

4 Diskussion

4.1 Lokalisation der K- und L-Zellen

Optik der K- und L-Zellen

Anhand der fluoreszenzgefärbten Darmschnitte konnte gezeigt werden, daß sowohl K- als auch L-Zellen endokrine Zellen vom offenen Typ sind. Diese Ergebnisse bestätigen die Angaben aus der Literatur zum Aussehen der K- und L-Zellen [20,48,49].

Verteilung der K-Zellen über die gesamte Darmlänge

Mit der Immunfluoreszenztechnik (siehe Punkt 2.1.1.2) konnten K-Zellen im Duodenum der Ratte nachgewiesen werden. Die weiteren radioimmunologischen Untersuchungen (siehe Punkt 2.1.2.2) ergaben, daß die Konzentration der K-Zellen vom Duodenum zum proximalen Jejunum ansteigt, dort ein Maximum erreicht und bis zum Ileum wieder abfällt. GIP war über die gesamte Dünndarmlänge nachzuweisen.

Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Beobachtungen überein [24,33,34,117]. Ein anderer Autor fand im Duodenum der Ratte die höchsten GIP-Gehalte, konnte aber ebenfalls K-Zellen über den über den kompletten Darm verteilt nachweisen [35].

Die in den Untersuchungen gefundenen Konzentrationen von $0,98 \pm 0,14$ ng GIP/mg Protein entsprechen in etwa den Werten einer anderen Studie [24], in der die Konzentration von GIP im Dünndarm mit $2,22 \pm 0,26$ ng/mg Protein angegeben wurde.

Die Verteilung der K-Zellen im menschlichen Darm unterscheidet sich leicht von der Verteilung im Rattendarm. Auch beim Menschen wurden im Duodenum [30,31] die höchsten K-Zell-Konzentrationen ermittelt, im Ileum konnten jedoch fast keine K-Zellen mehr nachgewiesen werden.

Verteilung der L-Zellen über die gesamte Darmlänge

Durch Immunfluoreszenzfärbungen auf Darmschnitten konnte GLP-1 im Ileum der Ratte nachgewiesen werden. Im Duodenum waren keine L-Zellen sichtbar.

Die radioimmunologischen Untersuchungen ergaben einen deutlichen Gradienten in der GLP-1-Verteilung entlang des Darms. Die GLP-1-Konzentrationen stiegen vom Duodenum zum Ileum an; nennenswerte Mengen an GLP-1 waren erst im distalen Jejunum meßbar.

Diese Ergebnisse stimmen mit den Angaben aus der Literatur überein [49,74]. Auch EISSELE et al. [50] fanden bei der Ratte vereinzelt L-Zellen im Duodenum ($0,16 \pm 0,09$ Zellen/mm³) und erst ab dem distalen Jejunum erwähnenswerte Mengen an GLP-1 ($10,30 \pm 1,25$ Zellen/mm³); die höchsten L-Zelldichten fanden sie bei der Ratte im Colon transversum ($15,49 \pm 4,64$ Zellen/mm³).

Im Gegensatz zu einer früheren Arbeit [74] wurden insgesamt um etwa Faktor 200 höhere GLP-1-Konzentrationen in allen Darmabschnitten gemessen.

Beim Menschen wurden übereinstimmend die höchsten GLP-1-Konzentrationen im distalen Dünndarm und Colon gefunden. Während SJÖLUND et al. [31] und NAUCK et al. [65] die höchste L-Zellkonzentration beim Menschen im Ileum nachgewiesen haben, zeigten EISSELE et al. [50] eine Verteilung der L-Zellen mit zwei Maxima auf: eines im distalen Jejunum und eines im Rectum. Über das Vorkommen von L-Zellen im menschlichen Duodenum existieren gegensätzliche Aussagen [36,50].

Lokalisation der K-Zellen entlang der Krypt-Villus-Achse

Mittels radioimmunologischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß sich die GIP-produzierenden K-Zellen bei der Ratte vor allem in der oberen Villushälfte befanden. Ein Vergleich mit Daten aus der Literatur ist schwierig, da bisher kaum Untersuchungen an Ratten vorliegen. SMITH [36] fand, daß GIP bevorzugt in Krypten, aber auch in Villi lokalisiert war, PEDERSON et al. [117] beobachteten eine gleichmäßige Verteilung der K-Zellen über Krypten und Villi. Im Gegensatz

dazu stellten ROTH et al. [118] bei Mäusen fest, daß sich die K-Zellen zu 75 % auf den Villi befanden.

Auch beim Menschen gibt es widersprüchliche Befunde. Eine bevorzugte Lokalisation der K-Zellen in den Krypten fanden SJÖLUND et al. [31] und RÖNNBLOM et al. [32]. POLAK et al. [30] wiesen die K-Zellen vor allem im mittleren Teil der Krypten, im Duodenum aber auch auf Villi nach und BUCHAN et al. [20] beobachteten die GIP-Zellen primär in den oberen Krypten und Villi.

Lokalisation der L-Zellen entlang der Krypt-Villus-Achse

Auch zur Lokalisation der L-Zellen entlang der Krypt-Villus-Achse liegen bisher wenige Untersuchungen vor. Diese stimmen allerdings mit den hier gefundenen Ergebnissen überein. Sowohl bei der Ratte [31,36] als auch beim Menschen [31,32] befinden sich die L-Zellen bevorzugt in den Krypten des Darms.

Zuverlässigkeit der vorliegenden Ergebnisse

Die Verteilung der K- und L-Zellen entlang des gesamten Darms und entlang der Krypt-Villus-Achse wurde in dieser Arbeit im Gegensatz zu anderen Arbeiten nicht nur durch ein Auszählen immunfluoreszenzmarkierter Zellen untersucht. Die Zellen wurden hier mit der Ausschütteltechnik, die eine durch die Markerenzyme nachgewiesene Trennung von Villus- und Kryptzellen erlaubt, lokalisiert und die Zellprodukte durch einen Radioimmunoassay quantifiziert.

Ein Auszählen angefärbter Zellen alleine ist unzuverlässig und kann nie repräsentativ sein, da auf diese Weise nur ein winziger Teil des zu untersuchenden Probenmaterials erfaßt werden kann. Gezielte Methoden, bei denen die gesamte Probe erfaßt wird und deren quantitative Ergebnisse durch den Einsatz eines Radioimmunoassays abgesichert wurden - wie in dieser Studie - sind zuverlässiger.

Nahrungseinflüsse

Sowohl die Zahl und Verteilung der enteroendokrinen Zellen im Darm der Ratte, als auch die Freisetzung ihrer Zellprodukte wird durch die Art der Nahrung, die Darmflora und deren Wechselwirkungen beeinflusst [29,35,119,120]. Da die in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Ratten gesund waren, freien Zugang zu Nahrung hatten, mit einer standardisierten Nahrung gefüttert und unter identischen Bedingungen gehalten wurden, sind Einflüsse innerhalb der Studie auszuschließen.

Unterschiede in der Verteilung der K- und L-Zellen bei Ratte und Mensch

Prinzipiell weisen Ratte und Mensch in der Verteilung ihrer K- und L-Zellen ähnliche Gradienten auf, doch kleine Unterschiede existieren: Die K- und L-Zellen kommen bei der Ratte im Gegensatz zum Menschen im gesamten Darm vor, sind also weiträumiger verteilt und die maximale Konzentration an K-Zellen befindet sich im Rattendarm distaler als im humanen Darm. Darauf soll später (siehe Punkt 4.6.2) noch eingegangen werden.

