

2 Material und Methoden

Ratten

Für sämtliche Versuche wurden weibliche und männliche Wistar-Ratten (150 bis 450 g) verwendet, die mit einer Standard-Diät (Altromin 1324, Altromin, Lage) ad libitum gefüttert wurden und freien Zugang zu Trinkwasser hatten. Die Ratten wurden entweder durch einen Genickschlag getötet oder durch Injektion eines Pentobarbitals (Nembutal) zunächst betäubt und durch eine Überdosis des Präparats getötet und der Darm nach Öffnung des Thorax entnommen. Mit allen Versuchen wurde zwischen 8 und 11 Uhr begonnen.

Verwendete Geräte

- * Analyseautomat Hitachi 717, Boehringer, Mannheim
- * Analysenwaage Typ BP211D, Sartorius, Göttingen
- * Biofuge 13 mit Rotor 3757, Heraeus Sepatech, Hanau
- * Dreh-Schüttelapparat Rettberg R-01, MAGV, Rabenau-Londorf
- * Einhängethermostat EM, Julabo Labortechnik, Seelbach
- * Elektronisches Thermometer Typ DT100P, Behring, Marburg
- * Gilson Pipetman-Pipetten, 20 bis 1000 µl, Abimed, Langenfeld
- * Grundschlitten-Mikrotom, Leitz, Wetzlar
- * Heizrührer IKAMAG REO und IKAMAG RCT, IKA-Labortechnik, Jahnke + Kunkel, Staufen
- * IKA-Vibrofix VF2, IKA-Labortechnik, Jahnke + Kunkel, Staufen
- * Kryostat CM 1850-01, Leica Instruments, Nussloch
- * Labsonic Model 2000 U mit Nadelschwingsonde 40 T, B. Braun, Melsungen
- * Mikroskop 471202 - 9901, Zeiss, Oberkochen
- * Mikroskop Axiovert 10 mit Fluoreszenzlampe und Filtern (450 - 490 nm und 546 nm), Zeiss, Oberkochen
- * Multi-Crystal Counter LB 2104, Berthold, Wildbad
- * Multipette 4780, Eppendorf, Hamburg

- * pH-Einstabmeßkette Typ N6280 und pH-Meter CG 840, Schott Geräte GmbH, Hofheim
- * Photometer Ultrospec III, Pharmacia Biosystems, Freiburg
- * Potter-Homogenisator Typ RM 14, Jahnke + Kunkel, Staufen
- * Reax top Reagenzglasschüttler, Heidolph, Kehlheim
- * Sartorius Basic Feinwaage Typ BA310P, Sartorius, Göttingen
- * Semi-Micro Osmometer, Knauer, Berlin
- * Spiegelreflexkamera Contax 167MT, Kyocera Europe, Neuss
- * Thermomixer Typ 5436, Eppendorf, Hamburg
- * Universal 16 R-Kühlzentrifuge (mit passenden Zytocentrifugeneinsätzen), Hettich, Tuttlingen

2.1 Lokalisation der K- und L-Zellen im Darm der Ratte

2.1.1 Immunhistochemische Lokalisation der K- und L-Zellen

Um die Lage der K- und L-Zellen zunächst optisch darzustellen, wurden aus verschiedenen Darmabschnitten der Ratte Proben entnommen, Gefrierschnitte hergestellt und diese mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern behandelt, so daß die gesuchten Zellen unter dem Mikroskop sichtbar wurden.

Dargestellt werden sollten K-Zellen im Querschnitt des Duodenums und L-Zellen im Querschnitt aus Ileum. Neben einer Einfachfärbung dieser Zellen durch GIP- bzw. GLP-1-Antikörper sollten auch Doppelfärbungen mit einem zusätzlichen Epithelzellmarker durchgeführt werden.

Bei der Auswahl aller zu testenden Antikörper wurde darauf geachtet, daß die Antikörper laut Hersteller mit dem entsprechenden *Ratten*-Antigen reagierten.

Auswahl geeigneter Objektträger

Zur Verwendung bei den immunhistochemischen Versuchen wurden verschiedene Objektträger getestet: unbeschichtete, Poly-L-Lysin-beschichtete

und „Super-Frost-Plus-Gold“- Objektträger (alle von Menzel-Gläser, Braunschweig).

Auswahl eines geeigneten Epithelzellmarkers

Als Epithelzellmarker wurden jeweils ein α - und β -Tubulin-Antikörper, sowie ein pan-Cytokeratin-Antikörper (alle von Sigma, Deisenhofen) erprobt.

Auswahl geeigneter Fluoreszenzfarbstoffe

Neben FITC (Fluorescein-isothiocyanat) und TRITC (Tetramethylrhodamin-isothiocyanat) wurden die Carbocyanin-Farbstoffe Cy2 und Cy3 (gekoppelt an IgG-Antikörper) eingesetzt, die nach Herstellerangaben [106] bei etwa gleicher Wellenlänge (siehe Tabelle 2-1) maximal angeregt werden, so daß dieselben Filter benutzt werden können, und außerdem wesentlich photostabiler und leuchtintensiver als FITC und TRITC sind.

Tabelle 2-1: Absorptions- und Emissionsmaxima der Fluoreszenzfarbstoffe FITC, TRITC, Cy2 und Cy3.

Farbstoff	Absorptionsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]
FITC	492	520
Cy2	490	508
TRITC	550	570
Cy3	553	575

Auswahl geeigneter Antikörperkonzentrationen

Um die optimalen Konzentrationen der primären und sekundären Antikörper für die immunhistochemischen Versuche zu ermitteln, wurden die Antikörper in Verdünnungen von 1:50 bis 1:800 getestet. Die Verdünnungsstufen, mit denen die deutlichsten und klarsten Bilder erzielt werden konnten, wurden für die nachfolgenden Versuche ausgewählt (siehe Tabelle 2-2).

2.1.1.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Kleine Stückchen aus dem Duodenum, Ileum und Colon der Ratte wurden durch Spülen mit HBSS von Nahrungsresten befreit. Nach Einbettung in Tissue-Tek (Gefriereinbettmedium, Miles Inc., Elkhart, USA) wurden sie in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ maximal zwei Wochen gelagert.

Mit einem Kryostat wurden bei einer Temperatur von $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ Schnitte in einer Dicke von $5\text{ }\mu\text{m}$ hergestellt und auf unbeschichtete Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden 20 min luftgetrocknet und in reinem Aceton (Merck, Darmstadt) 10 min fixiert.

2.1.1.2 Einfachmarkierung durch Immunfluoreszenz

Herstellung von 0,1 M Phosphate Buffered Saline (PBS) (10-fach konzentriert) für die Immunfluoreszenz-Versuche [107]

0,19 mol/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	(Merck, Darmstadt)
0,81 mol/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{ H}_2\text{O}$	(Merck, Darmstadt)
0,50 mol/l NaCl	(Roth, Karlsruhe)

Die Substanzen wurden in entionisiertem Wasser gelöst und der Puffer vor Gebrauch 1:10 verdünnt.

Durchführung der Immunfluoreszenz-Einfachmarkierung

Nach der Fixierung wurden die Objektträger mit 0,1 M PBS gewaschen und um die Schnitte herum getrocknet. Das Normalserum der Spezies, aus der der zweite Antikörper stammte (hier: Ziegen-Normalserum (NGS), Sigma, Deisenhofen), wurde mit PBS / 0,3 % Triton X-100 (Serva, Heidelberg) 1:10 verdünnt und die Schnitte damit 30 min blockiert. Anschließend wurde der erste Antikörper zentrifugiert, mit 0,1 mol/l PBS verdünnt (siehe Tabelle 2-2) und auf die Schnitte aufgetragen, die dann über Nacht im Kühlschrank inkubiert wurden.

