

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Isolierung und Anreicherung der enteroendokrinen  
K-Zellen aus Rattendarmmucosa**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Haushalts- und Ernährungswissenschaften  
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Dipl. oec. troph. Jutta Maaß  
aus Friedberg

Gießen im September 1999

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dr. A. Gardemann
2. Prof. Dr. H. Daniel

Tag der Disputation:

18.12.1999

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), Bonn finanziert.

„Wenn Kinder klein sind, gib ihnen Wurzeln,

wenn sie groß sind, gib ihnen Flügel.“

(U. Neumann)

Meinen Eltern



---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 PROBLEMSTELLUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Diabetes mellitus - Aktuelle Therapieansätze .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Theorie einer neuen Behandlungsmethode.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Enteroendokrine K- und L-Zellen - Lokalisation, Isolation und Anreicherung.....</b>	<b>6</b>
<b>1.4 Zusammenfassung der Aufgabenstellung .....</b>	<b>13</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Lokalisation der K- und L-Zellen im Darm der Ratte .....</b>	<b>16</b>
2.1.1 Immunhistochemische Lokalisation der K- und L-Zellen .....	16
2.1.1.1 Herstellung von Gefrierschnitten .....	18
2.1.1.2 Einfachmarkierung durch Immunfluoreszenz .....	18
2.1.1.3 Gegenfärbung mit Propidiumjodid.....	20
2.1.1.4 Doppelmarkierung durch Immunfluoreszenz.....	20
2.1.1.5 Negativkontrollen.....	20
2.1.2 Untersuchung der Verteilung der K- und L-Zellen über die gesamte Darmlänge.....	21
2.1.2.1 Die Schabtechnik .....	21
2.1.2.2 Bestimmung des GIP- und GLP-1-Gehaltes der Fraktionen durch Radioimmunoassay.....	22
2.1.2.3 Bestimmung des Proteingehalts der Fraktionen.....	23
2.1.3 Lokalisation der K- und L-Zellen entlang der Villus-Krypt-Achse.....	23
2.1.3.1 Die Ausschütteltechnik .....	24
2.1.3.2 Colorimetrische Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase.	25
2.1.3.3 Bestimmung der Thymidinkinase-Aktivität mittels Radioenzymassay .....	26

---

<b>2.2 Isolation der K- Zellen aus Duodenum .....</b>	<b>27</b>
2.2.1 Mechanische Isolation der K-Zellen.....	27
2.2.2 Enzymatische Zellisolation .....	28
2.2.2.1 Isolation .....	28
2.2.2.2 Hämalaun-Eosin-Färbung.....	29
2.2.3 Isolation der K-Zellen in hyperosmolarem Chelatpuffer.....	30
<b>2.3 Anreicherung der K-Zellen.....</b>	<b>32</b>
2.3.1 Zellanreicherung durch Magnetic Cell Sorting (MACS) .....	33
2.3.2 Zellanreicherung mit Dynabeads .....	36
2.3.2.1 Standardversuch und Variationen .....	38
<b>2.4 Nachweis der Anreicherung und der Glucose-Stimulierbarkeit der K-Zellen <i>in vitro</i>.....</b>	<b>41</b>
<b>2.5 Statistik.....</b>	<b>41</b>
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>43</b>
<b>3.1 Lokalisation der K- und L-Zellen im Darm der Ratte .....</b>	<b>43</b>
3.1.1 Immunhistochemische Lokalisation der K- und L-Zellen .....	43
3.1.2 Untersuchung der Verteilung der K- und L-Zellen über die gesamte Darmlänge .....	45
3.1.3 Lokalisation der K- und L-Zellen entlang der Villus-Krypt-Achse.....	48
<b>3.2 Isolation der K-Zellen .....</b>	<b>51</b>
3.2.1 Isolation von K-Zellen aus Duodenum.....	51
3.2.1.1 Ergebnisse der mechanischen Zellisolationsversuche .....	51
3.2.1.2 Ergebnisse der enzymatischen Zellisolationsversuche .....	52
3.2.1.3 Ergebnisse der Versuche mit hyperosmolarem Chelatpuffer .....	52
<b>3.3 Anreicherung der K-Zellen.....</b>	<b>53</b>
3.3.1 Zellanreicherung durch Magnetic Cell Sorting (MACS) .....	53
3.3.2 Zellanreicherung mit Dynabeads .....	54
3.3.2.1 Auswahl des primären Antikörpers .....	54
3.3.2.2 Optimierung der Standardbedingungen.....	57

---

<b>3.4 Glucose-Stimulierbarkeit der K-Zellen <i>in vitro</i> .....</b>	<b>60</b>
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>63</b>
<b>4.1 Lokalisation der K- und L-Zellen .....</b>	<b>63</b>
<b>4.2 Isolation der K-Zellen .....</b>	<b>66</b>
<b>4.3 Anreicherung der K-Zellen.....</b>	<b>69</b>
4.3.1 Zellanreicherung durch Magnetic Cell Sorting (MACS) .....	69
4.3.2 Zellanreicherung mit Dynabeads.....	70
<b>4.4 Glucosesensitivität der K-Zellen.....</b>	<b>74</b>
<b>4.5 Ausblick auf die Fortführung der Versuchsplanung .....</b>	<b>75</b>
<b>4.6 Die Signalkette zwischen K- und L-Zellen.....</b>	<b>79</b>
4.6.1 Erkenntnisse aus der Literatur.....	79
4.6.2 Erkenntnisse aus den Versuchen zur Lokalisation der K- und L-Zellen .....	82
<b>4.7 Schlußfolgerungen und Ausblick .....</b>	<b>85</b>
4.7.1 Weitere, neue Fragen, die sich aus der Lokalisation der K- und L-Zellen ergeben .....	85
4.7.2 Neue Entwicklungen in der Therapie des Diabetes mellitus.....	85
4.7.3 Resümee .....	90
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>91</b>
<b>6 LITERATUR .....</b>	<b>93</b>

