

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg

Chirurgische Klinik I

Direktor: Professor Dr. med. Prof. h.c. A. Thiede

**Untersuchungen zu *in vitro* modifizierten humanen  
Blutmonozyten:  
Immunhistochemisch-morphologische Charakterisierung  
und funktioneller Nachweis von Insulin**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

**Andreas Sebastian Herbst**

aus München

Würzburg, Juni 2008

Referent: Privatdozent Dr. rer. nat. C. Otto  
Korreferent: Prof. Dr. med. Prof. h.c. A. Thiede  
Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juli 2008**

**Der Promovend ist Arzt.**

Für euch, Kinder der Wissenschaft und der Weisheit, haben wir dieses geschrieben. Erforschet das Buch und suchet euch unsere Ansicht zusammen, die wir verstreut und an mehreren Orten dargetan haben; was euch an einem Orte verborgen bleibt, das haben wir an einem anderen offengelegt, damit es fassbar werde für eure Weisheit.

Heinrich Cornelius Agrippa von Nettesheim,  
„De occulta philosophia“, 3, 65

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2.....	1
1.2	Therapien des Diabetes mellitus Typ1.....	3
1.3	Zielsetzung .....	5
<b>2</b>	<b>Fragen</b> .....	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>8</b>
3.1	Leukozyten-Spender.....	8
3.2	Zellkulturmedium .....	8
3.3	Aufbereitung und Kultivierung von Monozyten.....	9
3.4	Mediumwechsel .....	10
3.5	Bezeichnung der kultivierten Zellen .....	10
3.6	Vitalitätstestungen .....	10
3.7	Immunhistochemie.....	10
3.8	Prüfung der biologischen Wirksamkeit von zellfreiem „Monozyten-Insulin“	12
3.9	Mikroskopie und Dokumentation.....	12
3.10	Statistik .....	12
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>13</b>
4.1	Antikörperfärbungen am humanen Pankreasgewebe.....	13
4.2	Einfluss unterschiedlicher Serumkonzentrationen auf das Wachstum von Monozyten .....	14
4.2.1	Kulturmedium ohne Serumzusatz.....	14
4.2.2	Zellkulturmedium mit 0,25 Prozent Serumzusatz.....	15
4.2.3	Zellkulturmedium mit 1 Prozent Serumzusatz.....	16
4.2.4	Zellkulturmedium mit 10 Prozent Serumzusatz.....	18
4.3	Immunhistochemische und morphologische Charakterisierung kultivierter Monozyten .....	19
4.3.1	Nachweis CD14-positiver Monozyten .....	20
4.3.2	Nachweis von Insulin.....	21
4.3.3	Nachweis von C-Peptid.....	22
4.3.4	Nachweis von Glukagon .....	23
4.3.5	Nachweis von GLUT-2.....	24
4.3.6	Nachweis von PDX-1 .....	25
4.3.7	Nachweis von Albumin.....	26
4.3.8	Nachweis von CD34 .....	27
4.4	Prüfung der biologischen Wirksamkeit von zellfreiem „Monozyten-Insulin“	29
4.5	Elektronenmikroskopischer Nachweis Insulin-positiver Granula.....	33



<b>5</b>	<b>Beantwortung der Fragen .....</b>	<b>34</b>
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>36</b>
<b>7</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>45</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>46</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>48</b>
<b>10</b>	<b>Appendix .....</b>	<b>55</b>

**Danksagung**

**Lebenslauf**

# 1 Einleitung

---

Unter dem Begriff Diabetes mellitus (auch *Zuckerkrankheit* genannt) wird eine Gruppe von Stoffwechselerkrankungen zusammengefasst, für die der Nachweis von Zucker im Urin charakteristisch ist. Bereits im Alten Ägypten war Diabetes bekannt – so sind im Papyrus Ebers (ca. um 1550 v. Chr.) Symptome der Polyurie beschrieben. Der Begriff Diabetes, der zum ersten Mal im antiken Griechenland von Areatus von Kappadokien (81-133 v. Chr.) erwähnt wurde, lässt sich mit „die Beine spreizend“ übersetzen und beschreibt ein klassisches Symptom dieser Erkrankung – das vermehrte Wasserlassen. Der Zusatz „mellitus“ wurde von Thomas Willis im Jahr 1675 hinzugefügt, nachdem bekannt war, dass Urin und Blut von Diabetikern einen süßlichen Geschmack aufweisen (Ahmed A.M., 2002).

Im Jahr 1889 gelang es Oskar Minkowski und Joseph von Mering einen ursächlichen Zusammenhang zwischen Diabetes und Organfunktion herzustellen. Entfernten sie Hunden ihre Bauchspeicheldrüse, so zeigten diese kurze Zeit darauf die typischen Symptome dieser Erkrankung: starker Durst, vermehrtes Wasserlassen und Gewichtsabnahme. Schließlich gelang es Frederick Banting und Charles Best 1921 Insulin aus Pankreasgewebe zu extrahieren (King K.M. und Rubin G., 2003). Heute weiß man, dass die Betazellen in den von Paul Langerhans 1869 entdeckten Inselzellen für die Produktion und Ausschüttung von Insulin verantwortlich sind. Seit 1998 unterscheidet die Weltgesundheitsorganisation vier unterschiedliche Typen von Diabetes mellitus (Tab. 1.1).

## 1.1 Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2

Die Zahl der Fälle von Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 steigt weltweit rasant an (Zimmet P. et al., 2001). So leiden in Deutschland ca. 95 Prozent der geschätzten 6 Millionen Diabetiker unter Typ 2 Diabetes und 5 Prozent unter Typ 1 Diabetes. Beide Diabetesformen können familiär gehäuft vorkommen. Beim Diabetes mellitus Typ 1 werden die Betazellen vom eigenen Immunsystem zerstört und „sichtbare“ Symptome manifestieren sich, wenn ca. 80-90 Prozent der Insulin-produzierenden Betazellen in der Bauchspeicheldrüse zer-

stört sind. Beim Diabetes mellitus Typ 1 handelt es sich um eine derzeit nicht heilbare Autoimmunerkrankung, die sich aber gut mit exogenem Insulin behandeln lässt. Doch eine ungenaue Einstellung des Blutzuckerspiegels führt zu zahlreichen diabetischen Folgeerkrankungen, wie u.a. Mikroangiopathien, Polyneuropathien oder Retinopathien. Zudem verringert ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen die Lebenserwartung von Diabetikern (Pajunen P. et al., 2005).

Beim Diabetes mellitus Typ 2 kommt es zu einer Insulin-Resistenz und/oder abnormalen Insulin-Sekretion, wodurch Insulin nicht effizient wirkt bzw. in zu geringen Mengen sezerniert wird. Eine exogene Insulinsubstitution ist zwar in erster Linie nicht zwingend erforderlich, sie kann aber nötig werden, um die Glukosehomöostase aufrechtzuerhalten. Einer der größten Risikofaktoren für Diabetes mellitus Typ 2 ist die Adipositas, unter der nicht nur die Menschen in den Industrienationen leiden, sondern inzwischen auch zahlreiche Ureinwohner aufgrund westlich orientierter Essgewohnheiten. Einer neuen Studie zufolge ist in den USA bereits jedes zehnte Baby übergewichtig; zudem stieg innerhalb von fünf Jahren die Zahl der krankhaft Fettleibigen in den USA um 50 Prozent an ([www.sueddeutsche.de/ gesundheits/artikel/505/109396](http://www.sueddeutsche.de/gesundheits/artikel/505/109396)).

**Tab. 1.1. Klassifikation des Diabetes mellitus.** Verkürzte Tabelle zur evidenzbasierten Leitlinie der Deutschen Diabetes-Gesellschaft ([http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/redaktion/mitteilungen/leitlinien/ Uebersicht\\_leitlinien\\_evidenzbasiert.php](http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/redaktion/mitteilungen/leitlinien/Uebersicht_leitlinien_evidenzbasiert.php)).

Typ 1 Diabetes	Typ 2 Diabetes	Typ 3 Diabetes	Typ 4 Diabetes
<p><b>Typ 1a:</b> Immunologisch vermittelte Form</p> <p><b>Typ 1b:</b> Idiopathische Form</p>	<p>Kann sich von einer vorwiegenden Insulin-Resistenz mit relativem Insulinmangel bis zu einem vorwiegend sekretorischen Defekt mit Insulin-Resistenz erstrecken</p>	<p>Andere spezifische Diabetes-Typen (A-H), z.B.</p> <p><b>A:</b> genetische Defekte der Betazelle</p> <p><b>B:</b> genetische Defekte der Insulin-Sekretion</p> <p><b>C:</b> Erkrankung des exokrinen Pankreas</p>	<p>Gestationsdiabetes</p>

## **1.2 Therapien des Diabetes mellitus Typ 1**

Nach einer Leitlinie der Deutschen Diabetes-Gesellschaft sind die Therapieziele bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 die „Prävention diabetesbedingter Einschränkungen der Lebensqualität, schwerer Stoffwechsellentgleisungen, mikroangiopathischer und anderer diabetesassoziierter Folgeschäden“ ([www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de](http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de)). Voraussetzung hierfür ist ein sorgfältig eingestellter Blutzuckerspiegel. Die Behandlung der Typ1 Diabetiker mit exogenem Insulin stellt eine lebensrettende Hormonersatztherapie dar, die zwingend indiziert und ein Leben lang beizubehalten ist, um die verlorengegangene bzw. beeinträchtigte Insulinsekretion auszugleichen. Seit 1922 wird Schweine- bzw. Rinderinsulin eingesetzt, und seit 1982 steht rekombinantes Humaninsulin zur Verfügung (Home P.D. und Alberti K.G., 1982). Während bei Gesunden die Betazellen durch kontinuierliches Messen des Blutzuckerspiegels den Insulinbedarf ermitteln (siehe auch Diskussion), steht dem Typ1 Diabetiker diese hochempfindliche „Messeinheit“ nicht mehr zur Verfügung. Bei ihnen hängt der Erfolg der Insulinsubstitutionstherapie von den pharmakokinetischen und -dynamischen Eigenschaften der therapeutisch verwendeten Insuline ab ([www.diabetes-news.de/info/insulin-uebersicht.htm](http://www.diabetes-news.de/info/insulin-uebersicht.htm)). Zudem muss der Patient die Zusammenhänge zwischen Insulinbedarf und Nahrungsaufnahme verstehen und dieses Wissen auch in die tägliche Praxis umsetzen; beides beeinflusst maßgeblich den Therapieerfolg (Deutsche Diabetes Gesellschaft). Aus diesen Gründen ist die Insulinsubstitutionstherapie noch weit davon entfernt, den Stoffwechsel optimal einzustellen – trotz unbestrittener Erfolge („Writing Team for the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications“, 2003).

Eine Alternative zur Insulinsubstitutionstherapie kann die Transplantation Insulin-produzierender Zellen sein (Lee D.D. et al., 2008). Hierzu gehören die Pankreastransplantation, die erstmals am 17. Dezember 1966 in Minneapolis durchgeführt wurde, und die so genannte Inselzelltransplantation. Bei diesem erstmals 1989 von Dr. E. Lacy klinisch durchgeführten Verfahren werden die aus Pankreata isolierten Langerhans-Inseln übertragen (Shapiro A.M. et al., 2000). Beide Verfahren ermöglichen zwar einen physiologisch regulierten

Blutzuckerspiegel, doch stehen sie aufgrund mangelnder humaner Spenderorgane nur einem sehr kleinen Patientenkreis zur Verfügung. Zudem lässt die Leistung der übertragenen Langerhans-Inseln mit der Zeit nach, so dass die Patienten wieder exogenes Insulin benötigen. Beide Verfahren stellen zudem eine allogene Transplantation dar, da sowohl die Pankreata als auch die isolierten Langerhans-Inseln von fremden Spendern stammen. Sie werden deshalb vom Immunsystem erkannt und zerstört. Um dies zu verhindern, müssen die Patienten ihr Immunsystem mit Medikamenten, so genannten Immunsuppressiva, unterdrücken – doch ist diese Strategie nicht ohne Nebenwirkungen. So zeigen die Patienten eine deutlich erhöhte Infektanfälligkeit und eine gesteigerte Krebshäufigkeit. Zudem sind viele Immunsuppressiva auch noch diabetogen, d.h. sie zerstören die übertragenen Langerhans-Inseln.

Um den Überblick der aktuell in Erprobung befindlichen zelltherapeutischen Ansätze zu vervollständigen, hier noch einige Worte zur Xenotransplantation. Im Gegensatz zur Transplantation humaner Langerhans-Inseln (Allotransplantation) unterliegt die Transplantation porciner Langerhans-Inseln keiner Limitierung durch Spenderorgane. Auch wird das in der Öffentlichkeit intensiv diskutierte Risiko einer möglichen Gefährdung durch freigesetzte Infektionserreger aus Xenotransplantaten von den Virologen zwischenzeitlich weniger kritisch beurteilt (Switzer W.M. et al., 2001). Die Transplantation porciner Langerhans-Inseln wird nach Einschätzung der eigenen Arbeitsgruppe ohne Maßnahmen zur Immunprotektion durch Verkapselung nicht erfolgreich sein (pers. Mitteilung Prof. Ulrichs). Durch die Verkapselung werden die porcinen Langerhans-Inseln vor den Attacken des Immunsystems geschützt, wobei der Transfer von Nährstoffen und Insulin nicht behindert wird (Otto C., Moskalenko V., Ulrichs K., 2004). Der Transplantation porciner Langerhans-Inseln (als Alternative zu humanen Langerhans-Inseln) wird derzeit große Chancen zur Heilung des Diabetes Typ 1 eingeräumt. So erhielt im Jahr 2007 das Unternehmen „Australia-based Living Cell Technologies“ von der neuseeländischen Gesundheitsbehörde die Genehmigung, eine klinische Studie mit neonatalen porcinen Langerhans-Inseln durchzuführen ([www.biospectrumasia.com](http://www.biospectrumasia.com)).

### 1.3 Zielsetzung

Ein wesentlicher Vorteil zelltherapeutischer Ansätze ist die Vermeidung diabetischer Spätfolgen, da Insulin-produzierende Zellen die physiologische Regulation des Blutzuckerspiegels sicherstellen. Neben der Transplantation ausdifferenzierter Langerhans-Inseln stehen seit einigen Jahren auch humane embryonale und adulte Stammzellen als Quelle für Insulin-produzierende Zellen im Zentrum des Interesses (Assady S. et al., 2001; Abraham E.J. et al., 2002; Hao E. et al., 2006; Santana A. et al., 2006). In Tab. 1.2 sind Beispiele erfolgreicher Zelltherapieansätze im diabetischen Tiermodell aufgelistet. Die Experimente zeigen, dass Zelltherapien zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ 1 möglich sind, doch wird die klinische Umsetzbarkeit sicher noch einige Zeit auf sich warten lassen. So ist die gezielte Differenzierung der Stammzellen in Zielzellen mit Hilfe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren ein kritischer Punkt. Auch die Züchtung ausreichender Mengen hochreiner Insulin-produzierender Zellen ist bisher ein noch ungelöstes Problem (Roche E. et al., 2005).

Die Übertragung autologer Zellen stellt für den Patienten kein immunologisches Risiko dar – im Gegensatz zu allogenen Zellen (siehe Kapitel 1.2). Im Jahr 2005 beschrieb die Kieler Arbeitsgruppe um Professor F. Fändrich die Möglichkeit, aus humanen peripheren Blutmonozyten Insulin-positive Zellen *in vitro* zu generieren (Ruhnke M. et al., 2005b). Hierzu wurden die Monozyten über Adhärenz angereichert und mit verschiedenen Cytokinen inkubiert. Die Autoren vertreten in ihrer Publikation die Auffassung, dass Monozyten sich *in vitro* dedifferenzieren lassen, um sie anschließend gezielt zu funktionsfähigen Zellen der Langerhans-Insel zu differenzieren.

*In vitro* modifizierte Monozyten wären somit ein möglicher autologer Ersatz für untergegangene Betazellen (Abb. 1.1). Um ihre Eignung jedoch beurteilen zu können, sind weiterführende Untersuchungen erforderlich.

**Tab. 1.2. Übersicht über *in vitro* generierte Insulin-produzierende Zellen aus embryonalen und adulten Stammzellen.** In verschiedenen Publikationen wurden diese Zellen auf ihre Fähigkeit getestet, Insulin auf einen Glukosereiz hin auszuschütten (*in vitro*) und Normoglykämie in diabetischen Tieren (*in vivo*) zu induzieren. M = Maus; H = Human; R = Ratte. Die untersuchten Eigenschaften wurden nachgewiesen (+) bzw. nicht nachgewiesen (-) oder nicht untersucht (n.u.).

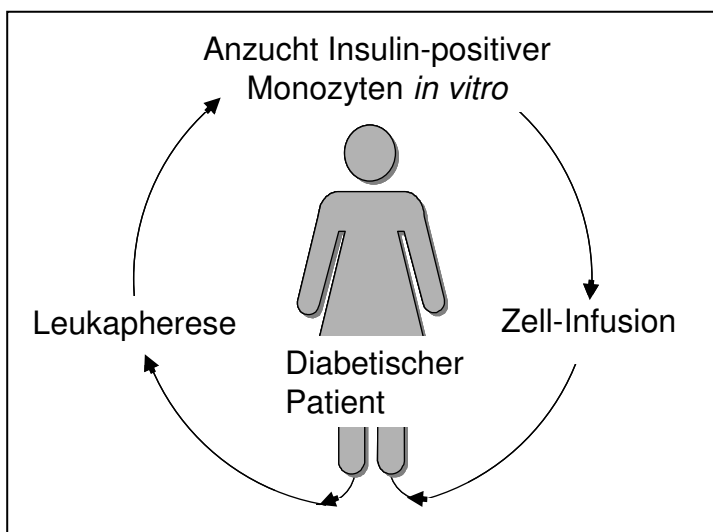
Ursprungszellen	Referenz	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Embryonale Stammzellen, M	Soria B. et al., 2000	+	+
Embryonale Stammzellen, M	Lumelsky N. et al., 2001	+	-
Embryonale Stammzellen, M	Shiroi A. et al., 2002	-	n.u.
Embryonale Stammzellen, M	Hori Y. et al., 2002	+	+
Embryonale Stammzellen, M	Blyszczuk P. et al., 2003	+	+
Embryonale Stammzellen, M	Moritoh Y. et al., 2003	+	-
Embryonale Stammzellen, M	Kahan B.W. et al., 2003	n.d.	n.u.
Embryonale Stammzellen, H	Assady S. et al., 2001	-	n.u.
Epithelzellen des Ductus pancreaticus, M	Ramiya V.K. et al., 2000	+	+
Epithelzellen des Ductus pancreaticus, H	Bonner-Weir S. et al., 2000	+	n.u.
Epithelzellen des Ductus pancreaticus, H	Gao R. et al., 2003	+	n.u.
Nestin-positive Zellen aus Langerhans Inseln, R & H	Zulewski H. et al., 2001	n.d.	n.u.
Nestin-positive Zellen aus Langerhans Inseln, H	Abraham E.J. et al., 2002	n.d.	n.u.
Hepatische ovale Zellen, R	Yang L. et al., 2002	+	+
Gastrointestinales Epithel, M	Suzuki A. et al., 2003	+	+
Knochenmark, M	Ianus A. et al., 2003	+	n.u.
Knochenmark, M	Hess D. et al., 2003	n.d.	+

## 2 Fragen

---

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung *in vitro* modifizierter Insulin-positiver Monozyten. Diese wurden von der Kieler Arbeitsgruppe 2005 als mögliche Quelle für Insulin-produzierende Zellen beschrieben (Ruhnke M. et al., 2005b). Folgende Fragen sollten in dieser Arbeit beantwortet werden:

1. In Kooperation mit der Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie wurden Leukozyten gesunder Spender gewonnen. Lassen sich auch hieraus Insulin-positive Monozyten gewinnen?
2. Humane Monozyten wurden *in vitro* kultiviert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten immunhistochemisch und morphologisch untersucht. Für welche Marker sind die Zellen positiv und welche morphologischen Charakteristika weisen sie auf? Stimmen die Ergebnisse mit den Beobachtungen der Kieler Arbeitsgruppe überein?
3. Die *in vitro* kultivierten Monozyten waren positiv für Insulin. Ist dieses „Monozyten-Insulin“ biologisch aktiv und senkt den Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse?



**Abb. 1.1. Mögliches Therapiekonzept mit *in vitro* modifizierten Insulin-positiven Monozyten.** Eine Therapie mit autologen *in vitro* generierten Insulin-positiven Monozyten stellt einen äußerst attraktiven Ansatz dar, sollte er sich klinisch umsetzen lassen.



## 3 Material und Methoden

---

### 3.1 Leukozyten-Spender

Junge, gesunde Probanden beiderlei Geschlechts im Alter von 22 bis 26 Jahren wurden als Spender ausgewählt (Tab. 3.1). In Zusammenarbeit mit Dr. A. Opitz, Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie der Universität Würzburg, wurden Leukozyten mit der Leukapherese gewonnen. Innerhalb von ca. 4 Stunden wurden zwischen  $10^9$  und  $10^{11}$  Zellen angereichert und anschließend im Labor aufgearbeitet. Die Leukapherese sowie die anschließenden *ex vivo* Untersuchungen wurden von der örtlichen Ethik-Kommission genehmigt.

**Tab. 3.1: Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten Apheresen.** Angegeben sind die Initialen und das Alter (GD = Geburtsdatum) der Spender, ihr Geschlecht (m = männlich, w = weiblich) sowie die mit diesen Zellen durchgeführten Experimente: (Vita) = Vitalitätsmessungen; (Immu) = Immunhistochemie; (EM) = Elektronenmikroskopie.