Die Schnitte wurden erneut gewaschen und dann der zweite Antikörper in der ausgetesteten Konzentration (siehe Tabelle 2-2) aufpipettiert. Dieser mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte zweite Antikörper band innerhalb von zwei Stunden vor Licht geschützt bei Raumtemperatur an den primären Antikörper (siehe Abbildung 2-1). Nach einem weiteren Waschvorgang wurden die Schnitte in Glycerol (Merck, Darmstadt)/ 0,1 M PBS (9:1) eingedeckelt und unter dem Mikroskop mit einer Fluoreszenzlampe und entsprechendem Filter begutachtet.

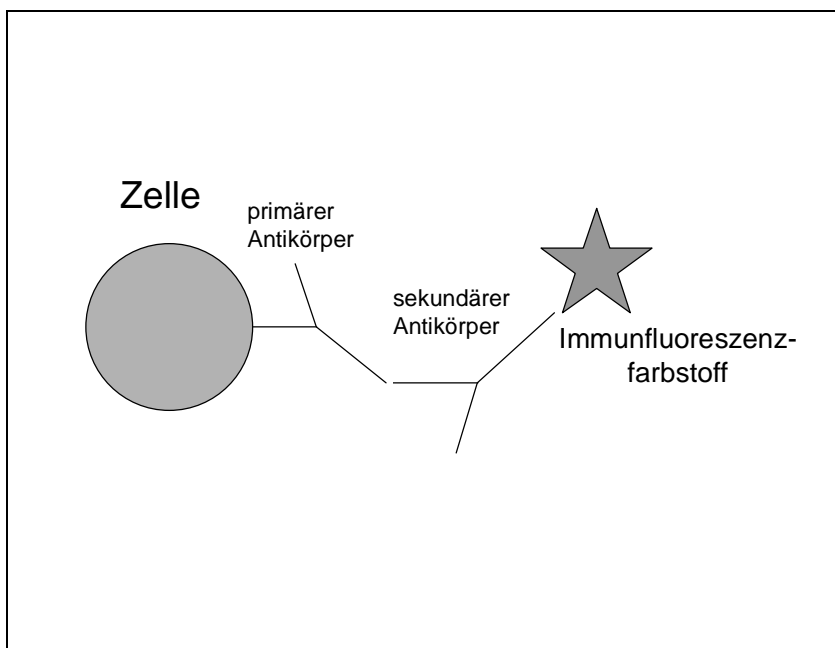


Abbildung 2-1: Schema der Antigen-Antikörper-Bindungen bei der Immunfluoreszenzmarkierung. Der Immunfluoreszenzfarbstoff bindet über zwei Antikörper indirekt an die zu markierende Zelle.

Tabelle 2-2: Übersicht über die bei den immunhistochemischen Versuchen verwendeten Antikörper

Antigen	GIP	GLP-1	Cytokeratin
Art des 1. Antikörpers	Kaninchen anti-Ratte IgG	Kaninchen anti-Mensch IgG	Maus anti-Mensch IgG
Hersteller	PepScan, Berlin	Peninsula, San Carlos	Sigma, Deisenhofen
eingesetzte Verdünnung	1:500	1:200	1:500
Art des 2. Antikörpers	Ziege anti-Kaninchen-IgG, Cy2-gekoppelt	Ziege anti-Kaninchen IgG, Cy2-gekoppelt	Ziege anti-Maus IgG, Cy3-gekoppelt
Vertreiber	Dianova, Hamburg	Dianova, Hamburg	Dianova, Hamburg
eingesetzte Verdünnung	1:100	1:100	1:200

2.1.1.3 Gegenfärbung mit Propidiumjodid

Um die Konturen der Darmstücke bei einfachmarkierten Schnitten besser erkennen zu können, wurde eine Gegenfärbung des Hintergrundes mit Propidiumjodid (Sigma, Deisenhofen) getestet. Propidiumjodid läßt das Cytoplasma von Zellen unter der Fluoreszenzlampe (TRITC-Filter) rot leuchten.

Die Schnitte wurden hierzu nach der Behandlung mit dem 2. Antikörper nicht direkt eingedeckelt, sondern nach dem Waschen mit einer Propidiumjodidlösung in PBS (Konzentration: 1 µg/ml, jeweils frisch aus einer Stammlösung angesetzt) bedeckt. Nach 15-minütiger Inkubation (lichtgeschützt) wurde die Lösung durch erneutes Waschen entfernt. Anschließend konnten die Schnitte eingedeckelt und unter dem Mikroskop begutachtet werden.

2.1.1.4 Doppelmarkierung durch Immunfluoreszenz

Die Schnitte wurden wie in Punkt 2.1.1.2 beschrieben behandelt. Einfach- und Doppelmarkierung unterschieden sich folgendermaßen:

- a) Anstelle eines Serumtyps mußte, falls die Herkunft der beiden zweiten Antikörper nicht übereinstimmte, ein Gemisch zweier Seren (2 x 5 %) zur Blockierung eingesetzt werden. Dies war aber nur beim Austesten geeigneter Antikörper im Vorfeld der Versuche nötig.
- b) Anstelle des ersten Antikörpers wurde eine Mischung aus zwei ersten Antikörpern in der jeweils nötigen Konzentration (siehe Tabelle 2-2) aufgetragen.
- c) Anstelle des sekundären Cy2- oder Cy3-gekoppelten Antikörpers wurde ein Gemisch aus einem Cy2- und einem Cy3-gekoppelten sekundären Antikörper in der benötigten Konzentration (siehe Tabelle 2-2) aufpipettiert.

2.1.1.5 Negativkontrollen

Um die Spezifität der Immunfluoreszenztechnik zum Nachweis der K- und L-Zellen zu überprüfen, wurden Negativkontrollen durchgeführt.

Die Objektträger, sowie die unbehandelten Schnitte wurden auf eine Eigenfluoreszenz hin kontrolliert. Außerdem wurden Schnitte begutachtet, bei denen entweder der primäre oder der sekundäre Antikörper nicht aufgetragen worden war.

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

Um zu untersuchen, in welcher Weise die K- und L-Zellen über die Länge des Darms verteilt sind, wurden Rattendärme in folgender Weise verarbeitet:

2.1.2.1 Die Schabtechnik

Herstellung der Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)

9,76 g/l	HBSS	(fertige Mischung; Life Technologies, Eggenstein)
1,00 g/l	Rinderserumalbumin	(BSA; Boehringer, Mannheim)
0,35 g/l	NaHCO ₃	(Merck, Darmstadt)
77,0 mg/l	Dithiothreitol	(DTT; direkt vor Gebrauch zugegeben; Sigma, Deisenhofen)

Die Substanzen wurden in entionisiertem Wasser gelöst und der pH auf 7,3 bis 7,4 eingestellt.

Durchführung

Nach Entnahme wurden Dünndarm und Colon mit kaltem HBSS-Puffer gespült und der Dünndarm in 10 gleich lange Abschnitte unterteilt. Die Darmmucosa der einzelnen Abschnitte wurde mit zwei geschliffenen Objektträgern abgeschabt und in Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Der Inhalt der Gefäße wurde mit eiskaltem RIA-Puffer (siehe Punkt 2.1.2.2) auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt und dann mit dem Potter-Homogenisator 1 Minute auf Eis vorbehandelt. Das Probenvolumen wurde dabei auf 2 ml aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben mit Ultraschall (Frequenz: 50 kHz) 30 s auf Eis homogenisiert, etwa 1,6 ml jeder

Probe in ein Eppendorf-Gefäß abpipettiert und 3 min aufgeköcht, um Proteasen unwirksam zu machen.

Die GefäÙe wurden 2 min bei 13800 x g zentrifugiert, die klaren Überstände aliquotiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren. Neben dem GIP- und GLP-1-Gehalt (siehe Punkt 2.1.2.2) wurden die Proteinkonzentration (siehe Punkt 2.1.2.3) der Proben ermittelt, um den Hormongehalt auf den jeweiligen Proteingehalt beziehen zu können.

