

**Aus der Klinik und Poliklinik für  
Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Christoph-Thomas Germer**

**Einfluss von extrazellulären Matrixproteinen und Polyelektrolyten auf  
die *In-Vitro*-Funktion von Langerhans-Inseln des Schweines**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von  
Kathrin Aurbach  
aus Neumarkt in der Oberpfalz**

**Würzburg, Dezember 2009**

Referentin: Prof. Dr. rer. nat. K. Ulrichs  
Korreferent: Prof. Dr. med. C.-T. Germer  
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2010

Die Promovendin ist Ärztin

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>3</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Fragen 12</b>	
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>13</b>
3.1 Untersuchungsmaterial.....	13
3.2 Isolierung und Reinigung der Langerhans-Inseln.....	13
3.3 Vitalität der Langerhans-Inseln.....	13
3.4 Kulturbedingungen.....	14
3.4.1 Kultur vor Zugabe der extrazellulären Matrixproteine und vor Nanover- kapselung .....	14
3.4.2 Kultur mit extrazellulären Matrixproteinen und Nanoverkapselung.....	15
3.4.2.1 Extrazelluläre Matrixproteine.....	15
3.4.2.2 Nanoverkapselung mit Polyelektrolyten.....	15
3.5 Fluoreszenzmikroskopie von Nanokapseln mit Fluoreszenzfarbstoff.....	19
3.6 Stimulation der Langerhans-Inseln mit Glukose (Perifusion).....	19
3.6.1 Perifusionsmedien.....	19
3.6.1.1 Krebs-Ringer-Lösung.....	19
3.6.1.2 Stimulationsmedien.....	20
3.6.2 Perifusionskammer und Zubehör.....	21
3.6.2.1 Perifusionskammer.....	21
3.6.2.2 Heizplatte und Wasserbad.....	22
3.6.2.3 Schlauchrollenpumpe.....	23
3.6.2.4 Schlauchsysteme.....	23
3.6.2.5 Einwegartikel.....	23
3.6.3 Durchführung der Perifusion.....	24
3.7 Insulinbestimmung.....	25
3.7.1 Labor-ELISA.....	25
3.7.2 Biosource-ELISA.....	26
<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>27</b>
4.1 Perifusion von Langerhans-Inseln nach Zusatz von extrazellulären Matrixproteinen zum Kulturmedium.....	27

4.1.1 Kultur und Perifusion ohne extrazelluläre Matrixproteine.....	27
4.1.2 Kultur und Perifusion mit extrazellulären Matrixproteinen.....	29
4.1.2.1 Kultur und Perifusion mit Kollagen IV und Laminin.....	29
4.1.2.2 Kultur und Perifusion mit Kollagen IV, Laminin und Fibronectin.....	31
Kultur und Perifusion mit Fibronectin .....	32
4.2 Perifusion der nanoverkapselten Langerhans-Inseln.....	33
4.2.1 Kultur und Perifusion der unverkapselten Langerhans-Inseln.....	33
4.2.2 Kultur und Perifusion der nanoverkapselten Langerhans-Inseln.....	35
4.2.2.1 Kultur und Perifusion der CPC-nanoverkapselten Langerhans-Inseln .....	36
4.2.2.2 Kultur und Perifusion der CPP-nanoverkapselten Langerhans-Inseln.....	38
4.3 Verwendung von FITC-gekoppelten Polyelektrolyten.....	39
4.3.1 Fluoreszenzmikroskopie unverkapselter Langerhans-Inseln (Kontrollen).....	40
4.3.2 Fluoreszenzmikroskopie von Langerhans-Inseln mit Nanokapseln aus einfachen und aus FITC-gekoppelten Polyelektrolyten.....	41
4.3.2.1 CPC-Nanokapseln.....	41
4.3.2.2 CPP-Nanokapseln.....	43
4.4 FDA/PI-Färbung der Langerhans-Inseln.....	44
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>46</b>
5.1 Insulinprofile unbehandelter/unverkapselter Langerhans-Inseln am Tag +1 und am Tag +6.....	46
5.2 Zugabe von extrazellulären Matrixproteinen zum Kulturmedium.....	48
5.3 Insulin-Profile nanoverkapselter Langerhans-Inseln.....	50
5.4 Fluoreszenzmikroskopie der Nanokapseln.....	51
<b>6 Ausblick.....</b>	<b>54</b>
<b>7 Zusammenfassung.....</b>	<b>55</b>
<b>8 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>58</b>

Danksagung

Lebenslauf



## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μIU	Mikro- <i>International Unit</i>
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ABTS	<i>2,2-Azino-Di-[3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid]</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Kollagen IV
C+L	Kollagen IV plus Laminin
C+L+F	Kollagen IV plus Laminin plus Fibronectin
ca.	circa
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CPC	Chitosan MMW/PEGPPGPEG/Chitosan MMW
CPC*	Chitosan MMW/PEGPPGPEG/Chitosan MMW-FITC-gekoppelt
CPP	Chitosan MMW/PAAMA/PAH 15 kDa
CPP*	Chitosan MMW/PAAMA/PAH 15 kDa-FITC-gekoppelt
d. h.	das heisst
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extrazelluläre Matrix
ECMP	Extrazelluläre(s) Matrixprotein(e)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
engl.	englisch
et al.	<i>et alii</i>
F	Fibronectin
Fa.	Firma
FDA	Fluoreszeindiacetat
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Gramm
G	<i>Guluronic Acid</i>

h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Hb	Hämoglobin
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCl	Salzsäure
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IEQ	Inseläquivalent(e)
Insel	Kurzform für Langerhans-Insel
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KRL	Krebs-Ringer-Lösung
L	Laminin
LbL	<i>Layer-by-Layer</i>
M	Mol; molar
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol, millimolar
MMW	<i>Medium Molecular Weight</i>
ms	Millisekunde(n)
nm	Nanometer
o. g.	oben genannten
PAA	<i>Poly(Acrylic Acid)</i>
PAAMA	<i>Poly(Acrylic Acid-Co-Maleic Acid) Sodium Salt</i>
PAH	<i>Poly(Allylamine Hydrochloride)</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PEGPPGPEG	<i>Poly(Ethylene Glycol)-Block-Poly(Propylene Glycol)-Block-Poly(Ethylene Glycol)</i>

PERV	<i>Porcine Endogenous Retrovirus</i>
PI	Propidiumiodid
PLL	<i>Poly-L-Lysine</i>
PSS	<i>Poly(Styrene-Sulfonate)</i>
s.	siehe
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
z. B.	zum Beispiel

## 1 Einleitung

Die Inzidenz des Diabetes, der häufigsten Stoffwechselerkrankung, ist steigend [1]. Unterteilt wird der Diabetes in Typ 1- und Typ 2-Diabetes. Der Typ 2-Diabetes ist eine Zivilisationskrankheit, Risikofaktoren sind insbesondere das Alter und die Adipositas. Pathophysiologisch liegen eine Abnahme der Insulinsekretion im Pankreas und eine Insulinresistenz in der Peripherie vor [2]. Patienten mit Risikofaktoren für die Entwicklung eines Typ 2-Diabetes können den Ausbruch der Erkrankung in 60 % durch eine Änderung ihrer Lebensführung verhindern; dies beinhaltet Umstellung der Ernährung und vermehrte körperliche Bewegung mit dem Ziel der Gewichtsreduktion. Diese Änderung der Lebensführung ist auch die wichtigste Säule in der Therapie des manifesten Typ 2-Diabetes. Medikamentös kann der Typ 2-Diabetes mit oralen Antidiabetika behandelt werden [1].

Beim Typ 1-Diabetes, dem Insulin-abhängigen Diabetes, liegt ein absoluter Insulinmangel vor. Während beim Typ 1B kein Hinweis auf eine Autoimmunität vorliegt, sondern dieser durch operative Entfernung des Pankreas, durch Infarkte oder Gendefekte verursacht wird, ist der Typ 1A-Diabetes eine chronisch verlaufende Autoimmunkrankheit. Er ist weitaus häufiger als der Typ 1B [3, 4]. Fünfzig bis sechzig Prozent der Patienten sind bei Manifestation jünger als 18 Jahre [3].

Es gibt eine genetische Veranlagung für den Typ 1A-Diabetes; ausserdem spielen Umwelteinflüsse eine Rolle. Der Einfluss der Genetik wurde zuerst gezeigt für das HLA-Gen auf Chromosom 6: Je nachdem, welchen Genotyp ein Individuum für HLA hat, ist sein Risiko, Diabetes zu entwickeln, im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöht oder erniedrigt [5]. Das HLA-Gen ist für 50 % der familiären Häufungen verantwortlich [4]. Ein weiteres wichtiges Gen mit Einfluss auf die Entstehung des Typ 1A-Diabetes ist das Insulin-Gen auf Chromosom 11; ausserdem spielen mindestens 15 weitere Gen-Loci eine Rolle [5]. Doch es muss noch andere Faktoren geben, die die Entstehung eines Typ 1A-Diabetes fördern. Dies kann man daran erkennen, dass bei eineiigen Zwillingen die Konkordanzrate für den Ausbruch der Erkrankung nur bei 30 bis 50 % liegt [2]. Ausserdem spricht für den Einfluss von Umweltfaktoren, dass der Typ 1A-Diabetes in unterschiedlichen Ländern unterschiedlich hohe Inzidenzraten hat, Migranten die Erkrankung

aber mit der Inzidenz ihres neuen Landes entwickeln [3]. Interessant ist ausserdem, dass die Inzidenz des autoimmunen Typ 1A-Diabetes nur in den Ländern der Ersten Welt ansteigt, nicht dagegen in den Entwicklungsländern [6]. Als Auslöser für die Erkrankung werden Einflüsse durch Stillen, Vitamin D-Mangel, die Exposition von Kuhmilch, Soja, Weizen, Omega-3-Fettsäuren und Toxinen diskutiert [2, 7]. Infektionen durch Entero-, Coxsackie-, Rota- und Mumpsviren sollen die Entstehung des Typ 1A-Diabetes fördern [3, 8]; eine klare kausale Beziehung wurde allerdings nur beim kongenitalen Röteln-Syndrom nachgewiesen, das in 20 % zum Ausbruch der Erkrankung führt [4]. Auch die Rolle von Impfungen wird diskutiert, allerdings wurde bis jetzt kein Beweis für ein gesteigertes Risiko für den Typ 1A-Diabetes erbracht [4]. Teilweise wird auch eine protektive Wirkung durch Infektionen und Impfungen angenommen, weil sie das Immunsystem „trainieren“ [6].

Ob bei einem Patienten mit Typ 1A-Diabetes Autoantikörper gefunden werden, hängt von seinem Geschlecht und Alter und ausserdem vom Stadium der Erkrankung ab [9, 10]. Insgesamt können bei 70 bis 80 % der Patienten mit der Erstdiagnose Inselzell-Antikörper nachgewiesen werden: häufig gegen Insulin und gegen die Betazellantigene *Glutamic Acid Decarboxylase*, GAD 65, und *Protein Tyrosine Phosphatase*, IA-2A. Diese sind als Hinweis für den Autoimmunprozess zu werten, in dessen Verlauf eine Zerstörung der pankreatischen Betazellen durch T-Lymphozyten bewirkt wird [2]. Wenn 80 % dieser Zellen zerstört sind, kommt es zu Symptomen der Erkrankung. Diese Zerstörung verläuft oft über viele Jahre und ist deswegen ein möglicher Ansatzpunkt für Präventivmassnahmen, die momentan intensiv erforscht werden [5].

Der Typ 1-Diabetes ist eine chronische Erkrankung, die mit einer deutlichen Einschränkung der Lebenserwartung einhergeht: Ein 10-jähriges Kind, das im Jahr 2000 einen Typ 1-Diabetes entwickelt, hat eine um durchschnittlich 19 Jahre verkürzte Lebenserwartung im Vergleich zu einem nichtdiabetischen Kind [3]. Dies liegt vor allem an der Entwicklung von Spätkomplikationen. Diese werden eingeteilt in mikrovaskuläre, also Retinopathie [11], Neuropathie [12] und Nephropathie [13, 14], und makrovaskuläre, das sind die ischämische Herzkrankheit, zerebro- und periphervaskuläre Erkrankungen [15]. Mikro- und makrovaskuläre Erkrankungen bestehen oft nebeneinander und erfordern zur Primär- und Sekundärprävention eine gute Therapie der Grunderkrankung *Dia-*

*betes mellitus* [16]. Hierbei müssen Hyperglykämien vermieden werden, die eine Glykosylierung von Proteinen und Lipiden in Gefässwänden verursachen und dadurch Auslöser der Vaskulopathien sind [15].

Die Therapie des Typ 1-Diabetes wurde durch die Einführung neuer Insulin-Analoga erleichtert. Verabreicht werden sie meist in Form der intensivierten Insulin-Therapie, bei der der Patient seinen Blutzuckerspiegel misst und mit bis zu acht Insulin-Injektionen pro Tag stabilisiert. Die kontinuierliche subkutane Insulin-Infusionspumpe CSII ist eine Alternative mit den Vorteilen einer geringeren Variation des Blutzuckerspiegels, niedrigeren HbA<sub>1c</sub>-Werten, einer geringeren Anzahl von Hypoglykämie-Episoden und einer verbesserten Lebensqualität [1, 17].

Allerdings ist die Insulin-Therapie in ihrer Antwort auf Blutglukoseschwankungen nie so präzise wie die Insulin-Ausschüttung aus den Betazellen. Erstrebenswert wäre ein Ersatz durch eine Transplantation Insulin-produzierender Zellen [18]. Geforscht wird an verschiedenen Quellen für diese Zellen, zum Beispiel an Insulin-produzierenden Zellen, die aus embryonalen oder adulten Stammzellen differenziert werden [18, 19]. Möglich scheint auch eine Transdifferenzierung aus nicht-pankreatischen Vorläuferzellen, eine gentherapeutische Herstellung immortalisierter Betazellen oder eine *In-Vitro*-Expansion humaner Inselzellen mit Hilfe von Wachstumsfaktoren. Diese Ansätze sind allerdings noch weit von einer klinischen Anwendung entfernt [20, 21]. Naheliegender ist die Transplantation von allogenen Pankreasgewebe, das von hirntoten Spendern gewonnen wird. Es kann das gesamte Pankreas transplantiert werden, als Alternative besteht auch die Möglichkeit der Transplantation von pankreatischen Langerhans-Inseln. Die Transplantation des gesamten Organs ist etablierter, sie wird standardmässig durchgeführt zusammen mit der Nieren-Transplantation beim niereninsuffizienten Diabetiker oder auch als reine Pankreas-Transplantation bei extremen, durch konservative Therapie nicht stabilisierbaren Blutglukoseschwankungen [22]. Mit der Pankreas-Transplantation erreicht der Patient eine von exogenem Insulin unabhängige Regulierung seiner Blutglukosewerte, eine Stabilisierung oder sogar eine Verbesserung der diabetischen Sekundärkomplikationen und eine verbesserte Lebensqualität. Nachteile der Pankreas-Transplantation sind die lebenslange Immunsuppression und die hohe operationsbedingte Morbidität [22, 23]. Eine Alternative zur Pankreas-Transplantation ist die Transplantation von Lan-

gerhans-Inseln. Durch die Einführung des Edmonton-Protokolls mit einer verbesserten Auswahl von Immunsuppressiva im Jahr 2000 wurde der Prozentsatz der Patienten, die ein Jahr nach Inselzell-Transplantation Insulin-unabhängig waren, von 8 % auf ca. 70 % verbessert [24, 25]. Und auch die Patienten, die durch die Transplantation nicht unabhängig von exogen zugeführtem Insulin wurden, erreichten durch die verbliebenen Inselzellen eine bessere Kontrolle ihrer Blutglukosewerte [26]. Die Indikationen für die Transplantation von Inselzellen nehmen zu und umfassen heute unter anderem den medikamentös schwer einstellbaren Typ 1A-Diabetes ohne Niereninsuffizienz [22, 27]. Nachteile gegenüber der Transplantation des Einzelorgans sind die Notwendigkeit, Langerhans-Inseln aus mehr als einem Spenderpankreas zu isolieren und Komplikationen wie Portale Hypertension, Thrombosen und Blutungen nach Infusion der Langerhans-Inseln in die Pfortader des Empfängers [28].

Ausserdem ist bei der Inselzell-Transplantation im Vergleich zur Pankreas-Transplantation eine höhere Rate des frühen Transplantatversagens zu beobachten [29]. Es ist bekannt, dass Zellen auf Signale von ausserhalb angewiesen sind, um zu überleben [30, 31]. Der Grund für das frühe Versagen der Inselzellen kann also möglicherweise in der Isolierung der Langerhans-Inseln aus dem Spenderpankreas und in ihrer anschliessenden Reinigung und Kultur liegen [29]. Dadurch wird die Mikroanatomie des Pankreas zerstört, Funktion und Überleben der Inselzellen werden negativ beeinflusst [31, 32]. Ausserdem wurde gezeigt, dass für das Anwachsen des Transplantates die Reinheit der Inselzell-Präparation nicht von Bedeutung ist, ein weiterer Hinweis darauf, dass eine Reinigung der Langerhans-Inseln vom restlichen Pankreasgewebe nach der Isolierung nicht so wichtig ist, wie zunächst angenommen wurde [33, 34]. Ganz im Gegenteil scheint das Überleben der Langerhans-Inselzellen von anderen im Rahmen der Inselzell-Präparation entfernten Bestandteilen des Pankreas abhängig zu sein, möglicherweise anderen Zellen: In der Inselzell-Kultur wurde nachgewiesen, dass eine Exposition mit Pankreasgangepithel zu einer verstärkten Inselzell-Proliferation führt und den Zelltod verhindert [34, 35]. Ein weiterer Ansatzpunkt, um für die Inselzellen möglichst physiologische Umgebungsbedingungen zu schaffen, ist die Exposition mit Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM). Die extrazelluläre Matrix ist ein wichtiger Bestandteil der direkten Umgebung von Zellen [29, 33] und wichtig für Entwicklung, Aufbau und die spezifische Funktion eines Gewebes [36]. Die ECM beeinflusst die Expression von Ge-

nen und den Aufbau des Zytoskeletts und somit Zelldifferenzierung und Zellwachstum [37]. Darüber hinaus ist die extrazelluläre Matrix ein Überlebensfaktor für die Zelle: Wird die Verbindung zwischen den beiden zerstört, kommt es zum programmierten Zelltod, der Apoptose [38, 39]. Dieser Mechanismus ist bedeutend in der Embryogenese und bei der Verhinderung von Tumorentstehung: Zellen, die ihren Zellverband verlassen und nicht mehr mit anderen Zellen über die ECM verbunden sind, stellen ein Risiko für den Organismus dar und fallen der Apoptose zum Opfer [40].

Die ECM kommt in zwei Formen vor [32]: als interstitielle Matrix und in ihrer spezialisierten Form als Basalmembran. Die Basalmembran liegt zwischen epithelialen und mesenchymalen Geweben [41] und umgibt somit auch die Langerhans-Inseln, die sich aus epithelialen Vorläuferzellen entwickeln [34]. Bei der enzymatischen Präparation der Langerhans-Inseln aus dem Spenderorgan wird nicht nur die interstitielle Matrix, sondern auch die Basalmembran zerstört [29]. Basalmembranen bestehen hauptsächlich aus Kollagen IV und Laminin [41-43], wobei Laminin wichtig ist für die Verbindung der epithelialen Zellen mit dem Kollagen IV [44]. Ein weiteres Protein der extrazellulären Matrix ist Fibronectin; es wird im Körper von vielen Zellen produziert und ist essentiell für normale Zelladhäsion und -mobilität [45, 46]. Bezüglich des Gehalts der ECM gibt es durchaus Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies: Während im menschlichen Pankreas die Langerhans-Inseln beinahe komplett von ECM umgeben sind, ist bei Langerhans-Inseln des Schweines wenig oder überhaupt keine ECM vorhanden [32, 43].

E. D. Hay stellte fest, dass die benachbarte ECM Teil der Zelle ist [44], und Meyer et al. forderten für die Inselzell-Präparation Spender mit einem hohen Anteil an ECM, um gute Bedingungen für die enzymatische Isolierung der Zellen zu schaffen und ihre Integrität durch die verbleibende ECM zu stabilisieren [47, 48]. Es stellt sich die Frage, ob nach der Präparation durch einen Ersatz der extrazellulären Matrixproteine (ECMP) ein positiver Effekt auf die Kultur der Langerhans-Inseln erreicht werden kann. In der Tat wurde schon 1983 gezeigt, dass einzelne Ratten-Inselzellen bei Kultur auf einer Kollagenmatrix sich zu inselartigen Organoiden zusammenfügten [49]. In weiteren Versuchen wurde ein positiver Einfluss auf das Anhaften und Wachstum der Ratten-Inselzellen gezeigt, wenn sie auf ECM-beschichteten Platten kultiviert wurden [50]. Perfetti et al. zeigten, dass nach 6-wöchiger Kultur von Ratten-Inselzellen auf dem aus ECMP be-



stehenden Matrigel die Funktion der Inselzellen, also ihre Insulin-Ausschüttung auf einen Glukosereiz, verbessert wird [51]. Nagata et al. kultivierten Langerhans-Inseln aus Ratten in Hydrogelen, bestehend aus verschiedenen Kollagenen und Laminin und erreichten bei einer Kulturdauer von 6 Tagen eine verbesserte Vitalität und Funktion der Zellen [33]. Bei fetalen inselartigen Zellverbänden aus Schweinen wurde bei Kultur auf Matrigel ein Erhalt der dreidimensionalen Struktur nachgewiesen und eine Rolle der Matrix bei der Differenzierung dieser Zellen [52].

Die verbesserten Kulturbedingungen durch Exposition von ECMP sollen in dieser Arbeit für die Kultur von porzinen Langerhans-Inseln untersucht werden. Zum einen werden die beiden Hauptbestandteile der ECM, Kollagen IV und Laminin, zur Inselzellkultur zugegeben, in einem weiteren Versuch zusätzlich Fibronectin. Die Inselzellen werden über 6 Tage kultiviert; am Tag +1 und am Tag +6 wird die Funktion der Inselzellen mit Hilfe einer dynamischen Glukose- und Kaliumchloridstimulation überprüft und ausserdem ihre Vitalität bestimmt, um zu testen, ob die Exposition mit den ECMP einen positiven Effekt auf die Schweine-Inselzellen ausübt.

Ein weiteres Problem der Inselzell-Transplantation ist die Knappheit von Spenderorganen, besonders weil hier zumeist 2 oder mehr Spenderpankreatata pro Empfänger benötigt werden [18, 20]. Eine Lösung wäre die Xenotransplantation von Langerhans-Inseln aus Schweinepankreatata. Schweine als Spender bieten sich an, weil sie in grossen Mengen verfügbar sind und sich ihr Insulin vom menschlichen nur in einer Aminosäure unterscheidet [27]. Gefürchtete Xenozoonosen können durch spezielle Aufzuchtbedingungen der Spendertiere verhindert werden. Allerdings besteht unverändert die Gefahr einer Infektion durch *Porcine Endogenous Retrovirus* (PERV), da sein Genom im Schweinegenom verankert ist. Bislang wurden aber keine Hinweise für eine Infektion *in vivo* gefunden, wenn Gewebe aus Schweinen in Menschen oder Hunde transplantiert wurde [53-55].

Eine Möglichkeit, die xenogenen Transplantate vor dem Angriff des menschlichen Immunsystems zu schützen, ist die *Immunisolation* durch Verkapselung der Langerhans-Inseln. Zusätzlich könnten die Empfänger allogener Transplantate durch eine

solche Verkapselung auf eine immunsuppressive Therapie mit ihren Nebenwirkungen verzichten [56, 57].

1980 wurden zum ersten Mal mikroverkapselte Inselzellen in Ratten transplantiert [58]. Hauptbestandteil dieser Mikrokapsel ist Alginat. Das Alginat wird über divalente Kationen, entweder Kalzium oder Barium, vernetzt und bildet so Hydrogele, die zur Mikroverkapselung verwendet werden können [59]. In der allogenen Transplantation scheint diese Art der Verkapselung einen ausreichenden Schutz zu bieten; bei der Xenotransplantation wird die Alginatkapsel mit einer zusätzlichen Schicht von Polykationen, meist *Poly-L-Lysine* (PLL) ummantelt [60]. Dieses Vorgehen macht die Kapsel stabiler und ihre Durchlässigkeit wird verringert. Dies schützt die Inselzellen vor den Komponenten des Immunsystems, wie zum Beispiel Immunglobulinen [59]. Trotz intensiver Forschung zur Mikroverkapselung sind noch immer viele Fragen ungelöst, bevor die Transplantation mikroverkapselter Xeno- und Allotransplantate im klinischen Alltag routinemässig etabliert werden kann [61]. So wird ein standardisiertes Protokoll für die Alginat- und die Kapselherstellung gefordert. Ausserdem sind die verwendeten Polykationen, wie etwa PLL, wenig biokompatibel. Wie oben bereits erwähnt, wird deshalb bei allogenen Transplantationen oft auf die zusätzliche Schicht von Polykationen verzichtet [60, 61]. Bei der Wahl der zu transplantierenden Zellen spielen ethische Bedenken und die Sorge vor einer möglichen PERV-Infektion eine Rolle. Ein weiteres Problem ist die Wahl des Transplantationsortes für mikroverkapselte Langerhans-Inseln, die ein grösseres Transplantat-Volumen im Vergleich zu den unverkapselten Inseln darstellen; hier eignen sich die Peritonealhöhle [60, 62] oder das Omentum [63].

Ein weiterer Diskussionspunkt ist die spezifische Zusammensetzung des Alginats, welche die Biokompatibilität entscheidend beeinflusst. Das Alginat besteht aus zwei Komponenten: *Guluronic Acid* (G) und *Mannuronic Acid* (M). Während teilweise ein hoher Anteil der G-Komponente mit einer besseren Biokompatibilität und Stabilität in Verbindung gebracht wird [64], wurde von anderen Autoren bei Alginat/PLL-Kapseln unter Verwendung von Alginat mit einer hohen G-Komponente viel PLL gefunden, dessen freie Bindungsstellen zu einer starken Fibrosierung führten. Dies wiederum bedeutet eine niedrigere Biokompatibilität [65, 66]. De Vos forderte deshalb 1997 die Verwendung von gereinigtem Alginat, um eine bessere Biokompatibilität zu erreichen [65].