4.2 Isolation der K-Zellen

Vergleich der getesteten Methoden mit Ergebnissen aus der Literatur

Intaktheiten wie bei SAIFIA et al. [62] (über 90 %) konnten mit der getesteten mechanischen Isolationsmethode nicht erreicht werden. Das könnte daran liegen, daß es nicht möglich war, technisch identische Versuchsbedingungen zu erzeugen. Wahrscheinlicher ist aber, daß die Zellen aus den Villusspitzen empfindlicher auf mechanische Reize reagieren als die zunächst noch eine Weile im Zellverband vorliegenden Kryptzellen, die SAIFIA et al. isoliert hatten. Auch andere Autoren haben für Epithelzellen, die mit mechanischen Verfahren isoliert wurden, schlechte Intaktheiten (< 10 %) beschrieben [94].

Im Gegensatz dazu erzielten PERRET et al. [88] bei der Isolation von Colon-Epithelzellen mit einer mechanischen Methode gute Ergebnisse (Ausbeute $4,0 \times 10^6$ Zellen mit einer Intaktheit von über 90 %). Auch aufgrund eigener Tests

kann vermutet werden, daß Colonzellen auf mechanischen Streß weniger empfindlich reagieren als Zellen aus dem Duodenum und Jejunum der Ratte.

Bei Versuchen zur Isolation von Epithelzellen aus dem proximalen Dünndarm der Ratte mit enzymatischen Methoden wurden - im Gegensatz zu den eigenen Versuchen - bereits gute Ergebnisse erzielt [89,121]; die durch Collagenase-Verdau gewonnenen Zellsuspensionen zeichneten sich sowohl durch hohe Zellgehalte (größer $1,5 \times 10^7$ Zellen pro 20 cm Darm) als auch durch hohe Intaktheiten (mehr als 90 %) aus. Allerdings bestanden die Suspensionen nicht nur aus Einzelzellen, sondern auch aus vielen Zellverbänden. Außerdem bringt ein Collagenase-Verdau unvorhersehbare Risiken bezüglich der Intaktheit der Antigene auf den Zelloberflächen mit sich. Für die Anreicherung endokriner Zellen durch immunomagnetische Methoden würde die enzymatische Zellisolation somit keine gute Grundlage bilden.

In Übereinstimmung mit den vergleichenden Untersuchungen von EADE et al. [94] konnten auch in dieser Arbeit die besten Ergebnisse durch Inkubation der Därme in hyperosmolarem Chelatpuffer erzielt werden. Aus dem Duodenum und proximalen Jejunum der Ratte konnten durchschnittlich $3,1 \pm 0,3 \times 10^6$ Zellen mit einer Intaktheit von 81 ± 1 % gewonnen werden. Durch das relativ schonende Verfahren wurden vor allem Zellen aus den Villi gelöst (Ergebnisse nicht dargestellt); die Zahl der isolierten Zellen war dadurch im Vergleich zu anderen Arbeiten eher gering [91]. Dies war für den weiteren Versuchsablauf allerdings auch wünschenswert, weil sich die zu isolierenden K-Zellen in der oberen Hälfte der Villi befinden und somit gleichzeitig weniger verunreinigende Zellen aus dem Zellverband gelöst wurden. Berücksichtigt man, daß Rattendarm als Untersuchungsmaterial besonders autolyseempfindlich ist [122], so ist die erzielte Intaktheit sehr positiv zu beurteilen. Sie ist in jedem Fall ausreichend für die sich anschließenden Anreicherungsversuche.

Der Zeitrahmen zur Inkubation des Darms scheint klar begrenzt zu sein. Bei einer Inkubationszeit deutlich unter 30 min wurden zu wenige Zellen aus dem Zellverband gelöst, mit einer über 30 min zunehmend längeren Inkubationszeit sank die Intaktheit der gewonnenen Zellen stetig.

Einige Gründe scheinen für eine Inkubation der Rattendarms bei 4 °C zur Zellisolation zu sprechen [91], z.B. der Erhalt instabiler mRNA-Transkripte und daraus entstehender Proteine, der bessere Erhalt der strukturellen Integrität der Einzelzelle und die Verhinderung der Internalisierung von Oberflächenrezeptoren. Dennoch wurden in dieser Arbeit mit einer Inkubation bei 37 °C bezüglich der Zellzahlen und der Intaktheit der Zellen bessere Ergebnisse erzielt als bei der Durchführung bei 0 °C. Für die weitere Versuchsdurchführung wurde in Übereinstimmung mit EADE et al. [94] und FLINT [91] eine Temperatur von etwa 4 °C gewählt.

Die Begasung der Zellsuspension stellte offenbar keinen zusätzlichen mechanischen Streß für die Zellen dar; im Gegenteil: die Zellen *benötigten* die Begasung bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C vermutlich sogar, um die Zellatmung in ausreichendem Maße aufrecht zu erhalten.

Ein Glutaminzusatz, der sich insbesondere protektiv auf Zellen aus dem Darm auswirken kann, da Glutamin in der Lage ist, in hohem Maße zu deren Energieversorgung beizutragen (siehe Übersichtsartikel [123,124]), hat hier offenbar kurzfristig keinen positiven Einfluß auf die Intaktheit der Zellen.

Besondere Vorteile der gewählten Methode

Die Zellisolation durch Einsatz des hyperosmolaren Chelatpuffers bietet für die weitere Versuchsdurchführung eine Reihe von Vorteilen:

1. Die Methode ist im Vergleich zu den anderen dargestellten Verfahren zellschonend.
2. Insbesondere im Vergleich zur enzymatischen Zellisolation werden die Proteine auf der Zelloberfläche, die für eine spätere immunologische Markierung benötigt werden, kaum geschädigt.
3. Die resultierende Zellsuspension besteht - im Gegensatz zu einer durch enzymatischen Gewebeverdau gewonnenen Suspension - weitgehend aus intakten Einzelzellen (wozu auch DTT im Inkubationspuffer [125] und EDTA im

Auffangpuffer beitragen). Dies macht eine immunomagnetische Zellanreicherung als nächsten Schritt erst möglich.

4. Im Vergleich zu anderen Chelatoren wie EDTA oder EGTA (Ergebnisse nicht dargestellt; siehe auch [94]) greift Natriumcitrat die Zelloberflächen weniger an, was sich in vergleichsweise höheren Intaktheiten ausdrückte.

Grenzen der Methode

1. Wie auch andere Verfahren bedeutet die Einwirkung des Chelatpuffers Streß für die Zellen. Durch die zur Isolation benötigte, unphysiologisch hohe Osmolalität der Lösung (siehe Punkt 2.2.3) ist eine gewisse Zellschädigung nicht auszuschließen, die sich nach Anreicherung der Zellen noch negativ auswirken könnte.
2. Eine relativ geringe Ausbeute an Zellen ist zwangsläufig gegeben, wenn seltene Zellen in hoher Reinheit angereichert werden und ist nicht negativ zu bewerten (siehe oben). Zur Steigerung der Zellausbeute kann im Bedarfsfall eine höhere Anzahl an Därmen eingesetzt werden.

4.3 Anreicherung der K-Zellen

4.3.1 Zellanreicherung durch Magnetic Cell Sorting (MACS)

Vor- und Nachteile der Zellanreicherung durch „MACS“

Die „MACS“-Beads sind extrem klein und verursachen bei Zellen daher kaum mechanischen Streß. Bei Einzelzellgemischen sind Trennungen mit hoher Reinheit und Intaktheit der zu isolierenden Zellen möglich, wie auch durch die Anreicherung eosinophiler Granulozyten aus Vollblut gezeigt werden konnte (siehe Punkt 3.3.1). Zudem könnten Zellen mit auch mit anhaftenden MACS-Microbeads, zunächst im Tierversuch, transplantiert werden, da ein Embolierisiko aufgrund der geringen Größe der Partikel sehr unwahrscheinlich ist.

Für visköse Proben ist die „MACS“-Technik offenbar nicht geeignet. Die Zellsuspension durchlief die Trennsäule nicht wie gewünscht. Eine Anwendung

von Druck auf die Säule ist vom Hersteller nicht vorgesehen und für den Trennungsvorgang nicht förderlich, da zum einen markierte und in der Matrix haftende Zellen direkt wieder aus der Säule herausgedrückt werden und zum zweiten die Intaktheit der Zellen durch die mechanische Belastung sinkt. Da das Verfahren somit für die untersuchte Anwendung ungeeignet ist, wurde auf eine weitere Erprobung der immunomagnetischen Zellseparation mit dieser Technik verzichtet.