2.1.2.2 Bestimmung des GIP- und GLP-1-Gehaltes der Fraktionen durch Radioimmunoassay

Zwei Radioimmunoassay-Kits (RIK 7123: Glucagon-Like Peptide-1, RIK 7154: Gastric Inhibitory Peptide (Human); Peninsula Laboratories Inc., San Carlos, USA) dienten der Bestimmung des GIP- und des GLP-1-Gehaltes der Proben. Der GIP-RIA zeigte keine Kreuzreaktivität mit Gastrin, Gastrin Releasing Peptide (GRP), Insulin, GLP-1 oder GLP-2. Der GLP-1-RIA reagierte nicht mit GLP-2, GIP, Glucagon, Insulin, Secretin oder Vasoactive Intestinal Peptide (VIP). Eine minimale Kreuzreaktivität (0,1 %) bestand mit GLP-1(7-36)amid.

Prinzip:

Ein primärer Antikörper, der in begrenzter Menge zur zu untersuchenden Probe (bzw. den Standards, jeweils 100 µl) zugegeben wird, bindet an das zu bestimmende Peptid. Durch Zugabe eines konkurrierenden, radioaktiv (¹²⁵I)-markierten Antikörpers wird ein entsprechender Anteil des primären Antikörpers aus seiner Bindung verdrängt. Die Antikörperkomplexe werden durch Zentrifugation von den freien, radioaktiven Antikörpern getrennt, die dann entfernt werden. Mit einem γ-Counter wird die im Rückstand verbleibende Radioaktivität gemessen. Durch Vergleich mit der Standardkurve ergeben sich die Peptidgehalte der Proben (in pg / Probenröhrchen). Das Ergebnis wird dann auf den ursprünglichen Peptidgehalt der Proben umgerechnet.

2.1.2.3 Bestimmung des Proteingehalts der Fraktionen

Der Proteingehalt der Proben wurde mit einem Proteinassay (BIO-RAD, München) nach LOWRY [108] bestimmt.

Die Proben wurden mit RIA-Puffer (siehe unter Punkt 2.1.2.2) 1:10 verdünnt. Pro Bestimmung wurden 375 µl der verdünnten Probenlösung eingesetzt.

Prinzip der Proteinbestimmung

Die Proteine der Lösung reagieren in alkalischem Medium mit Kupfer und bilden Komplexe, die ein Folin-Reagenz reduzieren. Die Reaktionsprodukte sind charakteristisch blau gefärbt. Die Extinktion der Proben wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen und mit einer Standardgeraden aus Rinderserumalbumin- (BSA-) Lösungen verschiedener Konzentrationen (0 bis 2 mg/ml) verglichen.

Die Bestimmung ist unempfindlich gegenüber Detergenzien in niedriger Konzentration, wie sie im RIA-Puffer (siehe Punkt 2.1.2.2) enthalten sind.

2.1.3 Lokalisation der K- und L-Zellen entlang der Villus-Krypt-Achse

Zur Lokalisation der K- und L-Zellen auf der Krypt-Villus-Achse wurden Darmstückchen von den Villi zu den Krypten hin in einzelnen Fraktionen abgebaut. Die Fraktionen wurden anschließend auf die Aktivitäten der Alkalischen Phosphatase (AP) und Thymidinkinase (TK), sowie ihren Gehalt an GIP und GLP-1 untersucht und die Ergebnisse auf den ebenfalls bestimmten Gehalt an Gesamtprotein bezogen.

Die Differenzierung vom Darmzellen findet in erster Linie in den Villi statt. Mit Alkalischer Phosphatase als Differenzierungsmarker [90] lassen sich Villuszellen nachweisen. In den Krypten proliferieren Darmzellen, Thymidinkinase als Proliferationsmarker [90] wurde daher zum Nachweis von Kryptzellen genutzt.

2.1.3.1 Die Ausschütteltechnik

Die Darmstückchen wurden nach einer von WEISER [90] erarbeiteten und von FLINT et al. [91] weiterentwickelten Methode (leicht modifiziert, wie im nachfolgenden Text beschrieben) behandelt. Eine spezielle Vorbehandlung für die weiteren Bestimmungen erfolgte nicht.

Herstellung des Chelatpuffers

27 mmol/l Natriumcitrat • 2 H ₂ O	(Merck, Darmstadt)
5 mmol/l Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O	(Merck, Darmstadt)
96 mmol/l NaCl	(Roth, Karlsruhe)
8 mmol/l KH ₂ PO ₄	(Merck, Darmstadt)
15 mmol/l KCl	(Merck, Darmstadt)
55 mmol/l D-Sorbitol	(Sigma, Deisenhofen)
44 mmol/l Saccharose	(Merck, Darmstadt)
0,5 mmol/l DTT	(entspricht 77 mg/l, direkt vor Gebrauch zugeben; Sigma, Deisenhofen)

Die Chemikalien wurden in entionisiertem Wasser gelöst und der pH auf 7,3 bis 7,4 eingestellt.

Herstellung des PBS (Phosphate Buffered Salt Solution)-Puffers (10-fach konzentriert)

137,0 mmol/l NaCl	(Roth, Karlsruhe)
2,7 mmol/l KCl	(Merck, Darmstadt)
8,0 mmol/l Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O	(Merck, Darmstadt)
1,5 mmol/l KH ₂ PO ₄	(Merck, Darmstadt)

Die Inhaltsstoffe des Puffers wurden in entionisiertem Wasser gelöst und der pH der Lösung auf 7,3 bis 7,4 eingestellt.

Durchführung der Ausschüttelversuche

Je etwa 22 cm Rattendarm aus dem proximalen oder dem distalen Teil des Dünndarms, bei einigen Versuchen auch der komplette Dünndarm, wurde umgestülpt und in kleine Ringe von jeweils 3 - 4 mm Länge geschnitten. Nachdem diese 5 min in kaltem HBSS gewaschen worden waren, wurden sie in 150 ml Chelatpuffer überführt und 20 min bei 4 °C unter Rühren inkubiert. Die Zellen dieser Fraktion wurden gesammelt (V^W) und die Darmringe in 20 ml frischen, kalten Chelatpuffer in Zentrifugenröhren überführt. Die Röhren wurden per Hand 20 mal umgedreht, die Zellsuspension gesammelt und der Vorgang mit jeweils frischem Puffer noch 9 mal wiederholt. Die Inhalte von Röhren 1 bis 3 wurden als Fraktion V^1 gepoolt, die Inhalte von Röhren 4 bis 6 als V^2 und die von Röhren 7 bis 10 als V^3 . Anschließend wurden die Ringe in 100 ml Chelatpuffer unter Rühren 10 min bei 4 °C inkubiert. Diese Fraktion wurde verworfen und die Darmstückchen abschließend erneut zehnmal in je 20 ml frischem Chelatpuffer ausgeschüttelt. So ergaben sich die Fraktionen C^1 aus Röhren 1 bis 5 und C^2 aus Röhren 6 bis 10. Zusätzlich wurden die Fraktionen C^3 bis C^6 gesammelt, die ebenfalls aus dem Inhalt von je 5 Einzelröhren hervorgingen.

Alle Fraktionen wurden auf Eis bis zum Ende der Isolation aufbewahrt und die Zellen dann durch 10-minütige Zentrifugation in der Kühlzentrifuge bei 50 x g geerntet. Die Zellen wurden in je 1 ml PBS-Puffer aufgenommen, jeweils 30 s mit Ultraschall behandelt, 10 min kalt bei 2000 x g zentrifugiert und dann für die anschließenden Untersuchungen aliquotiert bei -20 °C eingefroren.

2.1.3.2 Colorimetrische Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase

Die Aktivitäten der Alkalischen Phosphatase in den Fraktionen wurden mit einem Testkit (Boehringer Mannheim) am Analyseautomaten Hitachi 717 (Boehringer Mannheim) nach der Optimierten Standardmethode der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie [109] bestimmt.

Prinzip

Die in der Probe (10 µl) enthaltene Alkalische Phosphatase setzt p-Nitrophenylphosphat (10 mmol/l) in einem magnesiumchloridhaltigen (0,5 mmol/l) Diethanolamin-Puffer bei pH 9,8 zu Dihydrogenphosphat und p-Nitrophenolat-ionen um (siehe Abbildung 2-2).