---

## Verzeichnis der Tabellen

TABELLE 2-1: ABSORPTIONS- UND EMISSIONSMAXIMA DER FLUORESZENZ-FARBSTOFFE FITC, TRITC, CY2 UND CY3.....	17
TABELLE 2-2: ÜBERSICHT ÜBER DIE BEI DEN IMMUNHISTOCHEMISCHEN VERSUCHEN VERWENDETEN ANTIKÖRPER .....	19
TABELLE 2-3: ÜBERSICHT DER ZUR K-ZELL-ISOLATION VERWENDETEN COLLAGENASEN .....	28
TABELLE 2-4: ABFOLGE DER AUFSTIEGENDEN ALKOHOLREIHE ZUR ENTWÄSSERUNG VON BIOLOGISCHEM UNTERSUCHUNGSMATERIAL...29	
TABELLE 2-5: VARIATIONEN DER INKUBATIONSBEDINGUNGEN ZUR K-ZELL-ISOLATION.....	31
TABELLE 2-6: ÜBERSICHT ÜBER DIE ZUR ISOLATION DER K-ZELLEN GETESTETEN PRIMÄREN ANTIKÖRPER .....	39
TABELLE 2-7: FAKTOREN ZUM UMRECHNEN DER ZELLZAHL AUF DIE ZUR ISOLATION DER K-ZELLEN EINZUSETZENDE MENGE AN DYNABEADS...39	
TABELLE 3-1: GIP-VERTEILUNG ÜBER DIE DARMLÄNGE IM RATTENDARM. ....	46
TABELLE 3-2: GLP-1-VERTEILUNG ÜBER DIE DARMLÄNGE IM RATTENDARM .....	47
TABELLE 3-3: ANREICHERUNGSFAKTOREN FÜR K-ZELLEN BEI DER VERWENDUNG VERSCHIEDENER PRIMÄRER ANTIKÖRPER.....	56
TABELLE 3-4: ERGEBNISSE DER VERSUCHE ZUR ANREICHERUNG DER K-ZELLEN DURCH ABREICHERUNG VON EPITHELZELLEN. ....	56
TABELLE 4-1: DURCH ELUTRIATION ERZIELTE ANREICHERUNGEN ENDOKRINER ZELLEN. ....	70



---

## Verzeichnis der Abbildungen

ABBILDUNG 1-1: VEREINFACHT DARGESTELLTER MECHANISMUS ZUR INSULINSEKRETION AUS $\beta$ -ZELLEN DES PANKREAS.....	4
ABBILDUNG 1-2: SEQUENZEN VON GLUCOSE-DEPENDENT INSULINOTROPIC POLYPEPTIDE (GIP) BEI MENSCH UND RATTE .....	7
ABBILDUNG 1-3: PROZESSIERUNG VON PRÄPROGLUCAGON IN DEN L-ZELLEN ..	9
ABBILDUNG 1-4: SEQUENZ VON GLUCAGON-LIKE PEPTIDE 1 (1-37).....	9
ABBILDUNG 2-1: SCHEMA DER ANTIGEN-ANTIKÖRPER-BINDUNGEN BEI DER IMMUNFLUORESCENZMARKIERUNG.....	19
ABBILDUNG 2-2: NACHWEISREAKTION ZUR MESSUNG DER AKTIVITÄT VON ALKALISCHER PHOSPHATASE.....	26
ABBILDUNG 2-3: VERSUCHSAUFBAU ZUR ISOLATION VON K-ZELLEN IN HYPEROSMOLAREM CHELATPUFFER .....	31
ABBILDUNG 2-4: BINDUNG ZWISCHEN EINER ZELLE UND EINEM MAGNETISCHEN TEILCHEN BEI DER IMMUNOMAGNETISCHEN ZELLSEPARATION.....	32
ABBILDUNG 2-5: DIREKTE UND INDIREKTE TECHNIK BEI DER IMMUNOMAGNETISCHEN ZELLSEPARATION.....	33
ABBILDUNG 2-6: DAS VERFAHREN ZUR ZELLANREICHERUNG MIT MACS.....	34
ABBILDUNG 2-7: FUNKTIONSWEISE DER DYNABEADS .....	37
ABBILDUNG 3-1: A) K-ZELLE AUS DEM DUODENUM DER RATTE B) L-ZELLE AUS DEM ILEUM DER RATTE.....	44
ABBILDUNG 3-2: A) K-ZELLE AUS DEM DUODENUM DER RATTE B) L-ZELLE AUS DEM ILEUM DER RATTE .....	45
ABBILDUNG 3-3: GIP-VERTEILUNG ÜBER DIE DARMLÄNGE .....	46
ABBILDUNG 3-4: GLP-1-VERTEILUNG ÜBER DIE DARMLÄNGE .....	47
ABBILDUNG 3-5: VERLAUF DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄTEN AN ALKALISCHER PHOSPHATASE (AP) UND THYMIDINKINASE (TK) ENTLANG DER VILLUS-KRYPT-ACHSE A) IM KOMPLETTEN DÜNNDARM B) IM PROXIMALEN TEIL (DUODENUM UND PROXIMALES JEJUNUM) C) IM DISTALEN TEIL DES RATTENDARMS (DISTALES JEJUNUM UND ILEUM) .....	49

---

ABBILDUNG 3-6: VERLAUF DER SPEZIFISCHEN GIP- UND GLP-1-KONZENTRATIONEN ENTLANG DER VILLUS- KRYPT-ACHSE	
A) IM KOMPLETTEN DÜNNDARM	
B) IM PROXIMALEN TEIL (DUODENUM UND PROXIMALES JEJUNUM)	
C) IM DISTALEN TEIL DES RATTENDARMS (DISTALES JEJUNUM UND ILEUM) .....	51
ABBILDUNG 3-7: RELATIVER K-ZELLGEHALT IM VERGLEICH ZUM ANREICHERUNGSFAKTOR.....	56
ABBILDUNG 3-8: K-ZELLANREICHERUNG IN ABHÄNGIGKEIT VON DER DAUER DER INKUBATION MIT DEM PRIMÄREN ANTIKÖRPER .....	58
ABBILDUNG 3-9: K-ZELLANREICHERUNG IN ABHÄNGIGKEIT VON DER DAUER DER INKUBATION MIT DEM DYNABEAD-GEKOPPELTEN, SEKUNDÄREN ANTIKÖRPER .....	59
ABBILDUNG 3-10: STIMULATION DER GIP-SEKRETION AUS ANGEREICHERTEN K-ZELLEN.....	61
ABBILDUNG 4-1: NÄHRSTOFFABSORPTION IM DARM DES MENSCHEN .....	83