Doch auch bei guter Biokompatibilität der Alginatekapsel und geringer fibrotischer Überwucherung der Kapseln wurde eine hohe Nekroserate der mikroverkapselten Inselzellen festgestellt [67-69]. Möglicherweise wird nicht nur durch die Fibrose, sondern allein durch die Kapsel die Versorgung der Inselzellen mit Nährstoffen und Sauerstoff erschwert [67, 70]. Doch auch bei einer in einem *In-Vivo*-Versuch beobachteten Fibrose von nur 10 % der Alginate/PLL-Kapseln werden die Inselzellen der nicht befallenen 90 % der Kapseln geschädigt: Aktivierte Makrophagen an den fibrotisch überwucherten Kapseln produzieren Zytokine, die auch Inselzellen in unbefallenen Kapseln angreifen [71]. Ein Schutz vor toxischen Zytokinen kann durch eine längere Inkubation mit PLL erreicht werden [56] – das, wie schon erwähnt, für seine schlechte Biokompatibilität bekannt ist [69].

Es wurden einige Abwandlungen der klassischen Alginate/PLL-Kapsel vorgeschlagen, wobei Alginate weiterhin die Grundsubstanz aller Kapseln bleibt [72-74]. Teilweise wurden sie entwickelt, um einen anderen Nachteil der Mikroverkapselung zu vermeiden: das hohe Volumen der verkapselten Langerhans-Inseln. Diesen Nachteil hat auch die zweite Art der Mikroverkapselung mit Agarose [75, 76]. Ganz verlassen wurde die Idee der Makroverkapselung: Hier ist das Volumen der verkapselten Langerhans-Inseln so hoch, dass nicht einmal mehr die Peritonealhöhle dem Transplantat ausreichend Platz bietet; ausserdem erfolgt die Sekretion des Insulins hier zu langsam für die gewünschte schnelle Regulation des Blutglukosespiegels [57].

Der Grundstein für eine weitere Art der Verkapselung wurde in den frühen 90er Jahren durch die Einführung der *Layer-by-Layer* (LbL)-Technik durch Decher gelegt [77]. Die LbL-Technik funktioniert über die schichtweise Anlagerung von Polyelektrolyten aus einer wässrigen Lösung an eine geladene Oberfläche oder ein geladenes Kolloid. Man beginnt mit einer geladenen Oberfläche und Polyelektrolyten mit einer ihr entgegengesetzten Ladung; diese lagern sich wegen der elektrostatischen Anziehung als eine erste Schicht an. Da es sich bei den Polyelektrolyten um Moleküle mit mehr als einer Ladung und einer teilweise dreidimensionalen Struktur handelt, führt ihre Bindung zu einer Umkehrung der Oberflächenladung (Überkompensation der Primär-Ladung). Dies führt zu dem, dass die Polyelektrolyte nur bis zu einer gewissen Schichtdicke binden (Abstossung mit den gleich geladenen Polymeren in Lösung), zum anderen wird da-

durch im nächsten Schritt die Herstellung einer zweiten Schicht mit entgegengesetzter Ladung ermöglicht [77].

Durch abwechselnde Adsorption positiv, beziehungsweise negativ geladener Polyelektrolyte, können beliebig viele Schichten auf eine geladene Oberfläche aufgebracht werden – in Experimenten wurden über 1.000 Schichten hergestellt, bei guter mechanischer Stabilität [78-81].

Die Technik ist sehr einfach, es wird mit Polyelektrolyten im Überschuss gearbeitet; ungebundene Polyelektrolyte müssen nach der Herstellung einer Schicht in einem oder mehreren Waschschritten entfernt werden. Der Vorteil der Verwendung der relativ grossen Polyelektrolyte liegt darin, dass sie wegen ihrer Grösse Defekte in unteren Schichten überbrücken können [77].

In den letzten Jahren gab es viele Vorschläge zur Nutzung der LbL-Technik in der Medizin: Die Biokompatibilität von Oberflächen wurde durch Polyelektrolytschichten gesteigert, so dass das Anwachsen von Endothelzellen gefördert wurde, hilfreich zum Beispiel für den Einsatz als Gefässprothesen [82, 83]. Leere Kapseln wurden hergestellt und als Behältnisse oder Reaktionsgefässe vorgeschlagen [80]. Ausserdem denkbar ist die Verkapselung von Medikamenten, zum Beispiel von Insulin – Ort und Umstände der Freisetzung der Medikamente könnten so gesteuert werden [84]. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit ist die Immobilisierung von Zellen oder ihr Schutz vor mechanischer Beanspruchung [85, 86]: 2006 wurden zum ersten Mal menschliche Pankreaszellen mit einer multischichtigen, sogenannten Nanokapsel umhüllt [78]. Vorteile der Verkapselung mit mehreren Schichten ist unter anderem die Wahl der Schichten bezüglich ihrer Aufgaben: Wünschenswert ist eine Unterstützung der Inselzell-Funktion durch die innere, und eine Anregung der Neovaskularisierung und Verhinderung der Fibrosierung durch die äussere Schicht [70]. Ein weiterer Vorteil der Nanoverkapselung ist die Möglichkeit der genauen Festlegung der Membranpermeabilität, unter anderem durch die Auswahl der verwendeten Polyelektrolyte und die Anzahl der Schichten [84]. Vorteilhaft ausserdem ist die geringe Dicke der Nanokapsel: die Inselzellen können somit schnell auf den Glukosestimulus reagieren [78].

Prinzipiell kommen viele Moleküle für die Nanoverkapselung in Frage, wobei viele Polyelektrolyte für ihre Zytotoxizität bekannt sind [87]. Oft verwendet und gut erprobt sind zwei synthetische Polyelektrolyte, das positiv geladene *Poly(Allylamine Hydrochloride)* (PAH) und das negativ geladene *Poly(Styrene-Sulfonate)* PSS [77, 88]. Bei *In-Vivo*-Experimenten mit Ratten hatte PAH gute Ergebnisse gezeigt [87]. *In vitro* wuchsen Endothelzellen gut auf Polyelektrolytschichten, deren äussere Schicht aus PAH bestand [83] – ein Hinweis für die gute Biokompatibilität des PAH. Bei einem Versuch zur Insulin-Sekretion mit nanoverkapselten Zellen, bei denen PAH-Moleküle der Masse 15 kDa und 70 kDa verwendet wurden, hatte sich PAH mit der niedrigeren Molekülmasse als besser geeignet erwiesen [78].

Ein weiteres gern verwendetes Polyelektrolyt ist das positiv geladene natürliche Polysaccharid Chitosan, bekannt für seine gute Biokompatibilität und Nichttoxizität [82, 89].

Zwei verschiedene mit LbL-Technik hergestellte Polyelektrolytkapseln sollen in dieser Arbeit untersucht werden. Bezüglich der Anzahl der Schichten hatten Krol et al. gezeigt, dass Langerhans-Inseln mit einer geraden Anzahl von Polyelektrolytschichten keine adäquate Reaktion auf einen Glukosestimulus zeigten [78]. Die Nanoverkapselung mit drei Schichten erwies sich als geeignet; die Insulin-Ausschüttung im Vergleich mit unverkapselten Langerhans-Inseln war kaum vermindert und blieb abhängig von der Glukosestimulation [78]. Nanokapseln, die aus drei Schichten aufgebaut sind, haben eine positive Nettoladung, weil ihre äussere Schicht aus Polykationen besteht. Auf Nanokapseln mit einer positiven Nettoladung war ein verstärktes Wachstum von Zellen beobachtet worden, und eine geringere fibrotische Überwucherung [90].

Aus diesen Gründen sollen Polyelektrolyt-Nanokapseln aus drei Schichten untersucht werden. Für die erste, den Inselzellen nahe Schicht, wird das als biokompatibel bekannte Chitosan gewählt. Als äusserste Schicht wird einmal Chitosan, einmal PAH 15 kDa verwendet. Die mittlere der drei Schichten besteht bei einer der Kapseln aus *Poly(Ethylene Glycol)-Block-Poly(Propylene Glycol)-Block-Poly(Ethylene Glycol)* (PEG-PPG-PEG): PEGylierte Oberflächen werden in der Nanomedizin gerne verwendet, weil gezeigt werden konnte, dass sie bei guter Biokompatibilität unspezifische Protein- und Zellbindungen verringern [91-94]. Bei der anderen Kapsel wurde *Poly(Acrylic Acid-Co-*

*Maleic Acid*) Sodium Salt (PAAMA) verwendet: Gute Ergebnisse mit *Poly(Acrylic Acid)* (PAA) hatten sich in einem Versuch mit Zellen aus der Nebenschilddrüse ergeben, die mit Alginat mikroverkapselt worden waren: wurde eine zusätzliche Schicht PAA verwendet, zeigte sich im Vergleich zu reinen Alginatkapseln eine geringere Fibrösierung [95]. Hydrogele, die unter anderem aus dem zweiten Bestandteil des PAA-MA, der *Maleic Acid*, bestanden, hatten in *In-Vivo*-Versuchen in Ratten ihre Biokompatibilität bewiesen [96]. *Maleic Acid* ist zudem biologisch abbaubar und wird deshalb für „drug delivery“-Systeme benutzt [97, 98]. Die Langerhans-Inseln werden über 6 Tage kultiviert, und am Tag +1 und am Tag +6 wird die Funktion der Inselzellen mit Hilfe einer dynamischen Glukose- und Kaliumchloridstimulation überprüft und ausserdem ihre Vitalität bestimmt. Damit soll überprüft werden, ob die Polyelektrolyt-Nanokapseln die Insulin-Ausschüttung verhindern oder verzögern, oder aber im Vergleich zu den unverkapselten Langerhans-Inseln der Kontrolle verbessern können.

## 2 Fragen

- 2.1 Gibt es einen Unterschied in der Funktion der Langerhans-Inseln am Tag +1 und Tag +6 nach Versuchsbeginn? An welchem dieser Tage ist die Durchführung von Funktionsprüfungen, z. B. mittels Perifusion, sinnvoll und aussagekräftig?
- 2.2 Kann durch Exposition von extrazellulären Matrixproteinen eine verbesserte Funktion der Langerhans-Inseln erreicht werden? Welche dieser Proteine, z. B. Kollagen Typ IV, Laminin und/oder Fibronectin, eignen sich als Zusätze zum Kulturmedium besonders gut?
- 2.3 Beeinflussen Polyelektrolytschichten die Funktion der nanoverkapselten Langerhans-Inseln? Verhalten sich die beiden hier untersuchten Nanokapseln gleichartig?
- 2.4 Gibt es in der Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie Unterschiede zwischen den einfach Polyelektrolyt-nanoverkapselten und den unverkapselten Langerhans-Inseln?
- 2.5 Kann man die Nanokapseln fluoreszenzmikroskopisch darstellen und mit Hilfe der Fluoreszenz den Nachweis für die Integrität der Polyelektrolytschichten um die Langerhans-Inseln erbringen?

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Untersuchungsmaterial**

Die Versuche erfolgten mit Langerhans-Inseln, die aus dem Pankreas hirntoter Schweine isoliert wurden; die Pankreata wurden im Rahmen des regulären Schlachtbetriebes des Schlachthofs Würzburg (Südfleisch Holding GmbH) gewonnen; Organspender waren 1-2 Jahre alte weibliche Zuchtsauen mit einem Gewicht von 150-200 kg.

#### **3.2 Isolierung und Reinigung der Langerhans-Inseln**

Die enzymatische Isolierung und die Anreicherung der Langerhans-Inseln über Dichtegradienten-Zentrifugation erfolgten nach der halbautomatischen Isolierungstechnik von Ricordi et al. [99], modifiziert nach Heiser et al. [100] und Krickhahn et al. [101, 102] in der eigenen Arbeitsgruppe (Einzelheiten der Isolierung: siehe [99-102]). Unmittelbar nach der Isolierung wurden die Langerhans-Inseln mittels Dithizon-Färbung [103] auf ihre Reinheit überprüft: Dazu wurden 10 mg Dithizon (Diphenylthiocarbazon, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) in 1 mL DMSO (Dimethylsulfoxid, Fa. Sigma-Aldrich) und 9 mL HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*, Fa. Cell Concepts, Umkirch) gelöst und mit einem 0,2 µm-Filter (PALL Acrodisc PF, Fa. PALL Corp., New York, USA) filtriert. Mit Dithizon färben sich die endokrinen Zellen rot an, die exokrinen Zellen bleiben ungefärbt. Dithizon ist ein Zink-spezifischer Farbstoff, der das zentrale Zinkatom im Zink-Insulin-Komplex markiert.

#### **3.3 Vitalität der Langerhans-Inseln**

Vitalitätsbestimmungen der Langerhans-Inseln (besser: Betazellen) erfolgten mit der FDA/PI-Färbung [104]: 1 mg Fluoreszeindiacetat (FDA, Fa. Sigma-Aldrich) wurde in 1 mL Aceton (Fa. Baker, Deventer, Holland) gelöst; 5 mg Propidiumiodid (PI, Fa. Sigma-Aldrich) wurden in 10 mL PBS (engl. *Phosphate Buffered Saline*) gelöst. FDA ist lipidlöslich und wird im Zytoplasma der Zelle durch eine Esterase gespalten, wodurch ein grüner Farbstoff entsteht; dieser ist nicht lipidlöslich und verbleibt deshalb ausschließlich in den vitalen Zellen. PI dagegen färbt die Zellkerne avitaler Zellen mit einer Rotfluoreszenz. Die FDA-Lösung wurde im Verhältnis 1:1.000 zu der Suspension mit den Langerhans-Inseln gegeben. Die Proben wurden bei Raumtemperatur für 10 Minuten



lichtgeschützt inkubiert. Kurz vor der dann folgenden mikroskopischen Auswertung wurden zu jeder Probe 10 µL PI-Lösung gegeben. Die mikroskopische Auswertung erfolgte bei Durchlicht und bei Fluoreszenzlicht der Wellenlänge 488 nm (Olympus BX 50 der Fa. Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) und einem Bandpassfilter von 530 nm. Von den so gefärbten Inselzellen wurden bei 20-facher Vergrößerung mit Hilfe der analySIS-Software (Fa. Olympus Deutschland GmbH) mit der digitalen Kamera Color-View 12 (Fa. SIS, Stuttgart) Aufnahmen im Durchlicht wie auch mit Fluoreszenzlicht gemacht.

### **3.4 Kulturbedingungen**

#### **3.4.1 Kultur vor Zugabe der extrazellulären Matrixproteine und vor Nanoverkapselung**

Nach Reinigung und Bestimmung ihrer Vitalität wurden die Inselzellen in Kulturflaschen (Nunc Flasks Nunclon™Δ, Fa. Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold) im Brutschrank der Fa. NuAire Inc. (US Autoflow CO<sub>2</sub> Water-Jacketed Incubator NU 4500 E, Plymouth, USA) bei 24°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Kulturmedium war HAM's F-12 (Fa. Cell Concepts) mit Zusatz von 10 % FCS (engl. *Fetal Calf Serum*), 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % L-Glutamin, 1 % Amphotericin B (alle Fa. Cell Concepts) und 50 mM Nicotinamid (Fa. Sigma-Aldrich). Die Langerhans-Inseln wurden 24 Stunden in diesem Medium kultiviert, um ihnen Zeit zur Regeneration nach den enzymatischen und mechanischen Belastungen der Isolierung zu gewähren. Erst am Tag 0, also dem eigentlichen Versuchsbeginn, wurde das „Regenerations“-Medium gegen HAM's F-12 mit allen o. g. Zusätzen, einschliesslich der extrazellulären Matrixproteine, ausgetauscht. Dieses Medium wurde während der Versuchsdurchführung nicht gewechselt. Langerhans-Inseln, die mit Polyelektrolyten nanoverkapselt wurden, wurden nach der Isolierung zunächst 3 Tage in HAM's F-12 mit den o. g. Zusätzen kultiviert, ehe sie mit den Polyelektrolyten nanoverkapselt wurden. Das Kulturmedium HAM's F-12 mit den o. g. Zusätzen wurde alle 3 Tage gewechselt.

### 3.4.2 Kultur mit extrazellulären Matrixproteinen und Nanoverkapselung

In einer ersten Untersuchung wurde der Einfluss der extrazellulären Matrix auf die porzinen Langerhans-Inseln untersucht, in einer zweiten das Verhalten von Langerhans-Inseln, die zuvor mit Polyelektrolyten beschichtet (nanoverkapselt) wurden.

#### 3.4.2.1 Extrazelluläre Matrixproteine

Folgende ECMP wurden untersucht: Kollagen IV, Laminin und Fibronectin. Kollagen IV (Typ IV, gewonnen aus menschlicher Plazenta, Fa. Sigma-Aldrich) wurde im Verhältnis 1 mg/mL in 0,05 M HCl gelöst. Diese 0,05 M HCl-Lösung wurde durch zwanzigfaches Verdünnen einer 1 M HCl-Lösung (Fa. Merck, Darmstadt) gewonnen. Laminin (gewonnen aus menschlicher Plazenta, Fa. Sigma-Aldrich) wurde im Verhältnis 1:9 in HAM's F-12 mit den o. g. Zusätzen gelöst. Fibronectin (löslich, gewonnen aus menschlicher Plazenta, Fa. Sigma-Aldrich) wurde im Verhältnis 1 mg/mL in HAM's F-12 mit den o. g. Zusätzen gelöst. Diese Lösungen wurden bei 4°C bis zu ihrer weiteren Verwendung gelagert. Entweder wurde

- nur Fibronectin (F) oder
- die Kombination aus Kollagen IV und Laminin (C+L) oder
- die Kombination aus Kollagen IV, Laminin und Fibronectin (C+L+F) untersucht.

Von der Kollagen IV- und der Laminin-Lösung wurden jeweils 200 µL, von der Fibronectin-Lösung 300 µL zu jeder 7 mL-fassenden HAM's F-12-Kultur gegeben.

#### 3.4.2.2 Nanoverkapselung mit Polyelektrolyten

In einer zweiten Versuchsreihe wurden sogenannte Nanokapseln, also Kapseln, die aus verschiedenen Schichten von Polyelektrolyten bestehen, und die sich eng an die Langerhans-Inseln anlagern – die aber nicht mit den Alginate-Mikrokapseln verwechselt werden dürfen – untersucht. Es wurden zwei unterschiedliche Nanokapseln verwendet, die aus folgenden Materialien bestanden: Chitosan MMW (engl. *Chitosan Medium Molecular Weight*), PEGPPGPEG (engl. *Poly(Ethylene Glycol)-Block-Poly(Propylene Glycol)-Block-Poly(Ethylene Glycol)*), PAAMA (engl. *Poly(Acrylic Acid-Co-Maleic Acid) Sodium Salt*) und PAH 15 kDa (engl. *Poly(Allylamine Hydrochloride) 15 kDa*) (alle Fa. Sig-

ma-Aldrich). Zwei unterschiedliche Nanokapseln wurden aus diesen Polyelektrolyten hergestellt:

- die erste Nanokapsel mit den Schichten (von innen nach aussen) Chitosan MMW, PEGPPGPEG, Chitosan MMW (kurz CPC genannt) und
- die zweite Nanokapsel mit den Schichten (von innen nach aussen) Chitosan MMW, PAAMA und PAH 15 kDa (kurz CPP genannt).

Die Polyelektrolyte lagen in Pulverform vor; sie wurden zu einer Endkonzentration von 2 mg/mL in HBSS gelöst, mit einem pH-Wert zwischen 7,0 und 7,8. Die so vorbereiteten Polyelektrolyte wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Um die Kapseln später fluoreszenzmikroskopisch darzustellen, wurden neben einfachen Polyelektrolyten auch solche verwendet, an die ein Fluoreszenzfarbstoff kovalent gebunden war. Dabei wurde für die Herstellung der äusseren Schicht an Stelle des herkömmlichen Polyelektrolyts ein an FITC (Fluoreszeinisothiocyanat) gekoppelter Polyelektrolyt verwendet. Bei Anregung durch Licht der Wellenlänge 488 nm fluoreszieren diese Polyelektrolyte; auf diese Weise sollte die Nanokapsel sichtbar gemacht werden.

Für die Nanokapsel CPC mit Fluoreszenzfarbstoff (CPC\*) wurde als äussere Schicht FITC-gekoppeltes Chitosan MMW benötigt. Dieses wird in einer 2-Phasen-Reaktion hergestellt: Chitosan MMW wurde in H<sub>2</sub>O gegeben, und nach 24 h bei Raumtemperatur mit in DMSO (Dimethylsulfoxid, Fa. Sigma-Aldrich) gelöstem FITC (FluoroTag™ FITC Conjugation Kit, Fa. Sigma-Aldrich) versetzt. Nach 1 Stunde Inkubation wurde das feste Chitosan MMW zehnmal mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Das nun an FITC gekoppelte Chitosan MMW wurde lichtgeschützt in einem Eppendorfgefäss (1,5 mL, Fa. Eppendorf, Hamburg) bis zur weiteren Verwendung gelagert. Vor der Verkapselung wurde HBSS zugegeben, und der Überstand nach 24 h Inkubation für Experimente verwendet.

Für die Nanokapsel CPP mit Fluoreszenzfarbstoff (CPP\*) wurde als äussere Schicht FITC-gekoppeltes PAH 15 kDa (Fa. Sigma-Aldrich) benötigt. Diese Lösung musste vor ihrer Verwendung im Verhältnis 1:10 mit dem zuvor angesetzten PAH 15 kDa verdünnt werden, da die Fluoreszenz sonst zu intensiv war.

Bei beiden Polyelektrolyt-Lösungen wurde nach ihrer Fertigstellung der pH-Wert gemessen und auf Werte zwischen 7,0 und 7,8 eingestellt. Danach wurden sie bei 4°C lichtgeschützt bis zur weiteren Verwendung gelagert.

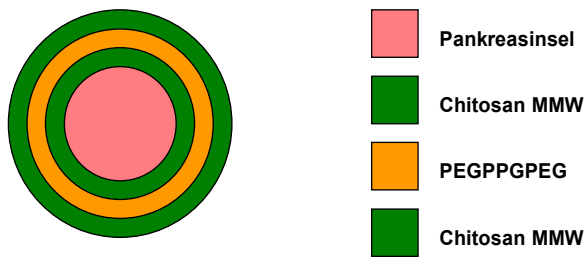
### **Technik der Nanoverkapselung**

Die Nanoverkapselung erfolgte anhand der *Layer-by-Layer*-Technik [77]. Bei der LbL-Technik werden die Schichten der Nanokapsel von innen nach aussen nacheinander auf die Langerhans-Inseln aufgebracht. Die in Lösung befindlichen Polyelektrolyte lagern sich an die peripheren Zellen der Langerhans-Inseln, bzw. an die zuvor bereits aufgetragenen Polyelektrolyte an, und bilden so eine mehrschichtige, eng anliegende Kapsel um die Langerhans-Insel herum. Die dabei wirkende Kraft ist die elektrostatische Anziehung. Dabei ziehen sich Zelloberfläche und erste Schicht der Polyelektrolyt-Nanokapsel, beziehungsweise danach die Schichten der Polyelektrolyt-Nanokapsel untereinander aufgrund ihrer gegensätzlichen Ladungen an. Bei der Wahl der Schichten muss also darauf geachtet werden, dass die verwendeten Polyelektrolyte abwechselnd positiv und negativ geladen sind, wobei mit einer positiv geladenen Schicht begonnen werden muss, die auf die negativ geladene Zellmembran der Inselzellen aufgebracht wird. Die Menge der an die Inselzellen oder an die vorhergehende Schicht gebundenen Polyelektrolyte wird durch die Überkompensation der Ladung begrenzt. Das heisst, sobald die entstehende Schicht der Kapsel dieselbe Ladung hat wie die Polyelektrolyte, die für ihre Herstellung verwendet werden, werden keine weiteren Polyelektrolyte mehr gebunden. Es wird mit Polyelektrolyten im Überschuss gearbeitet, was bedeutet, dass sich nach der Fertigstellung einer Schicht noch Polyelektrolyte in der Lösung befinden. Diese müssen durch mehrere Waschschriffe entfernt werden. Prinzipiell können Nanokapseln mit beliebig vielen Schichten hergestellt werden. In den hier beschriebenen Versuchen besteht eine Nanokapsel aus 3 Schichten. Die verwendeten Polyelektrolyte sind von innen nach aussen:

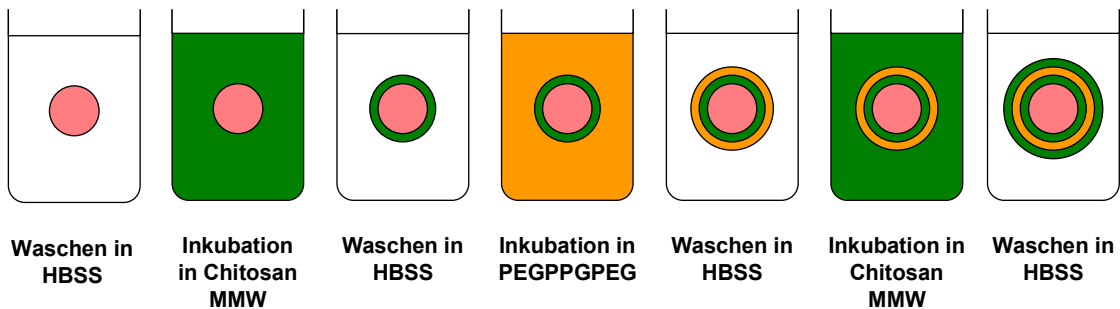
- Chitosan MMW, PEGPPGPEG und Chitosan MMW bei der Nanokapsel CPC, und
- Chitosan MMW, PAAMA und PAH 15 kDa bei der Nanokapsel CPP.