4.3.2 Zellanreicherung mit Dynabeads

Bisherige Anreicherungsversuche endokriner Zellen

Bisher wurde zur Anreicherung endokriner Zellen aus Dünndarm meist das Elutriationsverfahren genutzt [62,96,25,93,98,97]. Die mit dieser Technik erzielten Anreicherungsfaktoren waren jedoch durchgängig niedrig (siehe Tabelle 4-1) und lagen im Bereich einer 2 bis 13fachen Anreicherung der gewünschten Zellen.

Tabelle 4-1: Durch Elutriation erzielte Anreicherungen endokriner Zellen. CCK = Cholecystokinin, GIP= Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide, GLP-1 = Glucagon-Like Peptide-1

Autor	Untersuchte Spezies	Untersuchter Darmabschnitt	Angereicherte Zellart	Anreicherungsfaktor
SAIFIA et al.[62]	Ratte	Ileum	L-Zellen (GLP-1)	6 bis 7
BUCHAN et al. [96]	Hund	Ileum	L-Zellen (GLP-1)	4 bis 5
KIEFFER et al. [25]	Hund	Duodenum/Jejunum	K-Zellen (GIP)	3
POITRAS et al. [93]	Hund	Duodenum/Jejunum	K-Zellen (GIP)	6,6
XUE et al. [98]	Hund	Duodenum	S-Zellen (Sekretin)	13
KOOP et al. [97]	Hund	Jejunum	I-Zellen (CCK)	2,4

Durch gezielte anschließende Kultivierung konnten KIEFFER et al. [25] K-Zellen aus Hundeduodenum und -jejunum bis zu 100fach anreichern. Etwa 10 % der Zellen in Kultur waren nach Auswertung durch ein immunoenzymatisches Färbeverfahren (PAP-Färbung) K-Zellen.

Anteil der K-Zellen an der Gesamtzellzahl

SJÖLUND et al. [31] gaben die Anzahl endokriner Zellen im menschlichen Darm mit 3×10^9 Zellen an. POITRAS et al. [93] fanden heraus, daß der Anteil aller endokriner Zellen im Hundeduodenum und -jejunum nach rund fünffacher Anreicherung 4,4 % aller Zellen ausmacht. Somit läge der Anteil endokriner Zellen im Darm bei etwa 0,9 %. Bezogen auf die Angaben von SJÖLUND et al. [31] hieße das, daß die gesamte Zellzahl im menschlichen Darm bei etwa $3,3 \times 10^{11}$ Zellen liegt. Die Anteile der K-Zellen an der Zahl endokriner Zellen betragen nach einer Auszählung immunhistochemisch angefärbter Gewebeschnitte im menschlichen Duodenum rund 19 % und im Jejunum rund 15 % [31]. Somit läge der Anteil der K-Zellen im menschlichen Duodenum und Jejunum bei 0,1 bis 0,2 %.

Diese Rechnung soll als grober Richtwert für die weiteren Überlegungen dienen, zumal diese Zahlen in guter Übereinstimmung mit den Angaben von KIEFFER et al. [25] stehen, die für K-Zellen im Hundejejunum einen Anteil von kleiner 0,1 % angegeben haben.

Anreicherung der K-Zellen mit Dynabeads

Die Antikörper gegen Zellmembranbestandteile anti-Syntaxin und anti-N-CAM erbrachten gegenüber der Elutriationstechnik keine deutliche Verbesserung in der Anreicherung von K-Zellen. Eine neuere Studie [126] hat aufgezeigt, daß Synaptophysin weniger mit GIP, sondern eher mit Serotonin colokalisiert ist. Demnach ist Synaptophysin, wie vermutlich auch Syntaxin und N-CAM, eher ein allgemeiner endokriner Zellmarker. Unter diesem Aspekt ist der mit dem anti-Synaptophysin-Antikörper erzielte Anreicherungsfaktor von 22 ± 8 sogar besonders positiv zu bewerten. Diese Zahl liegt noch deutlich über den mit der Elutriation erzielten Ergebnissen. Der Antikörper muß demnach die endokrinen Zellen besonders effektiv markiert haben.

Mittels HLA I- oder HLA II-Antikörpern konnte keine gezielte Abreicherung der Epithelzellen erreicht werden. Das ist nicht allzu überraschend, da bei dieser Art der Antigene spezieabhängige Unterschiede bestehen, so daß die Markierung der Epithelzellen vermutlich zu unspezifisch erfolgte.

Allerdings war die Abreicherung der Epithelzellen auch mit den Maus anti-Ratte MHC-1- oder MHC-2-Antikörpern nicht möglich. Hierbei könnte eine Rolle spielen, daß die Zahl der K-Zellen im Vergleich zu den sie in Suspension umgebenden Epithelzellen zu gering war, so daß die Trennung nicht in ausreichendem Maße erfolgen konnte. Wahrscheinlicher ist jedoch, daß der zu Beginn der Studie angestellte Analogieschluß, daß die endokrinen Zellen der Ratte - im Gegensatz zu den Dünndarmepithelzellen - wenig oder gar nicht MHC-1 und MHC-2 exprimieren, nicht zutreffend war.

Sehr erfolgreich verlief die Anreicherung der K-Zellen mit dem Kaninchen anti-Mensch GIP-Antikörper. Der mit diesem Antikörper erzielte Anreicherungsfaktor liegt mit 209 ± 32 weit über den mit der Elutriationstechnik erzielten Faktoren.

Geht man davon aus, daß der Anteil isolierter K-Zellen in der Zellsuspension rund 0,2 % beträgt, was aufgrund der vorher angestellten Rechnung und der Tatsache, daß bei der hier verwendeten Isolationsmethode vor allem Villuszellen isoliert werden, wahrscheinlich ist, so bedeutet ein 209-facher Anreicherungsfaktor, wie er mit dem Kaninchen anti-human GIP-Antikörper erzielt wurde, eine ungefähr 42 %ige K-Zellsuspension. Der Anteil der Zellen in der Positivfraktion an der Gesamtzellzahl lag bei den Versuchen bei durchschnittlich 0,3 %. Es ist davon auszugehen, daß nahezu alle K-Zellen aus dem Zellverband in den Villusspitzen gelöst werden konnten und rund 0,1 % Epithelzellen die K-Zellsuspension verunreinigten.

Diese Rechnung kann ebenfalls nur einen groben Richtwert für die Reinheit der erzielten K-Zellsuspension darstellen, weil Vergleichswerte für die Ratte in der Literatur bisher nicht publiziert sind und eine Überprüfung dieses Ergebnisses durch ein Anfärben der K-Zellen mittels Immunfluoreszenzfarbstoffen technisch nicht möglich war (siehe 3.3.2.2).

Eine Erklärung, warum ausgerechnet ein Antikörper gegen das Zellprodukt GIP im Inneren der K-Zelle die besten Anreicherungsfaktoren ermöglichte, liefert möglicherweise die Studie von WYNICK und BLOOM [127]. Zur Markierung Prolactin-produzierender Adenohypophysenzellen erzielten sie spezifische

Markierungen mit einem Prolactin-Antikörper und vermuteten daraufhin, daß die Granula der Zellen unter den gegebenen Bedingungen (4 °C) teilweise in der Zellmembran verankert blieben und so ihre Produkte an den Zelloberflächen präsentiert wurden. Der gleiche Mechanismus wäre auch für die K-Zellen denkbar.

Daß auch ein humanspezifischer GIP-Antikörper in der Lage ist, die Antigene der Ratte zu markieren, ist nicht weiter verwunderlich, da sich, wie in der Einleitung beschrieben (siehe Abbildung 1-2), die Peptidsequenzen des GIP bei Ratte und Mensch nur in zwei Aminosäuren mit jeweils konservativem Austausch unterscheiden.