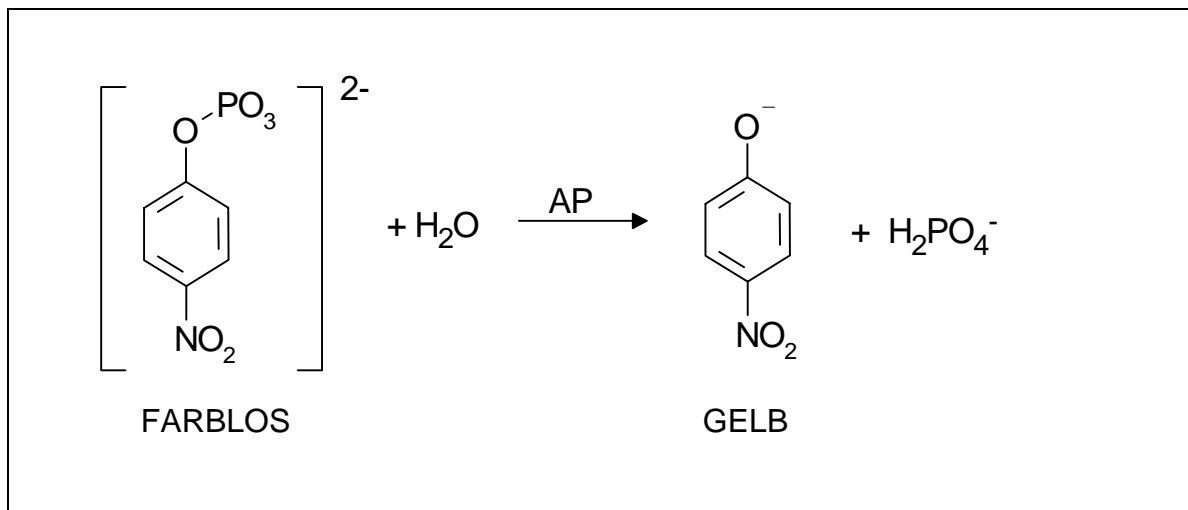


Abbildung 2-2: Nachweisreaktion zur Messung der Aktivität von Alkalischer Phosphatase. Diese setzt p-Nitrophenylphosphat in alkalischem Medium zu p-Nitrophenol (Anion) um; dabei ändert sich die Farbe der Lösung von farblos zu gelb. AP = Alkalische Phosphatase.

Die Konzentration des farbigen Produkts, dessen Gehalt proportional zur Enzymaktivität ist, wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Durch Vergleich mit einer Standardkurve wurde die Aktivität des Enzyms (in U/l) errechnet. Die Präzision der Messung wird durch geräteinterne Kontrollen (normale und pathologische Serumprobe) überprüft.

2.1.3.3 Bestimmung der Thymidinkinase-Aktivität mittels Radioenzymassay

Die Thymidinkinase-Aktivität in den Proben wurde ebenfalls mit einem Testkit (Sangtec Medical, Bromma, Schweden) bestimmt.

Prinzip

Die in der Probe (20 µl) enthaltene Thymidinkinase (TK) phosphoryliert ¹²⁵I-markiertes 5'Desoxyuridin in Gegenwart von ATP zu ¹²⁵I-Desoxyuridinmonophosphat. Nach einer festgelegten Inkubationszeit (4 Stunden bei 37 °C) wird die

Reaktion durch ein Trennmittel gestoppt. Das entstandene ^{125}I -Desoxyuridinmonophosphat bindet an das Trennmittel. Nach einem Waschschrift wird die Radioaktivität des gebundenen Produkts mit einem γ -Counter bestimmt. Da die gemessene Radioaktivität der Enzymaktivität der Proben (in U/l) proportional ist, kann diese durch Vergleich mit der Standarddeichkurve (2,5 - 40 U/l) ermittelt werden. Um die Richtigkeit und Präzision der Bestimmung zu überprüfen, werden zwei Kontrollen (6 U/l und 20 U/l) in jedem Ansatz mitbestimmt.

2.2 Isolation der K- Zellen aus Duodenum

Zur Isolation der K-Zellen aus dem Duodenum der Ratte wurden verschiedene Methoden getestet, die im Folgenden beschrieben werden.

Herstellung der Erythrosinlösung (0,1 %)

100 mg Erythrosin B (Aldrich-Chemie, Steinheim) wurden in 100 ml PBS gelöst und der pH auf 7,3 bis 7,4 eingestellt.

2.2.1 Mechanische Isolation der K-Zellen (modifiziert nach [62])

Der obere Dünndarm einer Ratte wurde entnommen und in eiskalten HBSS-Puffer gelegt. Dann wurde proximal ein Stück von 25 cm abgemessen und dieses zuerst mit 0,9 %iger Kochsalzlösung, dann mit HBSS gespült. Nach einer 15-minütigen Präinkubation in HBSS-Puffer bei 37 °C wurde das Darmstück über einem Glasstab (Durchmesser 4 mm) umgestülpt und dort mit Zwirn befestigt. Der Glasstab wurde in ein mit HBSS-Puffer gefülltes, großes Reagenzglas eingeführt und dieses mit einem Reagenzglasschüttler bei nahezu maximaler Intensität (ca. 2200 U/min, Amplitude 5 mm) 5 bis 10 min geschüttelt. 10 μl der entstandenen Zellsuspension wurden mit 10 μl der Erythrosin B-Lösung gemischt und in eine Neubauerkammer (MAGV, Rabenau-Londorf) pipettiert. Anschließend wurden Morphologie und Intaktheit der gewonnenen Einzelzellen unter dem Mikroskop untersucht.

2.2.2 Enzymatische Zellisolation

Herstellung der EDTA / PBS-Lösung

100 mmol/l EDTA (Merck, Darmstadt) wurden in 1-fach PBS gelöst und der pH dieser Stammlösung auf 7,3 bis 7,4 eingestellt. Vor Gebrauch wurde die Lösung 1:10 mit 1-fach PBS verdünnt.

Tabelle 2-3: Übersicht der zur K-Zell-Isolation verwendeten Collagenasen

Enzym	Hersteller	Spezielle Eignung
Collagenase D	Boehringer, Mannheim	Isolation von Einzelzellen aus einem Gewebeverband mit Erhalt der Zelloberflächenproteine
Collagenase Typ I	Sigma, Deisenhofen	Zellschonende Isolation von Einzelzellen aus einem Gewebeverband

2.2.2.1 Isolation

Erneut wurde der obere Dünndarm einer Ratte entnommen und in eiskalten HBSS-Puffer gelegt. Proximal wurde ein Stück von 25 cm abgemessen, dieses über einem runden Edelstahlstab (Durchmesser 4 mm) umgestülpt und der Darm anschließend mit einem Skalpell in 1 bis 2 mm dicke Ringe geschnitten. Diese wurden in 35 ml Collagenaselösung (in HBSS-Puffer) (siehe Tabelle 2-3) in Konzentrationen von 0,002 bis 0,25 % [110] überführt und unter Carbogenbegasung (5 % CO₂/ 95 % O₂, Messer Griesheim, Krefeld) 5 bis 60 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die entstehende Zellsuspension wurde auf Eis durch ein grobmaschiges Sieb und zwei Nylonfilter (Neolab, Heidelberg) von 250 und 60 µm Porengröße filtriert. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C 5 min bei 79 x g zentrifugiert und das entstehende Zellpellet ad 1 ml in PBS/EDTA resuspendiert. 10 µl der Lösung wurden mit der Erythrosinlösung angefärbt, in eine Neubauerkammer (MAGV, Rabenau-Londorf) pipettiert und unter dem Mikroskop auf die Zellzahl und die Intaktheit der Zellen hin untersucht.

2.2.2.2 Hämalaun-Eosin-Färbung

Zur Unterscheidung von Zellen und Zellfragmenten wurde die entstandene Zellsuspension durch Zytozentrifugation (2 min bei 79 x g) auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgebracht, 45 min in einer 4 %igen Formalinlösung fixiert und mit einer Hämalaun-Eosin-Färbung angefärbt.