---

## Verzeichnisse der Abkürzungen

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
AtT20	Zelllinie, aus dem Hypophysenvorderlappen von Mäusen gewonnen
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Konzentration
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCK	Cholecystokinin
CD	Cluster of Differentiation, Differenzierungscluster
cDNA	Complementary DNA oder copy-DNA
Cy2	Carbocyanin
Cy3	Indocarbocyanin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Kulturmedium)
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis( $\beta$ -aminoethylether)-tetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EHS	Abkürzung für die Namen der Forscher Engelbreth, Holm und Swarm, eingehend in den Namen „Biomatrix EHS“
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
<i>g</i>	Normwert der Fallbeschleunigung: 9,81 m / s <sup>2</sup>
GIP	Gastric Inhibitory Polypeptide oder Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide
GLC	Glucose
GLC - 6- P	Glucose-6-phosphat
GLP-1	Glucagon-like Polypeptide
GLP-2	Glucagon-like Peptide 2
GLUT2	Glucosetransporter 2
GRP	Gastrin Related Peptide
GRPP	Glicentin-Related Pancreatic Peptide
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution

HLA I	Human Leucocyte Antigene I
HLA II	Human Leucocyte Antigene II
IDDM	Insulin-dependent Diabetes mellitus
IGF	Insulin-like Growth Factor
IgG	Immunglobulin G
MACS	Magnetic Cell Sorting
MHC-1	Major Histocompatibility Complex 1
MHC-2	Major Histocompatibility Complex 2
MIN	Mausinsulinom-Zelllinie
N-CAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NIDDM	Non-Insulin-Dependent Diabetes mellitus
PBS	Phosphate Buffered Salt Solution
PC2	Peptid Convertase 2
PC3	Peptid Convertase 3
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
REA	Radioenzymassay
RIA	Radioimmunoassay
RIN	Ratteninsulinom-Zelllinie
SD	Standardabweichung (Standard Deviation)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (Standard Error of the Mean)
SGLT1	Sodium-Glucose-Transporter 1
TK	Thymidinkinase
TRITC	Tetramethylrhodamin-isothiocyanat
UW-Lösung	University-of-Wisconsin-Lösung
VIP	Vasoactive Intestinal Peptide
$\beta$ -TC	$\beta$ -Tumor-Zelllinie

---

Dreibuchstabencode für Aminosäuren

Ala	= Alanin	Leu	= Leucin
Arg	= Arginin	Lys	= Lysin
Asn	= Asparagin	Met	= Methionin
Asp	= Asparaginsäure	Phe	= Phenylalanin
Cys	= Cystein	Pro	= Prolin
Gln	= Glutamin	Ser	= Serin
Glu	= Glutaminsäure	Thr	= Threonin
Gly	= Glycin	Trp	= Tryptophan
His	= Histidin	Typ	= Tyrosin
Ile	= Isoleucin	Val	= Valin



# 1 Problemstellung

## 1.1 Diabetes mellitus - Aktuelle Therapieansätze

In den westlichen Industrieländern sind etwa 3 % der Bevölkerung Diabetiker; damit ist der Diabetes mellitus die am häufigsten vorkommende Stoffwechselerkrankung. Von klinischer Bedeutung sind vor allem der Typ I-Diabetes (IDDM, Insulin dependent diabetes mellitus) und der Typ II-Diabetes (NIDDM, Non-insulin-dependent diabetes mellitus). Der Typ I-Diabetes ist eine Autoimmunerkrankung mit immunogenetischem Hintergrund, bei der die Langerhansschen Inselzellen des Pankreas zerstört werden, was zu einem absoluten Insulinmangel führt. Die Ursachen des Typ II-Diabetes liegen entweder in einer verminderten Glucose-sensitivität der  $\beta$ -Zellen des Pankreas, woraus ein relativer Insulinmangel resultiert, oder einer peripheren Insulinresistenz [1].

Die Erkrankung ist meistens mit Begleit- und Folgekrankheiten (wie einer Makroangiopathie, Retinopathie, Neuropathie oder Nephropathie) verbunden. Diese können die Lebensqualität und die Lebenserwartung der Patienten deutlich herabsetzen. Außerdem verursacht deren Behandlung hohe Kosten. Um das Ausmaß der Begleit- und Folgekrankheiten möglichst gering zu halten, ist daher eine gute Einstellung des Blutglucosespiegels unbedingt anzustreben [2, 3].

Typ II-Diabetikern wird derzeit zunächst eine Normalisierung des Körpergewichts empfohlen sowie eine angemessene Diät, verbunden mit viel Bewegung [4]. Wenn nötig, werden orale Antidiabetika eingesetzt. Hierbei handelt es sich in erster Linie um Sulfonylharnstoffe, die die Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen stimulieren, um Biguanide oder um  $\alpha$ -Glucosidasehemmer, die die Disaccharid-Spaltung hemmen. Wenn die  $\beta$ -Zellen versagen, wird eine Therapie mit Insulin nötig, wie sie auch bei Typ I-Diabetikern angewandt wird. Hierbei unterscheidet man zwischen der konventionellen und der intensivierten Insulintherapie. Mittlerweile wird in den meisten Fällen die intensivierte Therapie angewandt, bei der die zu injizierende Insulinmenge flexibel an die physiologischen Bedürfnisse (Nahrungsaufnahme, Sport) des Patienten angepaßt wird. Selbst mit der intensivierten Insulintherapie ist aber keine vollständige Wiederherstellung der

Glucose-Homöostase möglich [5]. Außerdem ist der Erfolg der Therapie stark von der Einsicht und Disziplin des Patienten abhängig.

Aus diesem Grund wird für insulinpflichtige Diabetiker (Typ I-Diabetiker sowie Typ II-Diabetiker, die nicht mehr ohne Insulin behandelt werden können, sogenannte „Therapie-Versager“) nach alternativen Behandlungsmethoden gesucht.