Nr	GD	Spender	Geschlecht	Versuche
1	19.01.1980	A H	m	Vita, Immu (Cytospins)
2	08.03.1979	M U	m	Vita, Immu (Cytospins)
3	13.10.1981	HH W	m	Vita, Immu (Cytospins)
4	25.04.1980	N R	w	Immu (Deckgläschen)
5	23.01.1979	N S	m	Immu (Deckgläschen)
6	23.01.1979	N S	m	Immu (Deckgläschen)
7	19.01.1980	A H	m	Immu (Deckgläschen)
8	19.02.1979	M G	m	Immu (Deckgläschen), EM
9	19.02.1979	M G	m	Immu (Deckgläschen)

### 3.2 Zellkulturmedium

Das Medium zur Kultivierung der Monozyten bestand aus Phenolrot-freiem RPMI 1640 Medium (Cell Concepts; Umkirch) ergänzt mit folgenden Zusätzen: 1% hitzeinaktiviertes Humanserum (AB/Rhesus negativ; PAA; Cölbe), 2 mmol/l L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (alle Reagenzien von Cell Concepts), 0,05 mmol/l 2-Mercaptoethanol (Gibco-Invitrogen; Karlsruhe), 5 ng/ml M-CSF (*human recombinant macrophage colony stimulating factor*; R&D;

Wiesbaden) und 0,4 ng/ml Interleukin 3 (IL-3; R&D). Dieses Medium wird im Weiteren als X-Medium bezeichnet. Ein weiteres Medium mit der Bezeichnung Y-Medium setzt sich wie folgt zusammen: 1% hitzeinaktiviertes Humanserum (s. o.), 2 mmol/l L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (Cell Concepts), 10 ng/ml EGF (*human recombinant epidermal growth factor*; Fa. R&D), 20 ng/ml HGF (*human recombinant hepatocyte growth factor*; Fa. R&D) und 1,24 mg/ml Nicotinamid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen). Um die Zellen *in situ* zu färben, wurden sie auf sterilen Deckgläschen (24 x 24 mm) in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen kultiviert.

### **3.3 Aufbereitung und Kultivierung von Monozyten**

Jeweils 20 ml der Leukozytensuspension wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner; Frickenhausen) verteilt, in die jeweils 15 ml PBS, pH 7,2, vorgelegt waren. Die Suspension (35 ml) wurde anschließend vorsichtig auf 15 ml Ficoll (Linaris, Wertheim-Bettingen) in 50 ml Zentrifugen-Röhrchen aufgeschichtet und 20 Minuten bei 850 xg ohne Bremse zentrifugiert. Die Leukozyten wurden vorsichtig abgenommen, in ein neues Röhrchen überführt und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Nach dem Zentrifugieren (10 Minuten, 800 xg mit Bremse) wurden die Überstände verworfen und die Zellsedimente mit jeweils 2 ml PBS resuspendiert. Die Zellsuspensionen von jeweils 2 Röhrchen wurden vereint, mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Dies wurde solange wiederholt, bis sämtliche Zellen in einem Röhrchen vereint waren. Anschließend wurde ihre Vitalität mit Trypanblau bestimmt. Jeweils  $4 \times 10^7$  Zellen wurden mit 5 ml Medium pro Vertiefung in eine Zellkulturschale mit sechs Vertiefungen ausgesät. Die Monozyten wuchsen auf sterilen Deckgläschen, die sich in den Vertiefungen befanden. Zur Anreicherung der Monozyten wurden die Leukozyten für 1 Stunde im Brutschrank bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die nicht-adhärenenten Zellen vorsichtig abgesaugt und die adhärenenten Monozyten für 6 Tage in X-Medium und anschließend bis maximal Tag 28 in Y-Medium kultiviert.

### **3.4 Mediumwechsel**

Die Monozytenkulturen erhielten alle 3 Tage frisches Medium. Hierzu wurden die Zellkulturschalen vorsichtig geschwenkt, um die nicht-adhärenenten Zellen zu lösen. Anschließend wurde die Hälfte des Überstandes abgesaugt und durch unverbrauchtes Medium ersetzt.

### **3.5 Bezeichnung der kultivierten Zellen**

Sämtliche adhärenenten Zellen wurden unabhängig von der Kulturdauer und ihrer Differenzierung zu Makrophagen (Zuckerman S.H. et al., 1979) als Monozyten bezeichnet. Ein spezifischer Nachweis von Makrophagen wurde nicht geführt.

### **3.6 Vitalitätstestungen**

**Färbung mit Fluoreszein-Diazetat (FDA) und Propidiumjodid (PI).** Von einer 1 mg/ml FDA-Lösung (FDA gelöst in Aceton) wurden 1 µl in 1 ml PBS überführt. Hiervon wurden 60 µl kombiniert mit 10 µl einer 0,05-prozentigen PI-PBS-Lösung auf die Zellen gegeben. Vitale, metabolisch aktive Zellen besitzen zytoplasmatische Esterasen, die vom nicht-fluoreszierenden FDA das fluoreszierende Fluoreszein abspalten. Die Zellen erscheinen unter UV-Licht leuchtend grün, während sich tote bzw. apoptotische Zellen rot anfärben. Ihre Membranen sind bereits so geschädigt, dass PI in die Zelle und anschließend in den Kern wandert, wo es an die DNA bindet.

### **3.7 Immunhistochemie**

Soweit nicht anders erwähnt, wurden sämtliche Chemikalien von Merck Darmstadt bezogen. Die im Gefrierschrank aufbewahrten Deckgläschen wurden aufgetaut, für eine Stunde getrocknet und mit Entellan auf Objektträger fixiert. Am nächsten Tag wurden die Präparate für 10 Minuten in Aceton fixiert, 20 Minuten getrocknet und dreimal für jeweils 5 Minuten in Tris-NaCl (pH 7,4) „gewaschen“<sup>1)</sup>. Die mit Primärantikörpern (Tab. 3.1) bedeckten Präparate wurden über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Antikörper wurden mit „Antibody Diluent“ (Dako; Hamburg) verdünnt und jeweils 200 µl auf

---

<sup>(1)</sup> Der Begriff „Waschen“ beschreibt die Inkubation der Präparate in Pufferlösungen, um Reste von Lösemittel bzw. nicht-gebundenen Antikörpern zu entfernen.

die Präparate verteilt. Nach der einstündigen Inkubation wurden die Zellen dreimal für 5 Minuten in Tris-NaCl „gewaschen“, bevor sie bei 20°C in einer feuchten Kammer für eine Stunde mit den jeweiligen Sekundärantikörpern (Tab. 3.1) inkubiert wurden. Nach einem erneuten Waschschrift (3 x 5 Minuten in Tris-NaCl) wurden die Präparate mit Liquid DAB (BioGenex; San Ramon, USA) für 3 bis 5 Minuten inkubiert. Die Präparate wurden erneut mit Tris-NaCl (s. oben) sowie einmal mit Aqua dest. „gewaschen“, für 5 Minuten mit Meier's Hämalaun gefärbt und für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser entfärbt. Die Präparate wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, zweimal für 10 Minuten in Xylol inkubiert und mit Entellan eingedeckt.

**Tab. 3.2.** Primäre und sekundäre Antikörper zur immunhistochemischen Charakterisierung humaner Monozyten. Alle Sekundär-Antikörper (Ziege anti-Kaninchen bzw. Kaninchen anti-Maus) waren von DAKO und wurden in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. (M) = monoklonaler Antikörper; (P) = polyklonaler Antikörper.

Antigen	Klon/Bestell-Nr.*)	Firma	Verdünnung	Spezies
Insulin	IN 05	Exbio	1:100	Maus (M)
Glukagon	V2025 *)	Biomeda	1:100	Kaninchen (P)
Pdx-1	AB5999 *)	Chemicon	1:1000	Kaninchen (P)
C-Peptid	C-PEP-01	Acris	1:100	Maus (M)
CD34	ICO-115	Biomeda	1:100	Maus (M)
CD14	B365.1	Biomeda	1:100	Maus (M)
Glut-2	199017	R&D Systems	1:20	Maus (M)
Albumin	A0001 *)	Dako	1:2000	Kaninchen (P)

**Exbio:** [www.exbio.cz](http://www.exbio.cz); **Biomeda:** [www.biomeda.com](http://www.biomeda.com); **Chemicon:** [www.chemicon.com](http://www.chemicon.com);  
**Acris:** [www.acris-antibodies.com](http://www.acris-antibodies.com); **R&D Systems:** [www.rndsystems.com](http://www.rndsystems.com); **Dako:** [www.dako.com](http://www.dako.com)

Um zu gewährleisten, dass die Antikörper optimal verdünnt waren, wurden sie an humanen Pankreasschnitten (LabVision über Medac Diagnostika; Wedel) überprüft.

Mit einem Mikrotom (2800 Frigocut N; Leica; Bensheim) wurden 5 µm Gefrierschnitte angefertigt. Die Präparate waren zuvor in Tissue-Tek (Sakura; Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und bei -80 °C aufbewahrt.

### **3.8 Prüfung der biologischen Wirksamkeit von zellfreiem „Monozyten-Insulin“**

Hyperglykämie (d.h. Blutzuckerspiegel zwischen 300-600 mg/dl) wurde in männlichen Mäusen des Stammes C57BL/6 (Harlan-Winkelmann, Borcheln) durch eine einmalige intraperitoneale Injektion von 200 µg Streptozotocin pro Gramm Körpergewicht (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen), gelöst in Citratpuffer, pH 4,5, induziert. Die Blutzuckerspiegel wurden mit einem Blutzuckermessgerät (Glucometer Elite, Bayer) bestimmt. Hierzu waren 2 µl Blut aus der Schwanzvene notwendig. Die diabetischen Mäuse erhielten das aus  $5 \times 10^6$  kultivierten Monozyten isolierte Insulin. Hierzu wurden die Zellen im Ultraschallbad für 4 Minuten aufgeschlossen und der zellfreie Überstand den diabetischen Mäusen intraperitoneal injiziert. Die Blutzuckerspiegel wurden vor Injektion und eine bzw. fünf Stunden nach Insulininjektion bestimmt. Negativkontrollen waren 100 µl PBS bzw. zellfreier Überstand von Insulin-negativen Monozyten. Diese Monozyten, die sich für 24 Stunden in Kultur befanden, wurden ebenfalls im Ultraschallbad aufgeschlossen. Als Positivkontrolle erhielten diabetische Mäuse 4 IE Humaninsulin, was ca. 170 pg Insulin entspricht <sup>(2)</sup>.

### **3.9 Mikroskopie und Dokumentation**

Die immunhistochemischen Präparate sowie die Dithizonfärbungen wurden mit dem BX50 Mikroskop (Olympus; Hamburg) ausgewertet und mit der Digitalkamera ColorView 12 (Olympus) unter Zuhilfenahme der Software *analySIS*® (Fa. Soft Imaging System; Münster) dokumentiert. Zellen in Kultur wurden mit dem IMT-2 Phasenkontrastmikroskop, sowie mit der Kamera OM-1 und mit der Digitalkamera C-5050 Zoom fotografiert (Olympus).

### **3.10 Statistik**

Die *in vivo* Versuche wurden mit der „Graph Pad Prism“ Software Version 4 (GraphPad Software Inc.) statistisch ausgewertet. In den Diagrammen sind Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

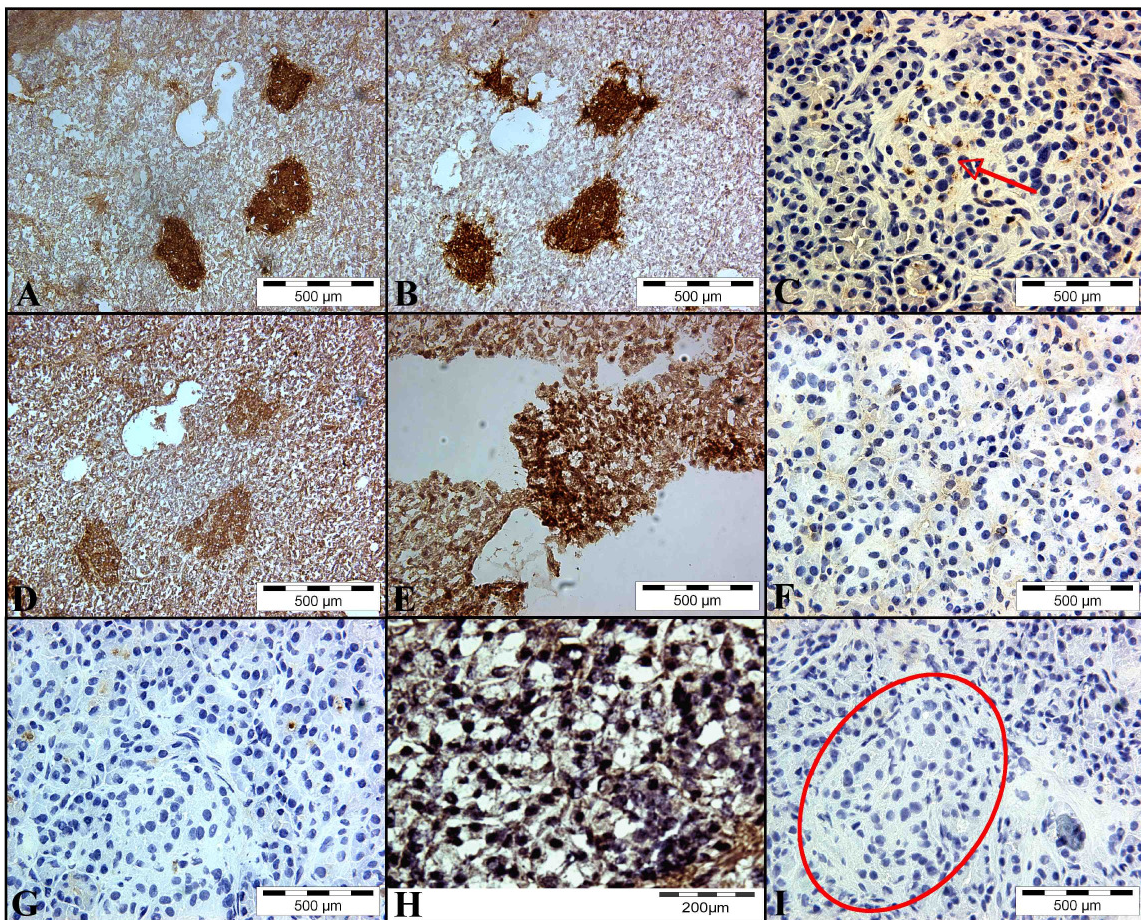
---

<sup>(2)</sup> Folgende Beziehung wurde für die Berechnung zugrunde gelegt: 1 mIE/l Insulin = 41,67 ng/l = 7,3 pmol/l.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Antikörperfärbungen am humanen Pankreasgewebe

Die Spezifität der verwendeten Antikörper (Tab. 3.2) wurde an Gefrierschnitten humaner Pankreasgewebe (bezogen von LabVision über Medac Diagnostika, Wedel) überprüft. Getestet wurden Antikörper gegen Insulin (A), C-Peptid (B), das bei der Prozessierung von Proinsulin zu Insulin freigesetzt wird, Glukagon (C, roter Pfeil), Glukosetransporter GLUT-2 (D) und Transkriptionsfaktor PDX-1 (E).



**Abb. 4.1. Gefrierschnitte humaner Pankreata. Insulin (A); C-Peptid (B); Glukagon (C); GLUT-2 (D); PDX-1 (E); Albumin (F); CD14 (G); CD34 (H); Negativkontrolle (I).** In A, B und D sind die in das Pankreasgewebe eingebetteten Langerhans-Inseln zu sehen. Innerhalb der Inseln sind Glukagon-positive Alpha-Zellen zu erkennen (C).

Zusätzlich wurde die Präsenz von CD14-positiven Monozyten (Abb. 4.1G) und CD34-positiven Stammzellen (Abb. 4.1H) überprüft. Dabei wurden keine positiven Zellen vorgefunden. Auch die mögliche Anwesenheit von Albumin (Abb. 4.1F) wurde überprüft. Da die *in vitro* modifizierte humanen peripheren Blutmonozyten u.a. mit dem *hepatocyte growth factor* (HGF) inkubiert wurden (Kapitel 3.2), sollte überprüft werden, ob die kultivierten Monozyten auch Eigenschaften von Hepatozyten aufweisen, wie z.B. die Synthese von Albumin.

## **4.2 Einfluss unterschiedlicher Serumkonzentrationen auf das Wachstum von Monozyten <sup>(3)</sup>**

Um das Kulturmedium für die Monozyten (Kapitel 3.2) zu optimieren, wurde der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an Humanserum auf das Zellwachstum getestet. Die Zellen wurden an den Kulturtagen 6, 14 und 18 auf Anwesenheit von Insulin, C-Peptid, CD14 und GLUT-2 immunhistochemisch untersucht. Da die Monozyten auf Deckgläschen (22x22 mm) kultiviert wurden, ließen sich auch morphologische Veränderungen erfassen. Auf Glas bzw. Kunststoff (Kulturflaschen) kultivierte Monozyten zeigten ein vergleichbares Wachstumsverhalten (nicht gezeigt).

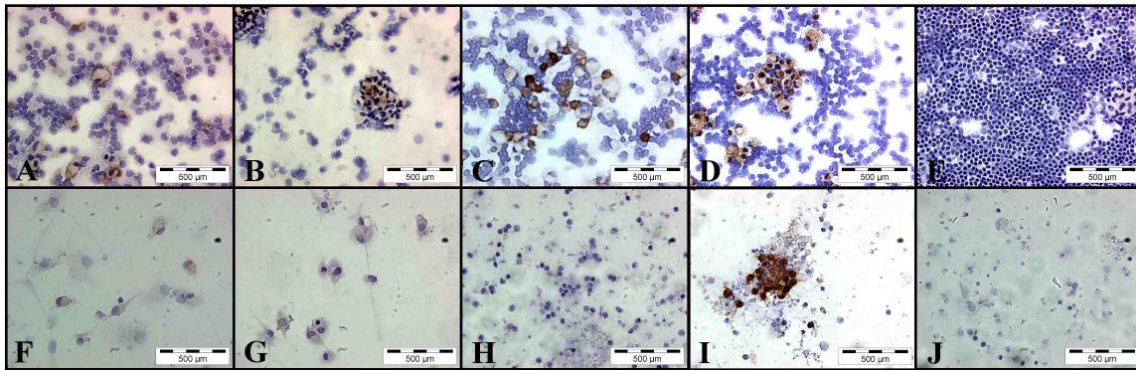
### **4.2.1 Kulturmedium ohne Serumzusatz**

Im Serum-freien Kulturmedium war ein geringer Anteil der Monozyten am 6. Kulturtag schwach positiv für Insulin und C-Peptid und stark positiv für CD14 und GLUT-2. Dass die Kulturbedingungen nicht optimal waren, verdeutlicht die Tatsache, dass zahlreiche Zellen tot bzw. stark „angegriffen“ waren; am 14. Kulturtag schließlich war der Großteil der Zellen tot. Nur wenige Zellen mit Makrophagen-Morphologie waren zu finden (4.2 F, G). Lediglich in einigen vitalen Zellklustern zeigten die Zellen eine deutliche Expression von GLUT-2. Aufgrund des hohen Zellverlusts konnte die Färbung am 18. Kulturtag schließlich nicht mehr durchgeführt werden. Ohne Serumzusatz war ein Überleben der Monozyten bis Tag 18 nicht möglich.

---

<sup>(3)</sup> Zur Bezeichnung der Zellen siehe auch Kapitel 3.5 in Material und Methoden.





**Abb. 4.2. Immunhistochemische Analyse und Morphologie von Monozyten im serumfreien Medium am 6. (A-E) bzw. 14. (F-J) Kulturtag.** A, F: **Insulin**; B, G: **C-Peptid**; C, H: **CD14**; D, I: **GLUT-2**; E, J: **Negativkontrollen**. Die Daten deuten darauf hin, dass Monozyten auch ohne Zusatz von Serum Insulin-positiv werden. Zwar konnte im fetalen Kälberserum kein Insulin nachgewiesen werden, doch stellt Serum eine mögliche Quelle für Insulin dar (s. auch Antwort zur Frage 2, Kapitel 5). Die serumfreien Bedingungen sind jedoch nicht geeignet, um die Vitalität der Monozytenkulturen zu erhalten. Am Kulturtag 14 sind Makrophagen zu erkennen (F, G).

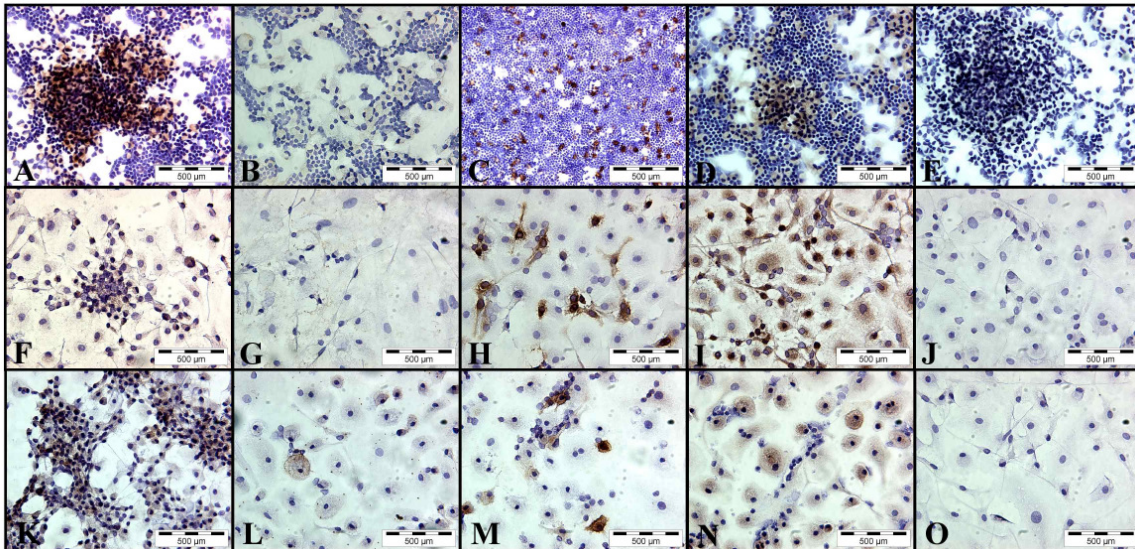
#### 4.2.2 Kulturmedium mit 0,25 Prozent Serumzusatz

In 0,25 Prozent Humanserum zeigten die Monozyten ein deutlich besseres Wachstum als die Zellen im serumfreien Kulturmedium. Jedoch wuchsen sie wesentlich langsamer als bei höheren Serumkonzentrationen (s. u.).