Durch diese Übersichtsfärbung sind Zellkerne, die durch Hämalaun blau gefärbt werden, von kompletten Zellen, bei denen zusätzlich das Cytoplasma durch Eosin rötlich gefärbt wird, zu unterscheiden.

Herstellung der Eosinlösung

1 g Eosin wurde in 100 ml 70 %igem Ethanol gelöst und mit 2 Tropfen Eisessig angesäuert.

Durchführung:

Die Objektträger wurden nach Fixierung der Zellen 15 min in Leitungswasser und 1 min in entionisiertem Wasser gewaschen, 10 min in einer Standkuvette in MAYERs saurem Hämalaun (Sigma, Deisenhofen) inkubiert und danach 10 min mit Leitungswasser gebläut. Anschließend wurden sie 2 min in Eosinlösung gefärbt, kurz mit entionisiertem Wasser gespült und dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe (siehe Tabelle 2-4) entwässert. Nach dem Eindeckeln in Entellan (Merck, Darmstadt) konnten die Zellen unter dem Mikroskop begutachtet werden.

Tabelle 2-4: Abfolge der aufsteigenden Alkoholreihe zur Entwässerung von biologischem Untersuchungsmaterial

Komponente	Einwirkzeit [min]
30 % Ethanol	je 5
70 % Ethanol	
96 % Ethanol	
100 % Ethanol	
100 % Xylol	

2.2.3 Isolation der K-Zellen in hyperosmolarem Chelatpuffer

Überprüfung der Osmolalität des Chelatpuffers

Um sicherzustellen, daß die Osmolalität des Chelatpuffers mit dem in der Literatur vorgegebenen Wert [91] übereinstimmte, wurde sie mit einem Osmometer kontrolliert, das die Osmolalität einer Salzlösung anhand der von ihr herbeigeführten Gefrierpunktniedrigung mißt. Als Eichlösung diente eine Natriumchloridlösung der Osmolalität 400 mosm/kg (Knauer, Berlin).

Isolation der Zellen

Der obere Dünndarm einer Ratte wurde entnommen und in eiskalten HBSS-Puffer gelegt. Dann wurde proximal ein Stück von 25 cm abgemessen, dieses über einem runden Edelstahlstab (Durchmesser 4 mm) umgestülpt und der Darm anschließend mit einem Skalpell in 1 bis 2 mm dicke Ringe geschnitten. Diese wurden in 35 ml Chelatpuffer überführt und unter Carbogenbegasung (5 % CO₂ / 95 % O₂, Messer Griesheim, Krefeld) 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert (siehe Abbildung 2-3). Die entstehende Zellsuspension wurde auf Eis durch ein grobmaschiges Sieb und zwei Nylonfilter (Neolab, Heidelberg) von 250 und 60 µm Porengröße filtriert. Danach wurden kleine Aliquots entnommen, um später die ursprüngliche GIP-Konzentration der Zellsuspension bestimmen zu können. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C 5 min bei 79 x g zentrifugiert und das entstehende Zellpellet ad 1 ml in PBS/EDTA resuspendiert. 10 µl der Lösung wurden mit der Erythrosinlösung angefärbt, in eine Neubauerkammer (MAGV, Rabenau-Londorf) pipettiert und unter dem Mikroskop auf Zellzahl und Intaktheit der Zellen hin untersucht.

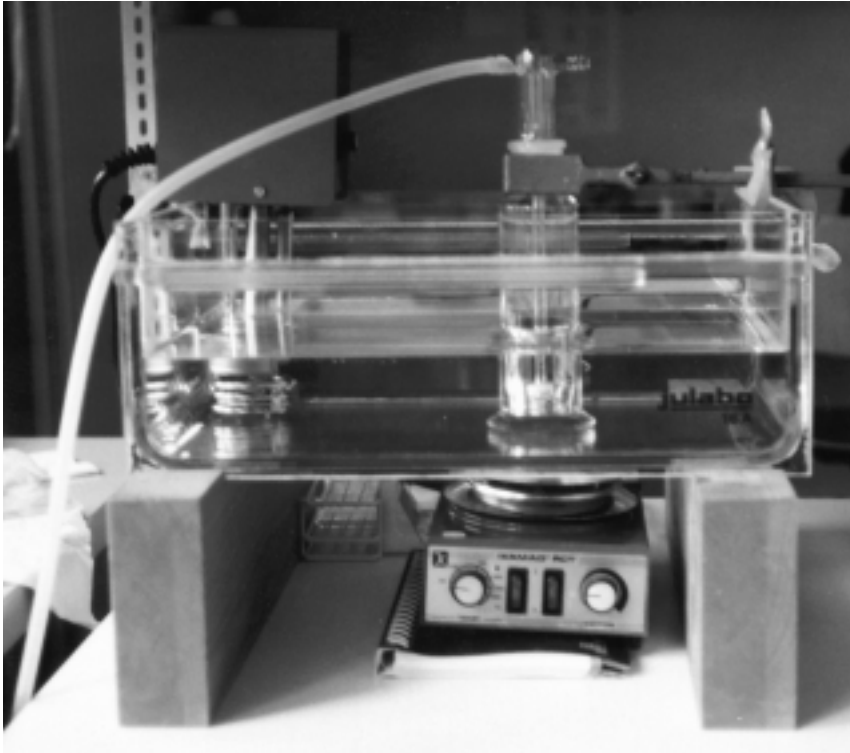


Abbildung 2-3: Versuchsaufbau zur Isolation von K-Zellen in hyperosmolarem Chelatpuffer. Die kleingeschnittenen Darmstückchen in Chelatpuffer werden in eine Gaswaschflasche mit Begasungseinsatz überführt. Die Lösung wird mit einem Magnetrührer durchmischt und durch ein Wasserbad auf einer Temperatur von 37 °C gehalten.

Variationen

Die Technik wurde variiert, indem Zeit oder Temperatur der ersten Inkubation verändert wurden, die Begasung weggelassen, ein Schutzstoff zugesetzt oder ein Chelatpuffer mit nahezu physiologischer Osmolarität (290 mosm/l) verwendet wurde (siehe Tabelle 2-5).

Tabelle 2-5: Variationen der Inkubationsbedingungen zur K-Zell-Isolation

Variable	Variation
Zeit	10 min bis 60 min
Temperatur	0 °C, 37 °C
Zusatz eines Schutzstoffes	Glutamin (1 - 5 mmol/l)
Begasung	ohne - mit
Osmolarität des Chelatpuffers	290 mosm/l - 385 mosm/l

2.3 Anreicherung der K-Zellen

Zur Anreicherung der isolierten Zellen sollten immunomagnetische Verfahren getestet werden.

Allgemeines Prinzip:

Magnetische Partikel, an die Antikörper gekoppelt sind, binden entweder direkt oder über einen weiteren Antikörper an die gewünschten Zellen (siehe Abbildung 2-4). In einem Magnetfeld lassen sich anschließend die markierten von den nicht-markierten Zellen trennen.

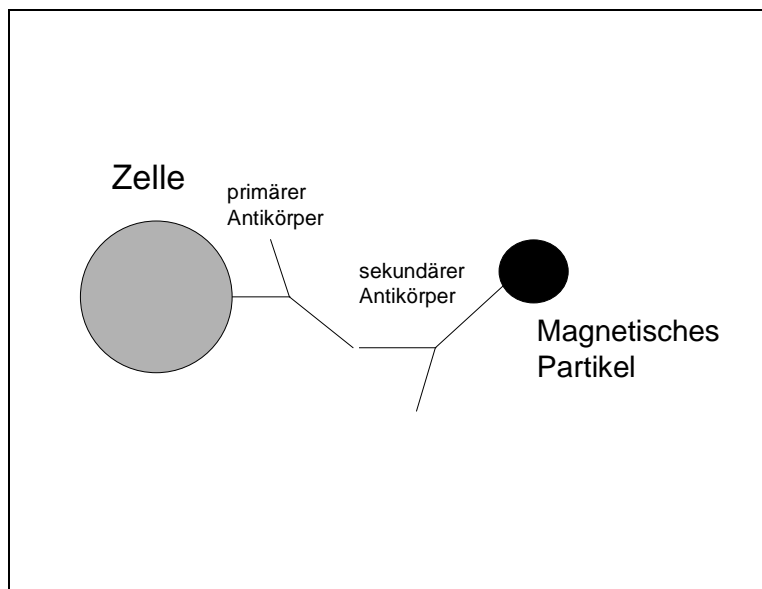


Abbildung 2-4: Bindung zwischen einer Zelle und einem magnetischen Teilchen bei der immunomagnetischen Zellseparation. Das Partikel bindet bei der indirekten Technik über zwei Antikörper an die zu markierende Zelle.

