normalerweise eine Arbeitstemperatur von 4 °C gewählt. Wurden die Anreicherungsversuche bei Raumtemperatur (etwa 22 °C) durchgeführt, so lagen die Intaktheiten der K-Zell-angereicherten Fraktionen etwas niedriger als vorher, der spezifische Anreicherungsfaktor sank auf nahe 0. Daher wurden weiterhin alle Versuche auf Eis ausgeführt.

### Vergleich der getesteten Puffersysteme

Um die Intaktheiten der K-Zell-angereicherten Fraktionen weiter zu verbessern, wurden einige Versuche durchgeführt, bei denen der bisher verwendete PBS/EDTA-Puffer durch andere, protektive Lösungen ersetzt wurde. Getestet wurden zwei Lösungen, die für den Einsatz bei Organtransplantationen entwickelt worden waren. Da sich die Zellen aber sowohl in der UW-Lösung als auch in der Euro-Collins-Lösung zu Zellaggregaten zusammenlagerten, wurde die Trennung der Zellen stark beeinträchtigt. Die Lösungen kamen somit für weitere Versuche nicht in Frage. Auch der Einsatz des Kulturmediums DMEM erbrachte keine Erhöhung der Intaktheiten bei gleichem K-Zell-Anreicherungsfaktor.

Zusätzlich zu den oben genannten Lösungen wurde eine kaliumreiche Krebs-Ringer-Lösung getestet. Diese sollte die Zellen bei niedrigen Temperaturen durch eine Blockierung des Natrium- und Kaliumionentransports schützen, bot jedoch keine weitere Verbesserung der Intaktheiten bis zur Beendigung des jeweiligen Versuchs (Ergebnisse nicht dargestellt).

Für alle weiteren Versuche wurde daher der beschriebene EDTA/PBS-Puffer eingesetzt.

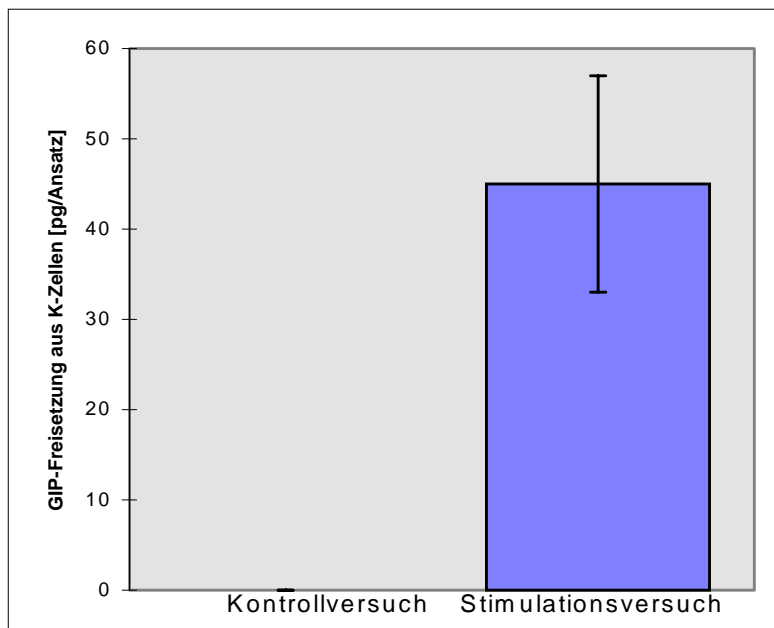
### Optischer Nachweis der Anreicherung durch Immunfluoreszenz

Die Anreicherung der K-Zellen in den Positivfraktionen sollte auch immuncytochemisch nachgewiesen werden, dies scheiterte jedoch daran, daß der primäre Antikörper aus nur einer Spezies zur Verfügung stand. Dieser bildete Brücken zwischen dem fluoreszierenden, zweiten Antikörper und dem mit Dynabeads gekoppelten Antikörper, so daß alle Dynabeads leuchteten und eine sinnvolle Auswertung der Versuche nicht möglich war.

## **3.4 Glucose-Stimulierbarkeit der K-Zellen *in vitro***

Durch Stimulationsversuche konnte gezeigt werden, daß die Zellsuspensionen, in denen die K-Zellen stark angereichert worden waren (siehe Punkt 3.3.2), auf einen Glucosereiz (20 mmol/l) mit der Ausschüttung von GIP reagierten, während

bei einer Kontrollfraktion mit gleicher Zellzahl kein GIP im Überstand der Zellen gemessen werden konnte (siehe Abbildung 3-10).



**Abbildung 3-10: Stimulation der GIP-Sekretion aus angereicherten K-Zellen.** Dargestellt sind die GIP-Gehalte [in pg / Ansatz] der Überstandsfraktion aus den Stimulationsversuchen (stimuliert mit 20 mmol/l Glucose) im Vergleich zu den Gehalten der Überstandsfraktion aus dem Kontroll (Blind-)versuch (mit Pufferzusatz). Die zusätzliche Linie markiert den Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