Die Monozyten waren zu allen drei Zeitpunkten (6., 14. und 18. Kulturtag) positiv für die vier untersuchten Marker Insulin, C-Peptid, CD14 und GLUT-2, wobei der Anteil positiver Zellen bei höheren Serumkonzentrationen wesentlich höher war (s. Kapitel 4.2.3 und 4.2.4).

Um einen vergleichbaren Anteil positiver Zellen wie bei 1 Prozent Serum zu erhalten, mussten die Zellen bei 0,25 Prozent Serum um ca. 3-5 Tage länger kultiviert werden.



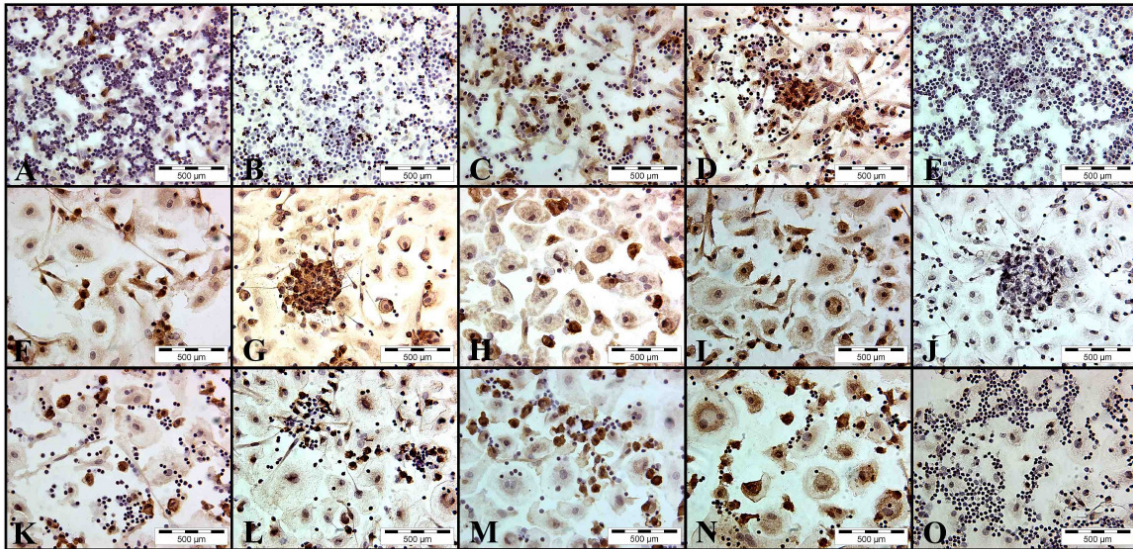


**Abb. 4.3. Immunhistochemische Analyse und Morphologie von Monozyten im Kulturmedium mit 0,25 Prozent Humanserum am 6. (A-E), 14. (F-J) und 18. (K-O) Kulturtag.** A, F, K: **Insulin**; B, G, L: **C-Peptid**; C, H, M: **CD14**; D, I, N: **GLUT-2**; E, J, O: **Negativkontrollen**. Die Zellen zeigten ein deutlich stärkeres Wachstum als im serumfreien Medium (Abb. 4.2). Auch hier waren bereits am 6. Kulturtag Insulinpositive Zellen nachzuweisen. Die Teilabbildungen C, H und M zeigen, dass nicht alle adhärennten Zellen CD14-positiv sind. Ab Tag 14 sind Makrophagen zu erkennen.

#### 4.2.3 Kulturmedium mit 1 Prozent Serumzusatz

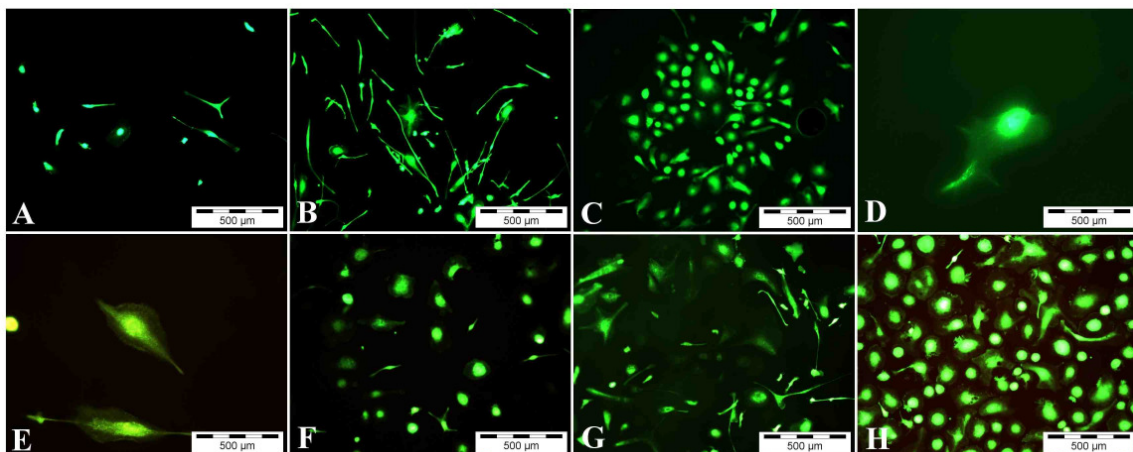
In 1 Prozent Humanserum entwickelten sich die ausgesäten Monozyten optimal. Sie veränderten sich morphologisch von kleinen runden Zellen über spindelförmige zu ovalen Zellen. Sie waren zu 100 Prozent vital und erreichten ab dem 14. Kulturtag teilweise eine Größe von über 600 µm. Die Zellen wiesen zudem morphologische Charakteristika von Makrophagen auf: breiter Cytoplasmaum mit teilweise mehreren Zellkernen.

Die Zellen waren für alle 4 Marker an den drei Testtagen deutlich positiv. Ab dem 4. Kulturtag waren teilweise adhärennte Zellverbände („Kluster“) zu beobachten, in denen mit hoher Wahrscheinlichkeit vermehrt Zellteilungen stattfanden. Mit zunehmender Kulturdauer lösten sich diese Zellverbände auf.



**Abb. 4.4. Immunhistochemische Analyse und Morphologie von Monozyten im Kulturmedium mit 1 Prozent Humanserum am 6. (A-E), 14. (F-J) und 18. (K-O) Kulturtag.** A, F, K: **Insulin**; B, G, L: **C-Peptid**; C, H, M: **CD14**; D, I, N: **GLUT-2**; E, J, O: **Negativkontrollen**. Die Monozyten entwickelten sich eindeutig zu Makrophagen.

Des Weiteren wurde die Vitalität der auf Deckgläschen gezogenen Monozyten in der Langzeitkultur überprüft. Hierzu wurden sie zu unterschiedlichen Kulturtagen mit FDA/PI gefärbt. Ihre Vitalität war selbst am 26. Kulturtag, dem Ende der Experimente, noch nahezu 100 Prozent.



**Abb. 4.5. Überprüfung der Vitalität kultivierter Monozyten mit FDA/PI.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von den Kulturtagen 6 (A), 8 (B), 13 (C), 15 (D), 17 (E), 19 (F), 22 (G), 26 (H). Die fast vierwöchige Kultur auf Deckgläschen schadete der Vitalität der Zellen nicht, da nahezu sämtliche Zellen (> 98%) grün fluoreszierend und damit lebend waren.

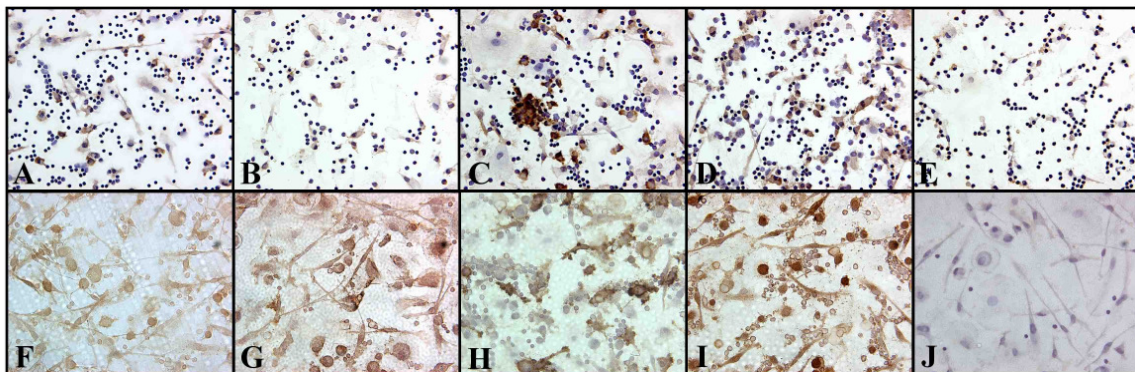


#### 4.2.4 Kulturmedium mit 10 Prozent Serumzusatz

Im Kulturmedium mit 10 Prozent Humanserum entwickelten sich die Monozyten hinsichtlich Größe und Morphologie wie Monozyten, die mit einem Prozent Humanserum kultiviert wurden (Kapitel 4.2.3). Ein schnelleres Wachstum oder ein größerer Anteil der für die getesteten Marker positiven Zellen wurde jedoch nicht beobachtet. Ein wesentlicher Nachteil dieser Serumkonzentration war, dass in der Immunhistochemie eine starke Hintergrund-Färbung auftrat. Auch mehrmaliges gründliches Waschen<sup>(4)</sup> der Präparate vor der immunhistochemischen Färbung führte zu keinem Erfolg. Vielmehr lösten sich vermehrt Zellen durch häufiges Waschen von den Deckgläschen.

Am 18. Kulturtag war die Hintergrundfärbung so hoch, dass keine auswertbaren Ergebnisse erzielt wurden, weshalb immunhistochemische Daten von diesem Kulturtag fehlen.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurden sämtliche in Kapitel 4.3 beschriebenen Versuche in Kulturmedium mit 1 Prozent Humanserum durchgeführt.



**Abb. 4.6: Immunhistochemische Analyse und Morphologie von Monozyten im Kulturmedium mit 10 Prozent Humanserum am 6. (A-E) und 14. (F-J) Kulturtag. A, F: Insulin; B, G: C-Peptid; C, H: CD14; D, I: GLUT-2; E, J: Negativkontrollen. Die Monozyten entwickelten sich eindeutig zu Makrophagen.**

<sup>(4)</sup> Zum Begriff „Waschen“ siehe auch Kommentar zum Kapitel 3.7 in Material und Methoden.

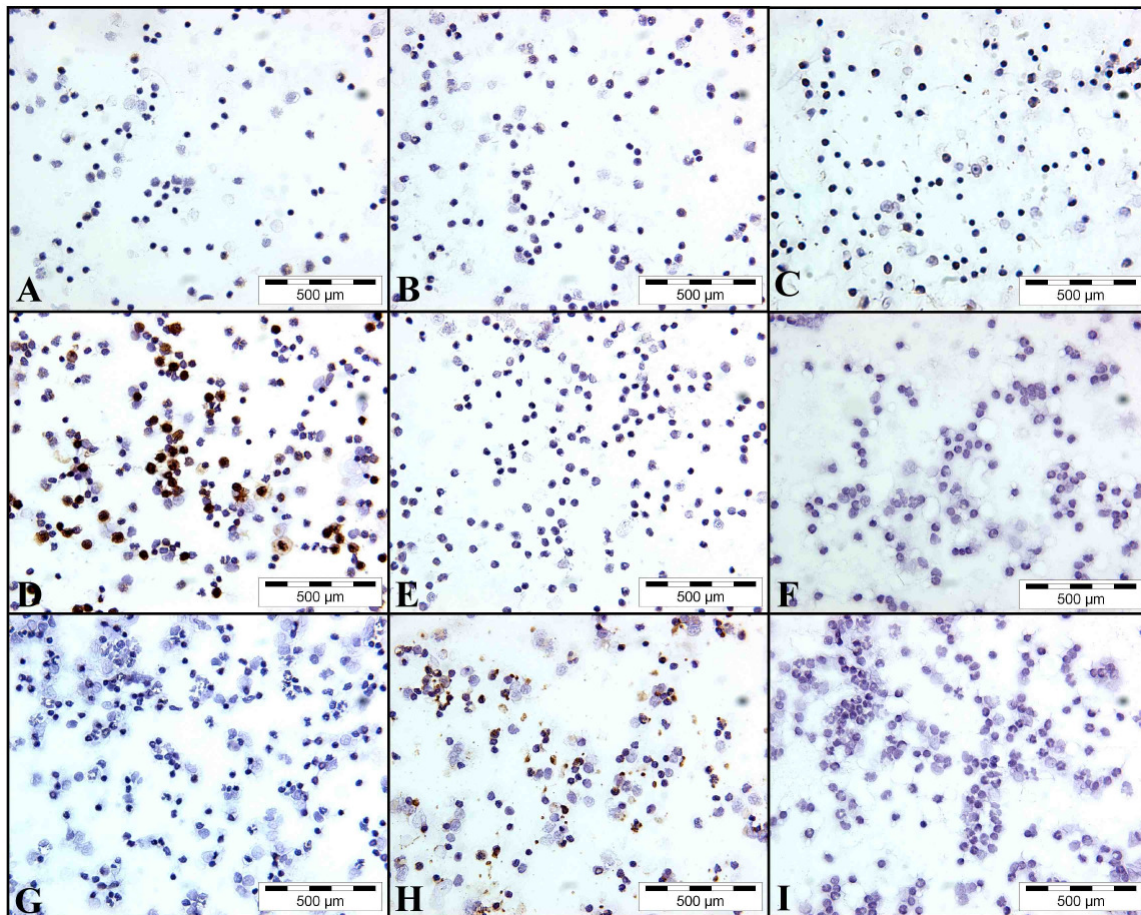
### **4.3 Immunhistochemische und morphologische Charakterisierung kultivierter Monozyten**

In diesem Kapitel wird die immunhistochemische und morphologische Charakterisierung der kultivierten Monozyten über einen Zeitraum von 26 Tagen gezeigt. Dabei wurden die Zellen auf die Präsenz folgender „Marker“ überprüft: Insulin, C-Peptid, Glukagon, CD14, CD34, GLUT-2, PDX-1 und Albumin. Hierbei handelt es sich um Marker einer funktionstüchtigen Beta-Zelle bzw. Langerhans-Insel.

**„Tag 0“-Monozyten.** „Tag 0“-Monozyten sind über Adhärenz angereicherte Monozyten, die bereits nach einem Tag in Kultur geerntet wurden. Hierzu wurden die auf Deckgläschen ausgesäten Leukozyten für eine Stunde im Brutschrank inkubiert, die nicht-adhärenenten Zellen abgesaugt und die adhärenenten Zellen über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die CD14-positiven Zellen waren zu diesem Zeitpunkt eindeutig negativ für Insulin, Glukagon, C-Peptid, GLUT-2, PDX-1 und den hämatopoetischen Stammzellmarker CD34. Vereinzelt waren Zellen hingegen positiv für Albumin. Hierbei handelte es sich sicherlich um Albumin aus den Seren der Spender (s. auch Kapitel 4.3.7).

**Monozyten der Kulturtage 6-26.** Zu definierten Zeitpunkten wurden die auf Deckgläschen kultivierten Monozyten geerntet und immunhistochemisch untersucht. Am 6. Kulturtag wurde das X-Medium gegen Y-Medium ausgetauscht und am 26. Kulturtag die Kultur beendet (Kapitel 3.2 „Zellkulturmedium“). Die nachfolgenden Abbildungen sind so gewählt, dass sie einen repräsentativen Ausschnitt der Gesamtkultur wiedergeben und nicht ein einzelnes Ereignis. Die Bilder wurden mit 600facher Vergrößerung aufgenommen.

**Abb. 4.7 (Seite 20). Immunhistochemische Analyse kurzzeitig (zwischen 1 und 16 Stunden) adhärrierter Monozyten („Tag 0“-Monozyten).** A: Insulin; B: C-Peptid; C: Glukagon; D: CD14; E: CD34; F: GLUT-2; G: PDX-1; H: Albumin; I: **Negativkontrolle.** Im Gegensatz zu kultivierten Monozyten sind die unmittelbar nach Adhärenz untersuchten Zellen eindeutig negativ für Insulin, C-Peptid, CD34, Glut-2 und PDX-1. Auch ist zu erkennen, dass nicht alle adhärenenten Zellen CD14-positiv sind. Die Albumin-positiven Zellen sind sicherlich das Ergebnis von anheftendem Albumin und nicht auf eine aktive Synthese von Albumin zurückzuführen (Kapitel 4.3.7).

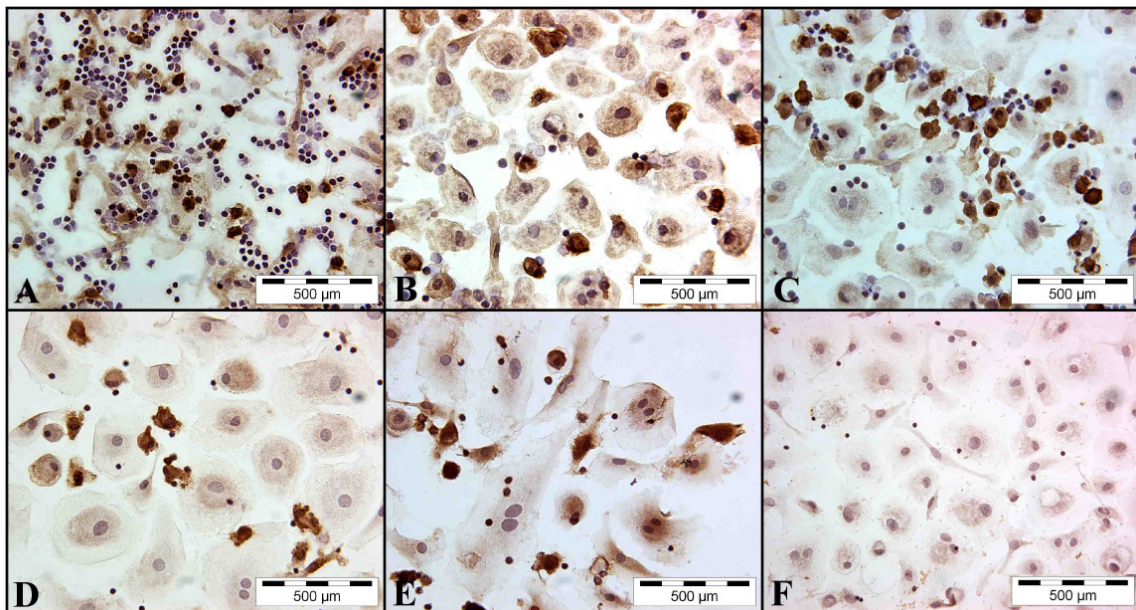


#### 4.3.1 Nachweis CD14-positiver Monozyten

Als erstes wurde überprüft, ob und wie lange adhärenente Monozyten CD14-positiv blieben. Mit Beginn der Kultur war ein deutlicher Anteil der adhärenenten Zellen CD14 positiv (Abb. 4.7D), der sich bis zum Kulturtag 6 noch wesentlich erhöhte (Abb. 4.8A). In der Kultur noch vorhandene Lymphozyten waren als kleine immunhistochemisch ungefärbte Zellen zu erkennen. Die kultivierten Monozyten ließen sich in zwei unterschiedliche „Makrophagen-Phänotypen“ unterteilen: Der erste Phänotyp (**Typ 1**), wie z.B. in Abb. 4.6J gut zu erkennen, war oval mit Zellausläufern. Er erinnerte an neuronale Zellen bzw. Fibroblasten. Der zweite Phänotyp (**Typ 2**), z. B. in Abb. 4.8D abgebildet, war sehr groß, teilweise mit einem Durchmesser von über 500 µm, von ovaler Form und häufig polynukleär. Dieser Zelltyp wies oft einen sichtbaren Saum auf, der um das Kerngebiet gruppiert war. Mit zunehmender Kulturdauer dominierte dieser Zelltyp in der Kultur. Ob die CD14-positiven Monozyten auch die Zellen sind,



die in Kultur doppelt-positiv für Insulin und C-Peptid waren, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht entscheiden, da keine Doppelfärbungen in dieser Arbeit durchgeführt wurden. Da jedoch ein recht hoher Prozentsatz der Zellen sowohl positiv für Insulin als auch C-Peptid waren (zwischen 40 und 70% am Tag 14), wird dies vermutet.

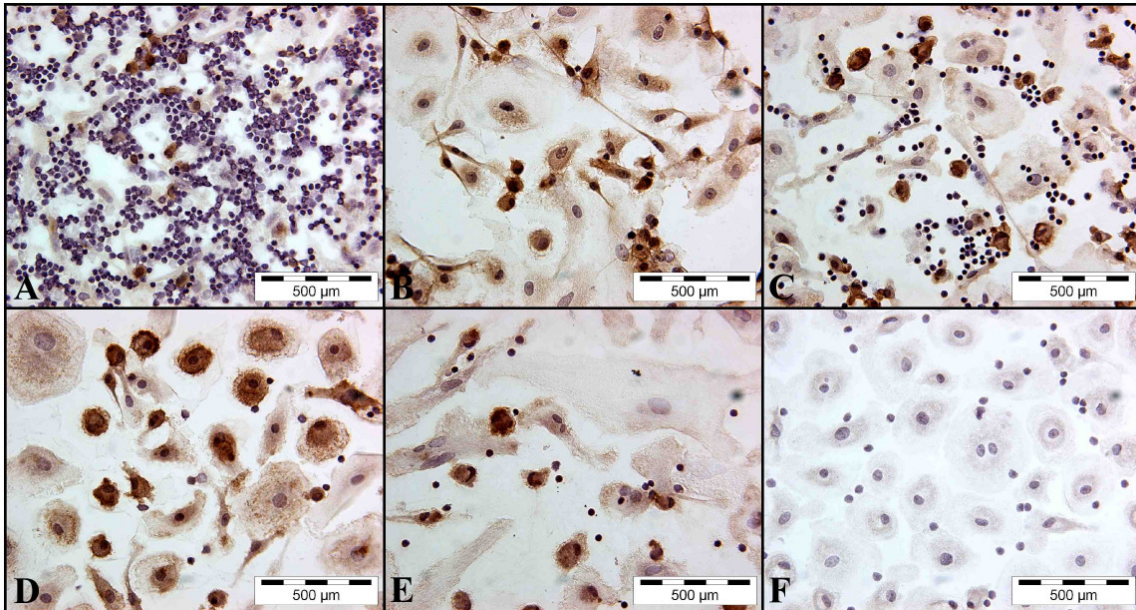


**Abb. 4.8: Nachweis von CD14.** Immunhistochemische Analyse und Morphologie von Monozyten an den Kulturtagen 6 (A), 14 (B), 18 (C), 21 (D) und 26 (E). Negativkontrolle (F). An dieser Serie ist gut zu erkennen, dass die großen ovalen Zellen (Zelltyp 2; siehe auch 4.3.2) die Kultur dominieren. Am Kulturtag 6 (A) sind noch kontaminierende Lymphozyten zu erkennen. Die Monozyten entwickelten sich eindeutig zu Makrophagen.