Neben einer Anreicherung der gesuchten Zellen ist auch eine Depletion der unerwünschten Zellen möglich. Hierbei werden alle störenden Zellen mit den magnetischen Partikeln markiert.

Die Markierung der Zellen mit den magnetischen Teilchen kann mittels einer direkten oder einer indirekten Technik erfolgen (siehe Abbildung 2-5). Bei der direkten Technik werden zuerst die magnetischen Partikel mit einer Lösung geeigneter primärer Antikörper inkubiert. Die markierten Antikörper werden dann einer Zellsuspension zugesetzt und binden dort an die gesuchten Zellen. Diese

Reihenfolge wird bei der indirekten Technik umgekehrt. Hier wird eine Zellsuspension mit der ausgewählten Antikörper-Lösung versetzt. Nachdem die Antikörper an die gesuchten Zellen gebunden haben, werden die magnetischen Teilchen zugesetzt, die ihrerseits an die Antikörper binden und dadurch die gesuchten Zellen markieren.

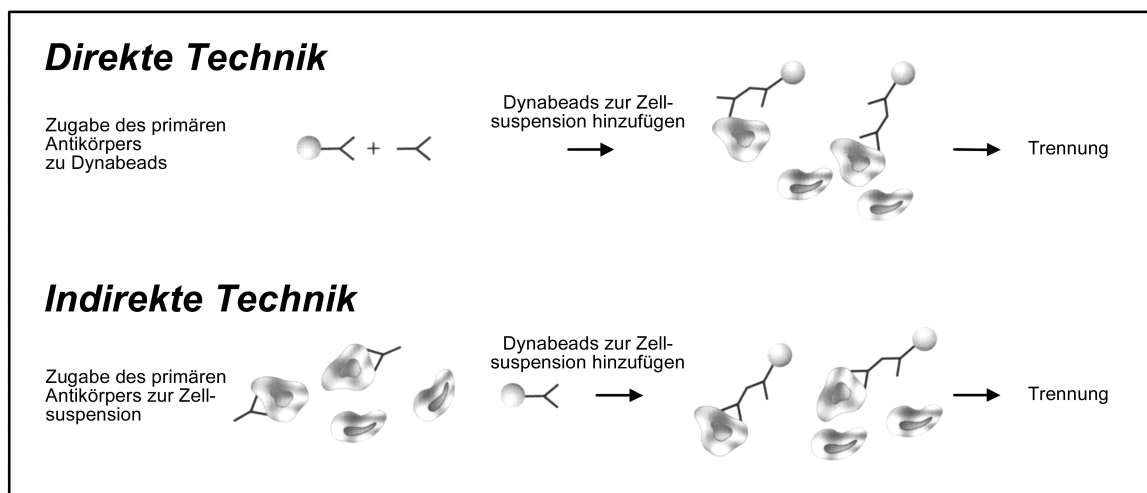


Abbildung 2-5: Direkte und indirekte Technik bei der immunomagnetischen Zellseparation. Bei der direkten Technik wird der primäre Antikörper mit den magnetischen Partikeln präinkubiert und anschließend zu den zu markierenden Zellen gegeben; bei der indirekten Technik werden die Zellen mit dem primären Antikörper inkubiert und anschließend die magnetischen Partikel hinzupipettiert (modifiziert nach [111])

Zur immunomagnetischen Anreicherung der K-Zellen sollten zwei verschiedene Systeme getestet werden.

2.3.1 Zellanreicherung durch Magnetic Cell Sorting (MACS)

Prinzip

Extrem kleine, superparamagnetische Kügelchen (MACS Microbeads) binden über eine Brücke aus einem primären und einem sekundären Antikörper an die zu isolierenden Zellen in einer Zellsuspension. Die Suspension wird auf eine Trennsäule aufgetragen, die aus kunststoffumhüllten, magnetischen Fasern besteht. Um die Säule herum erzeugt ein Separator (VarioMacs) ein starkes Magnetfeld. Während die markierten Zellen an der Säulenmatrix haften, werden die nicht markierten Zellen eluiert. Nachdem die Trennsäule aus dem Separator

entnommen worden ist, können auch die markierten Zellen eluiert werden (siehe Abbildung 2-6).

Zugabe von antikörpermarkierten MACS Microbeads zur Zellsuspension

Auftragen auf eine Trennsäule

Herauswaschen der nicht-markierten Zellen

Entnahme der Trennsäule aus dem Magnetfeld und Elutrierung der markierten Zellen

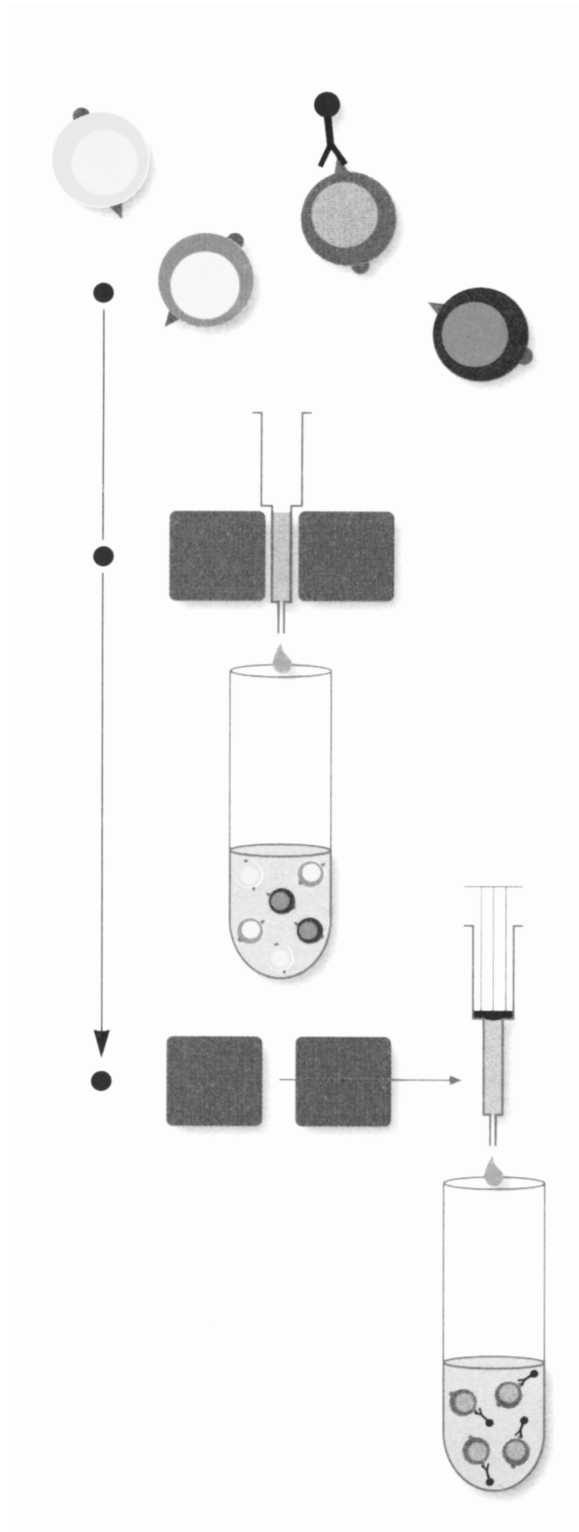


Abbildung 2-6: Das Verfahren zur Zellanreicherung mit MACS (modifiziert nach [99]). Dargestellt ist hier die Trennung mittels einer direkten Methode.