Vorteile einer Zellanreicherung mit Dynabeads

Im Gegensatz zur „MACS“-Technik sind die Dynabeads säulenunabhängig anzuwenden. Die Zellen sind in Lösung freier beweglich und dadurch besser trennbar; einen Zellverlust durch in der Säule haftende Zellen gibt es nicht. Im Vergleich zur Elutriationstechnik ist die neue Methode sehr viel spezifischer. Beiden Methoden gegenüber ist die Zellanreicherung mit Dynabeads deutlich einfacher durchzuführen.

Grenzen der Methode

1. Die Trennung mittels Dynabeads bedeutet in jedem Fall einen mechanischen Streß für die Zellen [128].
2. Der Zellgehalt in der Positivfraktion ist durch den geringen K-Zell-Anteil bei Verwendung eines Rattendarms extrem gering. Damit wird auch die Auszählung der Zellen schwierig und ungenau. Der Variationskoeffizient betrug 15 %.
3. Die geringe Zellzahl wird auch bei weiterführenden Versuchen zu Problemen führen. Daher sollte trotz gegebenenfalls geringerer Aussage für weiterführende Versuche mehr als ein Rattendarm pro Versuch verwendet werden.
4. Trotz der Waschschrte gelingt keine 100 %ige Abtrennung der K-Zellen von Epithelzellen. Aus diesem Grund ist auch die Intaktheit speziell der endokrinen

Zellen in der Suspension nicht isoliert zu beschreiben, da die K-Zellen unter dem Lichtmikroskop von den Epithelzellen nicht zu unterscheiden sind.

5. Für die Anreicherung menschlicher K-Zellen müßten die für Rattenzellen optimierten Bedingungen überprüft und gegebenenfalls modifiziert werden.

Zusammenfassung

Im Vergleich mit den bisher mittels Elutriation durchgeführten Anreicherungsversuchen zeichnet sich das immunomagnetische Verfahren mit Dynabeads bei Verwendung eines optimalen ersten Antikörpers durch bisher noch nicht erzielte spezifische Anreicherungsfaktoren und Reinheitsgrade der K-Zellsuspension aus. Die Anwendung dieses Trennverfahrens verlief für die K-Zellen so erfolgreich, daß nun auch denkbar ist, es für die Isolation anderer endokriner Zellen einzusetzen.

4.4 Glucosesensitivität der K-Zellen

Nach oraler Glucosezufuhr (Größenordnung 25 bis 75 g) steigt der GIP-Plasmaspiegel bei Menschen signifikant an [27,80,129]. Gleiches gilt für die Ratte [29]. Auch eine K-Zell-angereicherte Zellsuspension in Kultur ließ sich mit Glucose stimulieren: ab einer Glucosekonzentration von 15 mmol/l konnte eine signifikante Freisetzung von GIP in das Kulturmedium gemessen werden. Möglicherweise hemmte hierbei das nicht aus dem Medium entfernte Produkt GIP eine intensivere Ausschüttung bei niedrigeren Glucosekonzentrationen, wie sie physiologisch gewesen wären (kleiner 20 mmol/l) [25].

Diese Ergebnisse bestätigen die Befunde dieser Arbeit, bei denen eine Stimulation der GIP-Ausschüttung aus K-Zellen durch Glucose in einer Konzentration von 20 mmol/l gezeigt werden konnte. Damit wurde auch nachgewiesen, daß die mit dieser Methode angereicherten Zellen nicht nur morphologisch intakt, sondern auch funktionell aktiv waren. Es sollen nun weitere Studien durchgeführt werden, in denen die Glucose-Sensitivität der K-Zellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* genauer charakterisiert werden soll.

4.5 Ausblick auf die Fortführung der Versuchsplanung

Nach Anreicherung der K-Zellen gibt es zur weiteren Planung mehrere Ansätze:

1. Betrachtet man die Isolation und Anreicherung der K-Zellen in erster Linie als Grundlagenforschung, so wäre der nächste wichtige Schritt die Kultivierung der K-Zellen, um schließlich eine möglichst reine K-Zellkultur funktionell charakterisieren zu können. Untersucht werden sollten die Hauptstimulatoren der Sekretion *in vitro*, die Sättigungskinetiken und ob es andere Modulatoren der Stimulation gibt. Ebenso sollte die intrazelluläre Signalkette der GIP-Sekretion näher untersucht werden. Mit Hilfe reiner Kulturen könnten erstmals definitive Aussagen zum Metabolismus der K-Zellen getroffen werden. Parallel sollten die Zellen wie geplant mit dem Proinsulingen transfiziert werden.
2. Wichtig wäre außerdem auszutesten, wie sich die isolierten und angereicherten K-Zellen verhalten, wenn man sie in einen lebenden Organismus implantiert. Zu klären wäre der optimale Ort zur Infusion der Zellen. Die Zellen müssten dort anhaften und ihre Funktion aufrecht erhalten können.
3. Als Alternative zu einer Kultivierung der Zellen mit anschließender Transfektion des Insulingens ist auch eine direkte Transfektion der Zellen in Suspension mit anschließender Transplantation denkbar.
4. In jedem Fall sollten die Dynabeads zunächst von den Zellen gelöst werden, da sie sonst sowohl in Kultur als auch bei einer Transplantation Schwierigkeiten bereiten könnten.

Ablösen der Dynabeads von den K-Zellen

An K-Zellen anhaftende Dynabeads sollten entfernt werden, da sie bei einer Transplantation zu Mikroembolien führen, bzw. in Kultur die Durchführung der weiteren Untersuchungen behindern könnten.

Nach Angabe des Herstellers [100] lösen sich die Dynabeads über Nacht von den isolierten Zellen. Für eine Kultivierung sollten demnach keine Schwierigkeiten zu erwarten sein. Für eine direkte Transfektion mit anschließender Transplantation müsste eine „Wartezeit“ eingehalten werden.

Direkte Transfektion des Proinsulingens in Zellen in Suspension

Eine direkte Transfektion des Insulingens in K-Zellen in Suspension verbunden mit einer anschließenden Transplantation der Zellen in Ratten ermöglicht zumindest rasche erste Aussagen über das Verhalten der transfizierten Zellen *in vivo*. Eine ähnliche Herangehensweise ist für Humanstudien selbstverständlich ausgeschlossen, da sie hierfür mit einem viel zu hohen Risiko verbunden ist.

Kultur von K- Zellen

Abgesehen von dem geplanten Projekt ist eine Kultivierung von K-Zellen für die Grundlagenforschung von Interesse. Die Kultivierung von K-Zellen scheint allerdings mit vielen Problemen verbunden zu sein:

Bei einem bisherigen Versuch zur Kultivierung von K-Zellen aus Hundedünndarm überlebten die ausgesäten Zellen (10% K-Zellen) in Kultur zwei Tage [25]. Leider sind die Aussagen der Versuche bezogen auf das aktuelle Projekt begrenzt, da die verwendete Suspension zu 90 % aus Nicht-K-Zellen bestand und die Ergebnisse nicht ohne weiteres auf Versuche mit Rattendarm übertragbar sind, weil Rattendarmzellen noch wesentlich empfindlicher als Zellen aus Hundedarm auf äußere Einflüsse reagieren [122].

Weitere Versuche zur Kultivierung von Darmzellen der Ratte beschäftigten sich in der Regel mit Epithelzellen, die auf Dauer in Kultur zu halten bisher auch noch nicht gelungen ist. Die Intaktheit ausgesäter Einzelzellen sank innerhalb von Stunden rapide ab und auch als kleine Zellverbände in Kultur genommene Zellen überlebten nur wenige Tage aufgrund der mangelnden Versorgung der im Inneren gelegenen Zellen. Auch der Einsatz von fetalem oder neonatalem Dünndarm und Gewebekulturversuche waren bisher wenig erfolgreich (Übersichtsartikel [130]).