Das Prinzip der Nanoverkapselung ist in **Abb. 1** schematisch dargestellt und wird im Folgenden detailliert beschrieben.

## Die Schichten der Nanokapsel CPC



## Herstellung der Nanokapsel CPC



**Abb. 1:** Schematische Darstellung des Aufbaus und der Herstellung der Polyelektrolyt-Nanokapseln – hier am Beispiel der Nanokapsel CPC. Im oberen Teil wird die fertige Nanokapsel mit den drei eng anliegenden Polyelektrolytschichten gezeigt, im unteren Teil die einzelnen Schritte der LbL-Technik mit den jeweiligen Waschschritten.

Am Tag der Nanoverkapselung wurden die Langerhans-Inseln zunächst zweimal in HBSS gewaschen: Dazu wurden sie in ein 15 mL-fassendes Falcon-Röhrchen (BD Falcon™ Conical Tube, Fa. BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) überführt und wiederholt durch vorsichtiges Aufschwemmen, Sedimentieren und Verwerfen des Überstandes gewaschen.

Nach dem Waschen wurde die erste Schicht der Polyelektrolyt-Nanokapsel aufgebracht: Zu den sedimentierten Langerhans-Inseln wurde die Polykationlösung für die erste Schicht hinzugegeben; in beiden Fällen handelt es sich um Chitosan MMW. Nach vorsichtigem Aufschwemmen der Inselsuspension in der Polykationlösung wurde den Polykationen 13 Minuten Zeit für ihre Bindung an die Langerhans-Inseln gegeben. In dieser Zeit sedimentierten die Langerhans-Inseln auf den Boden des Reaktionsgefäßes. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, und es folgten zwei weitere Waschschriffe, wie oben beschrieben. Wie schon die erste Schicht, wurde auch die zweite Schicht der Nanokapsel, aus Polyanionen bestehend, aufgebracht. Bei der Kapsel

CPC handelte es sich um PEGPPGPEG, bei der Kapsel CPP um PAAMA. Auch nach diesem Schritt wurde 2x mit HBSS gewaschen. Schliesslich wurde die dritte Schicht, wiederum aus Polykationen bestehend, aufgebracht. Bei der Kapsel CPC handelte es sich um Chitosan MMW, bei der Kapsel CPP um PAH 15 kDa. Zusätzlich wurde bei beiden Nanokapseln je ein Ansatz mit einer FITC-gekoppelten äusseren Schicht hergestellt; die weiteren Inkubationsschritte erfolgten lichtgeschützt. Nach dem Aufbringen der 3. Schicht wurden die nanoverkapselten Langerhans-Inseln 2x gewaschen und sodann in Kultur gegeben.

### **3.5 Fluoreszenzmikroskopie von Nanokapseln mit Fluoreszenzfarbstoff**

An den Tagen +1, +6 und +13 nach Nanoverkapselung wurden von den Langerhans-Inseln digitale Bilder bei Durchlicht und bei Fluoreszenzlicht angefertigt (20-fache Vergrößerung; Fluoreszenzmikroskop BX50; analySIS-Software; digitale Kamera Color-View 12; Fluoreszenzlicht der Wellenlänge 488 nm; Bandpassfilters von 530 nm; Belichtungszeit der Fluoreszenzbilder 1.000 ms). Mit der Bildbearbeitungssoftware Microsoft Office PowerPoint wurden Farbton und Kontrast der Durchlichtbilder verbessert, sonst wurden keine Änderungen an den Bildern durchgeführt.

### **3.6 Stimulation der Langerhans-Inseln mit Glukose (Perifusion)**

Die Perifusion der Inselzellen diente dem Nachweis ihrer Funktion. Es wurde die Sekretionsdynamik der Inselzellen – mit und ohne ECMP beziehungsweise nach Nanoverkapselung mit Polyelektrolyten – auf einen Glukose-Stimulus hin untersucht. Im Folgenden werden zunächst die verwendeten Medien beschrieben, sodann ein Überblick über die Perifusionsanlage gegeben und anschliessend die praktische Durchführung der Perifusion erläutert. Dr. A. Kerscher hat die Perifusionskammer und -apparatur entwickelt [105] und sie für diese Untersuchungen freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

#### **3.6.1 Perifusionsmedien**

##### **3.6.1.1 Krebs-Ringer-Lösung**

Zur Herstellung der Krebs-Ringer-Lösung (KRL) wurden in 1.000 mL Reinstwasser (Milli-Q® Synthesis A10, Fa. Millipore, Billerica, USA) die folgenden Salze gelöst:

6,721 g NaCl, 350,4 mg KCl, 163,3 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 295,8 mg MgSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O (alle Fa. Merck) und 376 mg CaCl<sub>2</sub> (Fa. Sigma-Aldrich). Danach wurden 1,68 g NaHCO<sub>3</sub> (Fa. Merck) und 10 mL 1 M HEPES-Puffer (Fa. Cell Concepts) dazugegeben. Der pH-Wert lag zwischen 7,2 und 7,4. Die KRL war die Stammlösung für die Perifusion und bildete die Grundlage für alle in der Perifusion verwendeten Lösungen. Für die Perifusion von zwei Kammern (s. u.) wurden 500 mL KRL benötigt, aus der alle übrigen Perifusionsmedien angesetzt wurden. Dazu wurde zunächst noch BSA (Bovines Serumalbumin, Fa. Serva, Heidelberg) in der Konzentration 1 mg/mL der KRL hinzugefügt.

### 3.6.1.2 Stimulationsmedien

In jeder Perifusion wurden die Langerhans-Inseln mit zwei verschiedenen Medien stimuliert. Wenn nicht anders beschrieben, gilt folgender Ablauf:

- Bei den Versuchen mit den ECMP handelt es sich um eine hochmolare Glukose-Lösung (20 mM), zusätzlich wurde mit 20 mM KCl-Lösung stimuliert, um die Langerhans-Inseln zur Insulin-Freisetzung anzuregen.
- Bei den Versuchen mit den Polyelektrolyt-nanoverkapselten Langerhans-Inseln handelt es sich um eine niedrigmolare (3 mM) und eine hochmolare (20 mM) Glukose-Lösung.

Vor und nach den Stimulationsphasen wurden die Langerhans-Inseln mit KRL + BSA perifundiert. **Abbildung 2** zeigt die verschiedenen Schritte der mehrstündigen Perifusion, die verwendeten Stimulationsmedien und die Perifusionszeiten.

#### Versuchsreihe mit ECMP:

KRL+BSA	KRL+BSA	Glukose 20mM	KRL+BSA	KCl 20mM	KRL+BSA
0	20	40	60	80	100
120 Minuten					

#### Versuchsreihe mit Polyelektrolyt-nanoverkapselten Inseln:

KRL+BSA	KRL+BSA	Glukose 3mM	KRL+BSA	Glukose 20mM	KRL+BSA
0	20	40	60	80	100
120 Minuten					

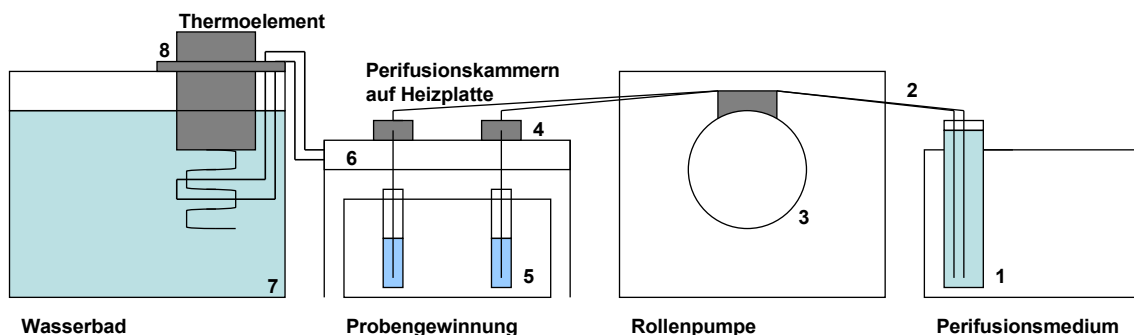
**Abb. 2:** Experimenteller Aufbau der Perifusion von porzinen Langerhans-Inseln in unterschiedlich konzentrierten Glukose-Lösungen und in 20 mM KCl-Lösung. Die Inselzellen werden vor der Perifusion entweder mit ECMP im Medium kultiviert oder mit Polyelektrolyten nanoverkapselt.

Pro Perfusionskammer wurden jeweils 50 mL Stimulationsmedium benötigt:

- Für die Stimulation mit 3 mM Glukose wurden 27 mg D(+)-Glukose (Fa. Merck) in 50 mL KRL+BSA gelöst,
- für die Stimulation mit 20 mM Glukose wurden 180 mg D(+)-Glukose in 50 mL KRL+BSA gelöst und
- für die Stimulation mit 20 mM KCl wurden 329  $\mu$ L KCl (3 M, Fa. VWR International GmbH, Darmstadt) in 50 mL KRL+BSA gelöst.

### 3.6.2 Perfusionskammer und Zubehör

Im Folgenden werden die Perfusionskammer und das notwendige Zubehör beschrieben. **Abbildung 3** stellt den Aufbau der Perfusionsapparatur schematisch dar.



**Abb. 3:** Schematische Anordnung der Perfusionsapparatur: Während der Perfusion wird das Medium (1) über ein Schlauchsystem (2) und eine Rollenpumpe (3) in die Perfusionskammer transportiert. Das Medium umspült die Langerhans-Inseln in der Perfusionskammer (4), wird sodann aus der Perfusionskammer gespült und in einem Probengefäß (5) aufgefangen. Es können mehrere Perfusionskammern gleichzeitig betrieben werden. Sie bestehen aus Edelstahl und liegen auf einer Heizplatte (6), die über ein Schlauchsystem, das aus einem beheizten Wasserbad (7) kommt, beheizt wird. Die Temperatur des Wasserbades wird über ein Thermoelement (8) gesteuert. Verwendung der Perfusionsanlage mit freundlicher Genehmigung von Dr. A. Kerscher [105].

#### 3.6.2.1 Perfusionskammer

Die Langerhans-Inseln befinden sich während der Perfusion in der Perfusionskammer, bzw. in mehreren Perfusionskammern (**Abb. 4**), die gleichzeitig betrieben werden können. Sie sind rund, bestehen aus einem Bodenteil und einem Deckel aus Edelstahl. Beide Teile haben eine zentrale Bohrung mit einem Durchmesser von 8 mm, die jeweils



mit einem Stück Plexiglas verschlossen werden; so entstehen 2 Fenster. Am oberen Teil der Kammer sind zwei zuführende Schläuche befestigt, die mit einem Adapter mit Injektionsmembran (IN-Stopper, Fa. B. Braun, Melsungen) enden. An diese kann jeweils ein Schlauch über eine Kanüle (Sterican® 1,10 x 30 mm, Fa. B. Braun) angeschlossen werden. Vom Unterteil der Kammer führt ein Schlauch weg, der mit einer Kanüle endet. In eine Vertiefung des Unterteils wird ein Gummiring (Aussendurchmesser 13 mm) gelegt. Wird nun der obere Teil mit Hilfe von drei Schrauben an dem unteren Teil der Perifusionskammer befestigt, entsteht in ihrer Mitte ein Hohlraum. Dieser ist luft- und wasserdicht verschlossen und mit dem Äusseren nur über die drei Schläuche verbunden. Während der Perifusion befinden sich hier die Langerhans-Inseln, die innerhalb der Kammer noch auf einem wasserdurchlässigen Gazefilter liegen, welcher vom O-Ring gehalten wird.

**Abb. 4:** Aufbau der Perifusionskammer. Auf das Unterteil aus Edelstahl (1) werden ein Gummiring (2) und ein Gazefilter (3) gelegt; der obere Teil der Kammer (4) wird mit 3 Schrauben (5) am unteren Teil befestigt. Der obere Teil der Kammer hat 2 zuführende Schläuche mit Adapter (6), der untere Teil einen ableitenden Schlauch (7). Verwendung der Perifusionskammern mit freundlicher Genehmigung von Dr. A. Kerscher [105].

### 3.6.2.2 Heizplatte und Wasserbad

Die Kammern liegen während der Perifusion auf einer Heizplatte (1), die aus Aluminiumteilen (Dicke 2 mm, Baufachmarkt Obi, Würzburg) aufgebaut ist. Die Heizplatte mit den Kammern liegt als Brücke in einem modifizierten Perifusionsgerät (Suprafusion 1.000, Fa. Brandel, USA). Auf der Heizplatte liegen die Kammern über einem Plastikständer, in dem die Plastikröhrchen zum Auffangen der Perifusionsflüssigkeit stehen. Die Heizplatte wird über ein Schlauchsystem mit Hilfe eines Wasserbades (006 T, Fa. Lauda, Lauda-Königshofen) mit Thermoelement (Ecoline E200, Fa. Lauda) auf 37,5°C erwärmt. Ausserdem dient das Wasserbad dazu, die Perifusionslösungen vor ihrer Verwendung auf 37,5°C zu erwärmen.

### **3.6.2.3 Schlauchrollenpumpe**

Zu jeder Perifusionskammer führt ein Schlauch, in dem das Perifusionsmedium transportiert wird. Die Schläuche führen über eine Rollenpumpe (MCP Standard, Fa. Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld), welche den Vorschub für das Medium liefert. Die pro Zeiteinheit beförderte Menge der Flüssigkeit kann durch Regulieren der Pumpgeschwindigkeit von 0,1 bis 200 mL/h eingestellt werden.

### **3.6.2.4 Schlauchsysteme**

Die Verbindung zwischen dem Perifusionsmedium in den Falcon-Röhrchen und den Perifusionskammern besteht aus einem System aus mehreren Schläuchen (Tygon LFL, Fa. Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH) mit einem Innendurchmesser von 0,27 mm. Untereinander sind die Schläuche über Metallröhrchen verbunden. Das eine Ende des Schlauchsystems, welches das Perifusionsmedium aufnimmt, ist offen. Das andere Ende, das zur Perifusionskammer führt, trägt eine Kanüle, über die dieser Schlauch mit dem zuführenden Schlauch der Perifusionskammer (**s. Abb. 4; Punkt 6**) verbunden wird.

### **3.6.2.5 Einwegartikel**

Die für die Perifusion verwendeten Lösungen wurden in Falcon-Röhrchen (BD Falcon™ Conical Tubes, 50 mL, Fa. BD Biosciences) abgefüllt, in den Plastikständer im Wasserbad gestellt und auf 37,5°C erwärmt. Die während der Perifusion gewonnenen Mediumproben werden in 5 mL-Plastikröhrchen (Fa. Sarstedt, Nürnbrecht) aufgefangen, in Eppendorfgläsern portioniert, beschriftet und bei -20°C bis zur Insulinbestimmung tief gefroren.

## **3.6.3 Durchführung der Perifusion**

Alle Perifusionslösungen wurden – wie oben beschrieben – im Wasserbad vorgewärmt; ebenso die Perifusionskammern – noch unverschlossen – auf der Heizplatte beheizt. Alle Schläuche wurden vor der Perifusion mit KRL durchgespült, um sie von restlicher Reinigungslösung – falls vorhanden – zu befreien und um ihre Durchgängigkeit zu prüfen. Für jede Perifusionskammer wurden 1.000 Inseläquivalente (IEQ) benötigt. Aus jeder Kulturflasche mit Langerhans-Inseln wurden 2x 50 µL Zellsuspension entnommen;

diese wurde in eine Multiwellplatte pipettiert und die IEQ bei 5-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop (Axiovert 40C, Fa. Carl Zeiss AG, Jena) ausgezählt. Der Durchmesser der Langerhans-Inseln bildete die Basis für die Berechnung der jeweils benötigten IEQ-Anzahl pro Perifusionskammer.

Aus jeder Kulturflasche wurde die zuvor berechnete Anzahl Langerhans-Inseln entnommen und in ein Eppendorfgefäß übertragen. Die Langerhans-Inseln sedimentierten bei Raumtemperatur, der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und die Langerhans-Inseln in möglichst kleinem Mediumvolumen in die Perifusionskammer überführt. Nacheinander wurden die Perifusionskammern mit den Langerhans-Inseln bestückt. Das Überführen der Langerhans-Inseln auf den Gazefilter in den Kammern erfolgte mit einer Glaspipette. Der Einschluss von Luftblasen in die Inselsuspension war in jedem Fall zu vermeiden. Anschliessend wurden oberer und unterer Teil der Kammer über die 3 Schrauben (s. o.) miteinander verbunden und auf die Heizplatte gelegt.

Nach Verbinden aller Perifusionsteile wurde die Perifusion mit einer Durchlaufgeschwindigkeit von 1 mL/min gestartet. Begonnen wurde mit der KRL+BSA nach dem in **Abb. 2** gezeigten Schema. Nach den ersten 2 Minuten wurde geprüft, ob sich unter den Deckgläschen (Fenstern) der Perifusionskammern Luftblasen gebildet hatten. War dies der Fall, wurden sie mit einer 1 mL-Einmalspritze (Omnifix F, Fa. B. Braun) aus dem zweiten blind verschlossenen Schlauch des Oberteils der Perifusionskammer abgezogen. Anschliessend wurde die Perifusion fortgesetzt. Die Perifusionsflüssigkeit der ersten 5 Minuten wurde verworfen. Sodann wurde von der perfundierten KRL + BSA alle 5 Minuten eine Probe gewonnen und wie oben beschrieben für die spätere Insulinbestimmung prozessiert (**s. Abb. 2**).

Nach 40 Minuten wurde die Perifusion kurz für den Wechsel des Perifusionsmediums gestoppt. Beim ersten Stimulationsmedium (3 bzw. 20 mM Glukose, **s. Abb. 2**) wurde 5 Minuten lang jede Minute eine neue Probe gewonnen, danach dreimal alle 5 Minuten. Nach diesem Zeitablauf erfolgte auch die Probengewinnung bei den dann folgenden Perifusionsschritten. Immer wenn das Perifusionsmedium gewechselt wurde, wurde die Perifusion gestoppt, um das Ansaugen von Luftblasen in die Schläuche und Kammern zu verhindern.

Nach Gewinnung von ca. 8 Proben wurden diese in die vorbereiteten Eppendorfgläser pipettiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tief gefroren. Nach dem Ende der Perfusion wurden die Schläuche und Kammern mit 70 %igem Ethanol und Reinstwasser gespült.

### **3.7 Insulinbestimmung**

Der Insulingehalt der Perifusionsproben wurde mit dem ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) bestimmt. Verwendet wurden 2 verschiedene nicht-kompetitive Assays: Überwiegend wurde ein im Rahmen einer früheren Dissertation im eigenen Labor entwickelter ELISA (im Folgenden Labor-ELISA genannt) verwendet [105]. Die Überprüfung der Messgenauigkeit dieses Labor-ELISA erfolgte mit einem kommerziellen ELISA (Fa. Biosource, Camarillo, USA), im Folgenden Biosource-ELISA genannt.

#### **3.7.1 Labor-ELISA**

Im Folgenden wird der Labor-ELISA für eine 96-Well-Platte (Fa. Nunc GmbH & Co. KG) beschrieben. Wenn nicht anders vermerkt, wurden in jedem Versuchsschritt 100  $\mu\text{L}$  der jeweiligen Versuchslösung in jedes Well der Platte pipettiert, sodann folgte eine 1-stündige Inkubation bei Raumtemperatur. Als Waschlösung diente PBS-Tween-Lösung: 10 PBS-Tabletten (Fa. Oxoid Ltd, Hampshire, UK) und 500  $\mu\text{L}$  Tween® 20 (Fa. Sigma-Aldrich) wurden in 1 L Reinstwasser gelöst. Hiermit wurden die Platten nach jedem Inkubationsschritt 3x im ELISA-Washer (Fa. Dynatech Medical Products Ltd., Guernsey, GB) gewaschen, um ungebundene Substanzen zu entfernen. Einen Tag vor Beginn des Labor-ELISA wurden 31,5  $\mu\text{L}$  des Maus-anti-human-Insulin Antikörpers (Fa. Biomedicals AG, Augst, Schweiz) in 10,5 mL 50 mM  $\text{NaHCO}_3$  gelöst, die 96-Well-Platten damit beschichtet und inkubiert ( $4^{\circ}\text{C}$  über Nacht). Am folgenden Tag wurden, um freie Adhäsionsstellen für Proteine zu blockieren, in jedes Well 300  $\mu\text{L}$  PBS-Tween-BSA-Lösung pipettiert (10 mg BSA/mL PBS-Tween-Lösung). Die Standardlösungen zur Berechnung der Insulinkonzentrationen wurden mit Reinstwasser angesetzt. Insulin-Konzentrationen (Standardlösungen) waren bei den ersten Versuchen: 0, 6, 14,4, 40, 119 und 310  $\mu\text{IU/mL}$ , später wurde mit 0, 5,1, 13,8, 44,4, 128 und 324  $\mu\text{IU/mL}$  (alle Fa. Biosource) gearbeitet. Die mit Standardlösungen und den mit PBS verdünnten Proben belegte Platte wurde zwei Stunden inkubiert. Primärantikörper zur Detektion des Insulins war "Guinea Pig-anti-Insulin" (Fa. Dako Deutschland GmbH, Hamburg), von

diesem wurden 12,5 µL in 10,5 mL PBS-Tween-BSA-Lösung gelöst. Der nächste Schritt war das Aufbringen der Sekundärantikörperlösung, dafür waren 1 µL “Horseradish Peroxidase Conjugated Affinity Purified anti-Guinea Pig” (Fa. Rockland, Gilbertsville, USA) in 10,5 mL PBS-Tween-BSA gelöst worden. Die an den Sekundärantikörper gebundene *Horseradish Peroxidase* (HRP) wandelte das ABTS der Farbstoffentwicklungslösung (15 mg ABTS (Fa. Sigma-Aldrich) in 10,5 mL 0,1 M Citratpuffer (Fa. Merck) gelöst, danach Zugabe von 10 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fa. Merck)) in eine fluoreszierende Form um. Im ELISA-Reader (Fa. Dynatech Medical Products Ltd.) wurde die Menge des Farbstoffes bei Licht der Wellenlänge 405 nm gemessen. Anhand der Menge des Farbstoffes, der bei den Standardlösungen mit bekannten Insulinkonzentrationen gemessen wurde, berechnete die Software Biolinx2 (Fa. Dynatech Laboratories Inc., Chantilly, USA) eine sigmoide Standardkurve, mit deren Hilfe der Insulingehalt der Proben bestimmt wurde.

### **3.7.2 Biosource-ELISA**

Alle Lösungen und Antikörper für den Biosource-ELISA wurden gemäss mitgelieferter Anleitung angesetzt. Zur Durchführung des Biosource-ELISA: Je 50 µL der Standardlösungen und verdünnten Proben wurden in ein Well der 96-Well-Platte pipettiert. Sodann wurde der HRP-konjugierte Anti-Insulin-Antikörper hinzugefügt. Nach der 30-minütigen Inkubation und 3x Waschen wurden in jedes Well 200 µL Chromogen-Lösung hinzugefügt. Die Farbstoffentwicklung wurde nach einer 15-minütigen Inkubation durch Zugabe von 50 µL Stopplösung je Well beendet. Innerhalb einer Stunde wurde die Farbstoffmenge bei 450 nm im ELISA-Reader gegen einen Referenzfilter von 650 nm gemessen. Mit der Biolinx2-Software wurde die Standardkurve berechnet, anhand derer der Insulingehalt der Proben ermittelt wurde.

## **4 Ergebnisse**

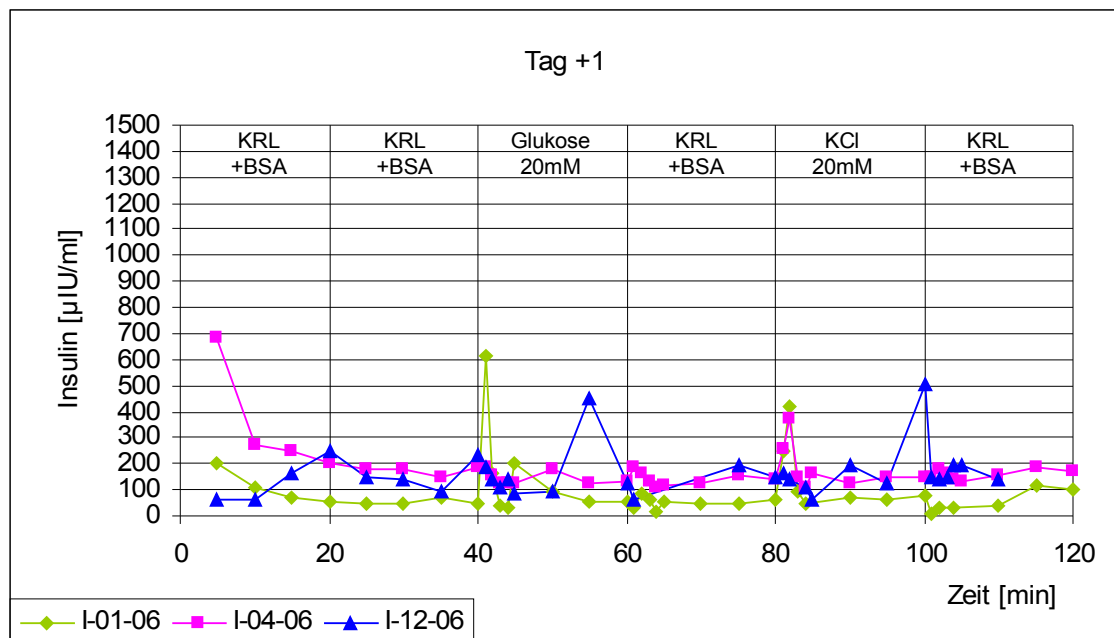
### **4.1 Perifusion von Langerhans-Inseln nach Zusatz von extrazellulären Matrixproteinen zum Kulturmedium**

Hierfür wurden 4 unterschiedliche Präparationen von porzinen Langerhans-Inseln verwendet: I-01-06, I-04-06 und I-12-06, die I-08-06 nur in einem ergänzenden Versuch.