#### 4.3.2 Nachweis von Insulin

Erste positive Zellen waren bereits am 6. Kulturtag nachzuweisen. Nach dem Wechsel in das Y-Medium wurde eine massive Größenzunahme der adherenten Zellen beobachtet. Die Anzahl der kleineren Insulin-positiven Zellen nahm bis zum 26. Kulturtag ab (Abb. 4.9E). Inwieweit die immunhistologischen Daten für die Makrophagen, die die Kultur zum späten Zeitpunkt dominierten, gesichert sind, darf bezweifelt werden.

Alle Kulturen waren mehr oder weniger stark mit Lymphozyten „kontaminiert“, wie z.B. in Abb. 4.8C zu sehen, die sich trotz intensiven Waschens nicht entfernen ließen (Abb. 4.9).



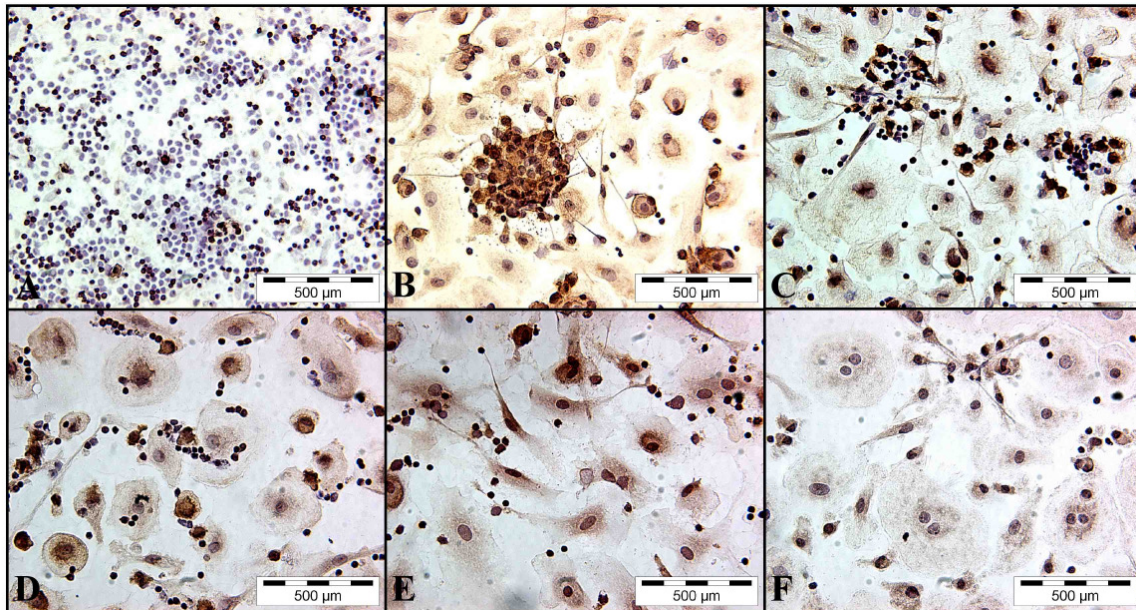
**Abb. 4.9. Nachweis von Insulin.** Immunhistochemische Analyse und Morphologie von Monozyten an den Kulturtagen 6 (**A**), 14 (**B**), 18 (**C**), 21 (**D**) und 26 (**E**). Negativkontrolle (**F**). Die Monozyten entwickelten sich eindeutig zu Makrophagen.

#### 4.3.3 Nachweis von C-Peptid

Auch C-Peptid-positive Monozyten wurden bereits am 6. Kulturtag nachgewiesen. Teilweise waren, wie in allen Kulturen, adhärenente Zellkluster (Abb. 4.10B) zu beobachten, die sich im Laufe der Kultur jedoch auflösten. Zeitweilig entstand der Eindruck, dass die Zellen vom Typ 1 sich aus diesen Zellverbänden „lösten“. Möglich erscheint aber auch, dass diese Zellkluster auf den adhärenenten Zellen von Typ 1 lagen. In jedem Fall sind diese Zellkluster auf vermehrte Zellteilungen zurückzuführen. Die Zellen in diesen Klustern waren positiv für C-Peptid (Abb. 4.10B) bzw. Insulin (nicht gezeigt). Zudem schienen sich die adhärenenten Zellen am Anfang der Kultur vermehrt zu teilen, während zum späteren Zeitpunkt ein Größenwachstum zu beobachten war.

Wie bereits für Insulin beobachtet wurde (Kapitel 4.3.2), war zwischen den Kulturtagen 18 und 21 ein Maximum an C-Peptid-positiven Monozyten zu erkennen.



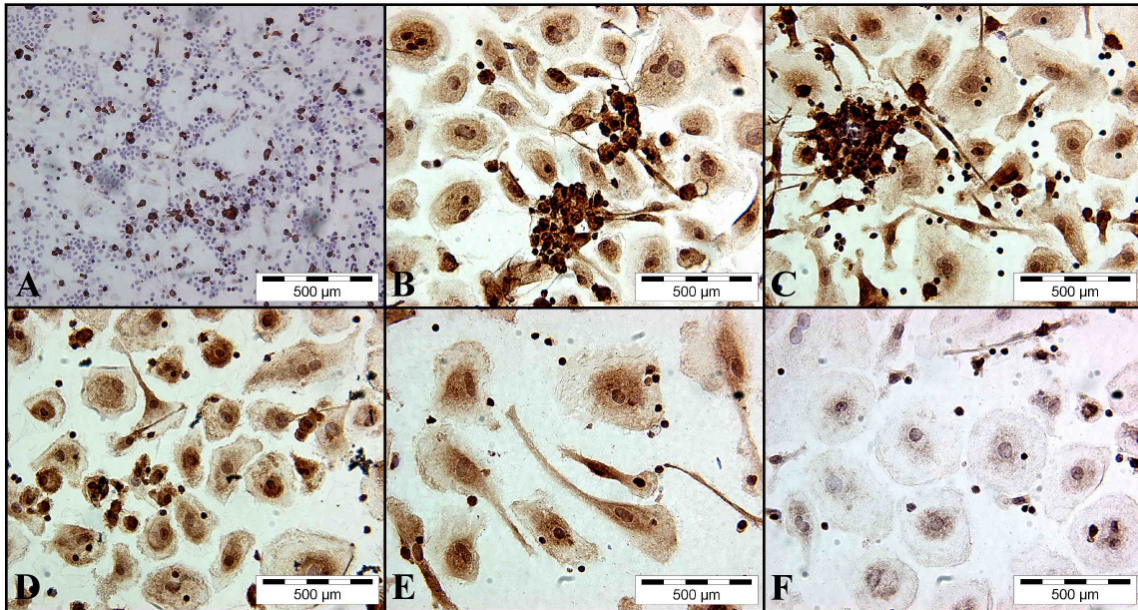


**Abb. 4.10: Nachweis von C-Peptid.** Immunhistochemische Analyse und Morphologie von Monozyten an den Kulturtagen 6 (A), 14 (B), 18 (C), 21(D) und 26 (E). Negativkontrolle (F). Die Monozyten entwickelten sich eindeutig zu Makrophagen.

#### 4.3.4 Nachweis von Glukagon

Glukagon-positive Zellen wurden nicht nur am 6. Kulturtag (Abb. 4.11B), sondern bereits am 2. Kulturtag vorgefunden (nicht gezeigt). Im Gegensatz zu den immunhistochemischen Färbungen zum Nachweis von Insulin und C-Peptid waren auch die Typ-2 Zellen (siehe hierzu Kapitel 4.3.5 auf der nächsten Seite) stark positiv für den anti-Glukagon-Antikörper V2025 (Tab. 3.2). Ab dem 14. Kulturtag war ein Großteil der Zellen stark positiv.



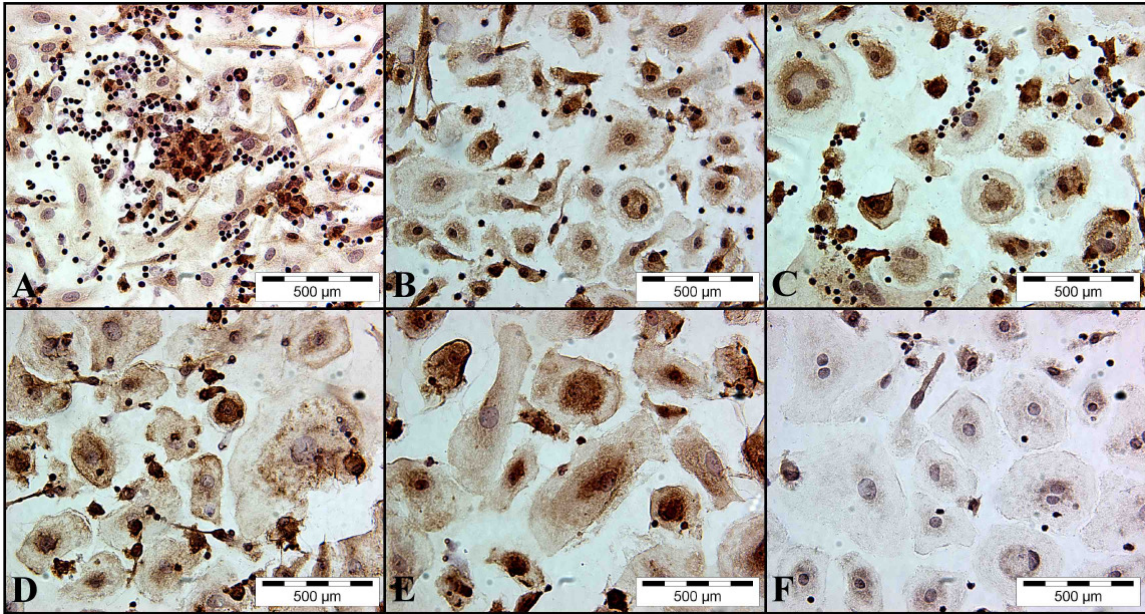


**Abb. 4.11. Nachweis von Glukagon.** Immunhistochemische Analyse und Morphologie von Monozyten an den Kulturtagen 6 (A), 14 (B), 18 (C), 21(D) und 26 (E). Negativkontrolle (F). Die Monozyten entwickelten sich eindeutig zu Makrophagen.

#### 4.3.5 Nachweis von GLUT-2

Der Glukosetransporter GLUT-2 (Fukumoto H. et al., 1988) aus der Familie der SCLC2A-Transporter wird von Betazellen (Permutt M.A. et al., 1989), aber auch von Zellen der Leber, Niere und des Dünndarms exprimiert. Er ist in der Lage, Glukose, Fruktose und Glukosamin zu transportieren. Er gehört, zusammen mit den Isoformen GLUT-1, -3, -4 und -14 zur Klasse 1 der Zuckertransporter. Er besitzt eine niedrige Affinität und seine Aktivität ist vom Blutzuckerspiegel abhängig (Scheepers A. et al., 2004).

Frisch isolierte Monozyten exprimierten kein GLUT-2 (Abb. 4.7). Ab dem 6. Kulturtag sind sowohl Zellen des Typs 1, als auch des Typs 2 (s. Kapitel 4.3.1) deutlich positiv für GLUT-2. Ein Maximum an GLUT-2-positiven Zellen war nicht erkennbar, doch schien am 14. Kulturtag der Anteil GLUT-2-positiver Zellen am höchsten zu sein. Auffällig ist, dass nicht alle Bereiche der Plasmamembran angefärbt waren; insbesondere die weiter vom Kern entfernten Bereiche waren nur schwach gefärbt.



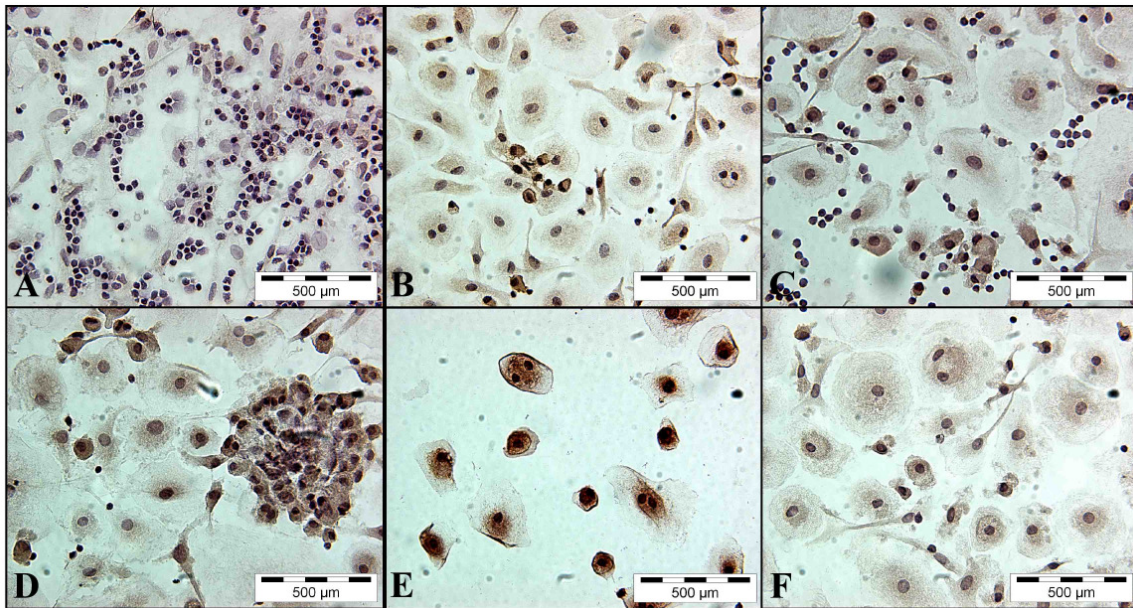
**Abb. 4.12. Nachweis von GLUT-2.** Immunhistochemische Analyse und Morphologie von Monozyten an den Kulturtagen 6 (A), 14 (B), 18 (C), 21(D) und 26 (E). Negativkontrolle (F). Die Monozyten entwickelten sich eindeutig zu Makrophagen.

#### 4.3.6 Nachweis von PDX-1

Der Transkriptionsfaktor PDX-1 („pancreatic duodenal homeobox-1“), der sich auf Chromosom 13 befindet (Stoffel M. et al., 1995), spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung des endokrinen als auch exokrinen Pankreas. Die Ausschaltung von PDX-1 beeinträchtigt die Funktion der Betazellen und führt zu Diabetes mellitus (Ahlgren U. et al., 1998). Ferner ist PDX-1 ein wichtiger Faktor, um die Transkription des Insulingens zu aktivieren. Darüber hinaus reguliert PDX-1 auch die Expression verschiedener Proteine, die für die Glukosemessung und -sekretion verantwortlich sind (Waeber G. et al., 1996).

Da die Spezifität des anti-PDX-1 Antikörpers AB5999 (Tab. 3.2) nicht geprüft wurde, können die Daten hierzu nicht abschließend kommentiert werden. Die Monozyten in den Zellklustern waren positiv (Abb. 4.13D), während die Ergebnisse für die Makrophagen (Abb. 4.13 E) mit Vorsicht zu betrachten sind. Die Färbungen zu anderen Zeitpunkten (Abb. 4.13A-C) unterscheiden sich nicht wesentlich von der Negativkontrolle.



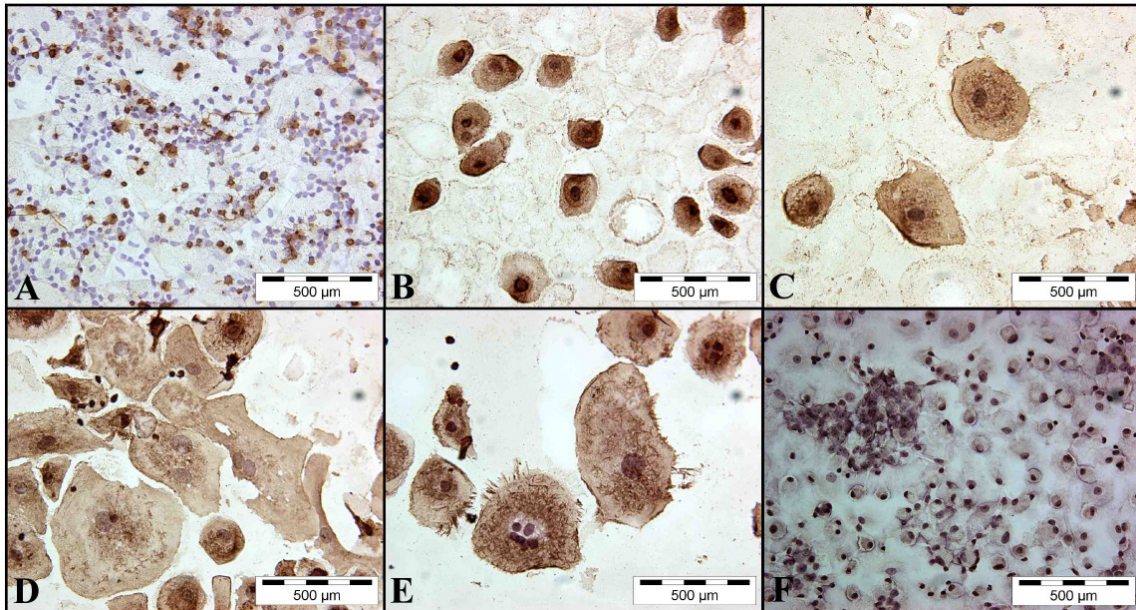


**Abb. 4.13. Nachweis von PDX-1.** Immunhistochemische Analyse und Morphologie von Monozyten an den Kulturtagen 6 (A), 14 (B), 18 (C), 21(D), 26 (E), Negativkontrolle (F). Die Monozyten entwickelten sich eindeutig zu Makrophagen.

#### 4.3.7 Nachweis von Albumin

Albumin, ein wasserlösliches Monomer, macht ca. die Hälfte der menschlichen Serumproteine aus. Im Blut übernimmt Albumin den Transport von Steroiden, Fettsäuren und Hormonen. Zudem hält es das extrazelluläre Flüssigkeitsvolumen aufrecht. Albumin wird zwar von der Leber synthetisiert, doch wurde die Präsenz dieses Proteins auch in den kultivierten Monozyten überprüft. Der Grund hierfür ist, dass in dieser Arbeit das Cytokin HGF (Kapitel 3.2) verwendet wurde, ein für die Entwicklung von Hepatozyten wichtiger Faktor. Deshalb wurde überprüft, ob die kultivierten Monozyten möglicherweise positiv für Albumin waren. Wie in 4.7 gezeigt, sind bereits am Tag 0 einige Zellen Albumin-positiv.

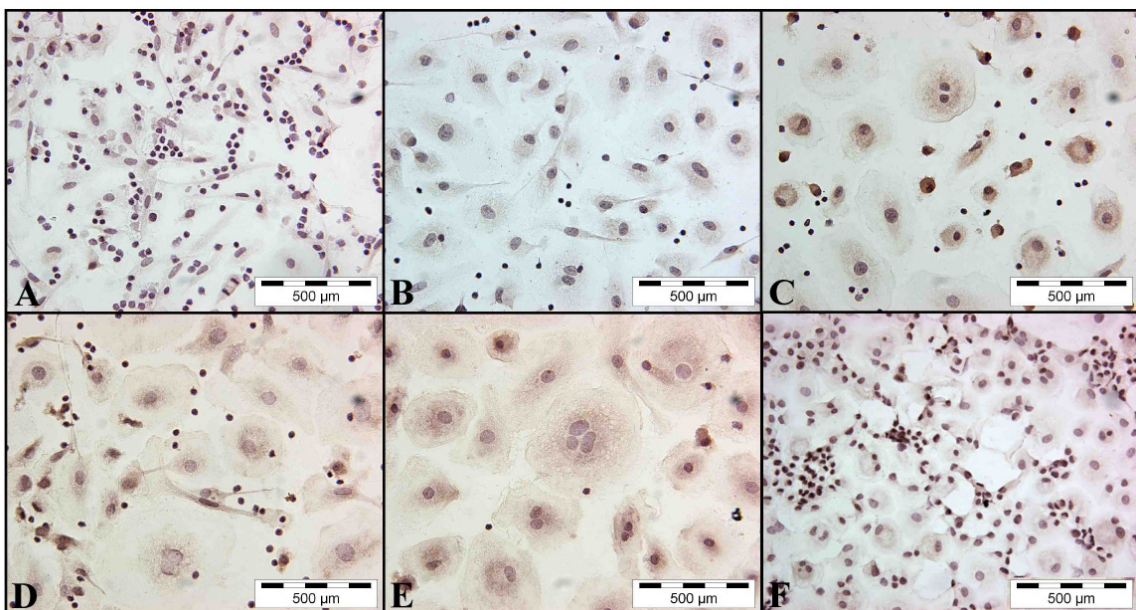
Die Daten für die Albuminfärbung lassen sich nicht eindeutig dahingehend interpretieren, dass kultivierte Monozyten Albumin synthetisieren, da nicht geklärt ist, ob das Ergebnis nicht durch zustande kam, dass diesen Zellen Albumin aus den Seren anhaftet.



**Abb. 4.14: Nachweis von Albumin.** Immunhistochemische Analyse und Morphologie von Monozyten an den Kulturtagen 6 (A), 14 (B), 18 (C), 21(D) und 26 (E). Negativkontrolle (F). Die Monozyten entwickelten sich eindeutig zu Makrophagen..