Ein ganz entscheidender Grund für das Scheitern bisheriger Versuche könnte darin liegen, daß die Zellen auf gewisse Faktoren aus der Basalmembran und aus anderen Zellen angewiesen sind.

BENYA et al. [131] stellten fest, daß bei Colonocyten aus Kaninchendarm Kontakte innerhalb der Darmepithelzellen wichtig für deren Intaktheit (und damit die Kultivierbarkeit) waren. BOUDREAU et al. [132] kamen wenig später zu dem Schluß, daß die extrazelluläre Matrix der Basalmembran integrinabhängig die Apoptose in Epithelzellen in Kultur und *in vivo* hemmt. 1997 beobachteten HAGUE et al. [133], daß humane Colonepithelzellen von Zellkontakten und verschiedenen Wachstumsfaktoren (wie IGF I+II, EGF, Insulin und Hydrocortison), die die Apoptose verhindern können, abhängig sind.

Daß der Zellkontakt und der Kontakt der Zellen zur Basalmembran offenbar so extrem wichtig sind, könnte für die geplante Kultivierung zu Problemen führen, da Einzelzellsuspensionen für die Isolation und Anreicherung der K-Zellen nach der erfolgreich getesteten Methode nötig sind.

Ein Lösungsansatz hierfür könnte in der Verwendung von Biomatrix EHS liegen. Diese Substanz simuliert quasi die natürliche Basalmembran in Kultur und unterstützt die Anheftung und das Zellwachstum auf dem Substrat [134]. Die optimale Formulierung des Kulturmediums wäre neu zu erarbeiten.

Ein weiteres Problem für die Kultivierung der K-Zellen könnte darin bestehen, daß die Zellen in Kälte isoliert und angereichert wurden. Diese Art der Aufarbeitung ist unumgänglich, bedeutet aber vermutlich großen Streß für die Zellen, der sich bei der anschließenden Kultivierung negativ auf die Intaktheit der Zellen auswirken könnte. Viele Autoren beschreiben Zellschädigungen bis hin zur kälteinduzierten Apoptose bei der Reperfusion von Geweben nach kalter Aufbewahrung bei Transplantationsversuchen oder nach Kälteexposition von Einzelzellen in Kultur [135,136,137,138,139].

Auch die geringen Arbeitsvolumina der Anreicherungsversuche könnten bei Kultivierungsversuchen Probleme bereiten. In kleinen Volumina wirken sich Konzentrationsveränderungen durch die Verdunstung von Kulturmedium stärker aus. Hierbei könnte allerdings die gleichzeitige Präparation mehrerer Rattendärme zur Gewinnung einer größeren Zellzahl an K-Zellen Abhilfe schaffen.

Weitere Voraussetzungen für die Transplantation der K-Zellen

Ganz entscheidend für die Fortführung der Versuche wird es sein, genaue Informationen über die Überlebenszeit der K-Zellen *in vitro* und *in vivo* zu gewinnen. Im lebenden Organismus wandern Darmepithelzellen von den Krypten bis zu den Villi und werden dort bei der Ratte nach 2 bis 3 Tagen abgestoßen [17]. Zu klären ist nun, wie lange Darmepithelzellen generell unter optimierten Bedingungen überleben können und ob die gleichen Daten auch für K-Zellen zutreffen. Zu klären ist auch, inwieweit sich die Transfektion auf die Überlebenszeit der K-Zellen auswirkt.

Wenn die Überlebenszeit der K-Zellen auf wenige Tage begrenzt bleibt, ist es sinnlos, die gentechnisch veränderten Zellen zu transplantieren, da sie ihre Funktion dann nicht lange genug erfüllen könnten. Für den erfolgreichen Einsatz der K-Zellen als β -Ersatzzellen muß außerdem sichergestellt werden, daß die Zellen ihre Funktion dauerhaft aufrechterhalten. Außerdem sollten Komplikationen im Organismus vor einer Transplantation ausgeschlossen werden können, da es praktisch nahezu unmöglich ist, die Zellen nach der Transplantation zu lokalisieren und zu entfernen.

Ein weiteres Problem könnte in der Isolation einer ausreichenden Menge an K-Zellen zur Transplantation bestehen. Bei einer Biopsie können aufgrund des geringen Vorkommens der K-Zellen nur wenige Zellen gewonnen werden. Diese sind dann aber ausdifferenziert und somit nicht mehr teilungsfähig.

Dieses Problem könnte dadurch gelöst werden, daß man sich nicht um die Isolation der differenzierten K-Zellen bemüht, sondern darum, ihre noch undifferenzierten Vorläuferzellen zu gewinnen. Diese machen zwar auch nur weniger als 0,1 % der Zellen im Darm aus [130], sind aber teilbar [19] und mit hoher Effizienz zu transfizieren [140]. Man könnte sie isolieren, anreichern und *in vitro* vermehren, um sie dann zu transfizieren. Vorab müßte allerdings sichergestellt werden, aus welchen der Stammzellen die K-Zellen hervorgehen.

4.6 Die Signalkette zwischen K- und L-Zellen

4.6.1 Erkenntnisse aus der Literatur

Der „enteroendokrine Loop“

ROBERGE und BRUBAKER [57] fanden 1991 heraus, daß eine Fettinfusion in das Duodenum der Ratte eine qualitativ und quantitativ gleichartige Erhöhung des Plasmaspiegels an GLP-1 hervorruft wie eine direkte Infusion in das Ileum. Sie stellten die Vermutung an, daß ein humoraler oder neuraler Faktor diese Wirkung vermitteln könnte und nannten als Kandidaten dafür bereits GIP.

Ein „*enteroendokriner Loop*“ könnte auch die Tatsache erklären, daß die Plasmakonzentrationen an GLP-1 schon wenige Minuten nach einer Nahrungszufuhr ansteigen, lange bevor die Nährstoffe eine ausreichende Menge an L-Zellen erreichen können [47].

An fetalen Ratten-Darmzellkulturen konnte BRUBAKER [58] einen dosisabhängigen, stark stimulierenden Effekt von GIP auf L-Zellen ab einer Konzentration von 10^{-10} mol/l nachweisen. Weder Cholecystokinin, Neurotensin noch Peptide YY zeigten ähnliche Eigenschaften, doch das neurokrine Gastrin-Releasing Peptide (GRP) stimulierte die GLP-1-Sekretion ebenfalls ab einer Konzentration von 10^{-12} mol/l signifikant.

1992 postulierten ENSINCK und D'ALESSIO [75] eine Schleife zwischen Duodenum und Ileum beim Menschen zur GLP-1-Freisetzung. Zur gleichen Folgerung kamen ROBERGE und BRUBAKER 1993 [46] nach ihren *in vivo* Studien an Ratten. Sie konnten zeigen, daß eine nahrungsinduzierte GIP-Freisetzung zur einer Stimulation der GLP-1 Sekretion führt und formulierten das Konzept des „*enteroendokrinen Loops*“. Dabei kamen sie bereits zu dem Schluß, daß hinsichtlich der Peptide, die in diese Schleife involviert sind, Speziesunterschiede bei Hund, Mensch und Ratte bestehen könnten.

PLAISANCIE et al. [47] konnten am isolierten, perfundierten Rattencolon zeigen, daß verschiedene Neuropeptide und Neurotransmitter (Bombesin, Isoproterenol, Calcitonin gene-related Peptide (zum Vergleich [58])) potente Stimulatoren der GLP-1-Freisetzung sind und bestätigten Unterschiede in deren Wirksamkeit zwischen Ratten und anderen Spezies.

Daß eine nahrungsinduzierte GLP-1-Freisetzung nicht zwingend mit einer Erhöhung des GIP-Plasmaspiegels einhergehen muß, konnten HERRMANN et al. [80] durch Humanstudien zeigen, bei denen sie niedrigkonzentrierte Glucoselösungen in das menschliche Duodenum infundierten. Demnach mußte es mindestens einen weiteren Faktor außer GIP geben, der für die Regulation der GLP-1-Sekretion verantwortlich ist. HERRMANN-RINKE et al. [141] vermuteten, daß GRP für die Stimulation der GLP-1-Sekretion beim Menschen wichtig sein könnte.