Die 4 Inselzell-Präparationen stammten von unterschiedlichen Spendertieren, alle übrigen Parameter waren identisch. Die mittels Dithizon-Färbung bestimmte Reinheit der Inselzellen betrug in allen 4 Präparationen 90-95 %, die mittels FDA/PI-Färbung bestimmte Vitalität 85-90 %.

#### 4.1.1 Kultur und Perfusion ohne extrazelluläre Matrixproteine

Unmittelbar nach der Isolierung begann die Kultur der Langerhans-Inseln in HAM's F-12-Medium. Perfusionen nach Stimulation mit 20 mM Glukose erfolgten am Tag +1 und Tag +6, jeweils von der 40. bis zur 60. Minute. Die Langerhans-Inseln sollten hierauf mit einer erhöhten Insulin-Ausschüttung reagieren. Zugabe von 20 mM KCl zur Inselzell-Kultur sollte die maximale Insulin-Ausschüttung provozieren.

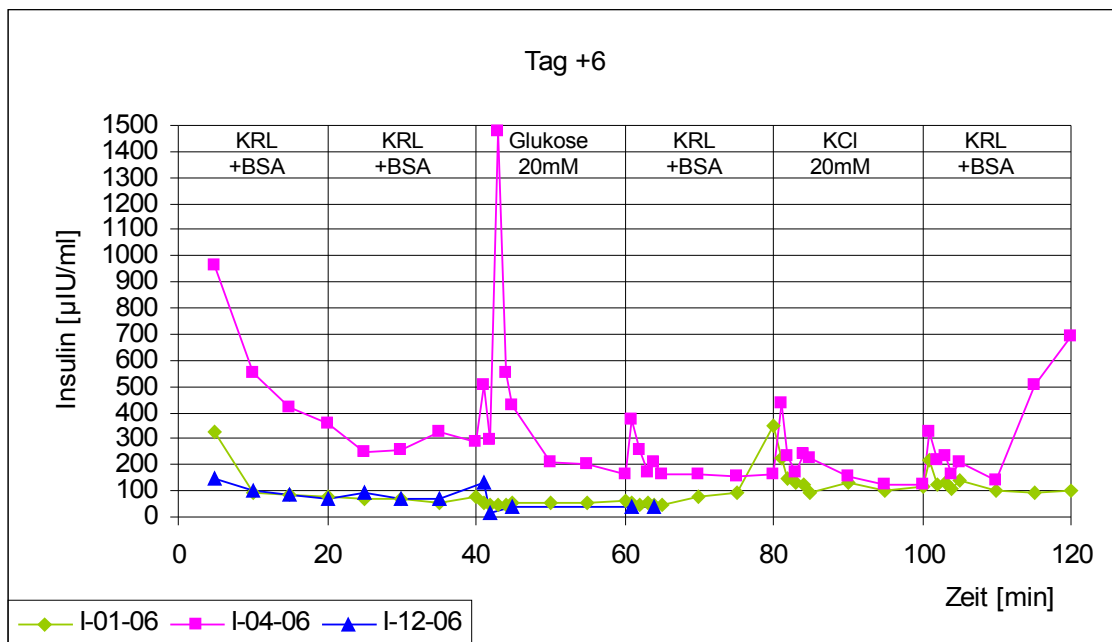


**Abb. 5:** Perfusion isolierter porziner Langerhans-Inseln, die ohne extrazelluläre Matrixproteine kultiviert wurden; Tag +1; KRL = Krebs-Ringer-Lösung; BSA = Bovines Serumalbumin; KCl = Kaliumchlorid.

Vor und nach den Stimulationsphasen (mit 20 mM Glukose bzw. 20 mM KCl) wurden die Inselzellen mit dem neutralen Medium KRL+BSA perfundiert, hier wurde eine gleichmässig niedrige Insulin-Basisausschüttung erwartet.

**Abbildung 5** zeigt das Ergebnis der Perfusion für die 3 unterschiedlichen Inselzell-Präparationen und den Tag +1. Danach reagiert lediglich I-01-06 mit einer ca. 10-fachen Insulin-Ausschüttung nach Glukosestimulation; I-12-06 reagiert zeitlich verzögert. Bei

I-04-06 kommt es zu einem Rückgang der Insulin-Ausschüttung. Auf KCl reagieren nur 2 von 3 Präparationen sofort mit gesteigerter Insulin-Ausschüttung, I-12-06 erneut verzögert. **Abbildung 6** dokumentiert das Ergebnis für die Perifusion der 3 Präparationen am Tag +6: Präparation I-01-06, die am Tag +1 eine vergleichsweise hohe Insulin-Ausschüttung nach Glukose- und Kaliumchloridstimuli gezeigt hatte, hat am Tag +6 offenbar ihre Stimulierbarkeit eingebüsst. Präparation I-04-06 zeigt einen sehr viel besseren Kurvenverlauf als am Tag +1; auffällig ist die um den Faktor 5 erhöhte Insulin-Ausschüttung, wenn die Langerhans-Inseln mit 20 mM Glukose stimuliert werden.



**Abb. 6:** Perifusion isolierter porziner Langerhans-Inseln, die ohne extrazelluläre Matrixproteine kultiviert wurden; Tag +6; KRL = Krebs-Ringer-Lösung; BSA = Bovines Serumalbumin; KCl = Kaliumchlorid.

Die Insulin-Messungen für Präparation I-12-06 dagegen brechen in der 64. Minute ab, da die folgenden absoluten Messwerte alle unter der Standardkurve lagen. [Um Mess- und Gerätebedienungsfehler auszuschliessen, wurden die Proben in einem 2. Insulin-ELISA erneut gemessen; in diesem Versuch brach die Kurve bereits in der 61. Minute ab, womit das Ergebnis des 1. Insulin-ELISA bestätigt wurde.]

#### 4.1.2 Kultur und Perifusion mit extrazellulären Matrixproteinen

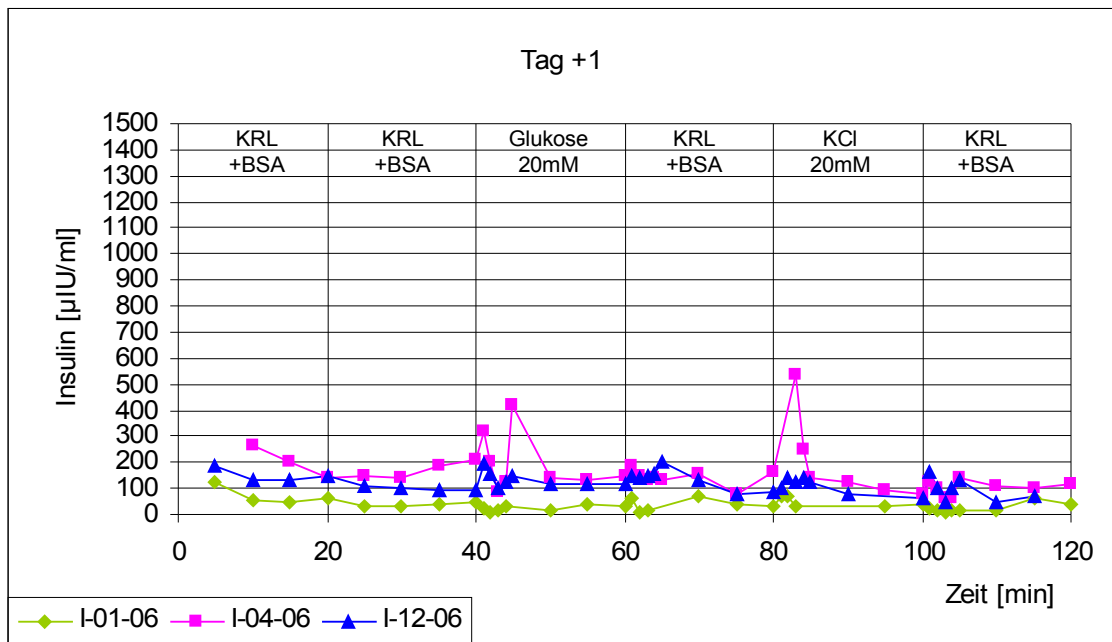
Da die 3 Präparationen sehr unterschiedliche und zugleich sehr unbefriedigende Insulin-Ausschüttungen nach Stimulation mit Glukose gezeigt hatten, was bei identischem Iso-

lierungsverlauf und einwandfreien Perfusionen überrascht, stellt sich die Frage, ob die Kultur der Langerhans-Inseln unter Zusatz von extrazellulären Matrixproteinen ihre Stimulationsfähigkeit verbessern würde. Nagata et al. hatten nämlich gezeigt, dass die Zugabe von ECMP zur Inselzellkultur, im Vergleich zu einer Kontrollkultur ohne ECMP, die Vitalität und Funktion von Ratten-Inselzellen verbesserte [33]. ECMP, die physiologisch im Pankreas vorkommen, sind unter anderem Kollagen IV, Laminin und Fibronectin [29, 32, 36]. Diese ECMP wurden dem Kulturmedium HAM's F-12 hinzugefügt, einmal in der Kombination Kollagen IV + Laminin (C+L) und einmal in der Kombination Kollagen IV + Laminin + Fibronectin (C+L+F). Ergänzend wurde noch Fibronectin allein untersucht.

#### **4.1.2.1 Kultur und Perfusion mit Kollagen IV und Laminin**

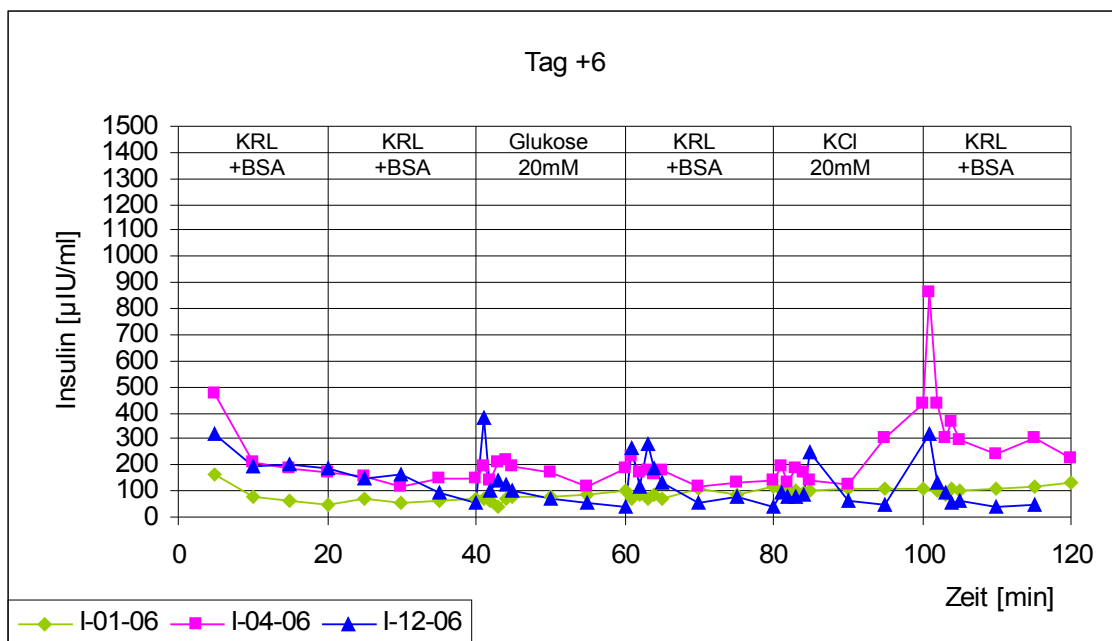
Einem Teil der Inselzell-Kultur der o. g. Präparationen wurden die ECMP Kollagen IV und Laminin hinzugegeben (s. Material und Methoden). 24 Stunden später (Tag +1) erfolgten die Perfusionen dieser ECMP-behandelten Langerhans-Inseln, gleichzeitig mit den Perfusionen der unbehandelten Inselzellen. **Abbildung 7** zeigt das Ergebnis dieses Versuches für den Tag +1: Präparation I-01-06 zeigt einen Rückgang der Insulin-Sekretion nach Stimulation mit Glukose und reagiert nicht auf die KCl-Stimulation. I-04-06 und I-12-06 reagieren auf die Glukose-Stimulation mit einer Verdoppelung der Insulinausschüttung; auf die KCl-Stimulation reagiert nur Präparation I-04-06 mit einer 4-fachen Insulinausschüttung.





**Abb. 7:** Perfusion isolierter porziner Langerhans-Inseln nach Zusatz der extrazellulären Matrixproteine Kollagen IV und Laminin zum Kulturmedium; Tag +1; KRL = Krebs-Ringer-Lösung; BSA = Bovines Serumalbumin; KCl = Kaliumchlorid.

In **Abb. 8** wird das Ergebnis der 3 Perfusionen am Tag +6 dargestellt.



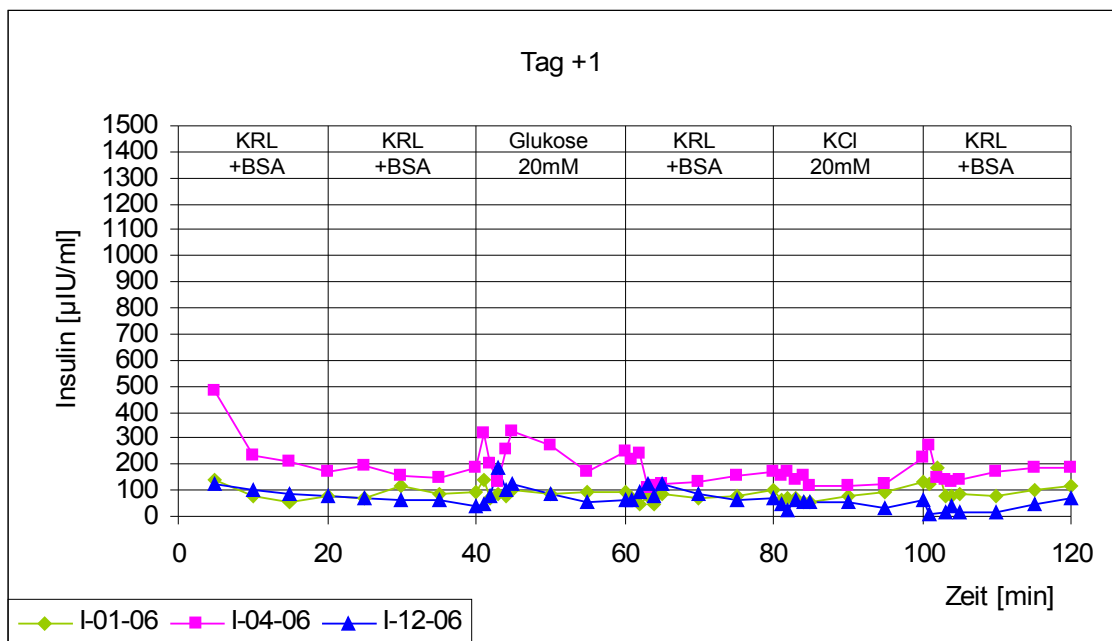
**Abb. 8:** Perfusion isolierter porziner Langerhans-Inseln nach Zusatz der extrazellulären Matrixproteine Kollagen IV und Laminin zum Kulturmedium; Tag +6; KRL = Krebs-Ringer-Lösung; BSA = Bovines Serumalbumin; KCl = Kaliumchlorid.

I-01-06 zeigt, wie schon am Tag +1, keine gesteigerte Insulin-Ausschüttung auf die Stimulation, sondern erneut einen Rückgang der Sekretion nach der Gabe von Glukose.

Präparation I-04-06, die am Tag +1 deutlich auf die beiden Stimuli reagierte, zeigt hier nur einen sehr geringen Anstieg der Insulinausschüttung nach Glukose-Stimulation und einen verspäteten und langsamen Anstieg 10 Minuten nach KCl-Stimulation. I-12-06 hingegen reagiert deutlich stärker als am Tag +1 und zeigt eine 6-fache Insulinausschüttung nach Glukose-Stimulation und auch nach KCl-Stimulation, hier allerdings um 5 Minuten verzögert. Unerwartet ist, dass die Insulinausschüttung nach Überführung der Langerhans-Inseln in das „neutrale“ Medium KRL + BSA um den Faktor 6 ansteigt.

#### 4.1.2.2 Kultur und Perifusion mit Kollagen IV, Laminin und Fibronektin

Im folgenden Experiment wurden die beiden ECMP Kollagen IV und Laminin um das ECMP Fibronektin erweitert. Ansonsten waren die Insel-Präparationen, Kultur- und Perifusionsbedingungen mit den vorherigen Versuchen identisch. Die Ergebnisse der Perifusionen für den Tag +1 sind in **Abb. 9** zusammengefasst.

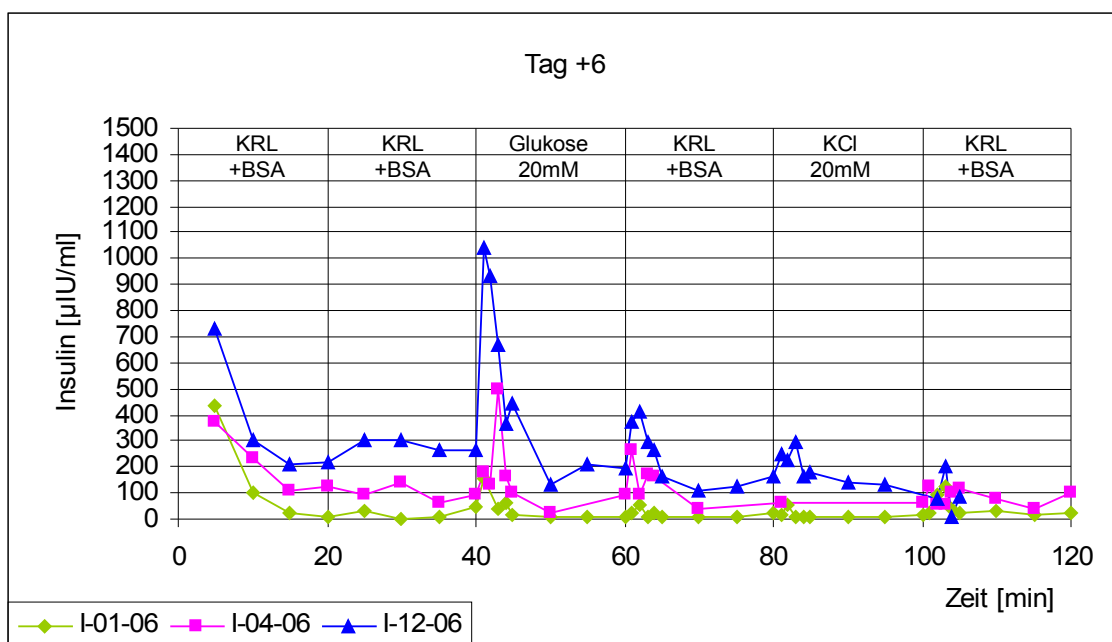


**Abb. 9:** Perifusion isolierter porziner Langerhans-Inseln nach Zusatz der extrazellulären Matrixproteine Kollagen IV, Laminin und Fibronektin zum Kulturmedium; Tag +1; KRL = Krebs-Ringer-Lösung; BSA = Bovines Serumalbumin; KCl = Kaliumchlorid.

I-01-06 zeigt einen 1,5-fachen Anstieg der Insulinausschüttung nur nach Stimulation mit Glukose. Bei I-04-06 ist die Reaktion auf den Glukose-Stimulus um mehr als das 1,5-fache erhöht, auch hier erfolgt keine Reaktion auf die KCl-Stimulation. I-12-06 reagiert deutlich mit einer 4-fachen Insulinausschüttung nach Glukose-Stimulation, aber

auch hier erfolgt keine Reaktion auf KCl. Es bleibt festzuhalten, dass keine der drei Präparationen am Tag +1 auf die KCl-Stimulation reagiert; hier kommt es zu einem leichten Abfall der Insulin-Ausschüttung.

**Abbildung 10** dokumentiert das Ergebnis der Perfusionen für die Inselzell-Kultur mit 3 ECMP und den Tag +6: Alle 3 Präparationen zeigen eine 4- bis 5-fach erhöhte Insulin-Ausschüttung nach Glukose-Stimulation. Unerwartet ist, dass jetzt auch eine Reaktion auf das „neutrale“ Medium KRL + BSA erfolgt: In allen 3 Präparationen ist die Insulin-Ausschüttung um das 2- bis 3-fache erhöht. Auf KCl hingegen reagieren nur I-01-06 und I-12-06 mit einer 2-fach höheren Ausschüttung, I-04-06 zeigt keine Reaktion. Insgesamt zeigen die Insel-Präparationen nach Zusatz von Kollagen IV, Laminin und Fibronektin am Tag +6 die höchsten Insulin-Freisetzen: Alle 3 Präparationen reagieren deutlich auf den Glukose-Stimulus, die Reaktion auf den KCl-Stimulus erfolgt in 2 von 3 Präparationen.

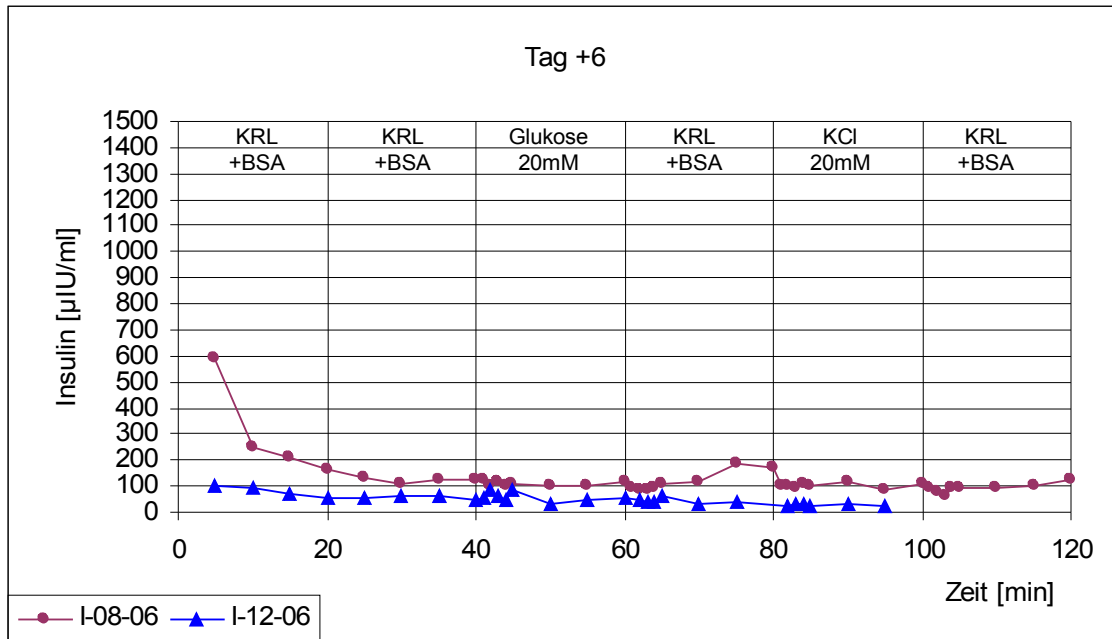


**Abb. 10:** Perfusion isolierter porziner Langerhans-Inseln nach Zusatz der extrazellulären Matrixproteine Kollagen IV, Laminin und Fibronektin zum Kulturmedium; Tag +6; KRL = Krebs-Ringer-Lösung; BSA = Bovines Serumalbumin; KCl = Kaliumchlorid.

### Kultur und Perfusion mit Fibronektin

Nachdem die Zugabe von C+L+F zu einem besseren Ergebnis als die Zugabe von nur C+L geführt hatte, wurde in einem ergänzenden Versuch der Effekt von Fibronektin

ohne Kollagen IV und Laminin auf die Langerhans-Inseln untersucht. Die Durchführung der Perfusionen entsprach den Versuchen mit den anderen ECMP; hier dargestellt sind die Ergebnisse vom Tag +6 (**Abb. 11**). Offensichtlich führt die Exposition von Fibronectin zu einer schlechteren Inselzell-Funktion: Nur I-12-06 reagiert mit einer Verdoppelung der Insulin-Sekretion auf die Stimulation mit 20 mM Glukose; abgesehen davon fehlen die erwarteten Insulin-Peaks.



**Abb. 11:** Perfusion isolierter porziner Langerhans-Inseln, die nur mit Fibronectin kultiviert wurden; Tag +6; KRL = Krebs-Ringer-Lösung; BSA = Bovines Serumalbumin, KCl = Kaliumchlorid.

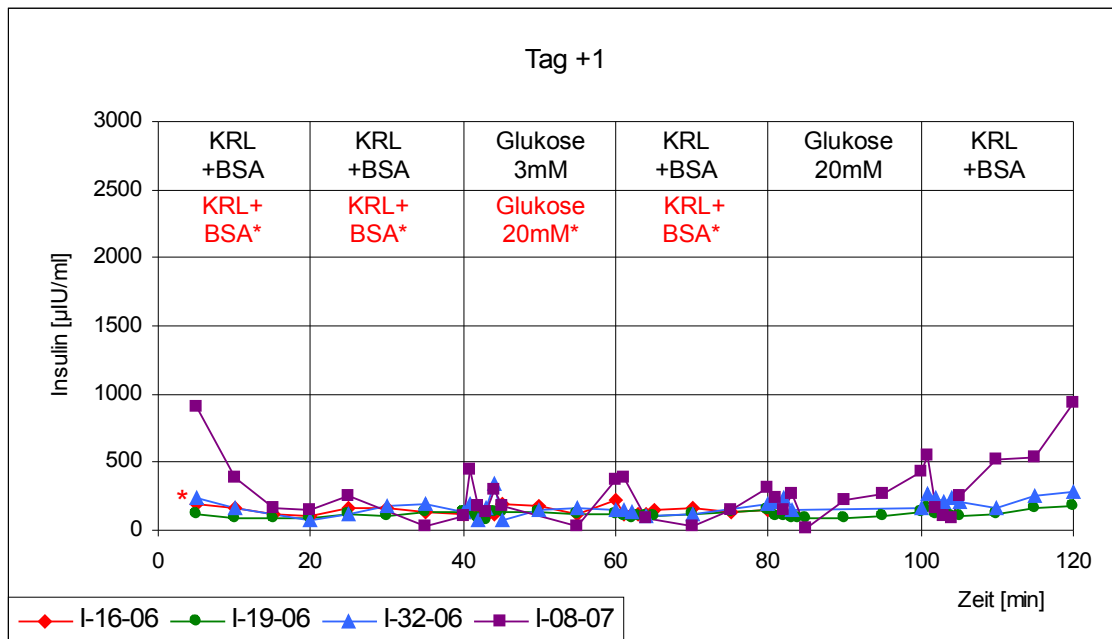
## 4.2 Perfusion der nanoverkapselten Langerhans-Inseln

Diese Versuche wurden mit 4 Präparationen porziner Langerhans-Inseln durchgeführt: I-16-06, I-19-06, I-32-06 und I-08-07. Die Reinheit der Inselzellen nach der Präparation (Dithizon-Färbung) betrug jeweils 90 %, ihre Vitalität (FDA/PI-Färbung) 80-90 %.