#### 4.3.8 Nachweis von CD34

Das Glykoprotein CD34 ist ein wichtiger Marker für hämatopoetische Vorläuferzellen (Sutherland D.R. et al., 1988). Im peripheren Blut kommen unter physiologischen Bedingungen nur äußerst wenige CD34-positive Zellen vor (Abb. 4.16).

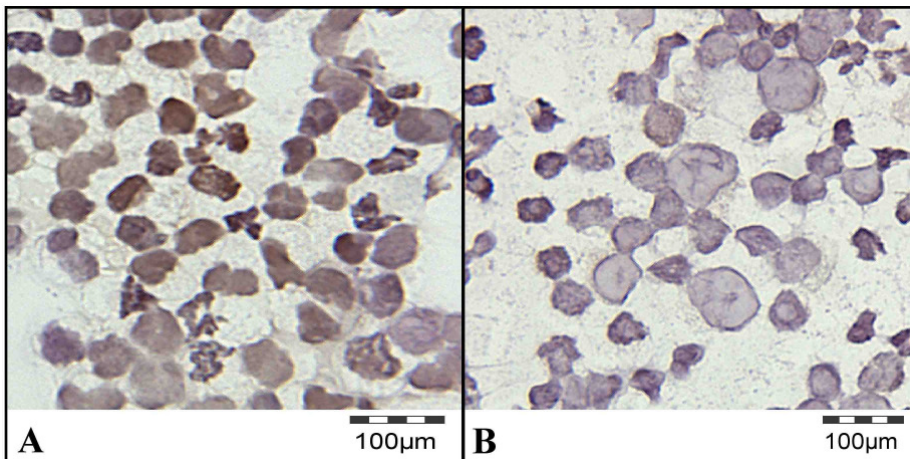




**Abb. 4.15 (Seite 27): Nachweis von CD34.** Immunhistochemische Analyse und Morphologie von Monozyten an den Kulturtagen 6 (A), 14 (B), 18 (C), 21 (D) und 26 (E), Negativkontrolle (F). CD34-positive Zellen waren nicht nachweisbar.

Als Ergebnis bleibt festzuhalten, dass kultivierte Monozyten zu keinem Zeitpunkt eindeutig CD34-positiv waren.

Um die Spezifität des anti-CD34 Antikörpers zu überprüfen, wurden uns freundlicherweise von der Abteilung für Transfusionsmedizin mit GM-CSF stimulierte Zellen zur Verfügung gestellt. Diese Zellen färbten sich deutlich positiv für CD34 (Abb. 4.16).



**Abb. 4.16:** GM-CSF stimulierte periphere Blutleukozyten.  
**A:** CD34 positive Zellen;  
**B:** Negativ-Kontrolle.

### Tabellarische Zusammenfassung des Kapitels 4.3

Tag 0 Monozyten (Abb. 4.7)	kultivierte Monozyten (Abb. 4.8 - 4.15)
nicht alle adhärenenten Zellen waren CD14 positiv; sämtliche Zellen waren jedoch negativ für: Insulin, C-Peptid, Glukagon, CD34, Glut-2, PDX-1; vereinzelt Albumin-positive Zellen (s. auch Kapitel 4.3.7).	Die Zellen wurden an den Kulturtagen 6, 14, 18, 21 und 26 untersucht. Bereits am Tag 6 war ein Teil der Zellen (ca. 40-70%) positiv für: Insulin, C-Peptid, Glut-2, CD14, Glukagon, Albumin und negativ für: CD34 und PDX-1.  Die Zellen waren bis zum Ende der Kultur positiv für diese vier Marker.  Die Zellmorphologie änderte sich mit der Zeit sehr stark und großvolumige Zellen dominierten die Kultur (s. auch Kapitel 4.3.1). Makrophagen waren deutlich zu erkennen

#### 4.4 Prüfung der biologischen Wirksamkeit von zellfreiem „Monozyten-Insulin“

Um die biologische Aktivität von „Monozyten-Insulin“ zu testen, wurden zellfreie Überstände lysierter Zellen diabetischer Mäuse vom Stamm C57BL/6 intra-peritoneal injiziert. Bei allen Tieren kam es zu einem deutlichen Abfall des Blutzuckerspiegels innerhalb einer Stunde (Tab. 4.1). Nach 5 Stunden stieg der Blutzuckerspiegel wieder an.

**Tab. 4.1: Veränderung der Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse 1 und 5 Stunden nach Injektion von „Monozyten-Insulin“** (ca. 10-20 pg Insulin pro Maus). Gezeigt sind die Blutzuckerwerte in mg/dl zum Zeitpunkt der Insulin-Injektion (z. Z. Injek.) sowie 1 und 5 Stunden danach. Alle Tiere zeigten einen deutlichen Abfall des Blutzuckerspiegels innerhalb einer Stunde. Vier von fünf Tieren waren im normoglykämischen Bereich. Nach 5 Stunden wurden die Ausgangswerte wieder nahezu erreicht (s. auch Tab. 4.2).

Kulturtag	Apherese	Tier	z. Z. Injek.	1 Stunde	5 Stunden
6	12	K4, #4	420	220	458
18	6	K1, #3	560	165	330
20	6	K1, #4	522	105	317
22	6	K2, #1	438	116	306
25	6	K2, #2	455	187	307
<b>Mittelwert:</b>			479	159	344
<b>Standardabweichung:</b>			59,5	48,2	64,7

Der prozentuale Abfall des Blutzuckerspiegels 1 und 5 Stunden nach Injektion von „Monozyten“-Insulin ist in Tab. 4.2 dargestellt.

**Tab. 4.2. Prozentuale Änderung des Blutzuckerspiegels 1 und 5 Stunden nach Injektion von „Monozyten-Insulin“** (s. auch Tab. 4.1). Die Abnahme des Blutzuckerspiegels (=  $\Delta$  Blutzuckerspiegel in %) wurde nach folgender Formel berechnet:  $(a-b/a) \times 100$ , für  $a > b$  und  $-(a-b/a)$  für  $a < b$ ;  $a$  = Blutzuckerspiegel zum Zeitpunkt der Injektion und  $b$  = Blutzuckerspiegel 1 Stunde bzw. 5 Stunden nach Injektion. Mit (+) wird der Anstieg und mit (-) der Abfall des Blutzuckerspiegels markiert.

Kulturtag	Apherese	Tier	$\Delta$ Blutzuckerspiegel in %	
			1 Stunde	5 Stunden
6	12	K4, #4	-47,6	+8,2
18	6	K1, #3	-70,5	-41,1
20	6	K1, #4	-79,9	-39,3
22	6	K2, #1	-73,5	-30,1
25	6	K2, #2	-58,9	-32,5

Der Blutzuckerspiegel fiel innerhalb einer Stunde um  $66,1 \pm 12,8$  Prozent ( $n=5$ ) ab; nach 5 Stunden um  $35,8 \pm 5,3$  Prozent ( $n=4$ ) (Tab. 4.2). Auch wurde überprüft, ob exogenes Human-Insulin den Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse verringert. Hierzu erhielten die Tiere jeweils 100  $\mu$ l einer Insulin-Lösung mit 4 IE (dies entspricht ca. 170 pg Insulin<sup>(5)</sup> pro Maus) intraperitoneal injiziert. Nach 5 Stunden waren bei vier Tieren die Blutzuckerwerte weiterhin abgesenkt (Tab. 4.3).

**Tab. 4.3: Veränderung der Blutzuckerspiegel (BZ) diabetischer Mäuse 1 und 5 Stunden nach Injektion von Human-Insulin.** Alle Tiere zeigten normoglykämische Werte (<200 mg/dl) 1 Stunde nach Insulininjektion. Nach 5 Stunden wiesen noch drei Tiere normoglykämische Werte auf. Die Blutzuckerspiegel sind in mg/dl angegeben. In Klammern sind die Schwankungen der Blutzuckerspiegel (- = Abfall, + = Anstieg) im Vergleich zum Zeitpunkt der Injektion (z. Z. Injek.) in Prozent angegeben. Der Grenzwert für den prozentualen Abfall des Blutzuckerspiegels wurde bei 30 Prozent gelegt (Tab. 4.4).

Tier	z. Z. Injek.	1 Stunde		5 Stunden	
K4, #4	392	67	(- 83,0)*	420	(+ 7,10)
K1, #3	501	54	(- 89,2)	163	(- 67,5)
K2, #4	391	69	(- 82,4)	247	(- 36,8)
K2, #5	349	20	(- 94,3)	187	(- 46,4)
K4, #2	203	57	(- 71,9)	89	(- 56,2)
Mittelwert:	367	53	(84,2)	221	(51,7)
Standardabw.:	107,7	19,7	(8,4)	124,7	(13,2)

\* Die prozentuale Senkung des Blutzuckerspiegels wurde wie folgt berechnet:

$$\Delta = \frac{BZ_{(z. Z. Injek)} - BZ_{(1 \text{ bzw. } 5 \text{ Stunden n. Injektion})}}{BZ_{(z. Z. Injek)}} \times 100$$

Als Negativkontrolle wurden jeweils 100  $\mu$ l PBS intraperitoneal in 5 diabetische Tiere injiziert, wobei natürliche Schwankungen des Blutzuckerspiegels nach „oben“ und „unten“ beobachtet wurden. Zur Beurteilung der Schwankungen sind ausschließlich die Absenkungen der Blutzuckerspiegel von Interesse. In Tab. 4.4 wird die prozentuale Durchschnittsschwankung mit 13 Prozent (1 Stunde nach Injektion) bzw. mit 21 Prozent (5 Stunden nach Injektion) berechnet.

<sup>(5)</sup> Siehe hierzu Kapitel 3.8.

**Tab. 4.4: Veränderung der Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse 1 und 5 Stunden nach Injektion von PBS.** Jeder Maus wurden 100 µl PBS i.p. injiziert. Die Messungen ergaben natürliche Schwankungen der Blutzuckerspiegel, aber kein Absinken in den normoglykämischen Bereich. Die Blutzuckerspiegel sind in mg/dl angegeben. In Klammern ist die Schwankung des Blutzuckerspiegels (- = Abfall, + = Anstieg) im Vergleich zum Ausgangswert zum Zeitpunkt der Injektion (z. Z. Injek.) angegeben (zur Berechnung s. Tab. 4.2). Die prozentuale Schwankung des Blutzuckerspiegels liegt somit 1 Stunde nach Injektion bei 13 Prozent und 5 Stunden nach Injektion bei 21 Prozent. Als Grenzwert wurde 30 Prozent festgelegt.

Tier	z. Z. Injek.	1 Stunde	5 Stunden
K1, #3	339	307 (-9,0)	478 (+41)
K2, #5	393	410 (+4,3)	333 (-15,3)
K4, #3	276	241 (-12,7)	200 (-27,5)
K8, #1	287	240 (-16,3)	337 (+17,4)
K8, #5	374	377 (+0,8)	300 (-19,9)
<b>Mittelwert:</b>	<b>334</b>	<b>315</b>	<b>330</b>
<b>Standardabw.:</b>	<b>51,7</b>	<b>77,5</b>	<b>99,7</b>

\* Die prozentuale Senkung des Blutzuckerspiegels wurde wie folgt berechnet:

$$\Delta = \frac{\text{BZ (z. Z. Injek)} - \text{BZ (1 bzw. 5 Stunden n. Injektion)}}{\text{BZ (z. Z. Injek)}} \times 100$$

Um zu zeigen, dass Insulin-negative Blutmonozyten (so genannte „Tag 0“-Monozyten; Kapitel 4.3) nicht in der Lage waren, den Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse zu senken, wurden jeweils  $1 \times 10^7$  Monozyten, resuspendiert in 100 µl PBS, im Ultraschallbad aufgeschlossen und der zellfreie Überstand diabetischen Tieren injiziert. Wie aus Tab. 4.5 zu entnehmen ist, liegen die Absenkungen der Blutzuckerspiegel unterhalb der definierten Schwankungsbreite von 30 Prozent. Mit diesen Experimenten wurde somit eindeutig gezeigt, dass sich aus Insulin-negativen Monozyten (überprüft in der Immunhistochemie; Abb. 4.7) auch kein Insulin isolieren lässt.

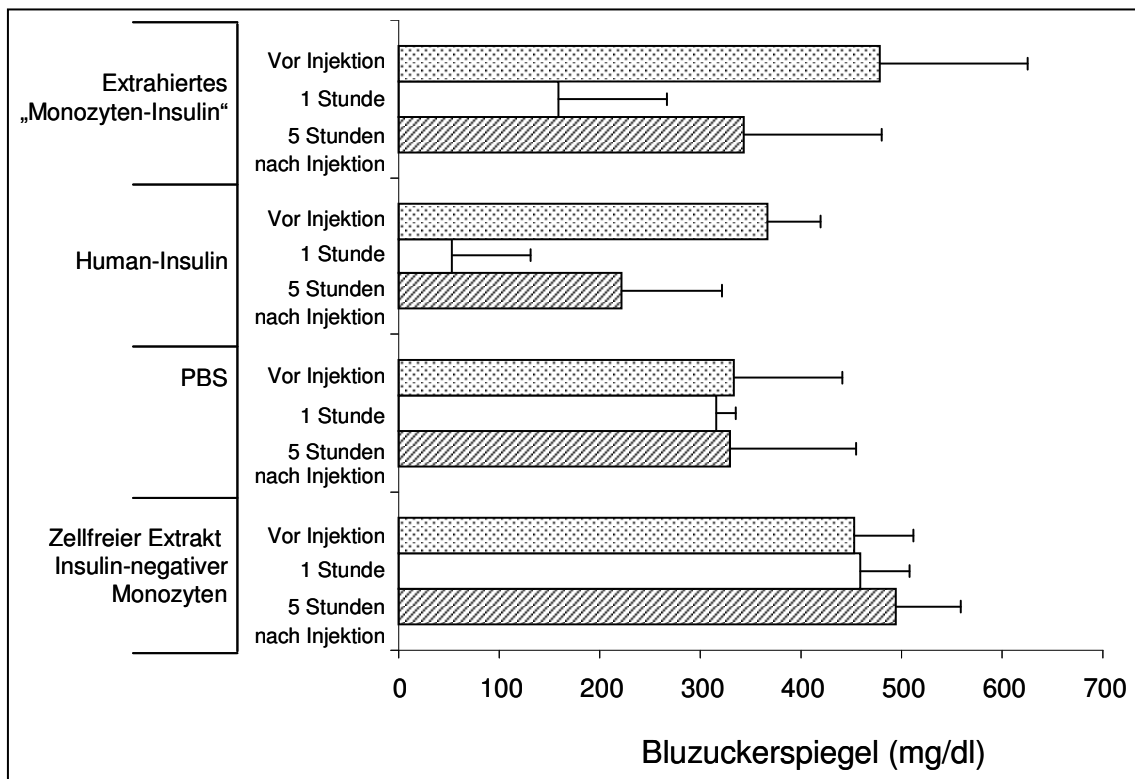
**Tab. 4.5 (Seite 32): Veränderung der Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse 1 und 5 Stunden nach Injektion von jeweils  $5 \times 10^6$  aufgeschlossenen peripheren Blutmonozyten.** Die Zellen waren negativ für Insulin und C-Peptid (Abb. 4.7). Zu keinem Zeitpunkt (1 bzw. 5 Stunden nach Injektion im Vergleich zum Zeitpunkt der Injektion (z. Z. Injek.) erreichten die abgesenkten Blutzuckerwerte den Grenzwert von 30 Prozent.



Tier	Apherese	z. Z. Injek.	1 Stunde	5 Stunden
K6, #1	15	329	493	455
K6, #4	15	266	270	275
K11, #1	15	600	547 (-8,8)	600
K11, #2	15	505	498 (-1,4)	600
K11, #3	15	561	486 (-13,4)	541 (-3,6)
<b>Mittelwert:</b>		452	459	494
<b>Standardabweichung:</b>		146,9	108,2	136,2

\* Die prozentuale Senkung des Blutzuckerspiegels wurde wie folgt berechnet:

$$\Delta = \frac{BZ_{(z. Z. Injek.)} - BZ_{(1 \text{ bzw. } 5 \text{ Stunden n. Injektion})}}{BZ_{(z. Z. Injek.)}} \times 100$$

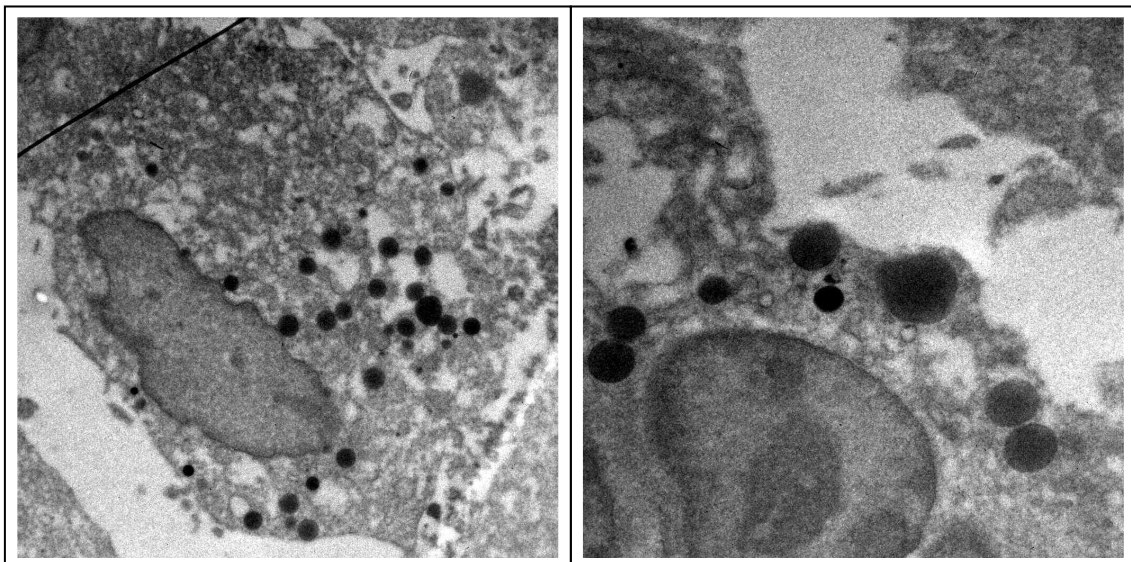


**Abb. 4.17: Veränderung der Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse 1 und 5 Stunden nach Injektion von „Monozyten-Insulin“, Human-Insulin, PBS und zellfreier Extrakte Insulin-negativer Monozyten.** Hierbei handelt es sich um die grafische Zusammenfassung der Tab. 4.1, 4.3-4.5. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von jeweils fünf *in vivo* Experimenten.

#### 4.5 Elektronenmikroskopischer Nachweis Insulin-positiver Granula

Um die in dieser Arbeit präsentierten *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse (Immunhistochemie bzw. Überprüfung der biologischen Aktivität von „Monozyten-Insulin“) zu stützen, wurden die kultivierten Monozyten in Zusammenarbeit mit Prof. Martini aus der Klinik für Neurologie der Universität Würzburg elektronenmikroskopisch auf das Vorhandensein Insulin-haltiger Granula überprüft. Hierzu wurden die Zellen am 14. Kulturtag geerntet und mit dem anti-Insulin Antikörper IN-05 immunhistochemisch gefärbt. Die weitere Bearbeitung erfolgte freundlicherweise durch Mitarbeiter von Prof. Martini. Um die Zellen mit dem Ultramikrotom schneiden zu können, wurden sie auf sterilen Plastikfolien gezüchtet. Auch auf dieser Oberfläche adhärten die Zellen sehr stark.

Die folgenden Abbildungen zeigen Monozyten mit Insulin-haltigen Granula, vergleichbar einer humanen Betazelle Abb. 4.18); einige der Granula sind stark vergrößert dargestellt. Sie haben sich um den Zellkern gruppiert, andere liegen in unmittelbarer Nähe der Phospholipidmembran. Im Vergleich zu humanen Betazellen ist der Anteil an Insulin-haltigen Granula jedoch wesentlich geringer (siehe hierzu Abb. 10.4).



**Abb. 4.18. Elektronenmikroskopische Aufnahmen *in vitro* modifizierter Monozyten.** Gezeigt ist ein Ausschnitt einer Zelle mit Insulin-haltigen Granula. Im rechten Bild ist dieser Bereich nochmals vergrößert.

## 5 Beantwortung der Fragen

---

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass *in vitro* modifizierte Monozyten Insulin-positiv sind. Zudem wurde die biologische Aktivität des isolierten Insulins in diabetischen Tieren gezeigt.

**1. In Kooperation mit der Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie wurden Leukozyten gesunder Spender gewonnen. Lassen sich auch hieraus Insulin-positive Monozyten gewinnen?**

Leukapheresen gesunder Spender eignen sich hervorragend zur Gewinnung peripherer Blutmonozyten. Der große Vorteil dieser Vorgehensweise ist, dass stets mit Zellen eines einzelnen Spenders gearbeitet werden kann und nicht, wie die Kieler Gruppe, mit einem Gemisch von Zellen unterschiedlicher Spender. Zudem lassen sich die erzielten Ergebnisse eindeutig einem Spender zuordnen, um gegebenenfalls eine weitere Leukapherese von ihm zu erhalten.

**2. Humane Monozyten wurden *in vitro* kultiviert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten immunhistochemisch und morphologisch untersucht. Für welche Marker sind die Zellen positiv und welche morphologischen Charakteristika weisen sie auf? Stimmen die Ergebnisse mit den Beobachtungen der Kieler Arbeitsgruppe überein?**

Die kultivierten Monozyten entwickelten sich, wie erwartet, mit der Zeit zu Makrophagen. Dies wird von der Makrophagen-typischen Morphologie der Zellen abgeleitet, obgleich immunhistochemische Färbungen zu ihrem Nachweis nicht durchgeführt wurden. Die frühe Phase der Kultur (bis ca. Tag 6) war von einer starken Zellteilung charakterisiert, während später eine deutliche Zunahme der Zellgröße zu beobachten war. Der Großteil der adhärenenten Zellen war CD14-positiv und diese waren zusätzlich positiv für: Insulin, C-Peptid,

Glukagon und Glut-2. CD34- und PDX-1-positive Zellen waren nicht sicher nachzuweisen. Zudem wurden die von der Kieler Arbeitsgruppe beschriebenen „Neolslets“ nicht beobachtet: Hierbei handelt es sich um Inselzell<sup>(6)</sup>-ähnliche Gebilde, die sich aus dedifferenzierten Monozyten entwickeln sollen.