Daß die Sensitivität der L-Zellen gegenüber Neurotransmittern und endokrinen Hormonen auch von ihrer Lage im Darm abhängig sein kann, vermuteten DUMOULIN et al. [142]. Bei ihrer Studie am perfundierten Rattenileum zeigten sie, daß L-Zellen aus dem Ileum weniger empfindlich gegenüber GIP als L-Zellen aus dem Colon sind. Eine Begründung dafür könnte in der jeweiligen Zahl der GIP-Rezeptoren auf den L-Zellen liegen. Außerdem postulierten DUMOULIN et al. eine rasche neurale Stimulation der L-Zellen nach der Nahrungsaufnahme.

1996 wiesen ROBERGE et al. [143] nach, daß eine Infusion des Neuropeptids Gastrin Releasing Peptide (GRP), das in Neuronen entlang des gesamten Darms vorkommt [144], die GLP-1-Sekretion aus den L-Zellen der Ratte stimuliert. Die Wirkung von GRP war dabei unabhängig von einer GIP-Sekretion. Der Einsatz des GRP-Antagonisten BW10 führte zu einer vollständigen Hemmung der GRP-abhängigen Stimulation der L-Zellen. ROBERGE et al. kamen zu dem Schluß, daß die Effekte von GIP *in vivo* bei der Ratte indirekt durch einen GRP-vermittelten Mechanismus zustande kommen könnten. Allerdings stimulierten physiologische Mengen an GRP die GIP-Freisetzung in ihrem Modell - im Gegensatz zu vorangegangenen Experimenten - nicht. Eine Erklärung hierfür könnte sein, daß eine Infusion von GRP nicht mit der physiologischen Freisetzung

des Transmitters zu vergleichen ist, da *in vivo* mehrere Transmitter gleichzeitig ausgeschüttet werden, die synergistisch wirken.

Nach den Ergebnissen von HERRMANN et al. [80] und nachdem NAUCK et al. [145] bereits festgestellt hatten, daß eine intravenöse GIP-Injektion in physiologischen Mengen ($1 \text{ pg/kg} \times \text{min}^{-1}$) beim Menschen keine GLP-1-Sekretion hervorruft, vermuteten ROBERGE et al. [143], daß beim Menschen GRP eine entscheidende Rolle im *enteroendokrinen Loop* spielt. Erstmals war nun von einem „*neuroendokrinen Loop*“ die Rede.

Das aktuellste Modell des „*neuroendokrinen Loops*“ stellten ROCCA und BRUBAKER [146] nach *in vivo* Tests am Rattenmodell vor: nach ihrem Verständnis umfaßt der „*neuroendokrine Loop*“ eine humorale Komponente (GRP, GIP) und eine neurale Komponente, den Vagusnerv, der die wichtigste parasympatische Innervation im proximalen Darm ist. Nahrungsinhaltsstoffe (Glucose und Fett) werden im Darm von K-Zellen, die quasi als „Fühler“ fungieren, registriert. Diese reagieren mit der Sekretion von GIP, welches wiederum konzentrationsabhängig zwei Wirkungen hat: in niedrigen Konzentrationen aktiviert es den Vagusnerv, der über eine GRP-Freisetzung L-Zellen stimuliert, daneben kann es in höheren Konzentrationen auch direkt stimulierend auf L-Zellen wirken. Zusätzlich ist vermutlich eine Komponente des Darmnervensystems in den Darmwänden für eine direkte, frühe Stimulation der L-Zellen im Ileum verantwortlich.

Dieses Konzept stellt sicher ein sehr gutes Modell für die Zusammenhänge im Organismus der Ratte dar. Beim Menschen spielt GIP allerdings offenbar eine geringere oder sogar keine Rolle bei der Aktivierung der L-Zellen, wie mehrere Autoren übereinstimmend festgestellt haben [80,145,147].

4.6.2 Erkenntnisse aus den Versuchen zur Lokalisation der K- und L-Zellen

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

Bei den Versuchen zur immunhistochemischen Lokalisation der K- und L-Zellen konnte gezeigt werden, daß sich die K-Zellen vor allem auf den Villusspitzen im Duodenum befinden und die L-Zellen vor allem in den Krypten des distalen Jejunums und Ileums.

Dieser Befund paßt in das von ROCCA und BRUBAKER [146] entworfene Modell. Mit ihrer exponierten Lage auf den Villusspitzen sind die K-Zellen in der Lage, als Sensor für den im Duodenum ankommenden Speisebrei zu fungieren. Durch Glucose und Fett werden die K-Zellen der Ratte stimuliert und schütten GIP in die Blutbahn aus.

Wenn die Stimulation durch die Nahrung für L-Zellen eine geringe Rolle spielt, was noch zu diskutieren ist, wäre ausschließlich eine möglichst schnelle Erreichbarkeit der L-Zellen über Blut- und Nervenbahnen wichtig. Damit wäre auch die Lage der L-Zellen in den Krypten für deren Funktion vorteilhaft.

Lokalisation der Nahrungsabsorption im Darm

Eine noch offene Frage ist, inwieweit Nahrungsinhaltsstoffe überhaupt in Kontakt mit den L-Zellen gelangen können. Abgesehen von ihrer „versteckten“ Lage in den Krypten, durch die fraglich ist, ob der Chymus überhaupt mit ihnen in Berührung kommt, ist zu klären, welche Nährstoffe bei ihrem Weg durch den Darm noch das distale Jejunum und Ileum erreichen, d.h. vorher nicht schon absorbiert werden. Abbildung 4-1 soll hierüber Aufschluß geben.