### 4.2.1 Kultur und Perfusion der unverkapselten Langerhans-Inseln

Nachdem die ECMP-behandelten Inselzellen sehr unterschiedliche Ergebnisse nach Stimulation ergeben hatten, und daher die Perfusionsergebnisse nicht einfach zu beurteilen waren, sollte das System in einer zweiten Versuchsreihe mit Polyelektrolyt-nanoverkapselten Inselzellen vereinfacht werden. So wurde festgelegt, dass nur noch mit einer Glukoselösung stimuliert wurde; auf die Stimulation mit der KCl-Lösung wurde ver-

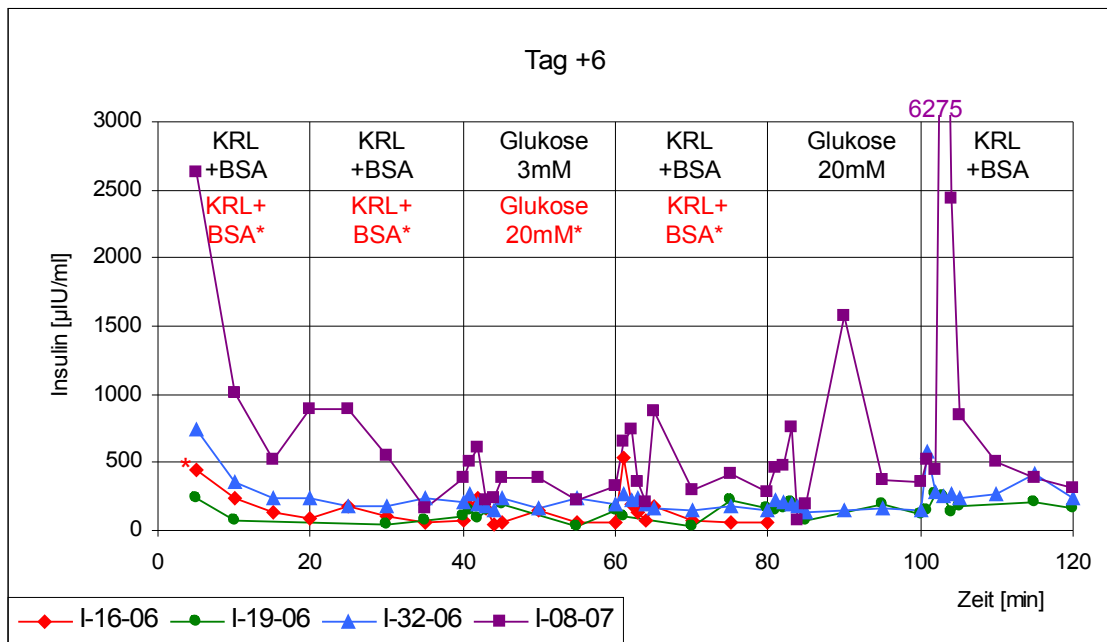
zichtet. Bei den Perfusionen mit der Präparation I-16-06 wurde einmal mit 20 mM Glukose nach 40 Minuten stimuliert und die Perfusion nach 80 Minuten beendet. Bei den drei anderen Präparationen wurde nach 40 Minuten mit 3 mM Glukose, nach 80 Minuten mit 20 mM Glukose stimuliert; in diesen Fällen dauerte die gesamte Perfusion 120 Minuten. Auch hier wurde vor und nach den Stimulationsphasen mit der neutralen KRL+BSA perfundiert und dabei eine niedrige Insulin-Basisausschüttung erwartet.



**Abb. 12:** Perfusion isolierter porziner Langerhans-Inseln ohne Polyelektrolyt-Nanoverkapselung; Tag +1; KRL = Krebs-Ringer-Lösung; BSA = Bovines Serumalbumin. Im Falle der roten Kurve (\* signalisiert die Kurve und die zugehörigen Medien) werden die Langerhans-Inseln nach 40 Minuten mit 20 mM Glukose stimuliert.

**Abbildung 12** zeigt die Ergebnisse der Insulin-Ausschüttung für die 4 Präparationen und den Tag +1. Die Ergebnisse ähneln jenen der Kontroll-Inselzellen der o. g. ECM-Versuche am Tag +1: I-16-06 reagiert gar nicht, I-19-06 mit einem Rückgang der Insulin-Sekretion nach dem Glukosestimulus. In I-32-06 dagegen verdoppelt sich die Insulin-Ausschüttung sowohl nach dem Stimulus mit 3 mM als auch mit 20 mM Glukose. I-08-07 zeigt eine 5-fache Insulinausschüttung nach 3 mM Glukose-Stimulation, nach 20 mM eine Verdoppelung.

**Abbildung 13** zeigt die Ergebnisse dieser Versuchsreihe für den Tag +6. Hier fällt der im Vergleich zu den drei anderen Präparationen deutlich höhere Kurvenverlauf bei I-08-07 auf; es kommt zur Verdoppelung der Insulin-Ausschüttung nach 3 mM und 20 mM Glukosegabe.



**Abb. 13:** Perifusion isolierter porziner Langerhans-Inseln ohne Polyelektrolyt-Nanoverkapselung; Tag +6; KRL = Krebs-Ringer-Lösung; BSA = Bovines Serumalbumin. Im Falle der roten Kurve (\* signalisiert die Kurve und die zugehörigen Medien) werden die Inselzellen nach 40 Minuten mit 20 mM Glukose stimuliert. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde der Maximalwert der Ordinate bei 3000 µU/ml belassen. Höhere Insulinwerte werden als Zahl an der entsprechenden Kurve vermerkt.

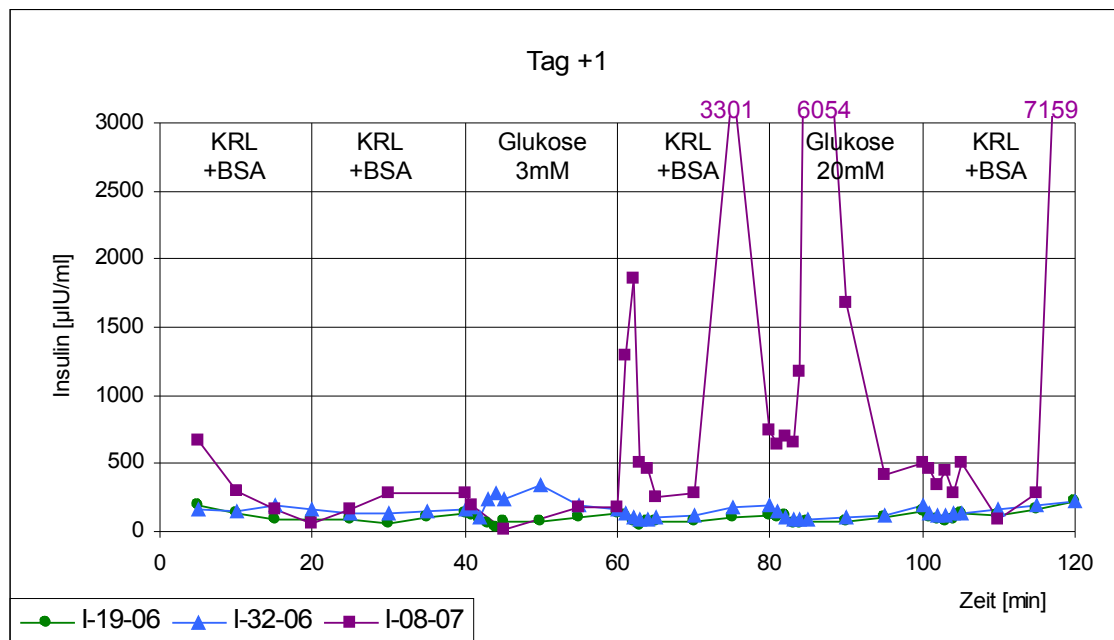
Ausserdem kommt es hier zu einem zusätzlichen, verspäteten 4-fachen Insulinanstieg nach Stimulation mit 20 mM Glukose und zu einem mehr als 2-fachen nach der Gabe von KRL+BSA. Bei der I-16-06 führen 20 mM Glukose zur 4-fachen Insulinausschüttung; auch hier ist eine unspezifische Stimulation durch KRL+BSA zu beobachten (9-fache Steigerung der Insulin-Ausschüttung). I-19-06 zeigt eine Verdoppelung der Insulin-Freisetzung nach Gabe von 3 mM Glukose, aber keine besondere Reaktion auf die Gabe von 20 mM Glukose. I-32-06 reagiert auf keine der beiden Lösungen mit einer verstärkten Insulin-Freisetzung.

#### 4.2.2 Kultur und Perifusion der nanoverkapselten Langerhans-Inseln

Die Langerhans-Inseln wurden nach der Isolierung und Reinigung zunächst 3-7 Tage in HAM's F-12 kultiviert, danach mit Hilfe der LbL-Technik mit Polyelektrolyten nanoverkapselt (s. Material und Methoden). Am Tag +1 und am Tag +6 erfolgten zeitgleich mit den unverkapselten Langerhans-Inseln die Perifusionen. Die technischen Bedingungen waren für unverkapselte und nanoverkapselte Langerhans-Inseln gleich.

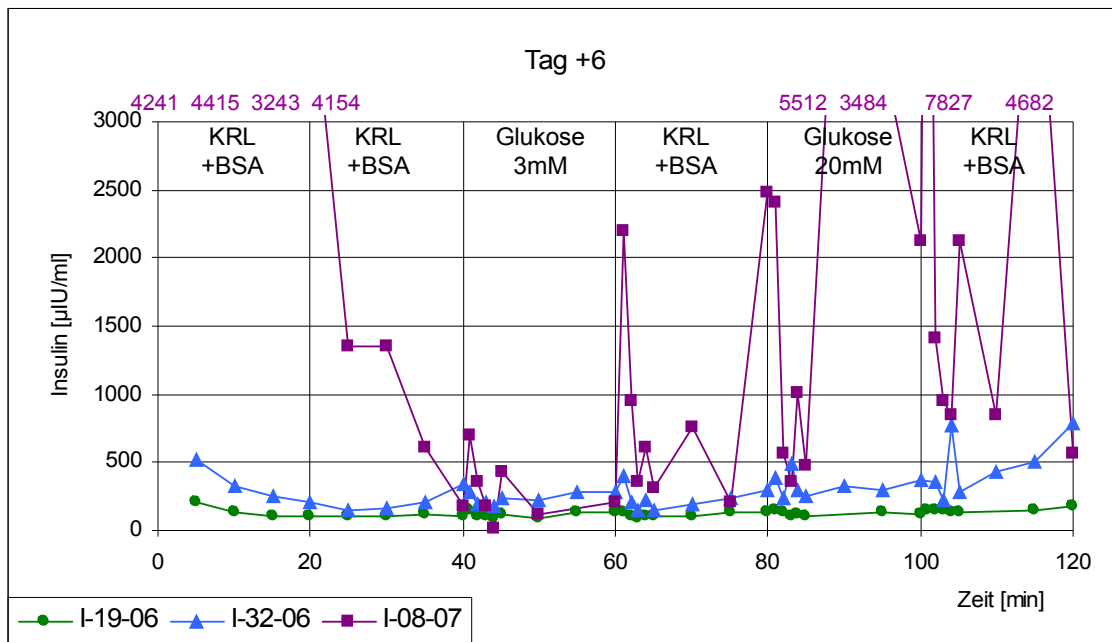
#### 4.2.2.1 Kultur und Perifusion der CPC-nanoverkapselten Langerhans-Inseln

Die erste Polyelektrolyt-Nanokapsel besteht aus Chitosan MMW/PEGPPGPEG/Chitosan MMW (CPC). Mit CPC wurden drei Inselzell-Präparationen nanoverkapselt: I-19-06, I-32-06 und I-08-07. Die Ergebnisse der Perifusion mit Glukose am Tag +1 sind in **Abb. 14** dargestellt.



**Abb. 14:** Perifusion isolierter porziner CPC-nanoverkapselter Langerhans-Inseln; Tag +1; KRL = Krebs-Ringer-Lösung; BSA = Bovines Serumalbumin. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde der Maximalwert der Ordinate bei 3000 µIU/ml belassen. Höhere Insulinwerte werden als Zahl an der entsprechenden Kurve vermerkt.

Die Präparation I-19-06 reagiert mit einem Rückgang der Insulin-Sekretion auf den Stimulus, vergleichbar den Kontroll-Inselzellen. I-32-06 zeigt eine Verdoppelung der Insulin-Ausschüttung nur nach Gabe von 3 mM Glukose. I-08-07, die auch in der Kontrolle am Tag +6 durch hohe Insulinwerte aufgefallen war, zeigt hier nach 60 Minuten eine sehr hohe Insulin-Ausschüttung, unter anderem einen 8-fachen Anstieg des Insulins nach Gabe von 20 mM Glukose, allerdings erst 10 Minuten nach Beginn der Glukose-gabe. Nach der Gabe von 3 mM Glukose kommt es auch hier zu einem Rückgang der Sekretion.



**Abb. 15:** Perfusion isolierter porziner CPC-nanoverkapselter Langerhans-Inseln; Tag +6; KRL = Krebs-Ringer-Lösung; BSA = Bovines Serumalbumin. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde der Maximalwert der Ordinate bei 3000  $\mu\text{IU/ml}$  belassen. Höhere Insulinwerte werden als Zahl an der entsprechenden Kurve vermerkt.

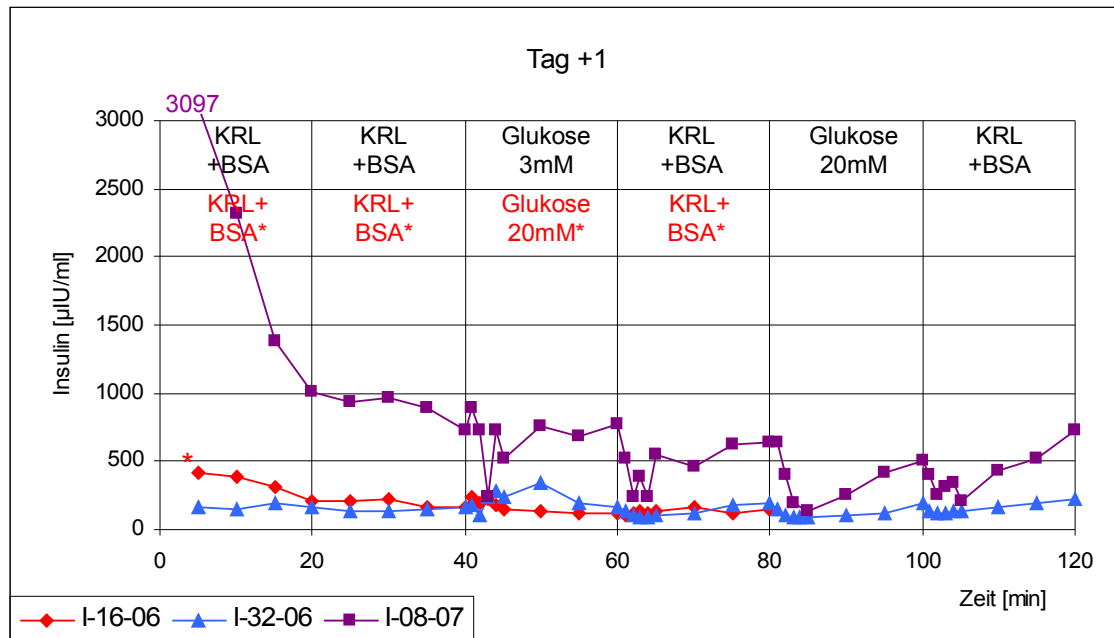
**Abbildung 15** zeigt die Ergebnisse der CPC-nanoverkapselten Inseln am Tag +6.

Am Tag +6 ist die Insulin-Ausschüttung im Vergleich zum Tag +1 gesteigert. Die Kurve von I-19-06 verzeichnet nach 3 mM Glukose einen leichten Anstieg um den Faktor 1,5; auf die Gabe von 20 mM reagieren die CPC-nanoverkapselten Langerhans-Inseln nicht. I-32-06 reagiert nach 3 mM Glukose mit einem Rückgang der Sekretion, nach 20 mM Glukose kommt es zur 2-fachen Insulin-Ausschüttung. Abgesehen davon, dass die Inselzellen von I-08-07 die Perfusion mit höheren Insulinwerten beginnen und auf 3 mM Glukose eine 3-fache Insulinausschüttung zeigen, gleicht ihr Insulinprofil jenem vom Tag +1: Ab der 60. Minute erkennt man mehrere hohe Insulinwerte, davon einer mit der 15-fachen Insulin-Ausschüttung 10 Minuten nach Gabe von 20 mM Glukose und wie am Tag +1 verzögert. Die hohen Insulinwerte, die bei der I-08-07 nach 60 Minuten auftreten, sind bei den CPC-nanoverkapselten Inseln kräftiger ausgeprägt als im Kontrollversuch am Tag +6.



#### 4.2.2.2 Kultur und Perifusion der CPP-nanoverkapselten Langerhans-Inseln

Die zweite Polyelektrolyt-Nanokapsel besteht aus Chitosan MMW/PAAMA/PAH 15 kDa (CPP). Mit diesen Polyelektrolyten wurden die Präparationen I-16-06, I-32-06 und I-08-07 nanoverkapselt. **Abbildung 16** zeigt die Ergebnisse der Perifusion am Tag +1.

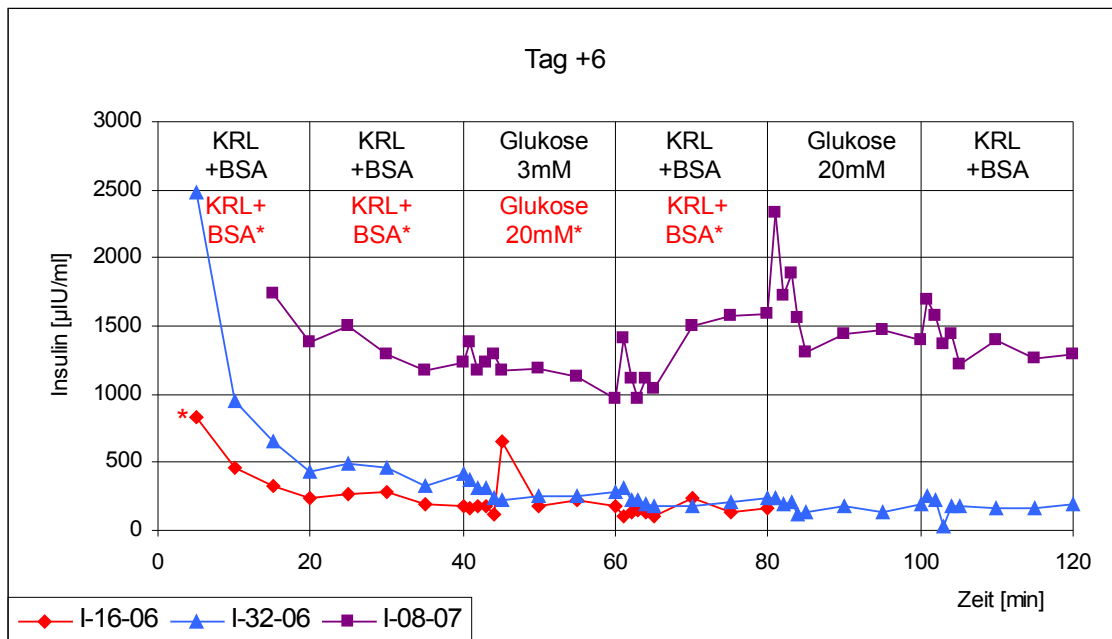


**Abb. 16:** Perifusion isolierter porziner CPP-nanoverkapselter Langerhans-Inseln; Tag +1; KRL = Krebs-Ringer-Lösung; BSA = Bovines Serumalbumin. Im Falle der roten Kurve (\* signalisiert die Kurve und die zugehörigen Medien) werden die Inselzellen nach 40 Minuten mit 20 mM Glukose stimuliert. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde der Maximalwert der Ordinate bei 3000 µIU/ml belassen. Höhere Insulinwerte werden als Zahl an der entsprechenden Kurve vermerkt.

I-16-06 reagiert nicht auf den Glukose-Stimulus, I-32-06 zeigt nach Stimulation mit 3 mM Glukose eine 2-fache Steigerung der Insulin-Ausschüttung, nach 20 mM Glukose kommt es zur verminderten Sekretion. I-08-07, deren Kurve auf einem höheren Niveau verläuft, verglichen mit den beiden anderen Präparationen, zeigt keine erhöhten Insulinwerte und reagiert auf beide Glukosegaben mit einem Rückgang der Insulin-Ausschüttung.

Das Ergebnis der Perifusion am Tag +6 ist in **Abb. 17** dargestellt. Während es bei I-32-06 als Reaktion auf die Stimulation mit Glukose zum Rückgang der Insulin-Sekretion kommt, zeigen I-16-06 und I-08-07 erhöhte Insulin-Ausschüttungen nach Gabe von 20 mM Glukose; wobei I-16-06 eine 4-fach gesteigerte Insulin-Ausschüttung zeigt, allerdings 5 Minuten verspätet. Bei I-08-07 ist diese um den Faktor 1,5 gesteigert. Das Insu-

linprofil von I-08-07 verläuft, wie schon zuvor, auf einem höheren Niveau als die Profile der beiden übrigen Präparationen.



**Abb. 17:** Perifusion isolierter porziner CPP-nanoverkapselter Langerhans-Inseln; Tag +6; KRL = Krebs-Ringer-Lösung; BSA = Bovines Serumalbumin. Im Falle der roten Kurve (\* signalisiert die Kurve und die zugehörigen Medien) werden die Inselzellen nach 40 Minuten mit 20 mM Glukose stimuliert.

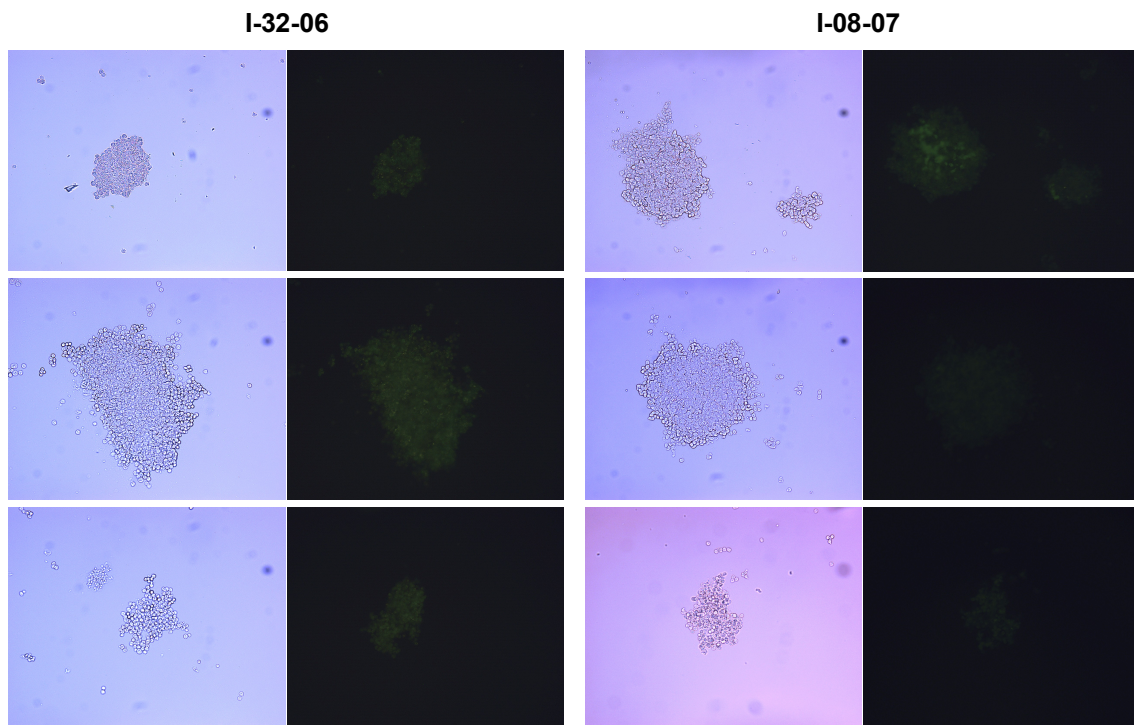
Bei den CPP-nanoverkapselten Langerhans-Inseln fehlen – im Gegensatz zu den CP-C-nanoverkapselten Langerhans-Inseln und jenen der Kontrollversuche – die sehr hohen Insulinwerte. Besonders zu beobachten ist, dass es im Falle der CPP-Nanokapseln am Tag +1 kaum zu einem Anstieg der Insulin-Ausschüttung kommt. Am Tag +6 dagegen sind bei 2 von 3 Präparationen deutliche Anstiege nach der Gabe von 20 mM Glukose erkennbar. Auffallend ist ausserdem die hohe Insulin-Basisausschüttung bei I-08-07.