Im Gegensatz zu Publikationen (z.B. Rajagopal J. et al., 2003), die zeigen, dass der alleinige Nachweis von Insulin nicht ausreicht, um Insulin-produzierende Zellen sicher zu identifizieren, war der Nachweis von C-Peptid, einem Nebenprodukt der *de novo* Insulinsynthese, für die *in vitro* modifizierten Monozyten erfolgreich. Zudem wurden die Zellen in Insulin-freiem Medium kultiviert (Kapitel 3.2).

### **3. Die *in vitro* kultivierten Monozyten waren positiv für Insulin. Ist dieses „Monozyten-Insulin“ biologisch aktiv und senkt den Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse?**

Das aus *in vitro* kultivierten Monozyten isolierte Insulin war in diabetischen Mäusen eindeutig biologisch aktiv. Hierzu wurden Zellen von unterschiedlichen Kulturtagen untersucht (Tab. 4.1). Auch aus Kulturen, die von Makrophagen dominiert waren, wurde Insulin isoliert. Die Injektion von „Monozyten-Insulin“, das aus ca.  $5 \times 10^6$  Zellen isoliert wurde, senkte den Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse innerhalb einer Stunde um durchschnittlich 66 Prozent (Tab. 4.2). Zum Vergleich: Die Injektion von ca. 170 pg Humaninsulin verringerte den Blutzuckerspiegel um durchschnittlich 84 Prozent (Tab. 4.3). Erste Daten der elektronenmikroskopischen Untersuchungen ergaben zudem, dass die *in vitro* modifizierten Zellen vom Kulturtag 10 möglicherweise Vesikel mit Insulin enthielten.

Eine Erklärung für die biologische Relevanz Insulin-positiver Monozyten / Makrophagen steht noch aus. Möglicherweise sind sie für eine lokal begrenzte Aktivierung der Zellteilung (Insulin ist ein wichtiger Wachstumsfaktor) von großer Bedeutung – wie z.B. bei der Wundheilung.

---

<sup>(6)</sup> Synonym für Langerhans-Inseln.

## 6 Diskussion

---

Ziel dieser Arbeit war, ein etabliertes Protokoll zur *in-vitro* Generierung Insulin-produzierender Monozyten zu überprüfen. Zudem wurden die Zellen immunhistochemisch-morphologisch charakterisiert und das aus diesen Zellen isolierte Insulin in diabetischen Mäusen erfolgreich getestet.

### 6.1 Ansätze zur Therapie des Diabetes mellitus Typ 1

Der Diabetes mellitus Typ 1 ist eine Autoimmunerkrankung der Bauchspeicheldrüse, bei der die Insulin-produzierenden Betazellen zerstört werden. Ohne Aussicht auf Heilung sind die Patienten auf die Zufuhr von Insulin angewiesen. Wesentliches Ziel bei der Behandlung des Diabetes mellitus Typ 1 ist ein sorgfältig eingestellter Blutzuckerspiegel, um die gefürchteten Spätfolgen zu vermeiden. Mit zugeführtem Insulin ist der Blutzuckerspiegel nicht optimal zu kontrollieren, weshalb schwerwiegende diabetische Komplikationen unvermeidbar sind (s. auch Einleitung). Häufiges Messen des Blutzuckerspiegels bedeutet zudem eine erhebliche Belastung und Beeinträchtigung der Lebensqualität („Writing Team for the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications“, 2003). Insulin-produzierende Zellen hingegen ermöglichen eine physiologische Regulation des Blutzuckerspiegels. Der Vorteil zelltherapeutischer Ansätze ist somit die Vermeidung diabetischer Spätfolgen.

Doch sollte sich der Zellersatz hinsichtlich Glukosesensitivität und Insulinausschüttung nicht wesentlich von Betazellen unterscheiden (Falqui L. et al., 1999). Als attraktive „Quelle“ für Insulin-produzierende Zellen werden embryonale und adulte Stammzellen gesehen (Assady S. et al., 2001; Abraham E.J. et al., 2002; Hao E. et al., 2006). Ohne an dieser Stelle auf die ethische Dimension der Stammzell-Forschung einzugehen, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht geklärt, ob sich die viel versprechenden experimentellen Ergebnisse auch klinisch umsetzen lassen. Um ausreichend große Mengen an Insulin-produzierenden Zellen zu erhalten, müssen sie sich *in vitro* vermehren lassen, wobei ein unkontrolliertes Wachstum (Tumorwachstum) auszuschließen ist. Weiterhin ist sicher-

zustellen, dass die Zellen keine infektiösen Erreger übertragen. Auch ist nicht geklärt, wie lange gezüchtete Betazellen im Organismus nach ihrer Transplantation überleben.

Bei Langerhans-Inseln aus embryonalen Stammzellen wird es sich in der Regel um allogene Transplantate handeln, d.h. sie sind mit dem Empfänger nicht genetisch identisch. Um allogene Langerhans-Inseln vor dem Immunsystem zu schützen, wird es notwendig sein, sie in biokompatible Polymere einzukapseln. Auch ist der optimale Transplantationsort für solche eingekapselten Zellen noch nicht geklärt, auch wenn die Bauchhöhle aufgrund der einfachen Zugänglichkeit bevorzugt wird. Um aus embryonalen Stammzellen autologe Langerhans-Inseln zu züchten, wäre die Technik des therapeutischen Klonens anzuwenden. Diese für den Mensch ethisch bedenkliche Technik wurde z.B. beim Schaf Dolly angewandt (Wilmut I. et al., 1997).

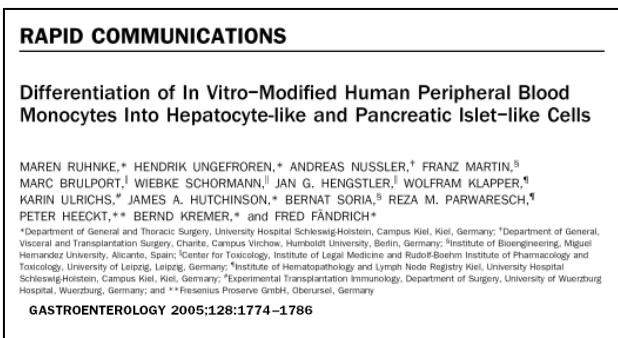
Eine Alternative zur Zellersatztherapie mit embryonalen Stammzellen ist die Anregung ortsständiger Stammzellen zur Neogenese Insulin-produzierender Zellen (Dor Y. et al., 2004). Über die Herkunft sich neu entwickelnder Langerhans-Inseln herrscht momentan noch Unklarheit. So wurden Vorläuferzellen innerhalb der Pankreasgänge, aber auch in den Langerhans-Inseln selbst identifiziert (Ramiya V. et al., 2000). Nach Pankreatektomie kommt es zu einer vermehrten Entwicklung von neuen Langerhans-Inseln, die sich aus Zellen der Pankreasgänge entwickeln. Während der Regeneration ist die Expression des Transkriptionsfaktors IDX-1 erhöht (Sharma A. et al., 1999). Jedoch sind die Mechanismen, die die Regeneration von Betazellen steuern, noch weitgehend ungeklärt (Kojima H. et al., 2003).

Pankreas und Leber entwickeln sich während der Embryogenese aus dem Endoderm. Kojima et al. zeigten 2003, dass es möglich ist, Leberzellen in Insulin-produzierende Betazellen „umzuwandeln“ (Kojima H. et al., 2003). Sie führten mit Hilfe eines adenoviralen Expressionssystems die genetische Information der für die Entwicklung von Betazellen wichtigen Gene Neurod1 und Betacellulin in Hepatozyten ein. Die transfizierten Hepatozyten waren an-

schließlich in der Lage, Insulin, Glukagon, Somatostatin und pankreasspezifische Polypeptide innerhalb Inselzell-ähnlicher Zellansammlungen zu synthetisieren. In diabetischen Tieren, die einer solchen Gentherapie unterzogen wurden, normalisierte sich der Blutzuckerspiegel. Zudem wiesen die Autoren in Leberzellisolaten eine Glukose-gesteuerte Insulin-Ausschüttung nach.

## 6.2 Periphere Blutmonozyten und ihr Potential zur Zelldifferenzierung

Auf der Suche nach weiteren Alternativen beschrieb die Kieler Arbeitsgruppe um Professor F. Fändrich die Möglichkeit, humane Insulin-positive Zellen aus *in vitro* modifizierten Monozyten zu differenzieren (Abb. 6.1).



**Abb. 6.1: Die Originalpublikation der Kieler Arbeitsgruppe um Prof. Fändrich in Gastroenterology 2005.** In dieser Arbeit beschrieben sie einen sich aus Monozyten entwickelnden Zelltyp mit „Inselzell<sup>(7)</sup>-ähnlichen“ Eigenschaften.

In den mit dem „Kieler Protokoll“ gezüchteten Zellen wurden Insulin und C-Peptid immunhistochemisch nachgewiesen (Abb. 4.9, 4.10), ebenso der zur Steuerung der Insulin-Ausschüttung wichtige Transporter GLUT-2 (Abb. 4.12). Zudem lassen die in dieser Arbeit präsentierten elektronenmikroskopischen Daten vermuten, dass *in vitro* modifizierte Monozyten Insulin-haltige Granula enthalten. Ebenfalls wurde gezeigt, dass dieses Insulin biologisch aktiv ist. Wurde es diabetischen Mäusen injiziert, so war ein kurzzeitiger Abfall des Blutzuckerspiegels zu messen (Abb. 4.17).

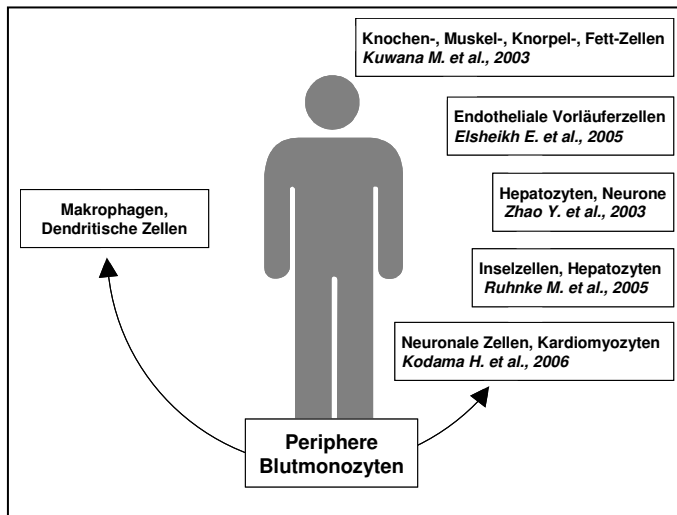
<sup>(7)</sup> Synonym für Langerhans-Inseln.

Weiter zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass *in vitro* modifizierte Monozyten sich eindeutig von frisch isolierten Monozyten unterschieden. Sie waren, im Gegensatz zu den kultivierten Zellen, bis auf CD14 für sämtliche getesteten Marker eindeutig negativ (Abb. 4.7).

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen zudem, dass sich die kultivierten Monozyten zu Makrophagen differenzierten; zumindest der Großteil der Zellen. Die hier beobachteten Zellformen wurden bereits von Zuckerman et al. 1979 beschrieben (Zuckerman S.H. et al., 1979). Charakteristische Formen *in vitro* kultivierter Monozyten wurden auch von weiteren Autoren beschrieben (Zhao Y. et al. 2003; Kuwana M. et al. 2003). Für den hier bezeichneten Zelltyp 2 (s. auch Kapitel 4.3.1) war eine starke Größenzunahme, die Ansammlung zahlreicher perinukleärer Organellen, wie Granula und Vakuolen, charakteristisch. Zudem waren cytoplasmatische Mikro- und Makroausläufer zu beobachten. Hierbei handelt es sich um Merkmale, die Makrophagen in der Dauerkultur zeigen (Zuckerman S.H. et al., 1979) (Abb. 10.6).

Insbesondere die im X-Medium befindlichen Cytokine IL-3 und M-CSF induzierten eine starke Zellproliferation. Im Gegensatz zu Ruhnke et al. wurden in dieser Arbeit keine CD34-positiven Zellen nachgewiesen. Dennoch finden sich in der Literatur weitere Hinweise auf Monozyten mit pluripotentem Potential (Elsheikh E. et al. 2005; Kodama H. et al. 2005; Zhao Y. et al., 2003). Der von Kuwana et al. beschriebene Zelltyp wies eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie auf und differenzierte sich in verschiedene Zellen der mesenchymalen Linie wie Knochen-, Muskel- und Fettzellen aus (Kuwana M. et al., 2003). In Abbildung 6.2 sind zudem weiteren Daten über das Differenzierungspotential peripherer Blutmonozyten zusammengefasst.





**Abb. 6.2. Das Differenzierungspotential peripherer Blutmonozyten *in vitro*.** Blutmonozyten differenzieren sich nicht nur - wie bereits seit längerem bekannt - in Makrophagen und Dendritische Zellen, sondern auch in eine Vielzahl nicht-phagozytierender Zellen. Dieses Differenzierungspotential geht vermutlich von einer kleinen Subpopulation monozytärer Zellen mit pluripotenten Eigenschaften aus.

### 6.3 Insulin-Ausschüttung durch Betazellen und *in vitro* modifizierten Blutmonozyten

Die Glukose-abhängige Insulinausschüttung durch Betazellen ist ein sehr fein regulierter Vorgang. Damit Zellersatzverfahren zur Therapie des Diabetes mellitus geeignet sind, müssen „Surrogat“-Betazellen in der Lage sein, den Blutzuckerspiegel im physiologischen Bereich zu halten. Hierzu haben sie jede Änderung des Blutzuckerspiegels zu registrieren und entsprechend zu reagieren. Nicht nur die Ernährung beeinflusst den Blutzuckerspiegel, auch Änderungen beim Gewicht des Patienten, sein Alter und körperliche Anstrengungen (Halban P.A. et al., 2001).

Der Anstieg des Blutzuckerspiegels sollte eine gesteigerte Transkription, Translation und Sekretion von Insulin nachsichziehen. Die Menge des sezernierten Insulins auf einen Glukosereiz ist keine „Alles-oder-Nichts“-Antwort, sondern richtet sich streng nach der Höhe des Blutzuckerspiegels. Während einer Nahrungskarenz wird Insulin pulsatil aus der Betazelle freigesetzt. Es gibt schnelle Pulse (alle 8-15 Minuten) und langsame Pulse (alle 80-150 Minuten), die den Blutzuckerspiegel im physiologischen Rahmen von 70-80 mg/dl (3,9-4,4 mmol/L) halten. Steigt nun postprandial der Blutzuckerspiegel an, so sezernieren die Betazellen vermehrt Insulin. Sinkt der Blutzucker wieder, wird entsprechend weniger Insulin ausgeschüttet.

Der Glukosetransporter GLUT-2 gehört zusammen mit den Isoformen GLUT-1, -3, -4 und -14, zur einer Familie von Transportproteinen, die den Einstrom von Glukose durch die Zellmembran ins Zellinnere vermitteln (Fukumoto H. et al., 1988) (Kapitel 4.3.5). GLUT-2 wird von den Betazellen des Pankreas, von Hepatozyten, von Zellen der Darmmukosa und den Epithelzellen der Niere exprimiert (Permutt M.A. et al., 1989).

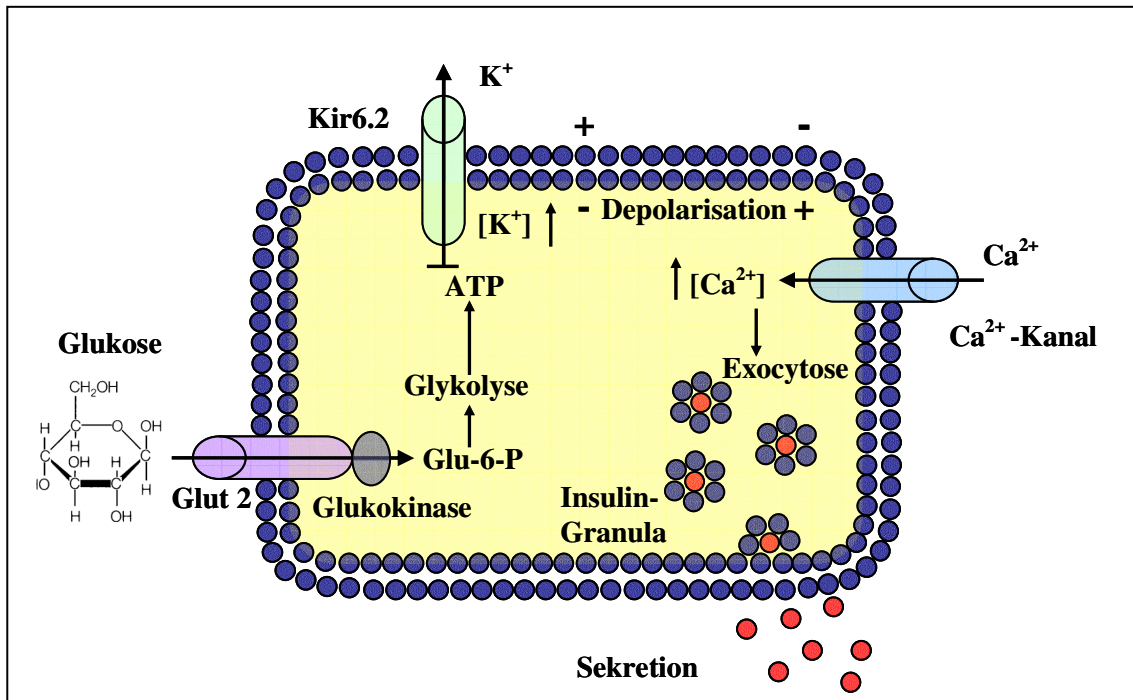
GLUT-2 ist Insulin-unabhängig und besitzt eine geringe Affinität für Glukose, sodass dieser Transporter bei hohen Blutzuckerspiegeln mehr Glukose einschleust. Hierdurch wird die Synthese und Freisetzung von Insulin in den Betazellen aktiviert und der Glukoseabbau in der Leber gehemmt (Scheepers A. et al., 2004). Dies ermöglicht der Betazelle die genaue Überwachung des Blutzuckerspiegels (Newgard C.B. und McGarry J.D., 1995). Änderungen in der intrazellulären ATP-Konzentration regulieren die Insulinfreisetzung (Deeney J.T. et al., 2000). Der  $K_{ATP}$ -Kanal Kir6.2 und ansteigendes Calcium im Zytoplasma sind für die exakte Steuerung der Insulin-Exozytose notwendig (Aguilar-Bryan L. et al., 2001).

In weiterführenden Experimenten ist daher zu untersuchen, ob auch die *in vitro* modifizierten Monozyten über diesen Mechanismus verfügen bzw. ob sie an bestimmten Stellen Defekte aufweisen, die dazu führen, dass die Zellen zu einer gleichwertigen Insulin-Ausschüttung nicht in der Lage sind.

Gegenwärtig wird die Glukose-abhängige Insulin-Ausschüttung von *in vitro* modifizierten Monozyten bestimmt <sup>(8)</sup>. Über die biologischen Sinn dieses Phänomens, dass Monozyten / Makrophagen Insulin synthetisieren, kann zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden (s. hierzu Beantwortung der Fragen).

---

<sup>(8)</sup> Sebastian Heil: Bestimmung der Glukose-abhängigen Insulinausschüttung *in vitro* modifizierter Monozyten. Inaugural-Dissertation der Medizinischen Fakultät der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Fertigstellung 2009.



**Abb. 6.3. Schema der Insulin-Sekretion durch eine Betazelle.** Entscheidend für die Insulin-Ausschüttung ist die Anreicherung von Adenosintriophosphat (ATP), das durch die Oxidation von Glucose bereitgestellt wird. Glucose wird durch den Carrier GLUT-2 in die Betazelle geschleust. Durch das steigende Verhältnis von ATP zu Adenosindiphosphat (ADP) wird der Kaliumkanal Kir6.2 gehemmt. Es kommt zur Depolarisation, wodurch spannungsabhängige Calciumkanäle geöffnet werden (Yang S.N. und Berggren P.O. 2005). Calcium strömt in die Zelle und bewirkt eine schnelle Freisetzung von Calcium, das im endoplasmatischen Retikulum gespeichert wird (Islam M.S. 2002). Dieser schnelle intrazelluläre Calciumanstieg löst die Exozytose der Insulin-Granula aus.

#### 6.4 Immunhistochemische Charakterisierung *in vitro* modifizierter Blutmonozyten

Die immunhistochemischen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ein Teil der kultivierten Monozyten ebenfalls positiv für Glukagon waren. Dies mag erstaunlich erscheinen, doch belegen Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen mit humanen und murinen Stammzellen, dass die hieraus differenzierten Zellen ebenfalls die beiden endokrinen Hormone Insulin und Glukagon gleichzeitig ausschütten (Peck A.B. und Ramiya V., 2004; Seaberg R.M. et al., 2004). Verschiedene Transkriptionsfaktoren wie c-Maf, Pax6, Cdx-2, HNF3 $\beta$  und Nkx2.2, regulieren die Transkription von Proglukagon (Cao X. et al., 2003). In weiterführenden Arbeiten sollten die *in vitro* kultivierten Monozyten auf die Präsenz dieser Faktoren untersucht werden.