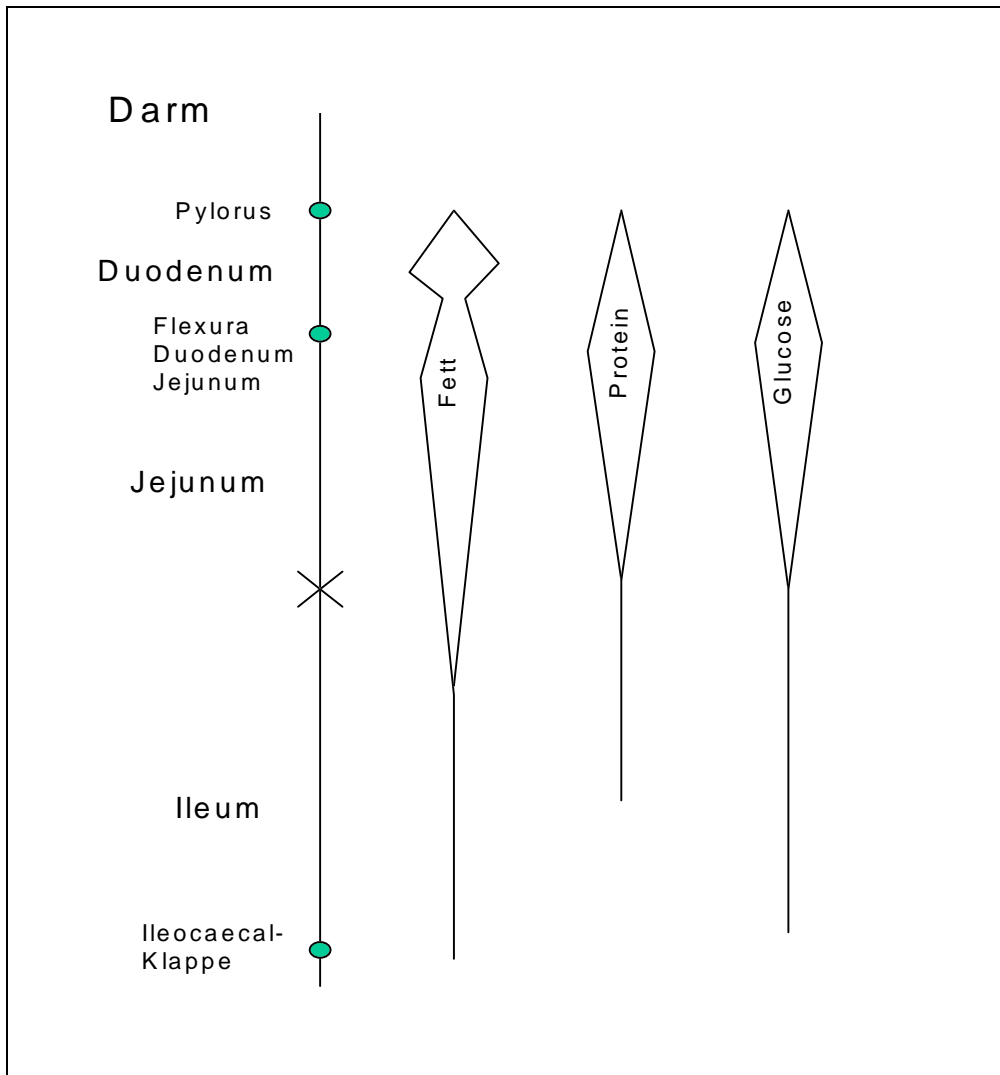


Abbildung 4-1: Nährstoffabsorption im Darm des Menschen. Die Abbildung zeigt, an welchen Stellen des Darms die verschiedenen Nährstoffe in welcher Menge absorbiert werden (modifiziert nach [148,149]).

Nach Angaben aktueller Physiologielehrbücher [148,149] werden Glucose und Proteine fast vollständig absorbiert, bevor der Nahrungsbrei das Ileum erreicht, minimale Mengen werden auch im Ileum noch aufgenommen. Fett (oder genauer: Fettsäuren) wird dagegen auch noch im Ileum absorbiert. Zusammengenommen bedeutet das, daß eine Stimulation der L-Zellen *in vivo* durch Nahrungsinhaltsstoffe zwar prinzipiell möglich, aber eher unwahrscheinlich ist. Am ehesten könnte Fett eine Ausschüttung von GLP-1 verursachen, da es noch in nennenswerten Mengen eine größere Zahl an L-Zellen erreicht. Diese Ansicht vertreten auch DUMOULIN et al. [150]. Bei der Ratte, deren Nahrung deutlich weniger Fett als die des Menschen enthält [29], entfallen Einflüsse der Nahrung auf die GLP-1-

Stimulation nahezu. Vielleicht spielt aus diesem Grund GIP als stimulierender Faktor für L-Zellen noch eine größere Rolle als beim Menschen.

Lokalisation der K- und L-Zellen entlang der gesamten Darmlänge

Insgesamt gesehen ist verwunderlich, warum die L-Zellen gerade im distalen Teil des Darms lokalisiert sind. Möglicherweise ist ihre physiologisch bedeutendste Funktion nicht die Stimulation der Insulinsekretion durch GLP-1, sondern der „Ileal-Brake“-Effekt: GLP-1 hemmt die Magenentleerung und verlangsamt Verdauungsfunktionen. Ein solches Signal aus dem distalen Darm könnte eine wertvolle, regulatorische Funktion ausüben und wäre somit eine gute Erklärung für die Lokalisation der L-Zellen [151,152].

Wie unter 4.1 beschrieben, gibt es in der Verteilung der K- und L-Zellen entlang des Darms Speziesunterschiede. K- und L-Zellen finden sich in ihren inversen Konzentrationsgradienten bei der Ratte im Gegensatz zum Menschen über die gesamte Dünndarmlänge verteilt. Zusätzlich befindet sich die höchste Konzentration an K-Zellen bei der Ratte etwas distaler gelegen als beim Menschen. Auch das bedarf einer Erklärung.

Möglicherweise gibt es bei der Ratte eine Verbindung von GIP und GLP-1 nicht nur entlang des Darmes, sondern auch innerhalb der Villus-Krypt-Achse für eine Art von Signalfunktion zur GLP-1-Freisetzung.

Denkbar wäre auch, daß das System des „*neuroendocrinen Loops*“ bei einer höheren Kohlenhydratzufuhr, wie sie bei der Ratte normalerweise besteht, sensibler reagieren kann, wenn die sensitiven K-Zellen durch ihre etwas distalere Lage einer nicht mehr ganz so hohen Glucosekonzentration ausgesetzt sind.

4.7 Schlußfolgerungen und Ausblick

4.7.1 Weitere, neue Fragen, die sich aus der Lokalisation der K- und L-Zellen ergeben

RAWDON und ANDREW haben in ihrem Übersichtsartikel [153] beschrieben, daß alle endokrinen Darmzellen und Epithelzellen des Darms aus gemeinsamen Stammzellen hervorgehen. Nach ihrer Hypothese sind endokrine Zellen als solche prädeterminiert und reifen nach Ausbildung bestimmter Rezeptoren durch den Einfluß auf sie wirkender Faktoren aus dem Mesenchym.

Das wirft die Frage auf, warum die K-Zellen in den Villi und die L-Zellen in den Krypten zu finden sind. Warum sind sie außerdem trotz starker Zellmigration der sie umgebenden Epithelzellen scheinbar stationär lokalisiert? Die Epithelzellen wandern sicher nicht um sie herum. Sind möglicherweise die Reifezeiten der K- und L-Zellen genetisch exakt abgestimmt, so daß sie erst in einem bestimmten „Wanderungsstadium“ ihre Funktion erhalten und geht die endokrine Funktion der L-Zellen vor der Abschilferung verloren? Diese Fragen müssen durch zukünftige Untersuchungen beantwortet werden.

4.7.2 Neue Entwicklungen in der Therapie des Diabetes mellitus

Zur Therapie des Diabetes mellitus werden neben dem in dieser Arbeit verfolgten Ansatz viele weitere Wege getestet, von denen einige die im Folgenden kurz beschrieben werden sollen.

Die Gewinnung von β -Ersatzzellen aus Tumorzelllinien

Mittlerweile ist es gelungen, durch Expression der Insulin-, GLUT2- und Glucokinasegene eine AtT20-Zelllinie zu konstruieren, die auf physiologische Mengen an Glucose mit der Ausschüttung von Insulin reagiert. Auch auf andere Stimulatoren reagieren diese Zellen qualitativ wie natürliche β -Zellen. Die charakteristische Ausschüttungsform als biphasische Sekretion konnte jedoch

nicht erreicht werden, auch Versuche an Tieren wurden mit diesen Zellen noch nicht durchgeführt [9].

DAVIES et al. [13] konnten zeigen, daß AtTinsGLUT2.36-Zellen glucoseabhängig Insulin ausschütten, allerdings auch schon bei subphysiologischen Konzentrationen (ab 50 $\mu\text{mol/l}$).

Durch die Elektrofusion der NEDH-Zellen (normale β -Zellen aus der Ratte) mit den immortalen RINm5F-Zellen konnten McCLENAGHAN und FLATT [154] die glucosesensitiven, insulinbildenden BRIN-Zelllinien generieren. Auch mit diesen Zellen wurden noch keine Tierversuche durchgeführt.