Ideal wäre hierfür ein geschlossenes System, in dem das Hormon an den metabolischen Bedarf angepaßt ausgeschüttet wird, so daß der Diabetiker selbst keine Parameter mehr zu kontrollieren hätte. Zu dieser Überlegung gibt es drei wissenschaftliche Ansätze [6]:

1. Es können mechanische Geräte entwickelt werden, die nach Detektion des Blutglucosespiegels automatisch eine adäquate Menge an Insulin freisetzen (Insulinpumpen). Verschiedene Probleme (u.a. die Störanfälligkeit der Systeme) haben jedoch verhindert, daß sich derartige Geräte in der Therapie des insulinabhängigen Diabetes durchgesetzt haben.
2. Neben der Transplantation des kompletten Pankreas ist die Inselzelltransplantation eine Möglichkeit, die derzeit intensiv untersucht wird. Diese Methode ist aber noch mit vielen Schwierigkeiten verbunden: Inselzellen können zwar schon isoliert und transplantiert werden; um Abstoßungsreaktionen zu vermeiden, müssen die Patienten aber lebenslanglich Medikamente zur Immunsuppression einnehmen. Auch die dauerhafte und ausreichende Hormonproduktion ist noch nicht gesichert. Ein großes Problem besteht darin, daß für eine Transplantation humaner Inselzellen zu wenig Spenderorgane zur Verfügung stehen. So erfolgen Transplantationen in der Regel nur bei Patienten, die bereits erhebliche Komplikationen der diabetischen Grunderkrankung entwickelt haben, und dann dadurch meist in Form einer doppelten Transplantation (z.B. Inseln und Niere). Ziel einer Therapie sollte aber bereits die *Vermeidung* von Komplikationen sein. Zur Umgehung der Immunabwehr wurden Versuche durchgeführt, bei denen die Inselzellen in Kunststoffhüllen eingebettet wurden. Auch bei dieser Methode ist eine dauerhafte Funktion der Zellen noch ungewiß [7].



3. Da die bisher entwickelten Verfahren zur Therapie des insulinpflichtigen Diabetes mellitus unzureichend sind, muß nach weiteren Methoden gesucht werden. Eine neuer Ansatz ist die Genterapie.

## 1.2 Theorie einer neuen Behandlungsmethode

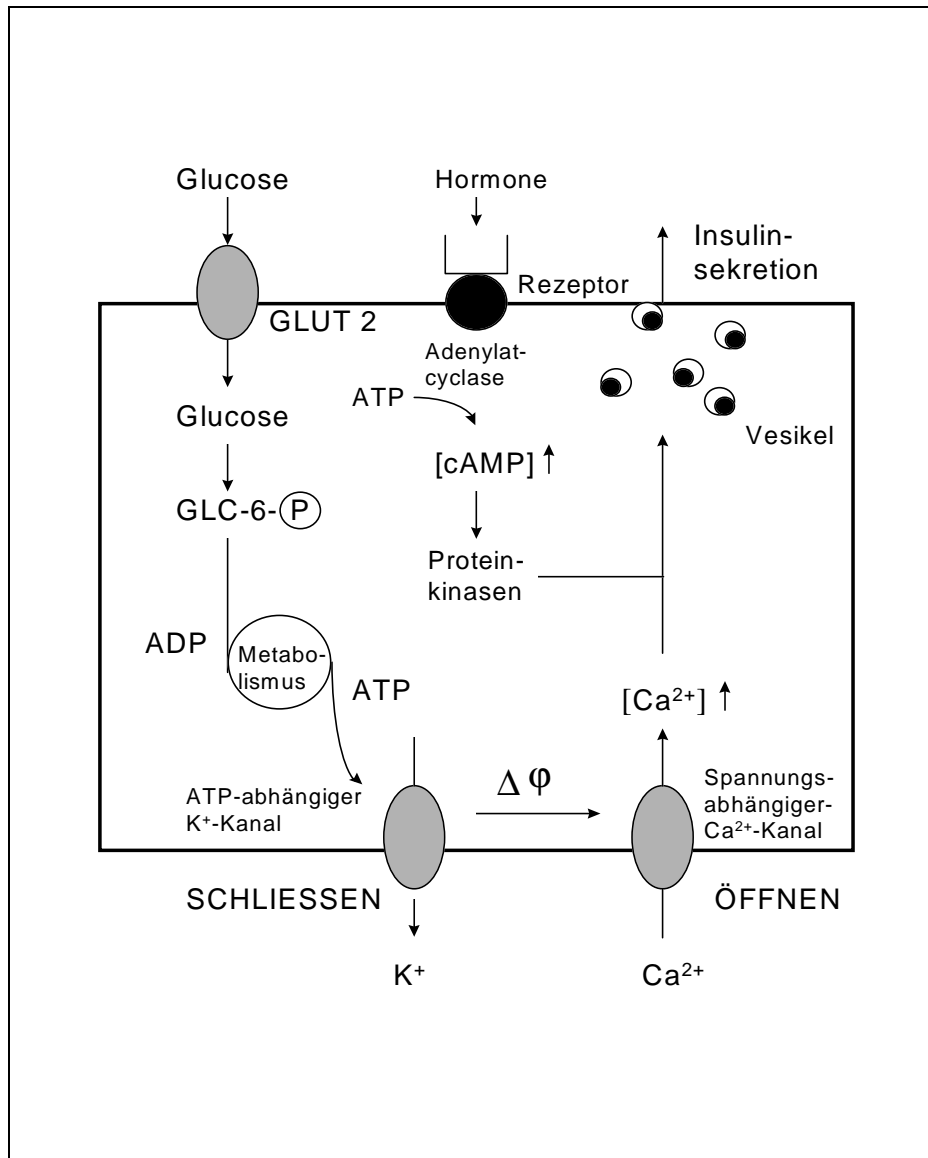
### Der Genterapieansatz

Die Idee des Genterapieansatzes liegt in der Herstellung "künstlicher  $\beta$ -Zellen" [8], die im folgenden als  $\beta$ -Ersatzzellen bezeichnet werden. Autologe Zellen sollen isoliert und angereichert werden, um dann mit Insulingenkonstrukten (mit geeignetem Promotor) transfiziert zu werden. Nach Reinfusion und Anheftung, z.B. in der Leber, sollen diese zur glucose-regulierten Insulinsynthese, -prozessierung und -sekretion fähig sein.

Um diese Anforderungen erfüllen zu können, müssen die in Frage kommenden Zellen den natürlichen  $\beta$ -Zellen funktionell möglichst ähnlich sein.