Eingesetzte Materialien (alle von Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

- * MACS Microbeads: superparamagnetische Microbeads aus Eisenoxid und einem Polysaccharid, an die ein Ratte-anti-Maus-IgG₁ Antikörper gekoppelt ist, Durchmesser 50 nm
- * Separator: VarioMACS
- * Magnetische Trennsäulen: Typ AS (für bis zu 3×10^7 markierte Zellen) oder RS (speziell für die Isolation seltener Zellen), jeweils mit einer Säulenmatrix aus ferromagnetischen Fasern mit Kunststoffumhüllung

Ansetzen des Säulentrennpuffers

5 mmol/l EDTA wurden in PBS gelöst und 0,5 % BSA zugesetzt.

Durchführung

Die Zellsuspension (wie unter Punkt 3.3.4 beschrieben) wurde mit 25 µl eines ersten Antikörpers (siehe Tabelle 2-6) 15 bis 120 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden MACS Microbeads (20 µl auf 10^7 Zellen) zu der Zellsuspension zugegeben und die komplette Suspension weitere 15 bis 45 min inkubiert.

Die verwendeten Trennsäulen wurden einmal mit 70 % Ethanol und mehrfach mit dem Säulentrennpuffer gewaschen, gekühlt, mit entgastem Puffer gefüllt und in den Separator eingespannt, anschließend mit der Pufferlösung durchspült und mit der gut gemischten Zellsuspension beladen. Nach mehrfachem Spülen mit dem Säulentrennpuffer (Negativ-Fraktion) wurde die Säule aus dem Separator genommen und die Positivfraktion mit dem Puffer eluiert.

Bei den meisten Versuchen mußte nach dem Auftragen der Zellsuspension auf die Trennsäule mit einer Einmalspritze ein Stempeldruck auf die Flüssigkeitssäule im Überstand ausgeübt werden, damit der Überstand in die Säule eintreten konnte.

Alle gewonnenen Fraktionen wurden 5 min bei 79 x *g* in der Kühlzentrifuge zentrifugiert, ad 1 ml mit entionisiertem Wasser aufgefüllt, mit Ultraschall behandelt, 10 min bei 2000 x *g* in der Kühlzentrifuge zentrifugiert und der Überstand aliquotiert bei -20 °C eingefroren.

Kontrollversuch

Herstellung des Percoll-Gradienten (Dichte: 1,088 g/ml)

1,5 ml	Percoll (Sigma, Deisenhofen) wurden mit
9,5 ml	10-fach konzentriertem HBSS-Puffer und
4,0 ml	entionisiertem Wasser gemischt.

Aus humanem Vollblut wurden Granulocyten durch einen Percoll-Gradienten, wie unter [112] beschrieben, vorangereichert. Mit Hilfe der Trennsäule Typ AS und Microbeads, an die direkt ein Antikörper gegen das Oberflächenmolekül CD 16 gekoppelt war, wurden im VarioMACS-Separator durch Depletion neutrophiler Granulocyten die eosinophilen Granulozyten isoliert.

2.3.2 Zellanreicherung mit Dynabeads

Prinzip

Die ausgewählten Zellen werden über Antikörperbrücken mit superparamagnetischen Kügelchen (Dynabeads) markiert. Anschließend wird das Röhrchen, in dem sich die Zellsuspension befindet, direkt in eine Magnethalterung eingesetzt. Die markierten Zellen haften an der Gefäßwand, während die nicht markierten Zellen in Lösung bleiben und mit einer Pipette entnommen werden können (siehe Abbildung 2-7).

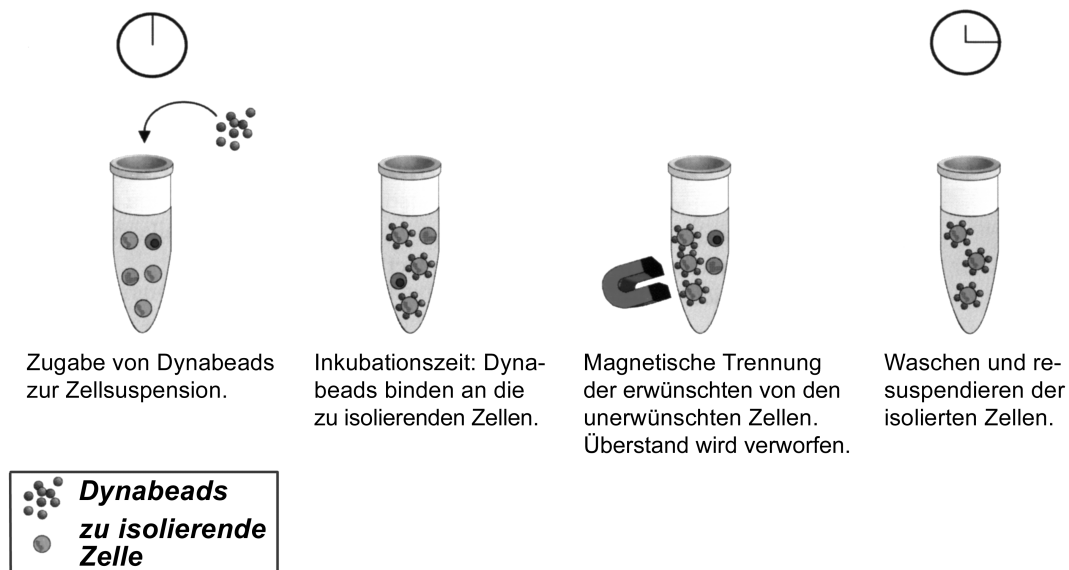


Abbildung 2-7: Funktionsweise der Dynabeads (modifiziert nach [113]).

Hinweise des Herstellers [100]

Für Zellen mit geringer Antigendichte empfiehlt Dynal, die indirekte Technik einzusetzen, da freie Antikörper, weil sie kleiner und somit beweglicher sind, leichter an Zelloberflächenantigene binden können als mit Dynabeads gekoppelte Antikörper. Die Inkubationszeit des primären Antikörpers sollte hierbei länger als 30 Minuten gewählt werden.

Dynal rät, $1-2 \times 10^7$ Dynabeads / ml Zellsuspension und 3 bis 5 μg des primären Antikörpers pro 10^7 Dynabeads (für eine maximale Bindung bis zu 8-10 μg Antikörper / 10^7 Dynabeads) und mindestens 4 Dynabeads pro gesuchter Zelle einzusetzen.

Eingesetzte Materialien (alle von Deutsche Dynal, Hamburg)

- * Dynabeads: Typ M-450 Ratte anti-Maus IgG₁, Typ M-280 Schaf anti-Kaninchen IgG, Typ HLA CLASS I und HLA CLASS II; superparamagnetische, antikörpergekoppelte Polymerkügelchen mit einem Eisenoxidkern, Durchmesser 4,5 bzw. 2,8 μm
- * Magnethalterung: Typ MPC E-1

2.3.2.1 Standardversuch und Variationen

Herstellung der kaliumreichen, chloridarmen Ringerlösung [114]

100 mmol/l	Kaliumgluconat	(Sigma, Deisenhofen)
30 mmol/l	KCl	(Merck, Darmstadt)
10 mmol/l	HEPES	(Roth, Karlsruhe)
20 mmol/l	NaCl	(Roth, Karlsruhe)
1 mmol/l	MgCl ₂ • 6 H ₂ O	(Merck, Darmstadt)
1,25 mmol/l	CaCl ₂ • 2 H ₂ O	(Merck, Darmstadt)

Alle Substanzen wurden in entionisiertem Wasser gelöst und der pH mit Kalilauge auf 7,3 bis 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde nicht länger als drei Tage im Kühlschrank aufbewahrt.