### 4.3 Verwendung von FITC-gekoppelten Polyelektrolyten

In diesen Versuchen sollte die Polyelektrolyt-Nanokapsel sichtbar gemacht werden. Dazu wurde ein Teil der Inselzellen mit Polyelektrolyten nanoverkapselt, an die FITC gekoppelt war. Die damit verbundene Fluoreszenz wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert. Diese Versuche wurden mit zwei Präparationen durchgeführt, die bereits für die Perfusionen mit Polyelektrolyt-nanoverkapselten Langerhans-Inseln eingesetzt wurden: I-32-06 und I-08-07; ihre Reinheit betrug 90 %, ihre Vitalität 80-85 %.

#### 4.3.1 Fluoreszenzmikroskopie unverkapselter Langerhans-Inseln (Kontrollen)

Die unverkapselten Langerhans-Inseln (Kontrollen) wurden nacheinander mit Durchlicht und Fluoreszenzlicht betrachtet; es galt sicher auszuschliessen, dass die Langerhans-Inseln keine Autofluoreszenz aufweisen. In **Abb. 18** dargestellt sind Bildpaare: Die Nummer über der Abbildung gibt die Inselzell-Präparation an, links erscheint das Ergebnis der Durchlichtmikroskopie, rechts das der Fluoreszenzmikroskopie (bei 488 nm Anregungs-Wellenlänge). Die obere Reihe stellt das Ergebnis für den Tag +1 dar, die mittlere Reihe für den Tag +6 und die untere Reihe für den Tag +13. Die Abbildung zeigt jeweils für den Versuch typische Bildpaare. Die unverkapselten Langerhans-Inseln sind im Durchlicht gut erkennbar; im Fluoreszenzlicht sind sie – wie erwartet – nicht oder nur schwach erkennbar, da hier noch keine FITC-gekoppelten Polyelektrolyte verwendet wurden. Die Hintergrund-Fluoreszenz der Langerhans-Inseln ist vernachlässigbar.



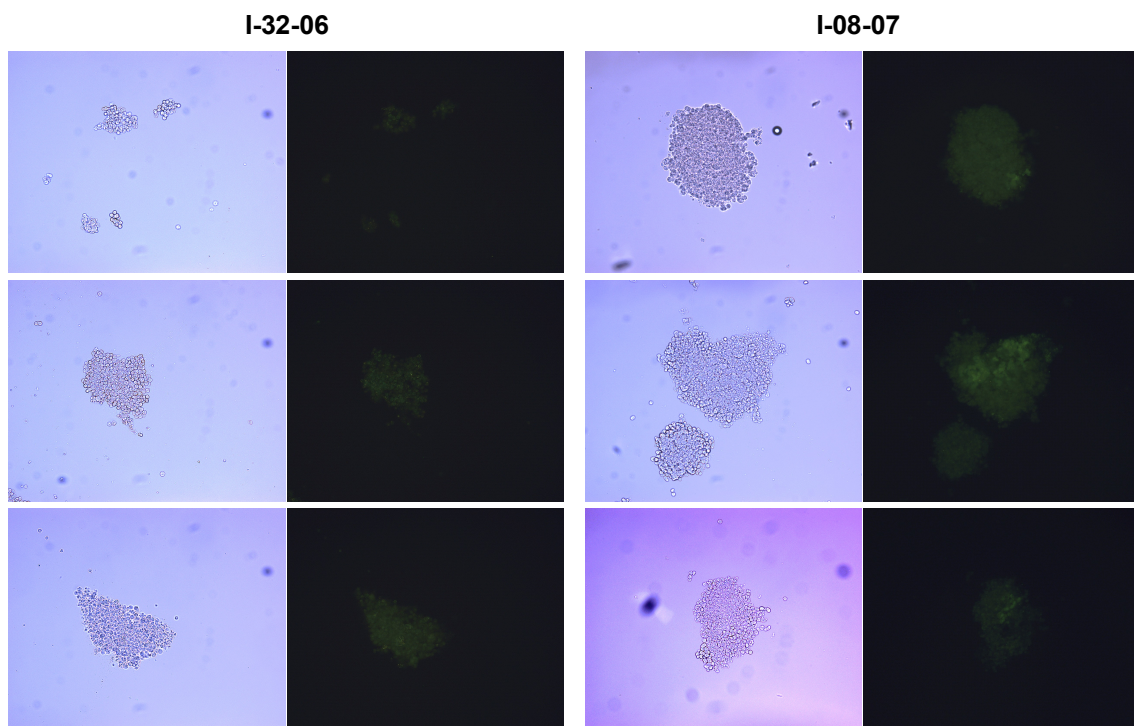
**Abb. 18:** Unverkapselte porcine Langerhans-Inseln (Kontrollen), aufgenommen im Durchlicht und im Fluoreszenzlicht. Obere Reihe: Tag +1; mittlere Reihe: Tag +6; untere Reihe: Tag +13. Linker Teil der Abbildung: Präparation I-32-06; rechter Teil der Abbildung: Präparation I-08-07. Durchlicht: Belichtung automatisch; Fluoreszenzlicht: Belichtungszeit eine Sekunde.

### 4.3.2 Fluoreszenzmikroskopie von Langerhans-Inseln mit Nanokapseln aus einfachen und aus FITC-gekoppelten Polyelektrolyten

#### 4.3.2.1 CPC-Nanokapseln

##### Nanokapseln ohne FITC-Kopplung (CPC)

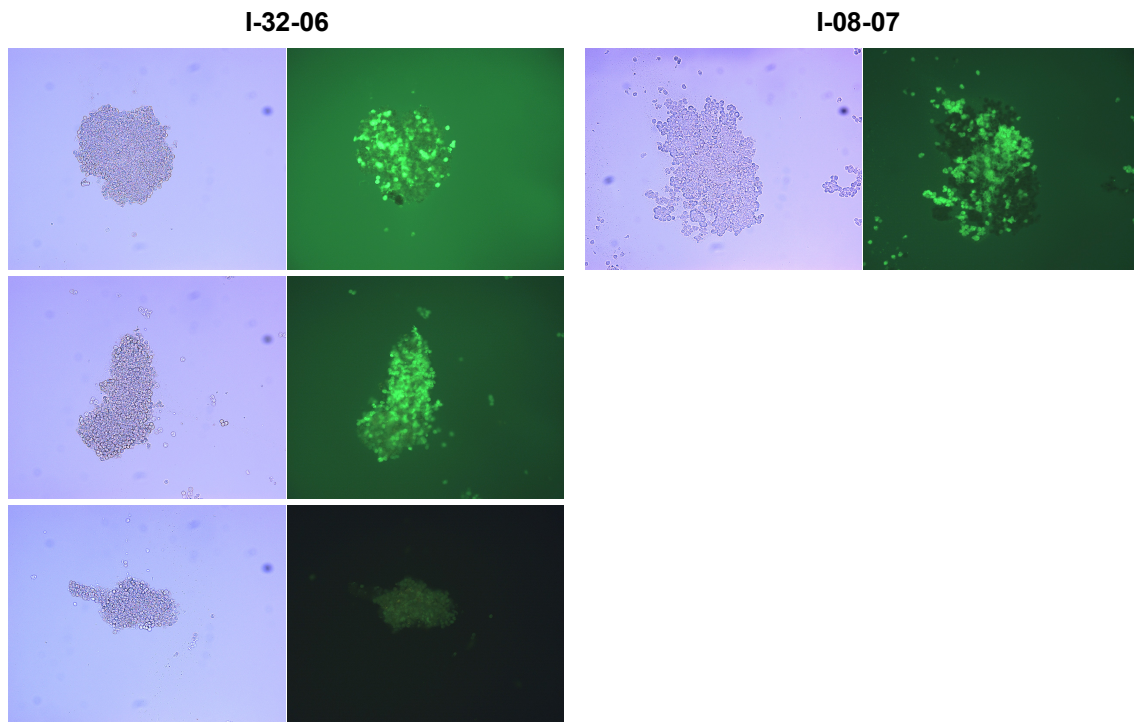
Zunächst wurden CPC-Nanokapseln ohne FITC-Kopplung mikroskopiert. Zur Erinnerung: Die Polyelektrolyt-Nanokapsel bestand aus den Schichten Chitosan MMW/PEG-PPGPEG/Chitosan MMW. Auch hier sollte eine Autofluoreszenz der Polyelektrolyte sicher ausgeschlossen werden. **Abbildung 19** zeigt die Durchlicht- und die Fluoreszenzlicht-Aufnahmen der CPC-nanoverkapselten Langerhans-Inseln. Das Ergebnis der Fluoreszenzmikroskopie der CPC-Nanokapseln entspricht jenem der unverkapselten Kontrollen (s. **Abb. 18**). Die Langerhans-Inseln sind im Durchlicht gut erkennbar, eine Autofluoreszenz findet nicht statt. Die schwache Hintergrund-Fluoreszenz ist vernachlässigbar.



**Abb. 19:** CPC-nanoverkapselte porzine Langerhans-Inseln, aufgenommen im Durchlicht und im Fluoreszenzlicht. Obere Reihe: Tag +1; mittlere Reihe: Tag +6; untere Reihe: Tag +13. Linker Teil der Abbildung: Präparation I-32-06; rechter Teil der Abbildung: Präparation I-08-07. Durchlicht: Belichtung automatisch; Fluoreszenzlicht: Belichtungszeit eine Sekunde.

### Nanokapseln mit FITC-Kopplung (CPC\*)

Die äussere Schicht der CPC-Nanokapsel wurde jetzt also mit FITC gekoppelt und mit einem \* gekennzeichnet: Chitosan MMW/PEGPPGPEG/Chitosan MMW-FITC-gekoppelt (CPC\*). **Abbildung 20** zeigt das Ergebnis für die CPC\*-nanoverkapselten Langerhans-Inseln der beiden o. g. Präparationen in der Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie. Bei beiden Präparationen fluoreszieren die FITC-gekoppelten CPC\*-Nanokapseln. Das unterscheidet sie von den unverkapselten Kontrollen und den nur CPC-nanoverkapselten Langerhans-Inseln. Allerdings ist an allen vier Versuchstagen (Tag +6 und Tag +13 der Präparation I-08-07 fehlen) eine ungleichmässige Verteilung der Fluoreszenz zu beobachten. Ausserdem ist die Hintergrundfluoreszenz, vor allem an den Tagen +1 und +6, stärker als zuvor.



**Abb. 20:** CPC\*-nanoverkapselte porzine Langerhans-Inseln, aufgenommen im Durchlicht und im Fluoreszenzlicht. Obere Reihe: Tag +1; mittlere Reihe: Tag +6; untere Reihe: Tag +13. Linker Teil der Abbildung: Präparation I-32-06; rechter Teil der Abbildung: Präparation I-08-07. Aus technischen Gründen fehlen die Ergebnisse für Tag +6 und Tag +13. Durchlicht: Belichtung automatisch; Fluoreszenzlicht: Belichtungszeit eine Sekunde.

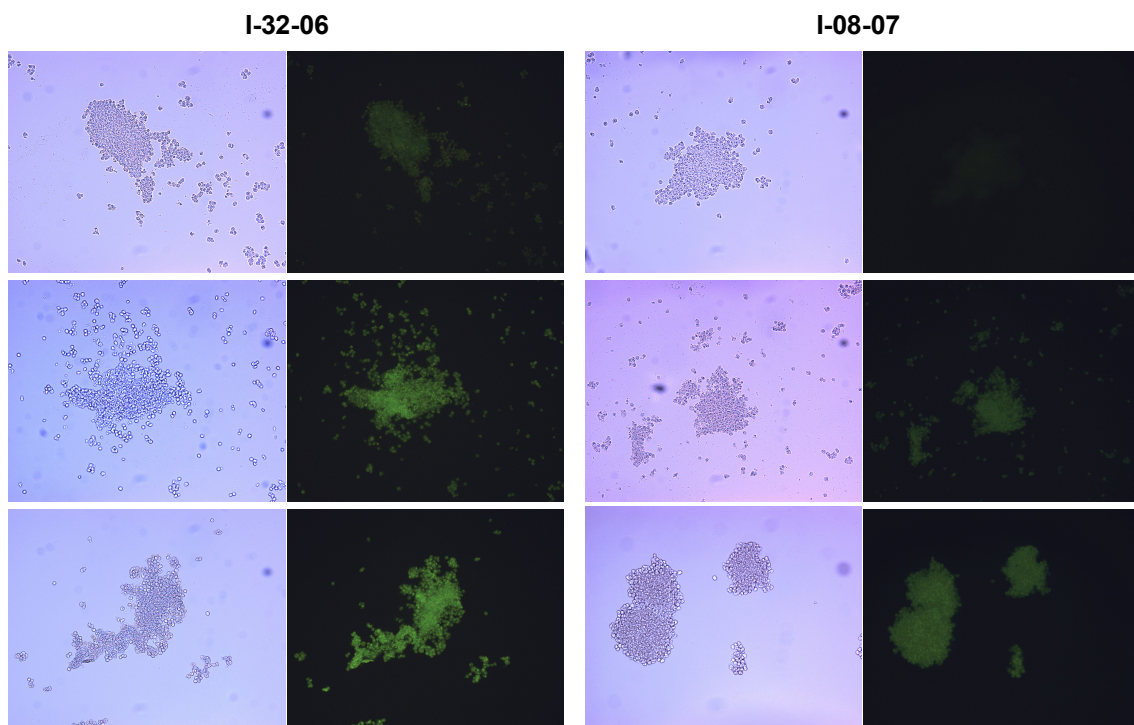


#### 4.3.2.2 CPP-Nanokapseln

##### Nanokapseln ohne FITC-Kopplung (CPP)

Jetzt wurden die CPP-Nanokapseln ohne FITC-Kopplung mikroskopiert. Sie bestanden aus den Schichten Chitosan MMW/PAAMA/PAH 15 kDa. Auch hier sollte eine mögliche Autofluoreszenz der Polyelektrolyte sicher ausgeschlossen werden. **Abbildung 21** zeigt die Durchlicht- und die Fluoreszenzlicht-Aufnahmen der CPP-nanoverkapselten Langerhans-Inseln.

Auffällig bei den Langerhans-Inseln mit der CPP-Nanokapsel ist deren Morphologie. Die Langerhans-Inseln sind nicht mehr überwiegend glatt begrenzt, sondern „laufen auseinander“, bzw. sie verlieren ihre inselförmige Integrität. Die Fluoreszenzmikroskopie zeigt unerwartet vor allem an den Tagen +6 und +13 eine Autofluoreszenz der CPP-Nanokapseln, wenn man sie mit den Kontrollen (s. **Abb. 18**) und den CPC-Nanokapseln (s. **Abb. 19**) vergleicht.

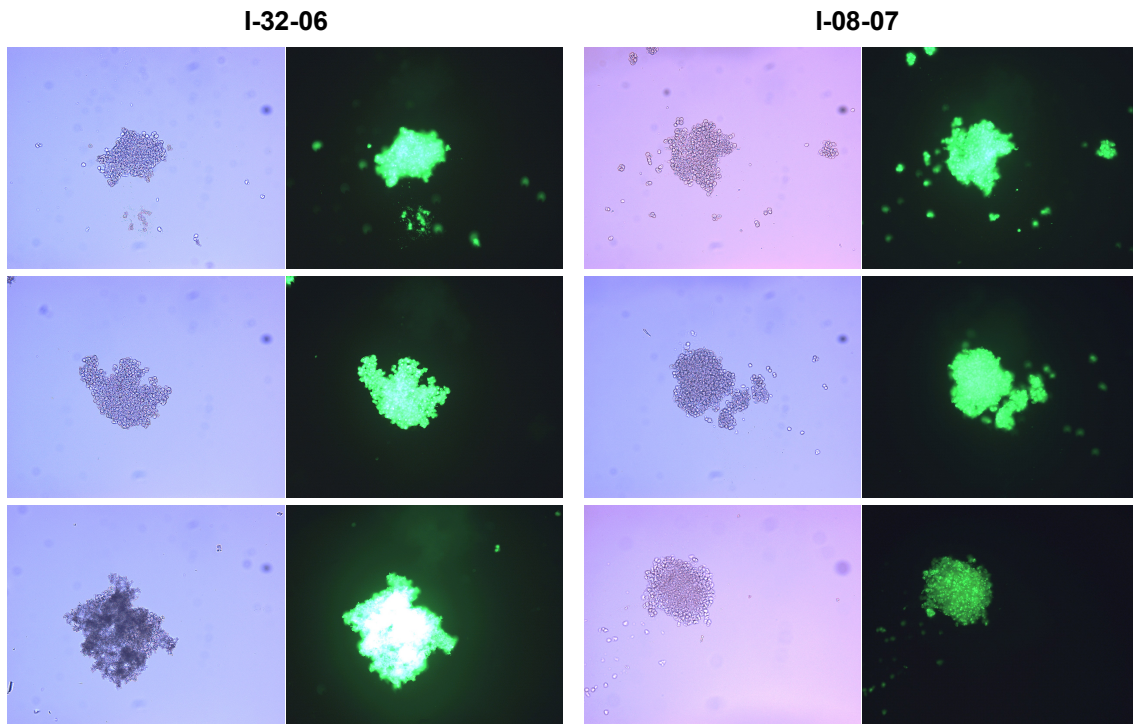


**Abb. 21:** CPP-nanoverkapselte porzine Langerhans-Inseln, aufgenommen im Durchlicht und im Fluoreszenzlicht. Obere Reihe: Tag +1; mittlere Reihe: Tag +6; untere Reihe: Tag +13. Linker Teil der Abbildung: Präparation I-32-06; rechter Teil der Abbildung: Präparation I-08-07. Durchlicht: Belichtung automatisch; Fluoreszenzlicht: Belichtungszeit eine Sekunde.

##### Nanokapseln mit FITC-Kopplung (CPP\*)

Die äussere Schicht der CPP-Nanokapsel wurde jetzt also mit FITC gekoppelt und mit einem \* gekennzeichnet: Chitosan MMW/PAAMA/PAH 15 kDa-FITC-gekoppelt

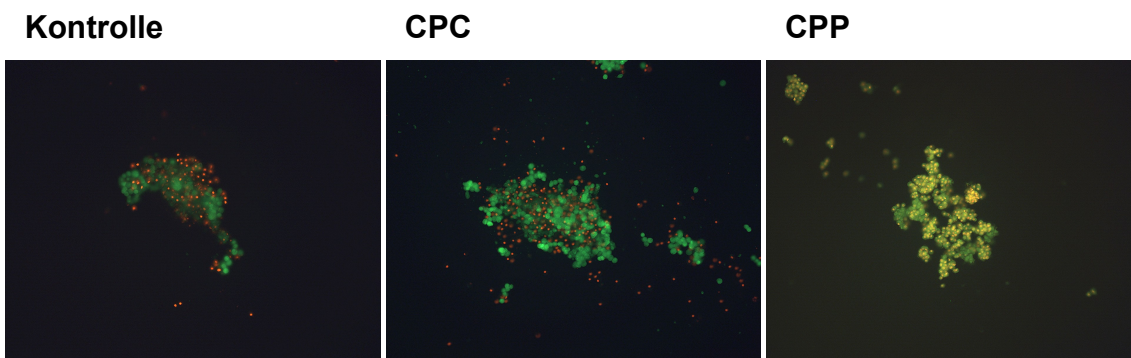
(CPP\*). **Abbildung 22** zeigt das Ergebnis für die CPP\*-nanoverkapselten Langerhans-Inseln der beiden o. g. Präparationen in der Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie. Die Morphologie dieser Langerhans-Inseln ist weniger auffällig als die der CPP-nanoverkapselten Langerhans-Inseln. Die CPP\*-nanoverkapselten Langerhans-Inseln zeigen eine sehr starke Fluoreszenz der äusseren Schicht, auch wenn diese am Tag +13 bei I-08-07 etwas weniger stark ausgeprägt ist.



**Abb. 22:** CPP\*-nanoverkapselte porzine Langerhans-Inseln, aufgenommen im Durchlicht und im Fluoreszenzlicht. Obere Reihe: Tag +1; mittlere Reihe: Tag +6; untere Reihe: Tag +13. Linker Teil der Abbildung: Präparation I-32-06; rechter Teil der Abbildung: Präparation I-08-07. Durchlicht: Belichtung automatisch; Fluoreszenzlicht: Belichtungszeit eine Sekunde.

#### 4.4 FDA/PI-Färbung der Langerhans-Inseln

Mit der FDA/PI-Färbung sollte die Vitalität der Langerhans-Inseln im Verlauf der Versuchsdurchführung untersucht werden. Dabei ergab sich bei den CPP-nanoverkapselten Langerhans-Inseln eine Besonderheit (**Abb. 23**): Im Gegensatz zu den Langerhans-Inseln der Kontrolle und den mit CPC nanoverkapselten Langerhans-Inseln ist die Abgrenzung von grünen (vitalen) bzw. roten (avitalen) Zellen nicht möglich, somit lässt sich hier keine Vitalitätsbestimmung durchführen.



**Abb. 23:** Präparation I-32-06 am Tag +6, FDA/PI-Färbung, Auswertung mit Fluoreszenzlicht. Links unverkapselte Inselzellen (Kontrolle), in der Mitte CPC-nanoverkapselte und rechts CPP-nanoverkapselte Inselzellen.



## 5 Diskussion

Auch nach jahrelanger intensiver experimenteller Forschung ist die klinische Transplantation von isolierten Langerhans-Inseln viel weniger verbreitet als die Transplantation des gesamten Pankreas [22]. Ein Grund ist die hohe Rate frühen Transplantatversagens nach Inselzell-Transplantation [29]. Hier spielt möglicherweise der Verlust der peri-insulären extrazellulären Matrix bei der Präparation der Langerhans-Inseln aus dem Pankreas eine wichtige Rolle [29, 32]. Die vorliegende Arbeit dokumentiert, dass die Beimengung bestimmter ECM-Proteine zum Kulturmedium die Kulturbedingungen für die Langerhans-Inseln verbessert, und diese so eine bessere Funktion behalten.

Ein weiteres ungelöstes Problem ist der weltweite Mangel an Spendern für Langerhans-Inseln [18, 20]; ein möglicher Weg ist die Verwendung von Langerhans-Inseln aus Schweinen [27]. Diese xenogenen Langerhans-Inseln müssen vor dem Angriff des Empfänger-Immunsystems geschützt werden (*Immunisolation*) [57]. Eine Technik ist die Mikroverkapselung mit medizinisch zugelassenem hochreinem Alginat, das mit 2-wertigen Kationen vernetzt wurde [59]. Eine Alternative dazu ist die vergleichsweise neue Nanoverkapselung mit der *Layer-by-Layer*-Technik: die verschiedenen Schichten der Nanokapseln bestehen abwechselnd aus positiv und negativ geladenen Polyelektrolyten; anders als die Alginat-Mikrokapseln schmiegen sie sich eng an die Oberfläche der Inselzellen an [77], womit der Vorteil verbunden ist, dass das Transplantat-Volumen geringer wird. Diese Arbeit zeigt, dass bei Verwendung bestimmter Polyelektrolyte die Funktion der Langerhans-Inseln nicht beeinträchtigt wird. Zudem lassen sich diese Nanokapseln mit FITC-gekoppelten Polyelektrolyten fluoreszenzmikroskopisch darstellen/identifizieren.

### 5.1 Insulinprofile unbehandelter/unverkapselter Langerhans-Inseln am Tag +1 und am Tag +6

Um den Einfluss der ECMP, beziehungsweise der diversen Polyelektrolytschichten auf die Langerhans-Inseln zu verstehen, muss man zunächst das Verhalten der unbehandelten/unverkapselten Langerhans-Inseln studieren. In dieser Arbeit wurden Präparationen von Langerhans-Inseln aus acht verschiedenen Isolierungen, d.h. acht porzinen Pankrea-ta verwendet. Die Perfusionen wurden an den Tagen +1 und +6 nach Versuchsbeginn

durchgeführt. Es stellte sich die Frage, wie sich die Profile der Insulin-Ausschüttung im Verlauf der Zellkultur entwickeln.

Durchweg sind die Insulin-Profile am Tag +6 besser ausgeprägt als am Tag +1, die Insulin-Peaks somit höher (**s. Abb. 5, Abb. 6, Abb. 12, Abb. 13**). Besonders am Tag +1 zeigte sich das Phänomen des paradoxen Rückgangs der Insulin-Sekretion nach Glukose-Stimulation. Dieses wurde von Davalli et al. für porcine Langerhans-Inseln einen Tag nach ihrer Präparation beschrieben [106], durch frühere Arbeiten der hiesigen Arbeitsgruppe bestätigt [105] und wird mit den jetzigen Untersuchungen erneut unterstrichen. Einige Tage später zeigen dieselben Langerhans-Inseln die erwarteten positiven Reaktionen auf den Glukose-Reiz. Dieses Verhalten wird besonders deutlich bei der Präparation I-04-06: Am Tag +1 zeigt sie die paradoxe Reaktion, am Tag +6 reagiert sie hingegen mit einem deutlichen Insulin-Peak (**s. Abb. 5, Abb. 6**).

Allerdings gibt es auch das Negativ-Beispiel der Präparation I-01-06: Sie zeigt am Tag +1 eine befriedigende Insulin-Ausschüttung, am Tag +6 hingegen reagiert sie auf keinen der Stimuli (**s. Abb. 5, Abb. 6**). Möglicherweise werden am Tag +1 restliche Insulin-Bestände aus den Zellen freigesetzt, die aber dann im Verlauf der Inselzell-Kultur nicht mehr nachgebildet werden.