### Mechanismus der Insulinsekretion aus den $\beta$ -Zellen des Pankreas

Glucose wird über den Glucosetransporter GLUT2 in die  $\beta$ -Zelle aufgenommen und intrazellulär durch Hexokinase I und Glucokinase, die in jeweils gleicher Konzentration vorkommen, verstoffwechselt. Glucokinase fungiert in Kombination mit GLUT2 als „Glucose-Sensor“ der Zelle. Durch die Metabolisierung der Glucose entsteht ATP, welches eine Schließung der Kaliumionen-Kanäle bewirkt. Dadurch wird die Zellmembran depolarisiert und Calciumionen-Kanäle öffnen sich. Der Einstrom von Calciumionen in die  $\beta$ -Zelle führt zur Sekretion des in Granula gespeicherten Insulins (siehe Abbildung 1-1) [5].



**Abbildung 1-1:** Vereinfacht dargestellter Mechanismus zur Insulinsekretion aus  $\beta$ -Zellen des Pankreas. GLUT2 = Glucosetransporter 2, GLC-6-P = Glucose-6-phosphat, ADP = Adenosindiphosphat, ATP = Adenosintriphosphat,  $\Delta\phi$  = Änderung des Membranpotentials,  $[X]\uparrow$  = Zunahme der Konzentration von Substanz X.

### Voraussetzungen für potentielle $\beta$ -Ersatzzellen

Zellen, die als  $\beta$ -Ersatzzellen genutzt werden sollen, müssen mehrere Anforderungen erfüllen:

- Sie sollen den natürlichen  $\beta$ -Zellen funktionell möglichst ähnlich sein, um die Zahl der Transfektionen so gering wie nötig zu halten. Aus diesem Grund sollten die Zellen GLUT2-Glucosetransporter und Glucokinase exprimieren [9], sie müssen physiologisch auf einen Glucosereiz reagieren und die nötigen Enzyme zur Prozessierung des Insulins aus dem Prärohormon (Peptid

Convertasen 2 und 3: PC2 und PC3) besitzen. Zur Speicherung des Insulins sollen Granula gebildet werden können.

- b) Um Abstoßungsreaktionen oder weiteren technischen Aufwand zu vermeiden, ist es sinnvoll, autologe Zellen einzusetzen. Diese müssen in einem einfachen, risikoarmen und wiederholbaren Eingriff gewonnen werden und stabil transfizierbar sein.

### Versuche zur Herstellung künstlicher $\beta$ -Zellen

Zur Herstellung von  $\beta$ -Ersatzzellen sind bereits einige Untersuchungen durchgeführt worden. Meistens wurden *Zelllinien* eingesetzt, die aus  $\beta$ -Zell-Tumoren von Nagetieren gewonnen wurden (RIN,  $\beta$ -TC, MIN) oder aus dem Hypophysenvorderlappen von Mäusen stammen (neuroendokrine AtT20-Zellen) und sowohl PC2 als auch Glucokinase exprimieren [10,11].

Die cDNA zur Expression von humanem Proinsulin konnte mit einem viralen Promotor bereits in AtT20-Zellen transfiziert werden (AtT20ins) [12]. Durch zusätzliche Transfektion des GLUT2-Gens waren die Zellen in der Lage, Insulin auf einen Glucosereiz hin auszuschütten, allerdings erfolgte die Insulinsekretion bei subphysiologischen Glucosekonzentrationen [8], vermutlich, weil im intrazellulären Glucokinase/Hexokinase-Verhältnis die Hexokinase überwiegt [5]. Weitere Probleme bestanden darin, daß nur ein geringer Teil des gebildeten Insulins freigesetzt wurde und daß die AtT20-Zellen zwar nahezu unbegrenzt verfügbar sind, aber aus Ratten stammen und somit beim Menschen eine Immunreaktion auslösen können. Unklar ist außerdem, wie ein unreguliertes Wachstum der zu transplantierenden Zellen im Empfängerorganismus vermieden werden kann, ob die Zellen zusätzliche (unerwünschte) Proteine produzieren und ob sie auf andere Stoffwechselsignale des humanen Organismus angemessen reagieren. Auch die Funktionsdauer der Zellen im Empfängerorganismus ist noch begrenzt [5,13].

Eine sehr vielversprechende Möglichkeit zur Herstellung von  $\beta$ -Ersatzzellen bieten die enteroendokrinen K-Zellen, die an Ratten als Modelltieren untersucht und im Folgenden näher beschrieben werden sollen. Außerdem soll dargestellt werden, warum die ihnen funktionell ähnlichen L-Zellen und die der AtT20-Zelllinie

zugrunde liegenden Zellen aus der Adenohypophyse [14] zu diesem Zweck vermutlich weniger geeignet sind.

### **1.3 Enteroendokrine K- und L-Zellen - Lokalisation, Isolation und Anreicherung**

#### Der Darmaufbau

Im Darm der Ratte beträgt die Länge des Duodenums etwa 10 cm, die des Jejunums etwa 80 cm und die des Ileums etwa 3 cm. An das Caecum schließt sich das Colon mit einer Länge von rund 10 cm an. Das Lumen hat einen von etwa 3 auf 10 mm zunehmenden Durchmesser [15]. Der menschliche Darm ist etwa 4,5 m lang, auf das Duodenum entfallen etwa 20-30 cm, auf das Jejunum etwa 1,2 m. An das Ileum (ca. 1,5 m) schließt sich direkt das Colon mit einer Länge von etwa 1,5 m an [16].

In das Darmlumen ragen zahlreiche blatt- oder fingerförmige Darmzotten (Villi), zwischen denen Einstülpungen der Epithelschicht, die Lieberkühnsche Krypten, liegen.

Alle Zellen des Darms entstehen durch Zellteilung aus gemeinsamen Stammzellen, migrieren villusaufwärts, verlieren dabei ihre Teilungsfähigkeit und werden nach 5-6 Tagen beim Menschen bzw. 2-3 Tagen bei der Ratte an der Villuspitze abgestoßen [17].

Verschiedene endokrine Zellen (Übersicht in [18]), die als Einzelzellen vorliegen, sind über die gesamte Darmlänge verteilt. Zu ihnen zählen die K- und L-Zellen.

#### K-Zellen

Die K-Zellen sind endokrine Zellen vom offenen Typ, sie erreichen das Darmlumen über einen schmalen Cytoplasmaausläufer und sind mit Nachbar epithelzellen verbunden. Junge Zellen, die man an der geringen Zahl der Granula erkennt, werden an der Kryptenbasis gebildet. Mit der Migration zur

Villusspitze vermehren sich die Granula und die Zellen verlieren ihre Teilungsfähigkeit [19,20].