Tumorzelllinien erscheinen trotz der mittlerweile erzeugbaren glucose-abhängigen Insulinsekretion weniger geeignet zur Konstruktion von β -Ersatzzellen, da sie einige entscheidende Nachteile haben:

1. Sie besitzen ähnliche, aber niemals identische Eigenschaften wie natürliche β -Zellen. Damit sind sie zwar nützlich, um qualitativ Mechanismen zu erforschen, können quantitativ aber schon in Vorversuchen keine absolut zuverlässigen Aussagen liefern.
2. Wenn Zellen wie die aus der Adenohypophyse stammenden AtT20-Zellen eingesetzt werden, so kann die Sekretion von Nebenprodukten, d.h. der ursprünglich produzierten Produkte, nicht komplett verhindert werden.
3. Tumorzelllinien sind in ihrem Wachstum unbegrenzt. Man könnte sie zur Transplantation in einen lebenden Organismus in eine semipermeable Membran einbetten, um ihre Ausbreitung einzugrenzen. Hierbei wäre aber noch zu zeigen, daß die Zellen dann ihre Insulinsekretion unverändert aufrecht erhalten [5]. Generell bleibt die Transplantation von Tumorzellen mit einem hohen Risiko verbunden. Ihre Anwendung sollte daher auf *in vitro*- und Tierversuche begrenzt bleiben.

Natürliche, humane Adenohypophysenzellen kommen als Grundlage für die Transfektion nicht in Frage, weil sie aus lebenden Menschen nicht isoliert werden können.

Die Inselzelltransplantation

Bei der Transplantation von Inselzellen wurden in den letzten Jahren große Fortschritte erzielt.

Bei Versuchen an Ratten und Mäusen wurden Inselzellen isoliert und in Kapseln aus Alginaten und Poly-L-Lysin eingebettet. Diese waren permeabel für Nährstoffe, Insulin und Glucose, aber impermeabel für Faktoren des Immunsystems, die eine Immunreaktion verursacht hätten. Auf diese Weise wurde auch die artfremde Transplantation von Inselzellen ohne immunsuppressive Medikation ermöglicht. Es kam zu keinen Entzündungsreaktionen.

Schwierigkeiten bestehen noch darin, einen geeigneten Ort zur Infusion der eingekapselten Inselzellen zu finden, nachdem Versuche mit der Injektion in das Peritoneum nicht erfolgreich waren. Nun werden neue Formen der Einkapselung gesucht, die das Volumen der verpackten Zellen herabsetzen.

Das größte Problem besteht momentan darin, daß die Funktion der eingekapselten, transplantierten Inselzellen bei Versuchen an Mäusen und Ratten zeitlich auf etwa 6 bis 20 Wochen begrenzt ist. Die Gründe hierfür sind noch unklar. Vermutet wird eine ungenügende Nährstoffversorgung der Zellen, die daraufhin zugrunde gehen, oder eine aus ungeklärten Gründen mangelnde Biokompatibilität der Verpackung [155]. So lange die Funktion der Inselzellen noch auf eine derart kurze Zeitspanne begrenzt ist, scheidet sie für eine breite Anwendung beim Menschen aus.

Bei Versuchen zur Inselzelltransplantation bei Mäusen beobachteten OGAWA et al. [156] nach einigen Wochen ebenfalls den Verlust der glucoseinduzierten Insulinsekretion.

Auch die Lokalisierbarkeit und die Entfernbarekeit der transplantierten β -Zellen ist noch nicht ausreichend untersucht worden.

GLP-1 als Medikament

Die GLP-1 Sekretion ist bei Typ II-Diabetikern normal und auch die insulinotrope Wirkung des Hormons besteht weiterhin [87]. Da der insulinotrope Effekt von GLP-1 glucoseabhängig ist, dachte man, daß Hypoglycämien - im Gegensatz zu den bisher genutzten Medikamenten wie den Sulfonylharnstoffen - bei der Verwendung von GLP-1 als Therapeutikum ausgeschlossen wären. So kam man auf die Idee, das Hormon zur Behandlung des Typ II-Diabetes mellitus einzusetzen [157].

Die Verwendung von GLP-1 als Therapeutikum für den Typ I-Diabetiker ist noch umstritten. Während CREUTZFELDT et al. [158] feststellten, daß intravenös verabreichtes GLP-1 auch beim Typ I-Diabetiker blutzuckersenkend wirkt, konnten FREYSE et al. [159] bei ihren Studien an Hunden keinen relevanten insulinähnlichen Effekt beim Diabetes mellitus Typ I beobachten und sind daher der Ansicht, daß das Hormon hierfür als Therapeutikum nicht in Frage kommt.

Mehrere Autoren berichten, daß sich GLP-1 beim Typ II-Diabetes mellitus sowohl am Rattenmodell als auch beim Menschen positiv auf die Glucosesensitivität von β -Zellen auswirkt [160,161,162,163].

Derzeit wird noch untersucht, in welcher Form GLP-1 am effektivsten verabreicht werden kann. Neben der intravenösen Zufuhr, deren Wirkung zeitlich sehr begrenzt ist [157], werden die Gabe als Tablette [164] oder die subkutane Injektion [165] erprobt. Keine der bisher getesteten Arten der Zufuhr ist jedoch aufgrund der kurzen Halbwertszeit von GLP-1 im Blut, die bei intravenöser Gabe etwa 4 min und subkutan injiziert etwa 30 bis 60 min beträgt [74], wirksam genug. Die optimale Art der Verabreichung, sowie die zeitliche und mengenmäßige Dosierung sind nach wie vor offen.

Neuere Studien haben außerdem gezeigt, daß GLP-1 beim gesunden Menschen sehr wohl reaktive Hypoglycämien auslösen kann [147,166]. Zudem beobachteten EDWARDS et al. [166] einen kurzfristigen Anstieg des Blutdrucks bei subkutaner GLP-1-Injektion. Die Nebenwirkung der Therapie sind bisher nicht ausreichend untersucht.

Weitere Probleme beim Einsatz von GLP-1 als Medikament bestehen darin, daß noch keine Langzeiterfahrungen über die Wirkung vorliegen und daß die Herstellung von GLP-1 noch vergleichsweise teuer ist.

Um die Effektivität des GLP-1 als Therapeutikum zu steigern, wurden alternative Wege gesucht.

Die Verwendung von Dipeptidyl-Peptidase-Inhibitoren

Das Enzym, das für den Abbau von GLP-1 im Blut des Menschen verantwortlich ist, ist die Dipeptidyl-Peptidase IV [167]. Wenn man das Enzym hemmt und damit dem Abbau von GLP-1 im Blut entgegenwirkt, müßte seine Wirkung länger andauern. Diese Vermutung konnten PEDERSON et al. [168] durch Studien an diabetischen Ratten bestätigen. Das Enzym hat allerdings auch Funktionen im Immunsystem. Als CD26 kommt es auf aktivierten B- und T-Zellen, sowie Makrophagen vor. Ob und welche Auswirkungen eine Hemmung des Enzyms auf das Immunsystem hat, ist noch unsicher [169].

Der Einsatz von GLP-1-Analoga

Ebenfalls denkbar ist der Einsatz von GLP-1-Analoga, die resistenter als GLP-1 selbst gegen den Abbau durch die Dipeptidyl-Peptidase IV sind. GREIG et al. [170] konnten zeigen, daß Exendin-4, das aus der Speicheldrüse von Echsen stammt und an die GLP-1-Rezeptoren der Ratte bindet, wirksamer als GLP-1 den Blutglucosespiegel reguliert.

Bei ihren Studien an Mäusen bewiesen BURCELIN et al. [171], daß ein an zweiter Position Glycin-substituiertes GLP-1 deutlich resistenter gegen Dipeptidyl-Peptidase IV ist und eine stark verlängerte Wirkungszeit gegenüber der natürlichen Form hat.

4.7.3 Resümee

Es existieren viele verschiedene Ansätze zur Therapie des Diabetes mellitus, eine einzige, optimale Methode gibt es jedoch noch nicht.

Wie unter Punkt 4.5 beschrieben, sind für den hier vorgestellten Ansatz noch viele Fragen zu klären. Wenn alle Voraussetzungen zur Herstellung von β -Ersatzzellen aus den endokrinen K-Zellen des Darms erfüllbar sind, dann wäre diese Methode eine sehr elegante und erstrebenswerte Möglichkeit zur Therapie des Typ I Diabetes mellitus und sollte daher unbedingt weiter verfolgt werden.