Im Y-Medium (Kapitel 3.2) befindet sich der Wachstumsfaktor HGF (Gohda E. et al., 1988), der bei der Entwicklung der Leber eine wichtige Rolle spielt. Knock-out-Mäuse ohne HGF-Gen sterben noch *in utero* an einer Hypoplasie der Leber (Schmidt C. et al., 1995). Zhao et al. zeigten, dass sich Monozyten unter dem Einfluss von HGF in die hepatozytäre Richtung differenzieren können und zudem Albumin exprimieren (Zhao Y. et al., 2003). Ruhnke et al. konnten zeigen, dass die Wachstumsfaktoren HGF und EGF in Monozyten die Expression von Markern induziert, die auch in Hepatozyten vorkommen (Ruhnke M. et al., 2005a). Daher wurden die kultivierten Monozyten immunhistochemisch untersucht, ob sie, wie Hepatozyten, auch Albumin synthetisieren. Wie in Abb. 4.14 dokumentiert, waren die Monozyten zu jedem Untersuchungszeitpunkt positiv für Albumin. Es ist aber nicht auszuschließen, dass der Nachweis von Albumin darauf zurückzuführen ist, dass Albumin, welches in großen Mengen im Serum zu finden ist, den kultivierten Monozyten anhaftet und nicht von ihnen produziert wird. Dies ist in weiteren Arbeiten zu klären.

Ein wichtiger Marker für die Differenzierung in eine Betazelle ist der Transkriptionsfaktor PDX-1. Experimente mit Knock-out Mäusen zeigen, dass ohne Expression von PDX-1 sich der Pankreas während der Embryogenese nicht ausbildet (Jonsson J. et al., 1994). PDX-1 wird vor allem in Betazellen exprimiert und ist ein wesentlicher Aktivator des Insulin-Gens (Melloul D. et al., 2002). Die Kieler Arbeitsgruppe zeigte, dass neben PDX-1 noch weitere wichtige Transkriptionsfaktoren wie Neurogenin 3, Nkx6.1, Beta2/NeuroD und MafA (Soria B. et al., 2001; Jensen J. et al., 2004; Kataoka K. et al., 2002) nachzuweisen waren (Ruhnke M. et al. 2005b). Der immunhistochemische Nachweis von PDX-1 in dieser Arbeit ist jedoch nicht gesichert.

Der Weg vom Gen zum Insulin ist sehr gut erforscht (Steiner D.F. und Oyer P.E. 1967; Bell G.I. et al. 1980; Ullrich A. et al. 1980). Ersatz-Betazellen müssen in der Lage sein, nicht nur Insulin zu produzieren und zu speichern, sondern als Antwort auf eine vermehrte Insulin-Ausschüttung eine sofortige Synthese von Proinsulin auszulösen (Goodge K.A. und Hutton J.C., 2000). Die Glukose-induzierte Hochregulierung der Proinsulin-Biosynthese auf Ebene der

Translation ist wahrscheinlich spezifisch für die Betazelle, da sie in dieser Komplexität in Surrogat-Zellen bisher nicht beobachtet wurde (Wicksteed B. et al. 2001).

Zum jetzigen Zeitpunkt ist nicht geklärt, ob die für eine Übertragung notwendigen Mengen an Insulin-produzierenden Zellen sich überhaupt aus Blutmonozyten gewinnen lassen. Über die Dauer der Insulinproduktion kann zum jetzigen Zeitpunkt ebenfalls keine Aussage gemacht werden – doch scheint der Anteil Insulin-positiver Zellen abzunehmen. Der Grund hierfür ist vermutlich, dass sich auch mit dem „Kieler Protokoll“ Monozyten zu Makrophagen differenzieren.

Experimentell ist gesichert, dass die in Kultur modifizierten Monozyten biologisch aktives Insulin enthalten, das den Blutzuckerspiegel diabetischer Tiere verringert. Inwieweit diese Zellen auch zur Glukose-abhängigen Insulin-Ausschüttung in der Lage sind, muss in weiteren Experimenten gezeigt werden. Von diesen Daten hängt sicherlich ab, ob *in vitro* modifizierte Monozyten überhaupt als Therapeutikum geeignet sind. Doch ohne Frage erweitern diese Untersuchungen unser Wissen über Monozyten / Makrophagen.

## 7 Ausblick

---

In dieser Arbeit wurden mit dem „Kieler Protokoll“ (Ruknke M. et al., 2005b) *in vitro* modifizierte Monozyten kultiviert, die Insulin positiv waren. Auch gelang der Nachweis, dass das von diesen Zellen produzierte Insulin biologisch aktiv war.

Eine wichtige Beobachtung dieser Arbeit ist, dass kultivierte Monozyten auch dann positiv für Insulin sind, wenn sie nicht mit den von den Autoren des „Kieler Protokolls“ angegebenen Cytokinen kultiviert wurden (Abb. 4.2). Wir vermuten, dass die Adhärenz ein wesentlicher Auslöser für die Expression unterschiedlicher Gene darstellt. Der Zusammenhang zwischen Adhärenz und Genexpression sollte deshalb in weiteren Arbeiten untersucht werden.

Auch die äußerst wichtige Frage, ob die *in vitro* modifizierten Monozyten Glukose-abhängig Insulin ausschütten, ist unbedingt zu klären. Die Experimente hierzu entscheiden darüber, ob die Zellen tatsächlich in der Lage sind, den Blutzuckerspiegel diabetischer Tiere systemisch zu regulieren. Es könnte auch sein, dass Monozyten die Fähigkeit, Insulin zu produzieren, ausschließlich lokal nutzen, um z.B. die Regeneration geschädigter Gewebe zu fördern.

## 8 Zusammenfassung

---

Insulin-produzierende Zellen als Ersatz für die beim Diabetes mellitus Typ 1 zerstörten Betazellen stellen einen hochattraktiven Forschungsansatz dar. Ziel dieser Arbeit war, Insulin-positive Zellen aus *in vitro* modifizierten Blutmonozyten zu gewinnen. Blutmonozyten sind nicht nur, wie bereits seit längerem bekannt, in der Lage, sich in Makrophagen und dendritischen Zellen zu differenzieren, sondern auch in eine Vielzahl nicht-phagozytierender Zellen, wie z.B. Insulin-produzierender Zellen.

Für die optimale Zelltherapie ist zu fordern, dass die gewünschten Zellen *in vivo* nicht nur ihre Funktion beibehalten, sondern dass von diesen Zellen auch kein immunologisches Risiko für den Patienten ausgeht. Eine dauerhafte Immunsuppression, wie sie für die Vollorgantransplantation notwendig ist, ist für Zelltransplantate nicht angebracht. Hier besteht Übereinkunft, dass Immunsuppressiva, wenn überhaupt, nur kurzfristig einzusetzen sind. Blutmonozyten lassen sich einfach gewinnen und stünden somit als autologer Zellersatz für eine mögliche Zelltherapie zur Verfügung.

Ein wesentlicher Aspekt dieser Arbeit war, die *in vitro* Differenzierung von Blutmonozyten zu charakterisieren. Dabei sollte die Expression von Insulin, Glukagon und dem Glukosetransporter Glut-2 nachgewiesen werden. Auch morphologische Veränderungen während der Kultur sollten beobachtet werden.

Die kultivierten Monozyten entwickelten sich mit zunehmender Kulturdauer eindeutig zu Makrophagen. Dabei waren zwei verschiedene Zellmorphologien zu unterscheiden: Der erste Zelltyp (Typ 1) war oval mit Ausläufern. Der zweite Zelltyp (Typ 2) war sehr groß, teilweise mit einem Durchmesser von über 500 µm, häufig von ovaler Form und polynukleär. Dieser Zelltyp wies zudem häufig einen breiten, um das Kerngebiet gruppierten Saum auf. Mit zunehmender Kulturdauer dominierte dieser Zelltyp die Kultur. Der Großteil der Typ 1-Zellen blieb CD14 positiv. Gab es CD14-negative Zellen in der Kultur, so gehörten sie mit großer Wahrscheinlichkeit zu den Typ 2-Zellen.

Nur in den *in vitro* modifizierten, nicht aber in den frisch isolierten Monozyten waren Insulin, C-Peptid, Glukagon und GLUT-2 immunhistochemisch nachzuweisen. Mit zunehmender Kulturdauer dominierten stark adhärenente Makrophagen die Kultur.

Das aus ca.  $5 \times 10^6$  Monozyten isolierte Insulin senkte den Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse innerhalb einer Stunde nach Injektion um  $66,1 \pm 12,8$  Prozent (n=5). Zum Vergleich: 170 pg Humaninsulin senkten den Blutzuckerspiegel um  $84,2 \pm 8,4$  Prozent (n=4). Insulin-negative Monozyten beeinflussten nicht den Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse. Zudem lassen erste elektronenmikroskopische Aufnahmen von *in vitro* modifizierten Monozyten Insulin-haltige Vesikel erkennen.

Zum jetzigen Zeitpunkt ist gesichert, dass *in vitro* modifizierte Monozyten über biologisch aktives Insulin verfügen, das den Blutzuckerspiegel diabetischer Tiere senkt. Der Nachweis von C-Peptid deutet zudem darauf hin, dass es sich hierbei um *de novo* Insulin handelt. Dies bedeutet, dass das Insulin-Gen in den *in vitro* modifizierten Monozyten aktiv ist und sie Insulin mRNA exprimieren, die anschließend in Insulin translatiert wird. Der elektronenmikroskopische Nachweis Insulin-haltiger Granula deutet außerdem darauf hin, dass diese Zellen Insulin speichern können. Inwieweit sie jedoch auch zur Glukose-abhängigen Insulin-Ausschüttung in der Lage sind, ist in weiteren Experimenten zu überprüfen.



## 9 Literaturverzeichnis

---

- Abraham E.J., Leech C.A., Lin J.C., Zulewski H. and Habener J.F. (2002) Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 differentiation of human pancreatic islet-derived progenitor cells into insulin-producing cells. *Endocrinology* **143**, 3152-3161.
- Aguilar-Bryan L., Bryan J. and Nakazaki M. (2001) Of mice and men: K(ATP) channels and insulin secretion. *Recent Prog Horm Res* **56**, 47-68.
- Ahlgren U., Jonsson J., Jonsson L., Simu K. and Edlund H. (1998) beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipf1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev* **12**, 1763-1768.
- Ahmed A.M. (2002) History of diabetes mellitus. *Saudi Med J* **23**, 373-378.
- Assady S., Maor G., Amit M., Itskovitz-Eldor J., Skorecki K.L. and Tzukerman M. (2001) Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* **50**, 1691-1697.
- Bell G.I., Pictet R.L., Rutter W.J., Cordell B., Tischer E. and Goodman H.M. (1980) Sequence of the human insulin gene. *Nature* **284**, 26-32.
- Blyszczuk P., Czyz J., Kania G., Wagner M., Roll U., St-Onge L. and Wobus A.M. (2003) Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 998-1003.
- Bonner-Weir S., Taneja M., Weir G.C., Tatarkiewicz K., Song K. H., Sharma A. and O'Neil J.J. (2000) In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7999-8004.
- Cao X., Flock G., Choi C., Irwin D.M. and Drucker D.J. (2003) Aberrant regulation of human intestinal proglucagon gene expression in the NCI-H716 cell line. *Endocrinology* **144**, 2025-2033.
- Deeney J.T., Prentki M. and Corkey B.E. (2000) Metabolic control of beta-cell function. *Semin Cell Dev Biol* **11**, 267-275.
- Dor Y., Brown J., Martinez O. I. and Melton D. A. (2004) Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* **429**, 41-46
- Elsheikh E., Uzunel M., He Z., Holgersson J., Nowak G. and Sumitran-Holgersson S. (2005) Only a specific subset of human peripheral-blood monocytes has endothelial-like functional capacity. *Blood* **106**, 2347-2355.
- Falqui L., Martinenghi S., Severini G.M., Corbella P., Taglietti M.V., Arcelloni C., Sarugeri E., Monti L.D., Paroni R., Dozio N., Pozza G., Bordignon C. (1999)

- Reversal of diabetes in mice by implantation of human fibroblasts genetically engineered to release mature human insulin. *Human Gene Therapy* **10**, 1753-1762.
- Fukumoto H., Seino S., Imura H., Seino Y., Eddy R. L., Fukushima Y., Byers M.G., Shows T.B. and Bell G.I. (1988) Sequence, tissue distribution, and chromosomal localization of mRNA encoding a human glucose transporter-like protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5434-5438.
- Gao R., Ustinov J., Pulkkinen M. A., Lundin K., Korsgren O. and Otonkoski T. (2003) Characterization of endocrine progenitor cells and critical factors for their differentiation in human adult pancreatic cell culture. *Diabetes* **52**, 2007-2015.
- Gohda E., Tsubouchi H., Nakayama H., Hirono S., Sakiyama O., Takahashi K., Miyazaki H., Hashimoto S. and Daikuhara Y. (1988) Purification and partial characterization of hepatocyte growth factor from plasma of a patient with fulminant hepatic failure. *J Clin Invest* **81**, 414-419.
- Goode K.A. and Hutton J.C. (2000) Translational regulation of proinsulin biosynthesis and proinsulin conversion in the pancreatic beta-cell. *Semin Cell Dev Biol* **11**, 235-242.
- Hao E., Tyrberg B., Itkin-Ansari P., Lakey J.R., Geron I., Monosov E.Z., Barcova M., Mercola M., Levine F. (2006) Beta-cell differentiation from nonendocrine epithelial cells of the adult human pancreas. *Nat Med* **12**, 310-316.
- Halban P.A., Kahn S.E., Lernmark A. and Rhodes C.J. (2001) Gene and cell-replacement therapy in the treatment of type 1 diabetes: how high must the standards be set? *Diabetes* **50**, 2181-2191.
- Hess D., Li L., Martin M., Sakano S., Hill D., Strutt B., Thyssen S., Gray D.A. and Bhatia M. (2003) Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol* **21**, 763-770.
- Home P.D. and Alberti K.G. (1982) The new insulins. Their characteristics and clinical indications. *Drugs* **24**, 401-413.
- Hori Y., Rulifson I.C., Tsai B.C., Heit J.J., Cahoy J.D. and Kim S.K. (2002) Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16105-16110.
- Ianus A., Holz G.G., Theise N.D. and Hussain M.A. (2003) In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* **111**, 843-850.
- Islam M.S. (2002) The ryanodine receptor calcium channel of beta-cells: molecular regulation and physiological significance. *Diabetes* **51**, 1299-1309.

- Jensen J. (2004) Gene regulatory factors in pancreatic development. *Dev Dyn* **229**, 176-200.
- Jonsson J., Carlsson L., Edlund T. and Edlund H. (1994) Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* **371**, 606-609.
- Kahan B.W., Jacobson L. M., Hullett D.A., Ochoada J.M., Oberley T.D., Lang K.M. and Odorico J.S. (2003) Pancreatic precursors and differentiated islet cell types from murine embryonic stem cells: an in vitro model to study islet differentiation. *Diabetes* **52**, 2016-2024.
- Kataoka K., Han S.I., Shioda S., Hirai M., Nishizawa M. and Handa H. (2002) MafA is a glucose-regulated and pancreatic beta-cell-specific transcriptional activator for the insulin gene. *J Biol Chem* **277**, 49903-49910.
- King K.M. and Rubin G. (2003) A history of diabetes: from antiquity to discovering insulin. *Br J Nurs* **12**, 1091-1095.
- Kodama H., Inoue T., Watanabe R., Yasuoka H., Kawakami Y., Ogawa S., Ikeda Y., Mikoshiba K. and Kuwana M. (2005) Cardiomyogenic potential of mesenchymal progenitors derived from human circulating CD14+ monocytes. *Stem Cells Dev* **14**, 676-686.
- Kodama H., Inoue T., Watanabe R., Yasutomi D., Kawakami Y., Ogawa S., Mikoshiba K., Ikeda Y. and Kuwana M. (2006) Neurogenic potential of progenitors derived from human circulating CD14+ monocytes. *Immunol Cell Biol* **84**, 209-217.
- Kojima H., Fujimiya M., Matsumura K., Younan P., Imaeda H., Maeda M., Chan L. (2003) NeuroD-betacellulin gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice. *Nat Med* **9**, 596-603.
- Kuwana M., Okazaki Y., Kodama H., Izumi K., Yasuoka H., Ogawa Y., Kawakami Y. and Ikeda Y. (2003) Human circulating CD14+ monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation. *J Leukoc Biol* **74**, 833-845.
- Latif Z.A., Noel J. and Alejandro R. (1988) A simple method of staining fresh and cultured islets. *Transplantation* **45**, 827-830.
- Lee D.D., Grossman E., Chong A.S. (2008) Cellular therapies for type 1 diabetes. *Horm Metab Res* **40**, 147-154.
- Lumelsky N., Blondel O., Laeng P., Velasco I., Ravin R. and McKay R. (2001) Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* **292**, 1389-1394.
- Melloul D., Marshak S. and Cerasi E. (2002) Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia* **45**, 309-326.

- Moritoh Y., Yamato E., Yasui Y., Miyazaki S. and Miyazaki J. (2003) Analysis of insulin-producing cells during in vitro differentiation from feeder-free embryonic stem cells. *Diabetes* **52**, 1163-1168.
- Newgard C.B. and McGarry J.D. (1995) Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction. *Annu Rev Biochem* **64**, 689-719.
- Otto C., Moskalenko V., Ulrichs K. Transplantationsimmunologische Forschung im Kleintier: Perspektiven für die klinische Praxis. In: *Chirurgische Forschung* (Hrg. M. G. Krukemeyer, H. U. Spiegel,) Thieme Verlag 2005: 349-367 (ISBN 978-3-13-133661-3).
- Pajunen P., Koukkunen H., Ketonen M., Jerkkola T., Immonen-Raiha P., Karja-Koskenkari P., Kuulasmaa K., Palomaki P., Mustonen J., Lehtonen A., Arstila M., Vuorenmaa T., Lehto S., Miettinen H., Torppa J., Tuomilehto J., Kesaniemi Y. A., Pyorala K. and Salomaa V. (2005) Myocardial infarction in diabetic and non-diabetic persons with and without prior myocardial infarction: the FINAMI Study. *Diabetologia* **48**, 2519-2524.
- Peck A.B. and Ramiya V. (2004) *In vitro*-generation of surrogate islets from adult stem cells. *Transpl Immunol* **12**, 259-272.
- Permutt M.A., Koranyi L., Keller K., Lacy P.E., Scharp D.W. and Mueckler M. (1989) Cloning and functional expression of a human pancreatic islet glucose-transporter cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 8688-8692.
- Rajagopal J., Anderson W.J., Kume S., Martinez O.I. and Melton D.A. (2003) Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake. *Science* **299**, 363.
- Ramiya V.K., Maraist M., Arfors K.E., Schatz D.A., Peck A.B. and Cornelius J.G. (2000) Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med* **6**, 278-282.
- Roche E., Reig J.A., Campos A., Paredes B., Isaac J.R., Lim S., Calne R.Y., Soria B. (2005) Insulin-secreting cells derived from stem cells: clinical perspectives, hypes and hopes. *Transpl Immunol* **15**, 113-129.
- Ruhnke M., Nussler A.K., Ungefroren H., Hengstler J.G., Kremer B., Hoeckh W., Gottwald T., Heeckt P. and Fandrich F. (2005a) Human monocyte-derived neohepatocytes: a promising alternative to primary human hepatocytes for autologous cell therapy. *Transplantation* **79**, 1097-1103.
- Ruhnke M., Ungefroren H., Nussler A., Martin F., Brulport M., Schormann W., Hengstler J. G., Klapper W., Ulrichs K., Hutchinson J.A., Soria B., Parwaresch R. M., Heeckt P., Kremer B. and Fandrich F. (2005b) Differentiation of in vitro-

- modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells. *Gastroenterology* **128**, 1774-1786.
- Santana A., Enseñat-Waser R., Arribas M.I., Reig J.A., Roche E. Insulin-producing cells derived from stem cells: recent progress and future directions. *J Cell Mol Med* 2006; 10(4): 866-883.
- Scheepers A., Joost H. G. and Schurmann A. (2004) The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **28**, 364-371.
- Schmidt C., Bladt F., Goedecke S., Brinkmann V., Zschesche W., Sharpe M., Gherardi E. and Birchmeier C. (1995) Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* **373**, 699-702.
- Seaberg R.M., Smukler S.R., Kieffer T.J., Enikolopov G., Asghar Z., Wheeler M. B., Korbitt G. and van der Kooy D. (2004) Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nat Biotechnol* **22**, 1115-1124.
- Shapiro A.M., Lakey J.R., Ryan E. A., Korbitt G.S., Toth E., Warnock G.L., Kneteman N. M. and Rajotte R.V. (2000) Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* **343**, 230-238.
- Sharma A., Zangen D.H., Reitz P., Taneja M., Lissauer M.E., Miller C.P., Weir G.C., Habener J.F., Bonner-Weir S. (1999) The homeodomain protein IDX-1 increases after an early burst of proliferation during pancreatic regeneration. *Diabetes* **48**, 507-513.
- Shiroi A., Yoshikawa M., Yokota H., Fukui H., Ishizaka S., Tatsumi K. and Takahashi Y. (2002) Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating dithizone. *Stem Cells* **20**, 284-292.
- Soria B. (2001) In-vitro differentiation of pancreatic beta-cells. *Differentiation* **68**, 205-219.
- Soria B., Roche E., Berna G., Leon-Quinto T., Reig J.A. and Martin F. (2000) Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* **49**, 157-162.
- Steiner D.F. and Oyer P.E. (1967) The Biosynthesis Of Insulin And A Probable Precursor Of Insulin By A Human Islet Cell Adenoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **57**, 473-480.