Das primäre Produkt der K-Zellen ist das aus 42 Aminosäuren bestehende Gastric Inhibitory Polypeptide (GIP) oder neuer: Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide (siehe Abbildung 1-2) [20, 21, 22]. Es wird nach noch nicht vollständig geklärtem Mechanismus aus Präpro-GIP gebildet [23, 24], in Granula gespeichert [20] und in Abhängigkeit vom extrazellulären Glucosespiegel über cAMP- und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Mechanismen [25,26] auf Stimulation durch Nahrungsinhaltsstoffe hin durch Exocytose ausgeschüttet. Stimulierend wirken bei Mensch [27,28] und Ratte [24,29] sowohl langkettige Fettsäuren als auch Glucose.

#### GIP, human

Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met-Asp-Lys-Ile-His-Gln-Gln-Asp-Phe-Val-Asn-Trp-Leu-Leu-Ala-Gln-Lys-Gly-Lys-Lys-Asn-Asp-Trp-Lys-His-Asn-Ile-Thr-Gln

#### GIP, Ratte

Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met-Asp-Lys-Ile-Arg-Gln-Gln-Asp-Phe-Val-Asn-Trp-Leu-Leu-Ala-Gln-Lys-Gly-Lys-Lys-Asn-Asp-Trp-Lys-His-Asn-Leu-Thr-Gln

**Abbildung 1-2: Sequenzen von Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP) bei Mensch [21] und Ratte [22].** Dargestellt im Dreibuchstabencode für Aminosäuren (siehe Abkürzungsverzeichnis, Seite VII).

Die Konzentration der K-Zellen nimmt beim Menschen vom proximalen zum distalen Teil des Darms ab [30,31]. Über die Lokalisation entlang der Krypt-Villus-Achse existieren widersprüchliche Befunde [20,30,31,32]. Auch bei der Ratte nimmt die Konzentration der K-Zellen von proximalen zum distalen Teil des Darms ab [33,34,35]. Ähnlich wie für Menschen gibt es auch hier keine klaren Aussagen zur Verteilung der K-Zellen entlang der Krypt-Villus-Achse [36]. Die Angaben zum Anteil der K-Zellen an der Gesamtzellzahl liegen bei weniger als 0,6 % [19,25].

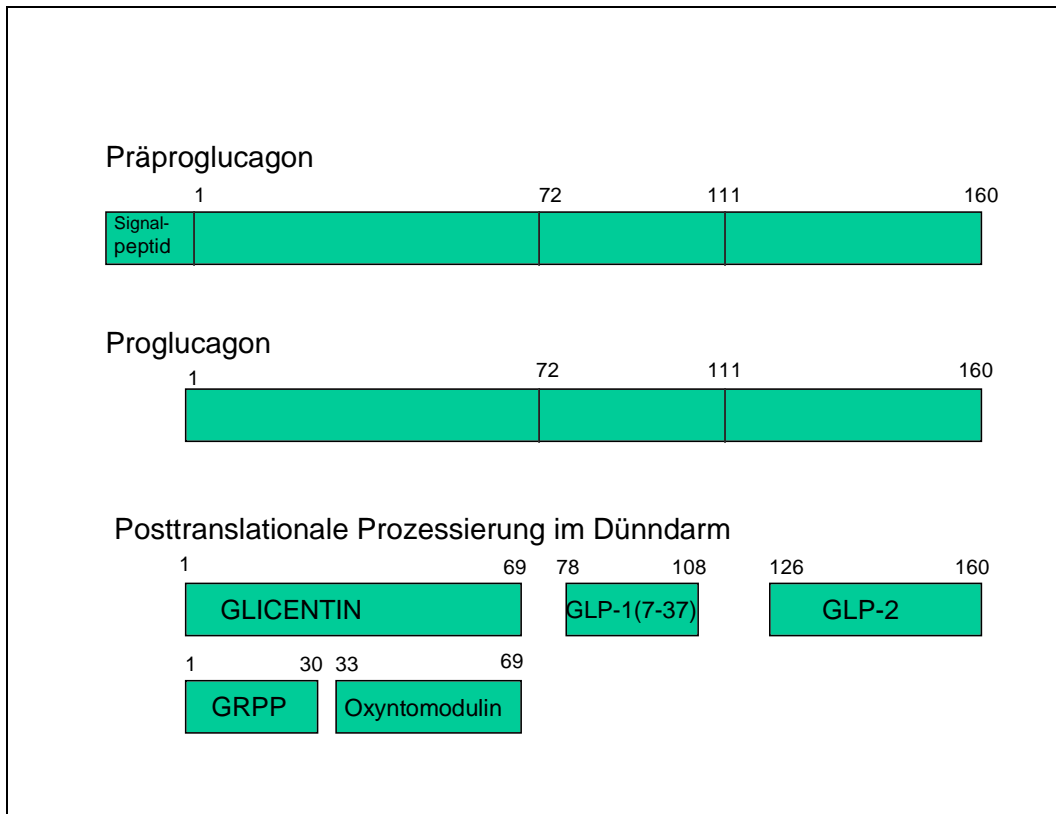
Neben vielen anderen biologischen Wirkungen (siehe Übersichtsartikel [37,38]) hemmt GIP die Magensäuresekretion beim Menschen [27] und stimuliert in physiologischen Mengen [39,40] glucose-abhängig [41,42] über Mechanismen, die von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP-) und Proteinkinase A (PKA) abhängig sind [43], die Synthese und Sekretion von Insulin aus den Langerhansschen Inselzellen des Pankreas bei Mensch und Ratte [44,45]. Außerdem stimuliert GIP die GLP-1-Synthese und -Sekretion aus L-Zellen der Ratte [46,47].

### L-Zellen

Die L-Zellen sind ebenfalls endokrine Zellen vom offenen Typ [48], deren Cytoplasma über einen schmalen Ausläufer das Darmlumen erreicht [49, 50].