Langerhans-Inseln, und in ihnen die Betazellen, benötigen die *In-Vitro*-Kultur, um sich vom mechanischen und chemischen Stress der Isolierung aus dem Pankreas zu erholen [106, 107]. Somit erscheint eine zu frühe Untersuchung ihrer Insulin-Sekretion, wie sie hier für den Tag +1 vorgenommen wurde, auf den ersten Blick wenig sinnvoll. Dennoch kann es durchaus erhellend sein, die Insulin-Sekretion zu diesem sehr frühen Zeitpunkt zu untersuchen; denn, wie in den oben genannten Beispielen gezeigt, entwickeln sich die Insulin-Profile der verschiedenen Inselzell-Präparationen sehr unterschiedlich. Somit setzt die Untersuchung der Insulin-Sekretion am Tag +1 einen Bezugspunkt für die Beurteilung der Inselzell-Funktion zu einem späteren Zeitpunkt. Ein direkter Vergleich der Insulin-Sekretionen einzelner Präparationen an einem definierten Versuchstag ist dagegen nur sehr bedingt möglich: Die hiesigen Ergebnisse mit unterschiedlichen Präparationen zeigen starke Schwankungen. Geht man von konstanten Isolierungs-Bedingungen im Labor aus, so ist der Grund dafür möglicherweise bei den Spendertieren und

den damit verbunden schwankenden Qualitäten der Langerhans-Inseln zu suchen, was sich immer wieder in sehr unterschiedlichen Isolierungs-Ergebnissen, variierender Anzahl und Morphologie der Langerhans-Inseln widerspiegelt [48, 108, 109].

## 5.2 Zugabe von extrazellulären Matrixproteinen zum Kulturmedium

Die Zugabe von extrazellulären Matrixproteinen zum Kulturmedium sollte bessere Kulturbedingungen für die unverkapselten Langerhans-Inseln schaffen. Mehrere Publikationen haben beschrieben, dass der Zusatz von ECM zur Inselzell-Kultur positive Effekte auf Langerhans-Inseln aus Ratten und Schweinen hatte [33, 49-51]. In dieser Arbeit wurden für einen Teil der Langerhans-Inseln Kollagen IV und Laminin verwendet (Kurzform: C+L). Die beiden Hauptbestandteile der Basalmembran, die während der enzymatischen Isolierung der Inselzellen zerstört wird, werden so ersetzt [29, 41-43]. Andere Langerhans-Inseln erhielten zusätzlich noch Fibronectin (Kurzform: C+L+F), also einen weiteren wichtigen Bestandteil der ECM, der für die Zelladhäsion wichtig ist [45, 46].

Unverkapselte Langerhans-Inseln, die mit C+L oder C+L+F kultiviert wurden, zeigen am Tag +1 sehr ähnliche Ergebnisse wie die unbehandelten Langerhans-Inseln (**s. Abb. 5, Abb. 7, Abb. 9**). Die Insulin-Peaks sind, wenn vorhanden, sehr niedrig oder es ist eine paradoxe Reaktion auf die Glukose-Stimulation zu beobachten. Offensichtlich wird bei dieser kurzen Exposition mit ECM kein positiver Effekt auf die Insulin-Ausschüttung der Langerhans-Inseln erzielt. Auffallend ist, dass bei den Langerhans-Inseln, die mit C+L+F kultiviert wurden, keine Reaktion auf die Stimulation mit Kaliumchlorid erfolgt. Dies könnte bei nur drei untersuchten Inselzell-Präparationen durchaus ein zufälliger Befund sein, oder aber die fehlende Reaktion ist auf den kurzen zeitlichen Abstand zum Stress der Isolierung zurückzuführen.

Betrachtet man die Entwicklung der Perfusionen der Inselzellen, die mit C+L von Tag +1 bis Tag +6 kultiviert wurden, so ist das Ergebnis ähnlich wie bei den unbehandelten/unverkapselten Langerhans-Inseln. Die Erwartung, dass die Inselzellen nach der Kultur mit C+L mehr Insulin ausschütten, bestätigt sich nicht (**s. Abb. 7, Abb. 8**). Interessant ist das Ergebnis der mit C+L+F kultivierten Langerhans-Inseln am Tag +6: Die Insulin-Ausschüttung aller drei Präparationen ist im Vergleich zum Tag +1

deutlich erhöht, ein 4-5-facher Insulin-Peak ist nach der Gabe der Glukose-Lösung zu beobachten, und 2/3 Präparationen reagieren nun auch auf Kaliumchlorid. Offensichtlich führt die Kultur mit C+L+F zu einer Verbesserung der Inselzell-Funktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und ist der Kultur mit C+L überlegen (**s. Abb. 9, Abb. 10**).

Interessanterweise führt der alleinige Zusatz von Fibronectin zum Kulturmedium zu schlechten Ergebnissen bei der Insulin-Ausschüttung (**s. Abb. 11**). In der Natur besteht die ECM nicht nur aus einem Protein, sondern bildet eine Einheit aus mehreren Proteinen [29], die offensichtlich interagieren: Beispielsweise wurde gezeigt, dass Fibronectin das Anheften von Zellen an Kollagen fördert [44] – ein Hinweis auf die komplexen Verbindungen zwischen den ECMP und der Zelle, passend zu dem hier gezeigten Ergebnis, dass Fibronectin das Zusammenspiel mit den anderen ECMP benötigt.

Wir können also die schon früher beschriebenen positiven Einflüsse der ECM auf isolierte Langerhans-Inseln, in dieser Arbeit für porcine Inselzellen, bestätigen. Wie oben dargestellt zeigt die hiesige Arbeit allerdings auch, dass das Zusammenwirken der einzelnen Bestandteile der ECM eine essentielle Bedeutung für das Ergebnis hat. Wang et al. hatten gezeigt, dass durch Zugabe von Fibronectin die Funktion der Langerhans-Inseln nach 2 Tagen im Vergleich zur Kontrolle besser erhalten blieb [29], und auch Nagata et al. hatten einen positiven Effekt auf Inselzellen bei verschiedener Zusammenstellung der Proteine Kollagen I, III bzw. IV und Laminin nachgewiesen [33]. Allerdings wurde hier mit Langerhans-Inseln aus dem Pankreas von Hunden und Ratten gearbeitet. Physiologisch gibt es jedoch grosse Unterschiede in der Ausprägung der ECM zwischen den Spezies: Während Langerhans-Inseln vom Hund von viel ECM umgeben sind, fehlen diese beim Schwein fast vollständig. Ratte und Mensch nehmen mit einer mittelmässig ausgeprägten ECM eine Zwischenstellung ein [32, 43]. Möglicherweise liegt der Unterschied nicht nur in der Ausprägung der ECM, sondern die Inselzellen verschiedener Spezies reagieren auch unterschiedlich auf Zugabe bestimmter ECMP: Während sich bei Langerhans-Inseln vom Hund bei Zugabe von nur einem ECMP schon ein positiver Effekt zeigt [29], brauchen Langerhans-Inseln vom Schwein möglicherweise das oben dargestellte Zusammenspiel der drei ECMP Kollagen IV, Laminin und Fibronectin.

### 5.3 Insulin-Profile nanoverkapselter Langerhans-Inseln

Für die aus Polyelektrolyten bestehenden Nanokapseln gibt es viele Verwendungsmöglichkeiten [80-86]. Eine ist die Nanoverkapselung von Langerhans-Inseln bevor sie zur Therapie des Typ 1-Diabetes transplantiert werden [78]. In der hier vorgelegten Arbeit wurde untersucht, ob die diversen Polyelektrolytschichten die Insulin-Ausschüttung der Inselzellen beeinträchtigen. Es wurden zwei unterschiedliche Nanokapseln untersucht, jeweils aus drei Polyelektrolytschichten bestehend. Anschliessend wurde die Insulin-Ausschüttung mit 3 mM bzw. 20 mM Glukose stimuliert.

Die Ergebnisse der unbehandelten/unverkapselten Langerhans-Inseln der Kontrolle wurden in 5.1 beschrieben.

Im Vergleich dazu schlechter sind die Perifusionskurven der CPC-nanoverkapselten Langerhans-Inseln: Die Insulin-Peaks auf Glukose-Stimulation sind niedriger, dafür werden die Insulin-Peaks bei Stimulation mit KRL+BSA durch die Verkapselung mit CPC noch verstärkt. (**s. Abb. 14, Abb. 15**). Die zweite untersuchte Nanokapsel CPP zeigt am Tag +1 deutlich den beschriebenen paradoxen Rückgang der Insulin-Ausschüttung. Am Tag +6 zeigt sich ein den Langerhans-Inseln der Kontrolle vergleichbares Bild. Bemerkenswert ist aber das hohe Niveau der Insulin-Ausschüttung bei einer der drei Präparationen (I-08-07), das *in vivo* zu einer Hyperinsulinämie des Transplantatempfängers führen würde. Allerdings zeigen die Inselzellen mit der Nanokapsel CPP eine gleichmässigeren Insulin-Sekretion, die hohen Peaks bei Perifusion mit KRL+BSA fehlen. Die Nanokapsel CPP führt also zu einer Stabilisierung der Insulin-Sekretion mit Erhaltung der erwünschten Peaks bei Glukose-Stimulation (**s. Abb. 16, Abb. 17**) und ist somit der Nanokapsel CPC überlegen.

Die unterschiedlichen Ergebnisse überraschen. Ein möglicher Grund liegt in der Wahl der einzelnen Polyelektrolyte und ihrer möglichen toxischen Wirkung auf die Inselzellen. Allerdings wurden hier ausschliesslich Polyelektrolyte verwendet, deren Biokompatibilität in anderen Versuchen nachgewiesen worden war. Das gilt zunächst für Chitosan, das für seine gute Biokompatibilität bekannt ist [89], gezeigt zum Beispiel in mehreren Versuchen mit humanen Nabelschnur-Endothelzellen [82], und das bei beiden Polyelektrolyt-Nanokapseln für die den Inselzellen nahe innere Schicht verwendet wurde.

PEGPPGPEG, die mittlere Schicht der CPC-Nanokapsel, wurde wegen der positiven Erfahrungen mit PEGylierten Oberflächen verwendet: Sie werden in der Biomedizin gerne verwendet, weil sie bei guter Biokompatibilität eine unspezifische Proteinbindung verhindern [91-94]. Für *Poly(Acrylic Acid)* wie in der Schicht PAAMA (engl. *Poly(Acrylic Acid-Co-Maleic Acid) Sodium Salt*) war zwar eine leichte Zytotoxizität nachgewiesen worden, allerdings hatte die Verwendung dieses Materials zu guten Ergebnissen bei der Nanoverkapselung von porzinen Nebenschilddrüsenzellen geführt, und auch die Biokompatibilität von *Maleic Acid* war bestätigt worden [95, 96]. PAH 15 kDa schliesslich, die äussere Schicht der CPP-Nanokapsel, ist eines der am häufigsten verwendeten Polyelektrolyte [77, 88] mit guten Ergebnissen in Versuchen mit humanen Inselzellen, humanen Nabelschnur-Endothelzellen und bei *In-Vivo*-Versuchen in Ratten [78, 83, 87]. Für die Polyelektrolyt-Nanoverkapselung, hier mit drei Schichten, wurde gezeigt, dass die Glukose-abhängige Insulin-Sekretion der Langerhans-Inseln erhalten blieb [78], möglicherweise wegen der dafür als vorteilhaft erwiesenen positiven Nettoladung der Nanokapsel [87, 90]. Eine mögliche Erklärung für die unbefriedigenden Perfusionsergebnisse mit der CPC-Nanokapsel ist die verminderte Permeabilität der Polyelektrolytschichten für Insulin, allerdings gibt es hier durchaus auch hohe Insulin-Peaks, so dass diese Erklärung für sich genommen nicht befriedigt.

#### 5.4 Fluoreszenzmikroskopie der Nanokapseln

Durch Verwendung von FITC-gekoppelten Polyelektrolyten in der äusseren Schicht konnten die Nanokapseln fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden.

Zunächst wurden Aufnahmen der unverkapselten Langerhans-Inseln erstellt. Dabei zeigten die Langerhans-Inseln der Kontrolle und die CPC-nanoverkapselten Langerhans-Inseln (ohne FITC-gekoppeltes Polyelektrolyt) sehr ähnliche Ergebnisse: im Durchlicht morphologisch unauffällige Langerhans-Inseln, im Fluoreszenzlicht sind diese nicht oder kaum erkennbar (**s. Abb. 18, Abb. 19**). Auffallend jedoch sind die Ergebnisse mit der CPP-Nanokapsel: Schon in den Durchlichtaufnahmen fällt auf, dass die Langerhans-Inseln im Gegensatz zu den Langerhans-Inseln der Kontrolle und den CPC-nanoverkapselten Langerhans-Inseln nicht glatt begrenzt sind, sondern im Randbereich „ausgefranst“ sind; um die grossen Langerhans-Inseln herum liegen gruppierte

und einzelne Inselzellen (**s. Abb. 21**). Wie oben beschrieben scheint diese veränderte Morphologie keine Auswirkungen auf die Funktion der Inselzellen zu haben: Die CPP-nanoverkapselten Langerhans-Inseln zeigen gute Ergebnisse in den Perifusionsversuchen.

Eine weitere Auffälligkeit ist die im Vergleich zu den Langerhans-Inseln der Kontrolle und den CPC-nanoverkapselten Langerhans-Inseln verstärkte Eigenfluoreszenz der CPP-nanoverkapselten Langerhans-Inseln. Da hier keine FITC-gekoppelten Polyelektrolyte verwendet wurden, muss die Autofluoreszenz also an den für die Nanoverkapselung verwendeten Polyelektrolyten Chitosan MMW/PAAMA/PAH 15 kDa liegen. Eine verstärkte Autofluoreszenz von Zellen korreliert mit deren Metabolismus und wird als ein Zeichen für Stress gewertet [110, 111]. Auch die Färbung mit FDA/PI, die zur Vitalitätsbestimmung der Langerhans-Inseln eingesetzt wird, zeigt bei der Nanokapsel CPP eine Besonderheit (**s. Abb. 23**): Offensichtlich gelangt das FDA in das Zytoplasma der Inselzellen, wo der grüne Farbstoff entsteht; das rote PI dagegen bindet an die freien Bindungsstellen der Polyelektrolytschichten und erreicht nicht das Zellinnere. Die CPP-Nanokapsel führt also zu einer offensichtlichen Eigenfluoreszenz der Langerhans-Inseln und macht die Vitalitätsbestimmung mit FDA/PI unmöglich.

Die CPC\*-nanoverkapselten Langerhans-Inseln (nur das Chitosan MMW in der äusseren Schicht ist mit FITC gekoppelt) zeigen eine ungleichmässige Fluoreszenzverteilung (**s. Abb. 20**). Möglicherweise werden durch die äussere FITC-Chitosanschicht die Langerhans-Inseln nicht vollständig bedeckt.

Die Bilder der CPP\*-Nanokapsel (**s. Abb. 22**; hier ist das PAH 15 kDa FITC-gekoppelt) zeigen dagegen eine sehr starke und gleichmässige Fluoreszenz. Alle Bereiche der Langerhans-Insel fluoreszieren. Hier scheint allerdings zuviel FITC an die Polyelektrolyte gebunden zu sein, bei zukünftigen Versuchen sollte das Mischungsverhältnis des FITC-PAH 15 kDa mit dem herkömmlichen PAH 15 kDa (hier 1:10, Mischung vor der Verkapselung) zu Gunsten des herkömmlichen PAH 15 kDa verändert werden.

Insgesamt ist die Integrität der Polyelektrolyt-Nanokapseln, die den Langerhans-Inseln eng anliegen, mit der hier verwendeten Epifluoreszenzmikroskopie schwer zu beurteilen: sie projiziert das dreidimensionale Molekül in ein zweidimensionales Bild. Durch

die Summation der Fluoreszenzsignale und die zu geringe Auflösung des Mikroskops können eventuelle Lücken in der Nanokapsel schlecht erkannt werden. Besser zu beurteilen wären Schnittbilder durch die FITC-Polyelektrolyt-nanoverkapselten Langerhans-Inseln, wie sie mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie erstellt werden können. Hier wird ein optisches Schnittbild durch das mikroskopierte Objekt erstellt. Bei der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie der Polyelektrolyt-nanoverkapselten Inselzellen würde so eine eindeutige Darstellung der Kapsel als eine die Langerhans-Insel umgebende, fluoreszierende Schicht gelingen.



## 6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von extrazellulären Matrixproteinen beziehungsweise von Polyelektrolytschichten als Nanokapsel auf die porzinen Langerhans-Inseln untersucht, ausserdem die mikroskopische Darstellbarkeit der Nanokapseln. Dabei konnte zunächst eine Verbesserung der Funktion der Langerhans-Inseln durch Exposition der ECMP Kollagen IV, Laminin und Fibronectin (C+L+F) gezeigt werden. Ist eine gute Auswahl der Spendertiere und eine hohe Qualität der Isolierung gewährleistet, so ist die dadurch erzielte Verbesserung der Kulturbedingungen der nächste wichtige Schritt, um gut funktionierende Langerhans-Inseln zu erhalten. Nachdem gezeigt wurde, dass durch Exposition von C+L+F (nicht aber von C+L) die Ergebnisse in den Perfusionen im Vergleich mit den Langerhans-Inseln der Kontrolle stabilisiert werden konnten, muss dieses Ergebnis jetzt in Langzeitversuchen bestätigt werden. Ausserdem muss untersucht werden, ob durch Variieren des ECMP-Gehalts im Kulturmedium weitere Verbesserungen erzielt werden. Der nächste Schritt in Richtung Transplantation ist die Verkapselung der Langerhans-Inseln. Hier wurde untersucht, ob durch die sogenannte *Layer-by-Layer*-Technik mit Aufbringen unterschiedlicher Polyelektrolytschichten als Nanokapsel die Funktion der Langerhans-Inseln beeinflusst wird. Es wurden zwei verschiedene Polyelektrolyt-Kombinationen untersucht. Nur bei der Nanokapsel CPP zeigte sich ein zufrieden stellendes Ergebnis, durch die Schichten CPC dagegen wurde die Funktion der Inselzellen negativ beeinflusst. Das Ergebnis der Nanokapsel CPP ist viel versprechend, eine unbeeinträchtigte Funktion der verkapselten Inselzellen ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Transplantation. Neben den hier verwendeten gibt es aber noch eine Vielzahl anderer Polyelektrolyte mit sehr guter Biokompatibilität. In weiteren Versuchen muss sich zeigen, welche Polyelektrolyte am besten für die Nanoverkapselung geeignet sind. Die Darstellung der Nanokapseln mit dem Fluoreszenzmikroskop stellte sich schwierig dar. Hier muss die Konzentration der FITC-gekoppelten Polyelektrolyte optimiert werden. Ein weiteres Problem ist die Darstellung der Polyelektrolytschichten, die durch die Erstellung von optischen Schnittbildern mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie besser gelingen könnte. Schliesslich muss untersucht werden, ob die Nanokapsel neben der mechanischen Stabilisierung einen guten Schutz der Langerhans-Inseln vor dem Empfänger-Immunsystem bietet; dies erfordert Versuche mit gegen die Inselzellen gerichteten Antikörpern.

## 7 Zusammenfassung

Auch nach jahrelanger Forschung ist eine Transplantation von Langerhans-Inseln noch keine Standard-Therapie des Insulin-abhängigen Diabetes mellitus. Ein Problem ist die grosse Anzahl benötigter Pankreata, mögliche Lösung die Verwendung porziner Langerhans-Inseln. Damit die späteren Spender-Langerhans-Inseln ein gutes *In-Vivo*-Ergebnis erzielen können, muss bereits eine gute Funktion *in vitro* gewährleistet sein. Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, ob sich eine verbesserte Funktion der Langerhans-Inseln durch eine Exposition von extrazellulären Matrixproteinen erreichen lässt. Weiterhin wird ein Einfluss von Polyelektrolytschichten auf die Funktion der Langerhans-Inseln und ihre mikroskopische Darstellbarkeit untersucht. Mit der sogenannten Nanoverkapselung soll bei der Transplantation eine *Immunisolation* der Spender-Inseln als Schutz vor dem Immunsystem des Empfängers erreicht werden. Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse der Funktionsversuche mit den ECMP und den Polyelektrolyten und die mikroskopische Auswertung der Versuche mit den Polyelektrolyten dargestellt.

1. Die Funktion der Langerhans-Inseln ist generell am Tag +6 besser als am Tag +1, weil diese sich zunächst vom Stress der Isolierung erholen müssen. Da sich aber die Qualität der einzelnen Präparationen stark unterscheidet und somit ihre Vergleichbarkeit untereinander erschwert ist, ist es sinnvoll, die Versuche auch am Tag +1 durchzuführen. So hat man für die späteren Versuchsergebnisse – getrennt für jede einzelne Präparation – einen individuellen Bezugspunkt. Aussagekräftiger ist also die Beurteilung einer Perifusion am Tag +6, aber diese muss mit der Funktion der Langerhans-Inseln am Tag +1 verglichen werden.
2. Eine Verbesserung der Inselzell-Funktion durch die ECMP kann bestätigt werden, allerdings hängt sie von den jeweils verwendeten Komponenten der ECM ab. Durchweg gute Perifusionsergebnisse am Tag +6 werden nach Exposition mit Kollagen IV, Laminin und Fibronectin erreicht. Fehlt dagegen Fibronectin (Exposition nur mit Kollagen IV und Laminin), ergibt sich im Vergleich zu den Langerhans-Inseln der Kontrolle kein verbessertes Ergebnis.

3. Bei den Versuchen mit den Polyelektrolyt-Nanokapseln ergeben sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Nanokapseln. Bei allen verwendeten Polyelektrolyten war auf gute Biokompatibilität geachtet worden. Dennoch scheinen die Schichten CPC einen negativen Einfluss auf die Langerhans-Inseln zu haben: Hier kommt es zu einer verschlechterten Funktion der Langerhans-Inseln am Tag +6. Die Langerhans-Inseln mit der Nanokapsel CPP dagegen zeigen am Tag +6 einen im Vergleich mit den Langerhans-Inseln der Kontrolle gleichmässigeren Kurvenverlauf, ohne dass die Insulin-Ausschüttung nach Glukose-Stimulation fehlt.
4. Unverkapselte und nanoverkapselte Langerhans-Inseln wurden an den Tagen +1, +6 und +13 durchlichtmikroskopisch beurteilt. Dabei sind die CPC-nanoverkapselten Langerhans-Inseln morphologisch unauffällig, bei den Langerhans-Inseln mit der CPP-Nanokapsel zeigen sich Unregelmässigkeiten: Die Langerhans-Inseln zeigen „ausgefranste“ Ränder und einzelne und gruppierte Zellen um die Langerhans-Inseln herum. In der Fluoreszenzmikroskopie zeigt sich bei den CPP-Nanokapseln eine verstärkte Autofluoreszenz, ein Zeichen für zellulären Stress. Dies korreliert allerdings nicht mit einer schlechteren Funktion: die CPP-Langerhans-Inseln zeigten gute Ergebnisse in den Perfusionen.
5. Durch die Verwendung von FITC-gekoppelten Polyelektrolyten lässt sich mikroskopisch eine verstärkte Fluoreszenz der Langerhans-Inseln nachweisen. Allerdings ist die Auswertung der zweidimensionalen Bilder schwer. Hier sollen in Zukunft mit der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie Schnittbilder durch die Langerhans-Inseln erstellt werden; dadurch könnte die Nanokapsel eindeutig sichtbar gemacht werden.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse über die extrazellulären Matrixproteine C+L+F sind zunächst für zukünftige Versuche wichtig: Die Funktion der Langerhans-Inseln wird verbessert, dies ist eine Voraussetzung für erfolgreiche Versuche. Ausserdem spielt sie für die spätere Vorbereitung von Langerhans-Inseln vor der Transplantation eine wichtige Rolle. Entscheidend ist also, dass die Langerhans-Inseln für mehrere Tage mit den

ECMP inkubiert werden, um so ihre Funktion zu verbessern. Bei der Polyelektrolyt-Nanoverkapselung besteht noch viel Forschungsbedarf: Anhand des Erfolg versprechenden Ergebnisses mit der CPP-Nanokapsel muss weitergearbeitet werden. Offensichtlich führt – bei Auswahl der richtigen Polyelektrolyte – die Nanoverkapselung nicht zu einer verschlechterten Funktion der Langerhans-Inseln. Bei einer grossen Anzahl in Frage kommender Polyelektrolyte muss die optimale Kombination von Schichten gefunden und ihre Fähigkeit zur Immunisation untersucht werden. Bezüglich der Darstellung der Nanokapseln bietet sich die konfokale Fluoreszenzmikroskopie an.