- Stoffel M., Stein R., Wright C.V., Espinosa R., 3rd, Le Beau M. M. and Bell G. I. (1995) Localization of human homeodomain transcription factor insulin promoter factor 1 (IPF1) to chromosome band 13q12.1. *Genomics* **28**, 125-126.
- Sutherland D.R., Watt S.M., Dowden G., Karhi K., Baker M.A., Greaves M.F. and Smart J.E. (1988) Structural and partial amino acid sequence analysis of the human hemopoietic progenitor cell antigen CD34. *Leukemia* **2**, 793-803.
- Suzuki A., Nakauchi H. and Taniguchi H. (2003) Glucagon-like peptide 1 (1-37) converts intestinal epithelial cells into insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5034-5039.
- Switzer W.M., Michler R.E., Shanmugam V., Matthews A., Hussain A.I., Wright A., Sandstrom P., Chapman L.E., Weber C., Safley S., Denny R.R., Navarro A., Evans V., Norin A.J., Kwiatkowski P., Heneine W. (2001) Lack of cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus infection to nonhuman primate recipients of porcine cells, tissues, or organs. *Transplantation* **71**, 959-965.
- Ullrich A., Dull T. J., Gray A., Brosius J. and Sures I. (1980) Genetic variation in the human insulin gene. *Science* **209**, 612-615.
- Waeber G., Thompson N., Nicod P. and Bonny C. (1996) Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IPF-1/STF-1/IDX-1 homeobox factor. *Mol Endocrinol* **10**, 1327-1334.
- Wicksteed B., Herbert T.P., Alarcon C., Lingohr M.K., Moss L.G. and Rhodes C.J. (2001) Cooperativity between the preproinsulin mRNA untranslated regions is necessary for glucose-stimulated translation. *J Biol Chem* **276**, 22553-22558.
- Wilmot I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H. (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **385**, 810-813.
- Writing Team for the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. (2003) Sustained Effect of Intensive Treatment of Type 1 Diabetes Mellitus on Development and Progression of Diabetic Nephropathy: The Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) Study *JAMA* **290**, 2159-2167.
- Yang L., Li S., Hatch H., Ahrens K., Cornelius J.G., Petersen B.E. and Peck A.B. (2002) In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8078-8083.
- Yang S.N. and Berggren P.O. (2005) Beta-cell CaV channel regulation in physiology and pathophysiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**, E16-28.

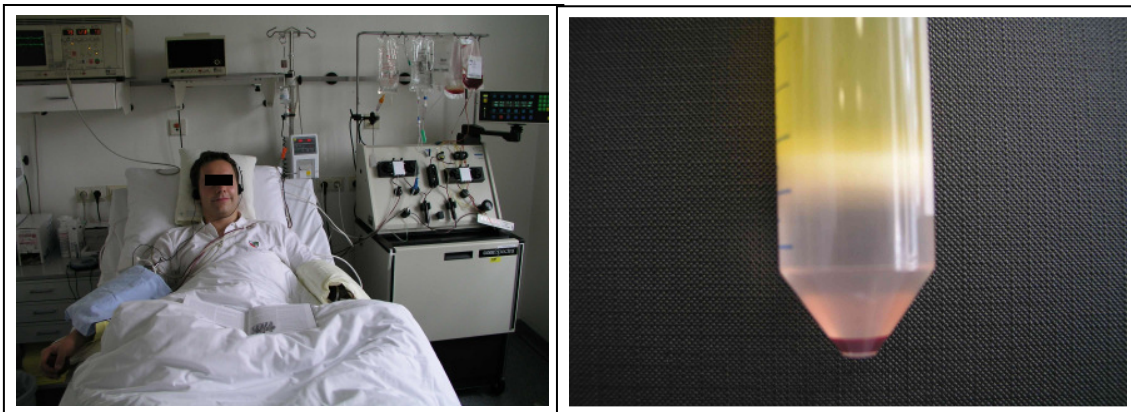
- Zhao Y., Glesne D. and Huberman E. (2003) A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2426-2431.
- Zimmet P., Alberti K.G. and Shaw J. (2001) Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* **414**, 782-787.
- Zuckerman S.H., Ackerman S.K., Douglas S.D. (1979) Long-term human peripheral blood monocyte cultures: establishment, metabolism and morphology of primary human monocyte-macrophage cell cultures. *Immunology* **38**, 401-11.
- Zulewski H., Abraham E.J., Gerlach M.J., Daniel P.B., Moritz W., Muller B., Vallejo M., Thomas M.K. and Habener J.F. (2001) Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* **50**, 521-533.

## 10 Appendix

---

### Zu 3.1 Leukapherese

Die Gewinnung der Leukozyten geschieht mittels der Technik der Leukapherese. Hierbei wird dem Spender in beide Unterarme eine Infusionsnadel in ein Blutgefäß eingeführt. Aus dem einen Arm fließt das Blut in eine Zentrifuge und wird im Zentrifugalfeld in seine Bestandteile aufgetrennt. Durch automatisches Verschieben einer Nadel in die Schicht der Leukozyten, auch buffy-coat genannt, werden diese abgesaugt und in einem separaten Beutel gesammelt. Der Rest des Blutes wird über die andere Nadel dem Körper wieder zugeführt. Damit das Blut in der Maschine nicht gerinnt, wird ein gerinnungshemmendes Mittel verabreicht. Die Leukapherese dauert ca. vier Stunden.



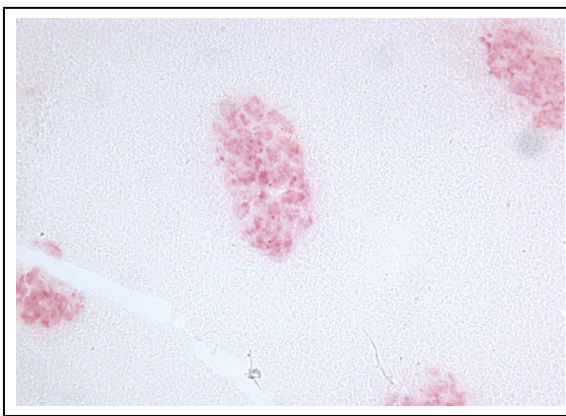
**Abb. 10.1. Gewinnung (links) und Aufreinigung (rechts) von Leukapheresen.** In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. A. Opitz aus der Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Würzburg erfolgt die Zellspende mit einer Zentrifuge (linkes Bild). Eine Sitzung dauert ca. 4 Stunden. Das rechte Bild zeigt das Ergebnis der Leukozytenaufreinigung mit Ficoll. Zwischen der klaren Ficolllösung und dem Plasma (gelb) haben sich die Leukozyten angereichert.

### Zu 4.1 Immunhistologische Färbungen am humanen Pankreas

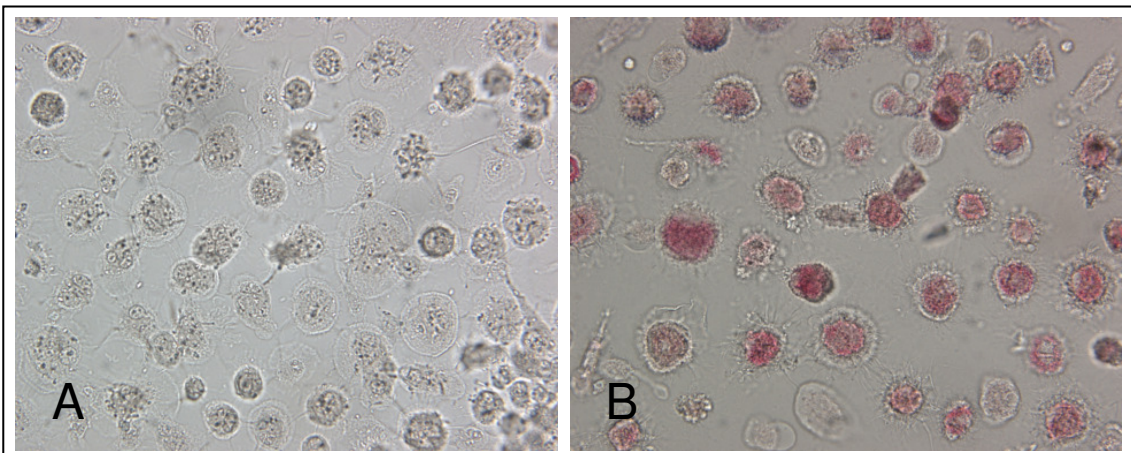
Dithizon ist ein Komplexbildner, der u. a. zweiwertige Zinkionen bindet. Mit diesem Farbstoff wird das in den Betazellen gespeicherte Insulin indirekt nachgewiesen, da sich je sechs Insulin-Moleküle um ein Zinkion lagern. So erscheinen ausschließlich die Betazellen leuchtend rot unter dem Durchlicht-



mikroskop (Abb. 10.1). Die Dithizonlösung (10 mg Farbstoff gelöst in 1 ml 99,5-prozentiges Dimethylsulfoxid (beides Sigma-Aldrich Chemie GmbH) wird mit 9 ml HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*; Cell Concepts) aufgefüllt und steril filtriert (Vorschrift aus: Latif Z.A. et al., 1988). Von dieser frisch angesetzten Lösung wurden 100 µl für jeweils 100 µl Zellsuspension eingesetzt und im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Färbung adhärenter Zellen einer 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche wurden 5 ml Dithizonlösung verwendet. Nach 1 und nach 24 Stunden wurden die Monozyten lichtmikroskopisch begutachtet und das Ergebnis photographisch dokumentiert.



**Abb. 10.2.** Gefrierschnitt eines Ratten-Pankreas. Nur Zellen, die Zink enthalten, erscheinen in dem Dithizon-gefärbten Präparat leuchtend rot. So lassen sich die Langerhans-Inseln sehr gut vom exokrinen Gewebe unterscheiden.



**Abb. 10.3.** Mit Dithizon gefärbte Monozyten vom Kulturtag 14. Nach einstündiger (A) und 24-stündiger (B) Inkubation. Im Gegensatz zu Inselzellen (Abb. 10.1) war bei den *in vitro* modifizierten Monozyten eine deutliche Rotfärbung erst nach einer 24-stündigen Inkubation zu erkennen.

### **Zellernte und Cytospins (zu Abb. 10.3)**

Ein kleiner Teil der Leukozyten wurde in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen kultiviert (4x10<sup>8</sup> Zellen pro Flasche). Nach 14 Tagen in Kultur wurden die adhärennten Monzyten mit einem Zellschaber (Nunc; Wiesbaden), der bei gleichmäßigem Druck vorsichtig über die Kunststoffoberfläche hin und her bewegt wurde, geerntet<sup>(9)</sup>. Hierzu wurde das Kulturmedium gegen PBS ausgetauscht. Nach der Ernte wurden die Zellen in ein 50 ml Zentrifugen-Röhrchen (Greiner) überführt. Um die Zellausbeute zu optimieren, wurden erneut 10 ml PBS (pH 7,2) zu den verbliebenen Zellen gegeben und die Prozedur wiederholt. Die abgelösten Zellen wurden bei 402 xg für 6 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellsediment erneut mit PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in einer Zählkammer nach Neubauer gezählt und mit Hilfe einer Cytospin-Zentrifuge (Thermo Shandon; Pittsburgh) auf Objektträger zentrifugiert. Dazu wurden die Zellen mit PBS auf 2x10<sup>5</sup> Zellen/ml eingestellt und pro Objektträger 100 µl der Zellsuspension eingesetzt. Die Zellen wurden für 1 Minute bei 34 xg auf eine 16 mm<sup>2</sup> große Fläche zentrifugiert. Die Cytospin-Präparate wurden entweder sofort gefärbt oder bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

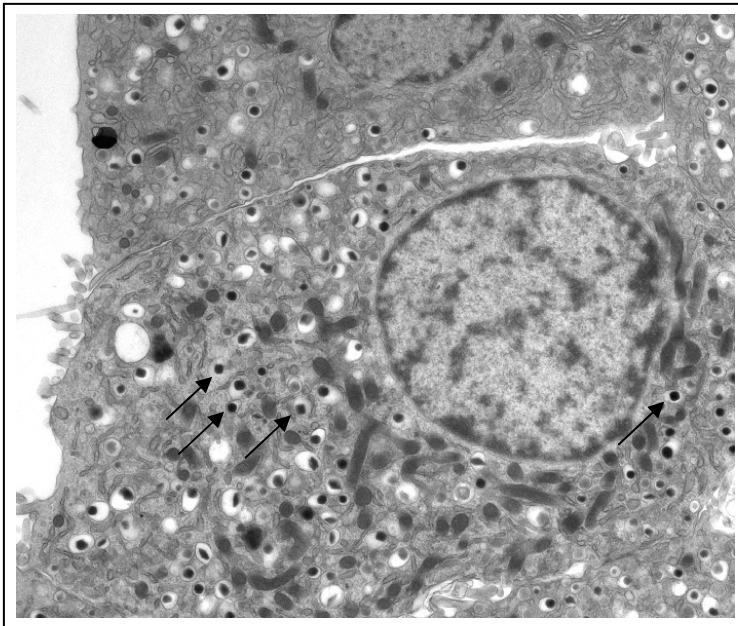
**Färbung mit Trypanblau.** Hierzu wurden je 100 µl Zellsuspension mit 100 µl einer gebrauchsfertigen Trypanblaulösung (0,4%; Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen) versetzt. Unter dem Mikroskop erscheinen vitale Zellen ungefärbt, tote Zellen hingegen blau. Diese Färbung wurde zur Bestimmung von Vitalität und Zellzahl verwendet.

---

<sup>(9)</sup> Diese Methode wurde in einer späteren Arbeiten optimiert.

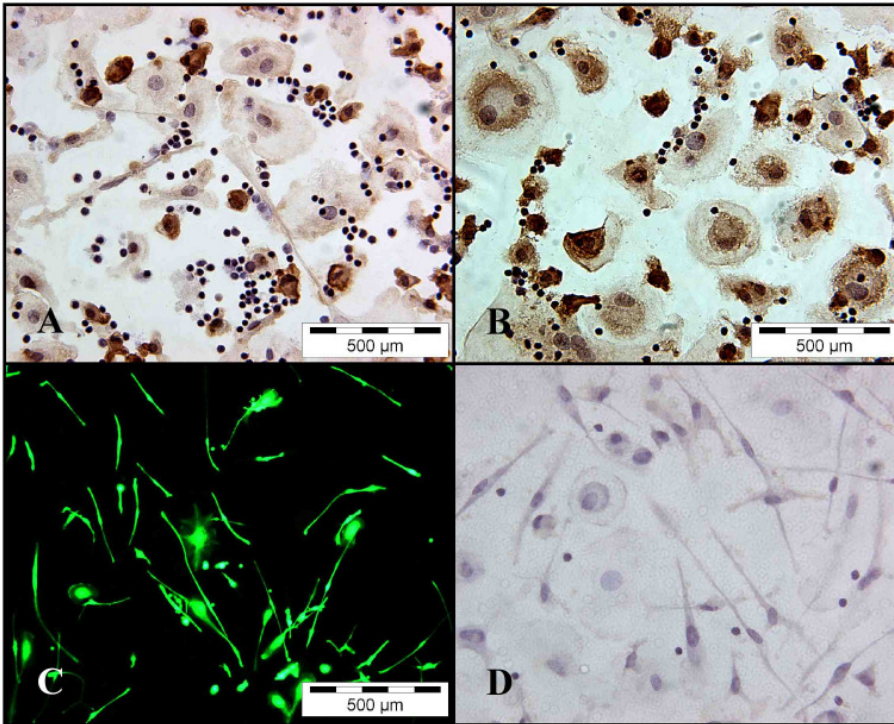
#### 4.7.1 Humane Betazelle

Abbildung 10.4 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme einer humanen Betazelle mit Insulin-positiven Granula. Sie variieren im Durchmesser zwischen 200 und 300 nm und können mehr als 250.000 Insulin-Moleküle enthalten, die beim Anstieg des Blutzuckerspiegels durch Exozytose in das Blut abgegeben werden (siehe auch Abb. 6.3). In diesen Granula gruppieren sich jeweils sechs Insulin-Moleküle um ein zentrales Zinkion. Die Betazellen liegen verstreut im exokrinen Drüsengewebe des Pankreas in den sog. Langerhans-Inseln; ca. 80 Prozent der Zellen sind Betazellen. Daneben kommen noch drei weitere Zellarten vor, die jeweils unterschiedliche Hormone sezernieren: Alphazellen (Glukagon), Deltazellen (Somatostatin) und PP-Zellen (Pankreatisches Polypeptid).

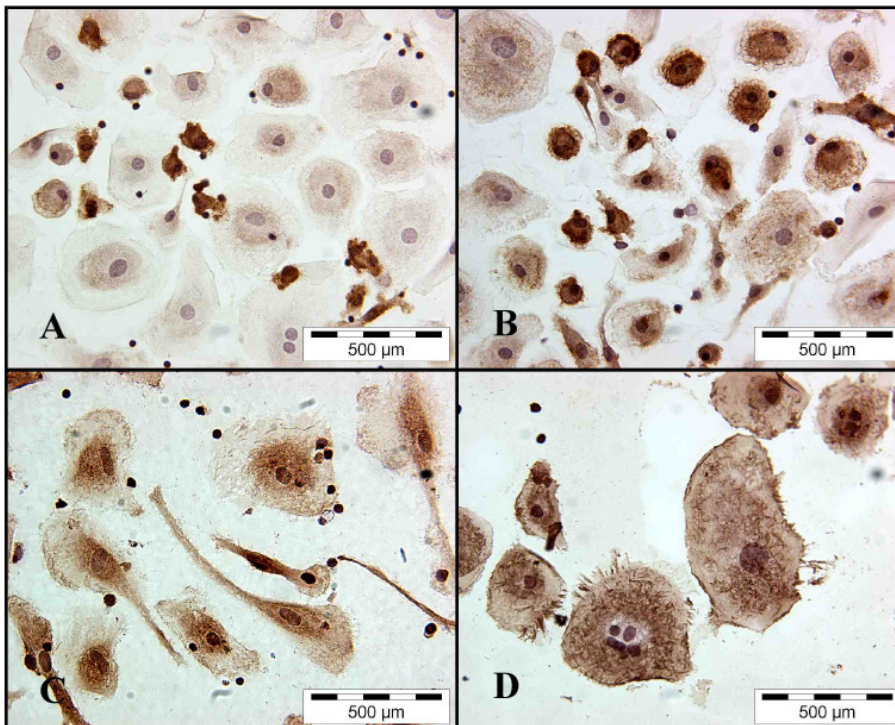


**Abb. 10.4.** Insulin sezernierende humane Betazelle aus einer Langerhans Insel des Pankreas mit Insulin-Granula (schwarze Pfeile).  
Quelle: [www.lifesci.sussex.ac.uk](http://www.lifesci.sussex.ac.uk)

#### Zu 4. Vergrößerung einzelner Abbildungen



**Abb. 10.5.** Vergrößerung der Abbildungen 4.4 K (A), 4.4 N (B); 4.5 B (C) und 4.6 J (D). Deutlich zu erkennen ist, dass „Makrophagen“ die Kultur dominieren. Nur die kleineren Zellen in der Kultur scheinen Insulin-positiv zu sein (A).



**Abb. 10.6.** Vergrößerung der Abbildungen 4.4 D (A), 4.9 D (B), 4.11 E (C) und 4.14 E (D). Schön zu erkennen ist die Morphologie der Makrophagen.



## Danksagung

---

Frau Prof. Dr. K. Ulrichs und Herrn Priv.-Doz. Dr. C. Otto, den Betreuern meiner Arbeit, möchte ich für das mir entgegengebrachte Vertrauen, aber auch für ihre motivierende Unterstützung - sowohl intellektuell als auch praktisch - danken. Dies hat ohne Zweifel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich sehr bei Herrn Prof. Dr. med. Prof. h.c. A. Thiede, Direktor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik I der Universität Würzburg.

Für die großzügige finanzielle Unterstützung der Arbeit und das mir entgegengebrachte Vertrauen möchte ich der Firma Fresenius Biotech GmbH danken.

Allen Mitarbeitern der Experimentellen Transplantations-Immunologie, Frau I. Chodnevskaja, Frau S. Eber, Frau M. Koospal, Frau S. Gahn, Frau B. Schneiker und Frau L. Stevenson-Knebel, danke ich für Ihre freundliche Unterstützung und die angenehme Atmosphäre vor Ort. Frau M. Schneider danke ich zudem für die tierexperimentellen Daten.

Ein großer Dank geht an Herrn Dr. med. A. Opitz von der Abteilung für Transfusionsmedizin sowie allen Mitarbeitern des Blutspende-Zentrums für die stets reibungslose Durchführung der Leukapheresen. Es hat immer Spaß gemacht mit ihnen zusammenzuarbeiten.

Mein besonderer Dank gilt allen Spendern, die die ca. 4 Stunden dauernde Leukapherese tapfer über sich haben ergehen lassen und die diese Arbeit so erst ermöglichten. Ferner möchte ich mich bei Kay-Renke Schmidt bedanken, welcher meine Arbeit mit großem Engagement weiterführt und sicherlich zu neuen Erkenntnissen gelangt.

## Lebenslauf

### Andreas S. Herbst

Geboren am 19. Januar 1980 in München

#### Schule und Wehrdienst

1986 - 1990  
1990 - 2000  
1997 - 1998  
07/00 – 07/01

Dom Pedro Grundschule in München  
Städtisches Luisengymnasium in München  
Union High School in Grand Rapids, Michigan, USA  
Wehrdienst als Sanitäter (1. Gebirgsdivision der Bundeswehr)

#### Studium

10/01 – 09/03  
10/03 – 05/08

Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians Universität zu Würzburg  
Vorklinischer Abschnitt  
Ärztliche Vorprüfung (Physikum) im Sommer 2003  
Klinischer Abschnitt, Staatsexamen im Frühling 2008

#### Famulaturen

02/04 - 03/04  
07/04 - 09/04  
08/05 - 08/05  
09/05 - 09/05  
02/06 - 04/06  
08/06 – 10/06

Anästhesiologische Praxis in München  
Laborfamulatur in Würzburg im Rahmen der Promotion  
Neurochirurgie im Kantonsspital Aarau (Schweiz)  
Neurologie im Kantonsspital Aarau (Schweiz)  
Neurochirurgie im Kantonsspital St. Gallen (Schweiz)  
Neurochirurgie im Kantonsspital St. Gallen (Schweiz)

#### Praktisches Jahr

1. Tertial  
2. Tertial  
3. Tertial

Chirurgie am Leopoldina Krankenhaus in Schweinfurt  
Neurochirurgie am Karolinska Sjukhuset in Stockholm  
Innere Medizin am Leopoldina Krankenhaus in Schweinfurt

#### Fortbildungen

21.-23.10.04  
11.-12.03.05  
05.05.06  
03.-04.10.06

14. Jahrestagung der deutschen Transplantationsgesellschaft  
Tagung des AK „Transplantationsimmunologie“ der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (GfI)  
Kurs „Intraoperativer Ultraschall in der Neurochirurgie“  
Jahrestagung der Schweizerischen Gesellschaft für Neurochirurgie in Montreux  
17. Jahrestagung der deutschen Transplantationsgesellschaft

Würzburg, den 01. Juni 2008

Andreas S. Herbst