In den L-Zellen des Darms wird GLP-1 in zwei Schritten prozessiert. Aus Präproglucagon [51,52] entstehen Glucagon-Like Peptide 1 (1-37) (GLP-1(1-37)), Glucagon-Like Peptide 2 (GLP-2) und Glicentin, welches weiter zu Glicentin Related Pancreatic Peptide (GRPP) und Oxyntomodulin umgesetzt wird (siehe Abbildung 1-3) [48,53]. GLP-1 (1-37), das biologisch noch unwirksam ist [54], wird beim Menschen zu den gleichermaßen wirksamen GLP-1 (7-37) und GLP-1(7-36)amid umgesetzt [55]. Die Sequenzen des Peptids sind bei allen bisher untersuchten Tierspezies und Menschen gleich (siehe Abbildung 1-4) [56]. Die Peptide werden in sekretorischen Granula gespeichert [49] und in das Blut freigesetzt, wenn die Zellen durch Nahrungsinhaltsstoffe (z.B. langkettige Fettsäuren [57]), Hormone oder Neurotransmitter [58,46,47] über einen PKA- und Proteinkinase C (PKC) -abhängigen Mechanismus [59,60,61] aktiviert werden.

Die Zahl der L-Zellen nimmt bei Mensch und Ratte vom proximalen zum distalen Teil des Darms und von den Villi zu den Krypten zu [49,31,36,50,32]. Der Anteil der L-Zellen an der gesamten Zellzahl im Darm beträgt im Ileum der Ratte weniger als 1 % [62].



**Abbildung 1-3: Prozessierung von Präproglucagon in den L-Zellen.** Im Dünndarm entstehen aus dem Vorläufermolekül Präproglucagon die Peptide GLP-1, GLP-2 und Glicentin, das teilweise weiter zu GRPP und Oxyntomodulin umgesetzt wird. Auch GLP-1 (7-37) wird größtenteils noch weiter zu GLP-1(7-36)amid umgesetzt (nicht dargestellt). GLP-1 (7-37) = Glucagon-Like Peptide 1 (7-37), GLP-2 = Glucagon-Like Peptide 2, GRPP = Glicentin Related Polypeptide.

His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly

**Abbildung 1-4: Sequenz von Glucagon-like Peptide 1 (1-37).** Dargestellt im Dreibuchstabencode für Aminosäuren (siehe Abkürzungsverzeichnis, Seite VII).

Neben vielen anderen biologischen Wirkungen (siehe Übersichtsartikel [63,64,65]) hemmt GLP-1 die Magensäuresekretion und Magenentleerung [66] über adrenerge Wege [67] und wirkt als Sättigungsfaktor bei Ratte und Mensch [68,69]. GLP-1 bindet an GLP-1-Rezeptoren auf den  $\beta$ -Zellen des Pankreas [70] und stimuliert in physiologischen Mengen [39,54,71] glucoseabhängig [72] über mindestens 2 Signaltransduktionskaskaden (PKA- und Calcium-abhängig) [73,26] die Insulinsynthese und -sekretion bei Mensch [74] und Ratte [39,54].

### Die extrazelluläre Signalkette der K-, L- und $\beta$ -Zellen

Man vermutet, daß zwischen proximalem und distalem Teil des Darms ein sogenannter „entero-endocriner loop“ besteht, d.h., daß *in vivo* durch Nahrung primär K-Zellen stimuliert werden und diese über GIP und andere Botenstoffe die L-Zellen zur GLP-1-Sekretion anregen. Dafür spricht, daß schon kurz nach der Nahrungsaufnahme erhöhte GLP-1-Konzentrationen im Blut meßbar sind, noch bevor die Nahrung eine größere Anzahl L-Zellen erreichen kann [57,58,75,46,47].

### K- und L-Zellen als Kandidaten für $\beta$ -Ersatzzellen

#### *Glucose-Stimulierbarkeit:*

K- und L-Zellen sind für den sogenannten "Inkretineffekt" verantwortlich. So bezeichnet man die Beobachtung, daß bei gleicher Plasmaglukosekonzentration nach oraler Glucosezufuhr mehr Insulin freigesetzt wird als nach intravenöser Infusion der gleichen Menge an Glucose. Die Zellen reagieren somit auf die orale Glucosezufuhr und verstärken durch Ausschüttung ihrer intestinalen Hormone (GIP und GLP-1) die insulinotrope Wirkung der Glucose.

Für eine Zellkultur, in der die K-Zellen auf einen Anteil von 10 % angereichert worden waren, konnte die Stimulierbarkeit durch Glucose *in vitro* ab einer Konzentration von etwa 10 mmol/l gezeigt werden [25]. Im perfundierten Rattenpankreas liegt die Schwelle bei etwa 5,5 mmol/l [42]. *In vivo* reagieren K-Zellen auf eine orale Glucosestimulation ebenfalls mit einer Freisetzung von GIP [27,41,76]. Das bedeutet, daß K-Zellen - genau wie  $\beta$ -Zellen - auf einen Glucosereiz in physiologischer Weise mit der Ausschüttung ihres Zellproduktes reagieren. Vermutlich exprimieren K-Zellen GLUT2-Transporter und Glucokinase, eine Transfektion der entsprechenden DNA wäre daher zur Herstellung von  $\beta$ -Ersatzzellen aus K-Zellen nicht nötig.

Im Gegensatz dazu ist die direkte Stimulierbarkeit der L-Zellen durch Glucose - die wesentliche Voraussetzung für ihre Eignung als  $\beta$ -Ersatzzellen - noch umstritten [57,58,59,77,78,79,80], obwohl Glucokinase in L-Zellen nachgewiesen wurde [81].



*Enzymausstattung zur Insulin-Prozessierung:*

Die enzymatische Ausstattung zur Prozessierung von Insulin besitzen K- und L-Zellen. Sowohl PC2 als auch PC3 kommen in endokrinen Zellen des Rattendarms vor. Höhere PC2-Konzentrationen finden sich allerdings nur im Duodenum [82]. PC3 ist das Enzym, das Proglucagon in L-Zellen zu Glicentin, Oxyntomodulin, GLP-1 und GLP-2 umsetzt [83].

*Speicherung der Produkte in Granula:*

Sowohl GIP als auch GLP-1 werden in Granula gespeichert [20,49].

*Gewinnung der Zellen:*

Im Gegensatz zu glucoseabhängig regulierten Gehirnzellen aus Hypophyse oder Hypothalamus [12,14], die sonst ebenfalls potentielle Kandidaten für  $\beta$ -Ersatzzellen wären, können K- und L-Zellen durch einen relativ einfachen, risikoarmen und wiederholbaren endoskopischen Eingriff gewonnen werden.