Durchführung des Standardversuchs

Zu der Zellsuspension (wie unter Punkt 2.2.3 beschrieben) wurde eine auf die Zellzahl abgestimmte Menge eines primären Antikörpers (siehe Tabelle 2-6) pipettiert. Die Röhrchen wurden in einen Drehschüttler eingespannt und bei 4 °C 60 min bei einer Drehfrequenz von 22 Umdrehungen / min inkubiert. Nach einer Zentrifugation in der Kühlzentrifuge bei 150 x g für 5 min wurden erneut Zellzahl und Intaktheit überprüft. Abgestimmt auf die errechnete Zellzahl wurden der Zellsuspension antikörpergekoppelte, magnetische Dynabeads zugesetzt (siehe Tabelle 2-7), die vorher mit EDTA/PBS-Puffer gewaschen worden waren. Die Mischung wurde 15 min auf Eis unter ständigem Drehen der Röhrchen inkubiert und die Gefäße danach in eine Magnethalterung eingesetzt. Dadurch wanderten die mit Dynabeads markierten Zellen in Richtung des Magneten an die Gefäßwand, während alle nicht markierten Zellen in Lösung blieben und anschließend entfernt werden konnten. Die markierten Zellen wurden zweimal mit EDTA/PBS-Puffer gewaschen, die Überstände mit dem ersten Überstand gepoolt und die so entstandenen Positiv- und Negativfraktionen auf ihre Zellzahl und Intaktheit wie vorher beschrieben kontrolliert. Die Positivfraktion wurde nach dem letzten Waschschrift in PBS-Puffer aufgenommen, die Negativfraktion nochmals bei 150 x g 5 min zentrifugiert und in entionisiertem Wasser aufgenommen. Die Proben wurden mit Ultraschall behandelt (siehe unter Punkt 2.1.2.1), bei 2000 x g

10 min zentrifugiert und aliquotiert bei -20 °C eingefroren. Der GIP-Gehalt aller Proben wurde durch ein RIA (siehe Punkt 2.1.2.2) bestimmt.

Der spezifische GIP-Gehalt wurde definiert als Quotient aus gemessener GIP-Konzentration der Probe und der vorher ermittelten Zellzahl. Der Anreicherungsfaktor für das Hormon ergab sich, indem der spezifische Hormongehalt der Positivfraktion durch den spezifischen Hormongehalt der Ausgangsfraktion (nach Filtration) geteilt wurde.

Die tatsächliche Zahl der Dynabeads in Lösung wurde vorher unter dem Mikroskop ausgezählt.

Tabelle 2-6: Übersicht über die zur Isolation der K-Zellen getesteten primären Antikörper
N-CAM = Neural Cell Adhesion Molecule, MHC-1 = Major Histocompatibility Complex 1
MHC-2 = Major Histocompatibility Complex 2

Antikörper	Typ	Hersteller	Biologische Funktion	Eingesetzte Konzentration [µg/ml]
Syntaxin	monoklonaler Maus anti-Ratte IgG ₁	Sigma, Deisenhofen	interzelluläre Signaltransduktion	152,5
Synaptophysin	monoklonaler Maus anti-Ratte IgG ₁	Sigma, Deisenhofen	interzelluläre Signaltransduktion	127,5
N - CAM	monoklonaler Maus anti-Ratte IgG ₁	Sigma, Deisenhofen	Zelladhäsion	97,5
GIP	polyklonaler Kaninchen anti-Mensch IgG	Peninsula, San Carlos	Insulinotropes Hormon	10
MHC-1	monoklonaler Maus anti-Ratte IgG ₁	Cedarlane, Hornby	Immunität	10
MHC-2	monoklonaler Maus anti-Ratte IgG ₁	Harlan Sera-Lab Ltd., Crawley Down	Immunität	10

Tabelle 2-7: Faktoren zum Umrechnen der Zellzahl auf die zur Isolation der K-Zellen einzusetzende Menge an Dynabeads.

Typ Dynabeads	Zuzugebendes Volumen [in µl]	Dynabeads / 10 ⁶ Zellen
M-450	Zellzahl [in 10 ⁶ /ml] * 50	12
M-280	Zellzahl [in 10 ⁶ /ml] * 37,5	12

Für die *Anreicherungsversuche* wurden primäre Antikörper gegen die Zellmembranproteine Syntaxin, Synaptophysin und N-CAM, sowie gegen das K-Zellprodukt GIP getestet (siehe Tabelle 2-6).

Analog wurden zur *Abreicherung* von Epithelzellen dem HLA I und HLA II bei Menschen entsprechende, rattenspezifische MHC-1- und MHC-2-Antikörper eingesetzt (siehe Tabelle 2-6).

Bei den humanspezifischen Dynabeads Typ HLA CLASS I+II (nicht in Tabelle 2-6 aufgeführt) waren die Antikörper, die an die Zelloberflächen binden, direkt mit den Dynabeads gekoppelt. Daher war bei diesen Versuchen eine direkte Technik zur *Abreicherung* von Epithelzellen anzuwenden.

Variationen der Standardtechnik

Bevor die oben beschriebene Durchführung feststand, wurden zusätzlich zu den Tests mit unterschiedlichen Antikörpern verschiedene andere Parameter des Versuchs variiert:

- a) Anstelle der indirekten Technik wurde bei Versuchen mit dem GIP-Antikörper die direkte Technik getestet.
- b) Der primäre Antikörper wurde zwischen 15 und 120 min bei 4 °C mit den Zellen inkubiert.
- c) Nach Zugabe der Dynabeads wurden die Röhrchen mit den Zellen zwischen 1 und 30 min auf Eis gedreht.
- d) Alle Arbeitsschritte wurden anstelle auf Eis bei Raumtemperatur (etwa 22 °C) durchgeführt.
- e) Um die Intaktheit der gewonnenen Zellen weiter zu erhöhen [115], wurden anstelle des EDTA/PBS-Puffers verschiedene Transplantationsmedien (VIASPAN (UW-Lösung), DuPont, Bad Homburg oder Euro-Collins-Lösung, nach Daten von Fresenius, Oberursel [116] selbst hergestellt), das Kulturmedium DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium Nr. 41965; Life Technologies, Eggenstein) oder eine kaliumreiche, chloridarme Ringerlösung eingesetzt.

2.4 Nachweis der Anreicherung und der Glucose-Stimulierbarkeit der K-Zellen *in vitro*

Nach Anreicherung der K-Zellen in der Positivfraktion (wie unter Punkt 2.3.2.1 beschrieben) sollte nachgewiesen werden, daß die Zellen auf einen Glucosereiz (20 mmol/l) mit der Ausschüttung von GIP reagieren.

Herstellung einer Glucoselösung der Konzentration 60 mmol/l

11,9 mg D-Glucose-Monohydrat wurden in 1 ml PBS (siehe unter Punkt 2.1.3.1) gelöst und der pH der Lösung auf 7,3 eingestellt.

Durchführung

Jeweils 200 µl der Positivfraktion (zweifach konzentriert, da aus doppeltem Ansatz) wurden für einen Stimulations- und einen parallelen Blindversuch eingesetzt. Nach Zugabe von 100 µl der Glucoselösung bzw. 100 µl PBS-Puffer wurden die Proben in Eppendorf-Gefäßen 20 min bei 4 °C unter ständigem Drehen inkubiert. Anschließend wurde der Überstand von den Zellen getrennt, indem die Eppendorf-Gefäße in eine Magnethalterung (siehe Punkt 2.3.2) eingesetzt und der Überstand anschließend nochmals 5 min bei 79 x g zentrifugiert wurde. Sowohl die Zell- als auch die Überstandsfraktionen wurden mit entionisiertem Wasser auf 200 µl aufgefüllt, alle Proben mit Ultraschall behandelt (siehe Punkt 2.1.2.1), 10 min bei 2000 x g in der Kühlzentrifuge zentrifugiert und aliquotiert bei -20 °C eingefroren. Der GIP-Gehalt der Proben wurde in einem RIA (wie unter Punkt 2.1.2.2 beschrieben) ermittelt.

2.5 Statistik

Zur statistischen Auswertung der Versuche wurde zum Vergleich zweier Werte jeweils der Students t-Test für ungepaarte Proben angewandt. Zwei Größen wurden mit einem Signifikanzniveau $p < 0,05$ als signifikant unterschiedlich betrachtet. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