*Kein Risiko einer Abstoßung oder Zerstörung der transplantierten K- und L-Zellen:*

Da es sich bei den K- und L- Zellen um körpereigene Zellen handelt, ist die Abstoßungsgefahr gering. Die Zellen werden durch Diabetes mellitus nicht zerstört; sowohl GIP [84,85] als auch GLP-1 [86,87] werden bei Typ I- und Typ II-Diabetikern unverändert auf Stimulation hin freigesetzt. Transplantierte K- oder L-Zellen sollten demnach voll funktionsfähig bleiben.

*Erfüllung der Voraussetzungen:*

K-Zellen sind geeignete Kandidaten zur Herstellung von  $\beta$ -Ersatzzellen, denn sie erfüllen alle gegebenen Voraussetzungen. Die L-Zellen sind, obwohl sie alle weiteren Anforderungen erfüllen, als  $\beta$ -Ersatzzellen weniger geeignet. Mehrere Untersuchungen weisen darauf hin, daß L-Zellen nicht direkt durch Glucose stimuliert werden. Die glucoseabhängig regulierten Zellen aus dem Gehirn scheiden als Kandidaten für  $\beta$ -Ersatzzellen ebenfalls aus, da sie aufgrund ihrer Lage nicht ohne einen drastischen Eingriff gewonnen werden können.

### Isolation und Anreicherung von K-Zellen

Zur Isolation der K-Zellen bestehen mehrere Möglichkeiten. Die Zellen können mechanisch durch Abschaben oder Vibration [88,62] aus dem Zellverband gelöst werden, sie können durch Enzyme wie z.B. Collagenase [25,89] oder durch Calciumionen-Chelatoren (Citrates, EDTA) in einem hyperosmolaren Puffer [90,91] herausgelöst werden. Oft werden Kombinationen aus mehreren Techniken eingesetzt [62,88,92,93]. Am zellschonendsten ist der Einsatz von Chelatoren (siehe Übersichtsartikel [94]).

Auch zur Anreicherung der K-Zellen gibt es verschiedene Möglichkeiten. Für endokrine Zellen wurde z.B. mehrfach eine von SOLL et al. [92,95] adaptierte Gegenstrom-Elutriation eingesetzt [25,93,96,97,98]. Dieses Verfahren ist allerdings relativ zeit- und kostenintensiv bei bisher unbefriedigenden Ergebnissen. Eine mehr als 10-fache Anreicherung war in der Regel nicht möglich [25,92,93]. Geht man von einem K-Zellgehalt von 0,1 bis 0,6 % [19,25] aus, so bedeutet das, daß die Suspension zu 94-99 % aus verunreinigenden Zellen bestand.

Zu Beginn der vorliegenden Studie existierte noch *keine* geeignete Methode, mit der sich die K-Zellen aus dem Darm isolieren und in für weitergehende Versuche ausreichender Konzentration anreichern ließen.

Aus diesem Grund sollten in der vorliegenden Arbeit immunomagnetische Verfahren zur Anreicherung der K-Zellen getestet werden, die für andere Zellen schon erfolgreich eingesetzt wurden. Diese versprachen eine einfache Handhabung, eine hohe Spezifität und eine zellschonende Anreicherung der gesuchten Zellen [99,100].

### Mögliche Antikörper zur Markierung der K-Zellen

Zur Markierung der K-Zellen bei der immunomagnetischen Zellanreicherung kommen verschiedene Arten von Antikörpern in Frage:

a) *Antikörper gegen das K-Zellprodukt GIP*

b) *Antikörper gegen Zellmembranbestandteile endokriner Zellen:*

Syntaxin ist ein Fusionsprotein, das in den synaptischen Vesikeln neuronaler Gewebe vorkommt. Das Glycoprotein Synaptophysin wurde in neuronalen, endokrinen und neuroendokrinen Zellen nachgewiesen; in epithelialem Gewebe kommt es nicht vor [101,102]. Auch N-CAM (Neural Cell Adhesion Molecule), ein membrangebundenes Glycoprotein, läßt sich nur in endokrinem Gewebe und Nervenenden nachweisen [103].

c) *Antikörper gegen Oberflächenantigene mit immunologischer Funktion:* Human Leucocyte Antigen I (HLA I) und Human Leucocyte Antigen II (HLA II) kommen auf endokrinen Zellen des menschlichen Darms im Gegensatz zu Epithelzellen nicht vor [104,105]. Für den Rattendarm liegen noch keine entsprechenden Ergebnisse vor.

#### **1.4 Zusammenfassung der Aufgabenstellung**

K-Zellen sind geeignete Kandidaten zur Herstellung von  $\beta$ -Ersatzzellen, denn sie erfüllen alle hier beschriebenen Voraussetzungen. Daher sollen sie lokalisiert, isoliert und angereichert werden.

Da zur Lokalisation der K-Zellen sowohl entlang des gesamten Darms als auch entlang der Villus-Krypt-Achse noch unvollständige oder widersprüchliche Aussagen vorliegen, sollten die Zellen in dieser Arbeit immunhistochemisch und radioimmunologisch lokalisiert werden.

L-Zellen sind als  $\beta$ -Ersatzzellen weniger geeignet, weil ihre Glucosesensitivität nicht nachgewiesen werden konnte. Da zu ihrer Verteilung im Darm aber - wie für die K-Zellen - unvollständige oder widersprüchliche Angaben existieren und sie für den „enteroendokrinen Loop“ eine wichtige Rolle spielen, sollten sie zumindest ebenfalls immunhistochemisch und radioimmunologisch lokalisiert werden.

Zur Isolation der K-Zellen sollen dann verschiedene Methoden (z.B. der Einsatz eines Calcium-Chelators in einem hyperosmolaren Puffer) überprüft werden. Anschließend sollen immunomagnetische Verfahren zur Zellanreicherung getestet

werden, weil diese im Gegensatz zum Elutriationsverfahren neben einer einfachen Handhabung auch eine zellschonende und vor allem hochspezifische Anreicherung der gesuchten Zellen erwarten lassen.

Als Grundlage für weitere funktionelle Studien oder Kultivierungsversuche sollen möglichst reine Suspensionen von K-Zellen gewonnen und deren Glucosestimulierbarkeit *in vitro* nachgewiesen werden.