## 8 Literaturverzeichnis

- 1 N. D. Cohen, J. E. Shaw. Diabetes: advances in treatment. *Internal Medicine Journal* 37: 383-388, 2007
- 2 P. Dejkhamron, R. K. Menon, M. A. Sperling. Childhood diabetes mellitus: Recent advances & future prospects. *Indian Journal of Medical Research* 125: 231-250, 2007
- 3 D. Daneman. Type 1 diabetes. *Lancet* 367: 847-858, 2006
- 4 D. T. Robles, G. S. Eisenbarth. Type 1A Diabetes Induced by Infection and Immunization. *Journal of Autoimmunity* 16: 355-362, 2001
- 5 K. M. Gillespie. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. *Canadian Medical Association Journal* 175 (2): 165-170, 2006
- 6 J.-F. Bach. Protective Role of Infections and Vaccinations on Autoimmune Diseases. *Journal of Autoimmunity* 16: 347-353, 2001
- 7 J. M. Norris, X. Yin, M. M. Lamb, K. Barriga, J. Seifert, M. Hoffman, H. D. Orton, A. E. Barón, M. Clare-Salzler, H. P. Chase, N. J. Szabo, H. Erlich, G. S. Eisenbarth, M. Rewers. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Intake and Islet Autoimmunity in Children at Increased Risk for Type 1 Diabetes. *Journal of the American Medical Association* 298 (12): 1420-1428, 2007
- 8 C. Filippi, M. v. Herrath. How viral infections affect the autoimmune process leading to type 1 diabetes. *Cellular Immunology* 233: 125-132, 2005
- 9 J. Graham, W. A. Hagopian, I. Kockum, L. S. Li, C. B. Sanjeevi, R. M. Lowe, J. B. Schaefer, M. Zarghami, H. L. Day, M. Landin-Olsson, J. P. Palmer, M. Janer-Villanueva, L. Hood, G. Sundkvist, Å. Lernmark, N. Breslow, G. Dahlquist, for the Swedish Childhood Diabetes Study Group, G. Blohmé for the Diabetes Incidence in Sweden Study Group. Genetic Effects on Age-Dependent Onset and Islet Cell Autoantibody Markers in Type 1 Diabetes. *Diabetes* 51: 1346-1355, 2002

- 10 R. Jensen, L. Gilliam, C. Torn, M. Landin-Olsson, J. Palmer, K. Åkesson, I. Kockum, B. Lernmark, A. F. Karlsson, K. F. Lynch, N. Breslow, Å. Lernmark, G. Sundkvist on behalf of the Diabetes Incidence Study in Sweden group. Islet cell autoantibody levels after the diagnosis of young adult diabetic patients. *Diabetic Medicine* 24: 1221-1228, 2007
- 11 Q. Mohamed, M. C. Gillies, T. Y. Wong. Management of Diabetic Retinopathy. A Systematic Review. *Journal of the American Medical Association* 298 (8): 902-916, 2007
- 12 A. J. M. Boulton, A. I. Vinik, J. C. Arezzo, V. Bril, E. L. Feldman, R. Freeman, R. A. Malik, R. E. Maser, J. M. Sosenko, D. Ziegler. Diabetic Neuropathies. A statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 28 (4): 956-962, 2005
- 13 J. N. Harvey, K. Rizvi, L. Craney, J. Messenger, R. Shah, P. A. Meadows. Population-based survey and analysis of trends in the prevalence of diabetic nephropathy in Type 1 diabetes. *Diabetic Medicine* 18: 998-1002, 2001
- 14 R. Bogdanović. Diabetic nephropathy in children and adolescents. *Pediatric Nephrology* 23 (4): 507-525, 2008
- 15 S. Rahman, T. Rahman, A. Al-S. Ismail, A. R. A. Rashid. Diabetes-associated macrovasculopathy: pathophysiology and pathogenesis. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 9: 767-780, 2007
- 16 A. J. Krentz, G. Clough, C. D. Byrne. Interactions between microvascular and macrovascular disease in diabetes: pathophysiology and therapeutic implications. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 9: 781-791, 2007
- 17 U. Scheidegger, S. Allemann, K. Scheidegger, P. Diem. Continuous subcutaneous insulin infusion therapy: effects on quality of life. *Swiss Medical Weekly* 137: 476-482, 2007
- 18 E. Roche, J. A. Reig, A. Campos, B. Paredes, J. R. Isaac, S. Lim, R. Y. Calne, B. Soria. Insulin-secreting cells derived from stem cells: Clinical perspectives, hypes and hopes. *Transplant Immunology* 15: 113-129, 2005
- 19 S. T. Gangaram-Panday, M. M. Faas, P. de Vos. Towards stem-cell therapy in the endocrine pancreas. *TRENDS in Molecular Medicine* 13 (4): 164-173, 2007

- 20 A. Hayek. Cell replacement in type 1 diabetes. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism* 18 (1): 1157-1161, 2005
- 21 R. G. Bretzel, M. Eckhard, H. Jahr, M. D. Brendel. Inselzelltransplantation, Stammzelltherapie und regenerative Therapie bei Diabetes mellitus. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 131: 903-906, 2006
- 22 E. A. Ryan, D. Bigam, A. M. J. Shapiro. Current indications for pancreas or islet transplant. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 8: 1-7, 2006
- 23 P. A. Gerber, V. Pavlicek, N. Demartines, R. Zuellig, T. Pfammatter, R. Wuethrich, M. Weber, G. A. Spinas, R. Lehmann. Simultaneous islet-kidney vs pancreas-kidney transplantation in type 1 diabetes mellitus: a 5 year single centre follow-up. *Diabetologia* 51 (1): 110-119, 2008
- 24 P. Witkowski, S. B. Zakai, A. Rana, Z. Śledzinski, M. A. Hardy. Pancreatic Islet Transplantation, what has been Achieved since Edmonton Break-Through. *Annals of Transplantation* 11 (2): 5-13, 2006
- 25 A. M. J. Shapiro, J. R. T. Lakey, E. A. Ryan, G. S. Korbutt, E. Toth, G. L. Warnock, N. M. Kneteman, R. V. Rajotte. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *The New England Journal of Medicine* 343 (4): 230-238, 2000
- 26 E. A. Ryan, B. W. Paty, P. A. Senior, D. Bigam, E. Alfadhli, N. M. Kneteman, J. R. T. Lakey, A. M. J. Shapiro. Five-Year Follow-Up After Clinical Islet Transplantation. *Diabetes* 54: 2060-2069, 2005
- 27 A. Hogan, A. Pileggi, C. Ricordi. Transplantation: current developments and future directions; The future of clinical islet transplantation as a cure for diabetes. *Frontiers in Bioscience* 13: 1192-1205, 2008
- 28 J. Ren, P. Jin, E. Wang, E. Liu, D. M. Harlan, X. Li, D. F. Stromeck. Pancreatic islet cell therapy for type 1 diabetes: understanding the effects of glucose stimulation on islets in order to produce better islets for transplantation. *Journal of Translational Medicine* 5: 1-15, 2007
- 29 R. N. Wang, L. Rosenberg. Maintenance of beta-cell function and survival following islet isolation requires re-establishment of the islet-matrix relationship. *Journal of Endocrinology* 163: 181-190, 1999

- 30 M. C. Raff. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356: 397-400, 1992
- 31 D. W. Hopcroft, D. R. Mason, R. S. Scott. Structure-function relationships in pancreatic islets: support for intraislet modulation of insulin secretion. *Endocrinology* 117: 2073-2080, 1985
- 32 R. N. Wang, S. Paraskevas, L. Rosenberg. Characterization of Integrin Expression in Islets Isolated from Hamster, Canine, Porcine and Human Pancreas. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 47 (4): 499-506, 1999
- 33 N. Nagata, A. Iwanaga, K. Inoue, Y. Tabata. Co-culture of extracellular matrix suppresses the cell death of rat pancreatic islets. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 13 (5): 579-590, 2002
- 34 P. Metrakos, S. Yuan, D. Agapitos, L. Rosenberg. Intercellular communication and maintenance of islet cell mass -- implications for islet transplantation. *Surgery* 114 (2): 423-427, 1993
- 35 A. Ilieva, S. Yuan, R. N. Wang, D. Agapitos, D. J. Hill, L. Rosenberg. Pancreatic islet cell survival following islet isolation: the role of cellular interactions in the pancreas. *Journal of Endocrinology* 161: 357-364, 1999
- 36 T. M. Gress, A. Menke, M. Bachem, F. Mueller-Pillasch, V. Ellenrieder, H. Weidenbach, M. Wagner, G. Adler. Role of Extracellular Matrix in Pancreatic Diseases. *Digestion* 59: 625-637, 1998
- 37 J. C. Adams, F. M. Watt. Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* 117: 1183-1198, 1993
- 38 S. M. Frisch, H. Francis. Disruption of Epithelial Cell-Matrix Interactions Induces Apoptosis. *The Journal of Cell Biology* 124 (4): 619-626, 1994
- 39 J. E. Meredith Jr, B. Fazeli, M. A. Schwartz. The Extracellular Matrix as a Cell Survival Factor. *Molecular Biology of the Cell* 4: 953-961, 1993
- 40 J. E. Meredith Jr, M. A. Schwartz. Integrins, adhesion and apoptosis. *Trends in Cell Biology* 7: 146-150, 1997
- 41 F.-X. Jiang, L. C. Harrison. Extracellular Signals and Pancreatic  $\beta$ -cell Development: A Brief Review. *Molecular Medicine* 8 (12): 763-770, 2002
- 42 J. Labat-Robert, M. Bihari-Varga, L. Robert. Extracellular Matrix. *FEBS Letters* 268 (2): 386-393, 1990



- 43 J. H. M. van Deijnen, C. E. Hulstaert, G. H. J. Wolters, R. van Schilfgaarde. Significance of the peri-insular extracellular matrix for islet isolation from the pancreas of rat, dog, pig, and man. *Cell and Tissue Research* 267: 139-146, 1992
- 44 E. D. Hay. Extracellular Matrix. *The Journal of Cell Biology* 91 (No. 3, Pt. 2): 205s-223s, 1981
- 45 Y. Mao, J. E. Schwarzbauer. Stimulatory effects of a three-dimensional microenvironment on cell-mediated fibronectin fibrillogenesis. *Journal of Cell Science* 118 (19): 4427-4436, 2005
- 46 I. Vakonakis, D. Staunton, L. M. Rooney, I. D. Campbell. Interdomain association in fibronectin: insight into cryptic sites and fibrillogenesis. *The EMBO Journal* 26 (10): 2575-2583, 2007
- 47 T. Meyer, S. Czub, I. Chodnewska, U. Beutner, W. Hamelmann, G. Kloeck, U. Zimmermann, A. Thiede, K. Ulrichs. Expression pattern of extracellular matrix proteins in the pancreas of various domestic pig breeds, the Goettingen Minipig and the Wild Boar. *Annals of Transplantation* 2 (3): 17-26, 1997
- 48 T. Meyer, C. Buehler, S. Czub, U. Beutner, C. Otto, A. Thiede, K. Ulrichs. Selection of Donor Pigs for Pancreatic Islet Transplantation May Depend on the Expression Level of Connective Tissue Proteins in the Islet Capsule. *Transplantation Proceedings* 30: 2471-2473, 1998
- 49 R. Montesano, P. Mouron, M. Amherdt, L. Orci. Collagen Matrix Promotes Reorganization of Pancreatic Endocrine Cell Monolayers into Islet-like Organoids. *The Journal of Cell Biology* 97: 935-939, 1983
- 50 C. H. Thivolet, P. Chatelain, H. Nicoloso, A. Durand, J. Bertrand. Morphological and Functional Effects of Extracellular Matrix on Pancreatic Islet Cell Cultures. *Experimental Cell Research* 159: 313-322, 1985
- 51 R. Perfetti, T. E. Henderson, Y. Wang, C. Montrose-Rafizadeh, J. M. Egan. Insulin Release and Insulin mRNA Levels in Rat Islets of Langerhans Cultured on Extracellular Matrix. *Pancreas* 13 (1): 47-54, 1996
- 52 C. Oeberg-Welsh. Long-Term Culture in Matrigel Enhances the Insulin Secretion of Fetal Porcine Islet-like Cell Clusters In Vitro. *Pancreas* 22 (2): 157-163, 2001

- 53 K. Edamura, K. Nasu, Y. Iwami, R. Nishimura, H. Ogawa, N. Sasaki, H. Ohgawara. Prevalence of Porcine Endogenous Retrovirus in Domestic Pigs in Japan and Its Potential Infection in Dogs Xenotransplanted with Porcine Pancreatic Islet Cells. *The Journal of Veterinary Medical Science* 66 (2): 129-135, 2004
- 54 K. Paradis, G. Langford, Z. Long, W. Heneine, P. Sandstrom, W. M. Switzer, L. E. Chapman, C. Lockey, D. Onions, The XEN 111 Study Group, E. Otto. Search for Cross-Species Transmission of Porcine Endogenous Retrovirus in Patients Treated with Living Pig Tissue. *Science* 285: 1236-1241, 1999
- 55 W. Heneine, A. Tibell, W. M. Switzer, P. Sandstrom, G. V. Rosales, A. Mathews, O. Korsgren, L. E. Chapman, T. M. Folks, C. G. Groth. No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts. *Lancet* 352: 695-699, 1998
- 56 M. de Groot, P. P. M. Keizer, B. J. de Haan, T. A. Schuurs, H. G. D. Leuvenink, R. van Schilfgaarde, P. de Vos. Microcapsules and Their Ability to Protect Islets Against Cytokine-Mediated Dysfunction. *Transplantation Proceedings* 33: 1711-1712, 2001
- 57 P. de Vos, P. Marchetti. Encapsulation of pancreatic islets for transplantation in diabetes: the untouchable islets. *TRENDS in Molecular Medicine* 8 (8): 363-366, 2002
- 58 F. Lim, A. M. Sun. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 210: 908-910, 1980
- 59 B. L. Strand, Y. A. Mørch, K. R. Syvertsen, T. Espevik, G. Skjåk-Bræk. Microcapsules made by enzymatically tailored alginate. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A.* 64 (3): 540-550, 2003
- 60 G. Orive, R. M. Hernández, A. R. Gascón, R. Calafiore, T. M. S. Chang, P. de Vos, G. Hortelano, D. Hunkeler, I. Lacík, A. M. J. Shapiro, J. L. Pedraz. Cell encapsulation: Promise and progress. *Nature Medicine* 9 (1): 104-107, 2003
- 61 G. Orive, R. M. Hernández, A. R. Gascón, R. Calafiore, T. M. S. Chang, P. de Vos, G. Hortelano, D. Hunkeler, I. Lacík, J. L. Pedraz. History, challenges and perspectives of cell microencapsulation. *TRENDS in Biotechnology* 22 (2): 87-92, 2004

- 62 S. Krol. Nanomedicine in diabetes – Recent developments. *European Journal of Nanomedicine* 1: 40-44, 2008
- 63 T. Kobayashi, Y. Aomatsu, H. Iwata, T. Kin, H. Kanehiro, M. Hisanga, S. Ko, M. Nagao, G. Harb, Y. Nakajima. Survival of Microencapsulated Islets at 400 Days Posttransplantation in the Omental Pouch of NOD Mice. *Cell Transplantation* 15: 359-365, 2006
- 64 P. Soon-Shiong, R. E. Heintz, N. Merideth, Q. X. Yao, Z. Yao, T. Zheng, M. Murphy, M. K. Moloney, M. Schmehl, M. Harris, R. Mendez, R. Mendez, P. A. Sandford. Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation. *Lancet* 343: 950-951, 1994
- 65 P. de Vos, B. de Haan, R. van Schilfgaarde. Effect of the alginate composition on the biocompatibility of alginate-polylysine microcapsules. *Biomaterials* 18: 273-278, 1997
- 66 P. de Vos, C. G. Hoogmoed, H. J. Busscher. Chemistry and biocompatibility of alginate-PLL capsules for immunoprotection of mammalian cells. *Journal of Biomedical Materials Research* 60 (2): 252-259, 2002
- 67 P. de Vos, B. J. de Haan, G. H. J. Wolters, J. H. Strubbe, R. van Schilfgaarde. Improved biocompatibility but limited graft survival after purification of alginate for microencapsulation of pancreatic islets. *Diabetologia* 40: 262-270, 1997
- 68 P. de Vos, J. F. M. van Straaten, A. G. Nieuwenhuizen, M. de Groot, R. J. Ploeg, B. J. de Haan, R. van Schilfgaarde. Why Do Microencapsulated Islet Grafts Fail in the Absence of Fibrotic Overgrowth? *Diabetes* 48: 1381-1388, 1999
- 69 P. de Vos, C. G. van Hoogmoed, J. van Zanten, S. Netter, J. H. Strubbe, H. J. Busscher. Long-term biocompatibility, chemistry, and function of microencapsulated pancreatic islets. *Biomaterials* 24: 305-312, 2003
- 70 S. Krol, A. Gliozzi, A. Diaspro. Polyelectrolyte Nanocapsules – Promising Progress in Development of New Drugs and Therapies. *Frontiers in Drug Design and Discovery* 2: 333-348, 2006
- 71 P. de Vos, I. Smedema, H. van Goor, H. Moes, J. van Zanten, S. Netters, L. F. M. de Leij, A. de Haan, B. J. de Haan. Association between macrophage activation and function of micro-encapsulated rat islets. *Diabetologia* 46: 666-673, 2003

- 72 A. Bartkowiak. Optimal Conditions of Transplantable Binary Polyelectrolyte Microcapsules. *Annals of the New York Academy of Sciences* 944: 120-134, 2001
- 73 S. Schneider, P. J. Feilen, V. Slotty, D. Kampfner, S. Preuss, S. Berger, J. Beyer, R. Pommersheim. Multilayer capsules: a promising microencapsulation system for transplantation of pancreatic islets. *Biomaterials* 22: 1961-1970, 2001
- 74 S. Miura, Y. Teramura, H. Iwata. Encapsulation of islets with ultra-thin polyion complex membrane through poly(ethylene glycol)-phospholipids anchored to cell membrane. *Biomaterials* 27: 5828-5835, 2006
- 75 H. Iwata, K. Kobayashi, T. Takagi, T. Oka, H. Yang, H. Amemiya, T. Tsuji, F. Ito. Feasibility of agarose microbeads with xenogeneic islets as a bioartificial pancreas. *Journal of Biomedical Materials Research* 28: 1003-1011, 1994
- 76 Y. Teramura, Y. Kaneda, H. Iwata. Islet-encapsulation in ultra-thin layer-by-layer membranes of poly(vinyl alcohol) anchored to poly(ethylene glycol)-lipids in the cell membrane. *Biomaterials* 28: 4818-4825, 2007
- 77 G. Decher. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* 277: 1232-1237, 1997
- 78 S. Krol, S. del Guerra, M. Grupillo, A. Diaspro, A. Gliozzi, P. Marchetti. Multilayer Nanoencapsulation. New Approach for Immune Protection of Human Pancreatic Islets. *Nano Letters* 6 (9): 1933-1939, 2006
- 79 S. T. Dubas, J. B. Schlenoff. Factors Controlling the Growth of Polyelectrolyte Multilayers. *Macromolecules* 32: 8153-8160, 1999
- 80 E. Donath, S. Moya, B. Neu, G. B. Sukhorukov, R. Georgieva, A. Voigt, H. Baeumler, H. Kiesewetter, H. Moehwald. Hollow Polymer Shells from Biological Templates: Fabrication and Potential Applications. *Chemistry* 8 (23): 5481-5485, 2002
- 81 A. A. Antipov, G. B. Sukhorukov. Polyelectrolyte multilayer capsules as vehicles with tunable permeability. *Advances in Colloid and Interface Science* 111: 49-61, 2004
- 82 Y. Zhu, C. Gao, T. He, X. Liu, J. Shen. Layer-by-Layer Assembly To Modify Poly(L-lactic acid) Surface toward Improving Its Cytocompatibility to Human Endothelial Cells. *Biomacromolecules* 4: 446-452, 2003

- 83 C. Boura, P. Menu, E. Payan, C. Picart, J. C. Voegel, S. Muller, J. F. Stoltz. Endothelial cells grown on thin polyelectrolyte multilayered films: an evaluation of a new versatile surface modification. *Biomaterials* 24: 3521-3530, 2003
- 84 Y. F. Fan, Y. N. Wang, Y. G. Fan, J. B. Ma. Preparation of insulin nanoparticles and their encapsulation with biodegradable polyelectrolytes via the layer-by-layer adsorption. *International Journal of Pharmaceutics* 324: 158-167, 2006
- 85 A. Diaspro, D. Silvano, S. Krol, O. Cavalleri, A. Gliozzi. Single Living Cell Encapsulation in Nano-organized Polyelectrolyte Shells. *Langmuir* 18: 5047-5050, 2002
- 86 S. Krol, M. Nolte, A. Diaspro, D. Mazza, R. Magrassi, A. Gliozzi, A. Fery. Encapsulated Living Cells on Microstructured Surfaces. *Langmuir* 21: 705-709, 2005
- 87 M. Chanana, A. Gliozzi, A. Diaspro, I. Chodnevskaja, S. Huewel, V. Moskalenko, K. Ulrichs, H.-J. Galla, S. Krol. Interaction of Polyelectrolytes and Their Composites with Living Cells. *Nano Letters* 5 (12): 2605-2612, 2005
- 88 B. G. de Geest, N. N. Sanders, G. B. Sukhorukov, J. Demeester, S. C. de Smedt. Release mechanisms for polyelectrolyte capsules. *Chemical Society Reviews* 36: 636-649, 2007
- 89 S. V. Madhally, H. W. T. Matthew. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 20: 1133-1142, 1999
- 90 M. de Rosa, M. Carteni, O. Petillo, A. Calarco, S. Margarucci, F. Rosso, A. de Rosa, E. Farina, P. Grippo, G. Peluso. Cationic Polyelectrolyte Hydrogel Fosters Fibroblast Spreading, Proliferation, and Extracellular Matrix Production: Implications for Tissue Engineering. *Journal of Cellular Physiology* 198: 133-143, 2004
- 91 E. A. Scott, M. D. Nichols, L. H. Cordova, B. J. George, Y.-S. Jun, D. L. Elbert. Protein adsorption and cell adhesion on nanoscale bioactive coatings formed from poly(ethylene glycol) and albumin microgels. *Biomaterials* 29: 4481-4493, 2008

- 92 G. M. Harbers, K. Emoto, C. Greef, S. W. Metzger, H. N. Woodward, J. J. Mascali, D. W. Grainger, M. J. Lochhead. A functionalized poly(ethylene glycol)-based bioassay surface chemistry that facilitates bio-immobilization and inhibits non-specific protein, bacterial, and mammalian cell adhesion. *Chemistry of Materials* 19 (18): 4405-4414, 2007
- 93 B. Thierry, F. M. Winnik, Y. Merhi, H. J. Griesser, M. Tabrizian. Biomimetic Hemocompatible Coatings through Immobilization of Hyaluronan Derivatives on Metal Surfaces. *Langmuir* 24: 11834-11841, 2008
- 94 E. Ostuni, R. G. Chapman, R. E. Holmlin, S. Takayama, G. M. Whitesides. A Survey of Structure – Property Relationships of Surfaces that Resist the Adsorption of Protein. *Langmuir* 17: 5605-5620, 2001
- 95 A. Gaumann, M. Laudes, B. Jacob, R. Pommersheim, C. Laue, W. Vogt, J. Schrezenmeir. Xenotransplantation of Parathyroids in rats using barium-alginate and polyacrylic acid multilayer microcapsules. *Experimental and Toxicologic Pathology* 53: 35-43, 2001
- 96 D. Saraydin, E. Koptagel, S. Uenver-Saraydin, E. Karadağ, O. Gueven. *In vivo* biocompatibility of radiation induced acrylamide and acrylamide/maleic acid hydrogels. *Journal of Materials Science* 36: 2473-2481, 2001
- 97 P. Basak, B. Adhikari. Poly(vinyl alcohol) hydrogels for pH dependent colon targeted drug delivery. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2008 Jul 1 [Epub ahead of print]
- 98 S. Namkung, C. C. Chu. Partially biodegradable temperature- and pH-responsive poly(N-isopropylacrylamide)/dextran-maleic acid hydrogels: formulation and controlled drug delivery of doxorubicin. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition* 18 (7): 901-924, 2007
- 99 C. Ricordi, C. Socci, A. M. Davalli, C. Staudacher, P. Baro, A. Vertova, I. Sassi, F. Gavazzi, G. Pozza, V. di Carlo. Isolation of the elusive pig islet. *Surgery* 107 (6): 688-694, 1990
- 100 A. Heiser, K. Ulrichs, W. Mueller-Ruchholtz. Isolation of Porcine Pancreatic Islets: Low Trypsin Activity During the Isolation Procedure Guarantees Reproducible High Islet Yields. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 8: 407-411, 1994

- 101 M. Krickhahn, C. Buehler, T. Meyer, A. Thiede, K. Ulrichs. The morphology of islets within the porcine donor pancreas determines the isolation result: successful isolation of pancreatic islets can now be achieved from young market pigs. *Cell Transplantation* 11 (8): 827-838, 2002
- 102 M. Krickhahn, T. Meyer, C. Buehler, A. Thiede, K. Ulrichs. Highly efficient isolation of porcine islets of Langerhans for xenotransplantation: numbers, purity, yield and in vitro function. *Annals of Transplantation* 6 (3): 48-54, 2001
- 103 A. Shiroi, M. Yoshikawa, H. Yokota, H. Fukui, S. Ishizaka, K. Tatsumi, Y. Takahashi. Identification of Insulin-Producing Cells Derived from Embryonic Stem Cells by Zinc-Chelating Dithizone. *Stem Cells* 20: 284-292, 2002
- 104 D. W. Gray, P. J. Morris. The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a viability stain for isolated islets of Langerhans. *Stain Technology* 62 (6): 373-381, 1987
- 105 A. Kerscher. Entwicklung einer mikroskopierbaren Perfusions-Kulturkammer für die Kultivierung, die *In-Vitro*-Vitalitäts- und die Funktionsdiagnostik von endokrinen Zellen. Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg. 2006
- 106 A. M. Davalli, F. Bertuzzi, C. Socci, L. Scaglia, F. Gavazzi, M. Freschi, V. Di-Carlo, A. E. Pontiroli, G. Pozza. Paradoxical release of insulin by adult pig islets in vitro. *Transplantation* 56 (1): 148-154, 1993
- 107 J. R. Lakey, G. L. Warnock, N. M. Kneteman, Z. Ao, R. V. Rajotte. Effects of pre-cryopreservation culture on human islet recovery and in vitro function. *Transplantation Proceedings* 26 (2): 820, 1994
- 108 K. Ulrichs, M. Bosse, A. Heiser, V. Eckstein, H.-H. Wacker, A. Thiede, W. Mueller-Ruchholtz. Histomorphological characteristics of the porcine pancreas as a basis for the isolation of islets of Langerhans. *Transplantation Proceedings* 26 (2): 610-612, 1994
- 109 C. Socci, C. Ricordi, A. M. Davalli, C. Staudacher, P. Baro, A. Vertova, M. Freschi, F. Gavazzi, S. Braghi, G. Pozza, et al. Selection of donors significantly improves pig islet isolation yield. *Hormone and Metabolic Research. Supplement series* 25: 32-34, 1990

- 110 P. Constantinou, R. S. Dacosta, B. C. Wilson. Extending immunofluorescence detection limits in whole paraffin-embedded formalin fixed tissues using hyperspectral confocal fluorescence imaging. *Journal of Microscopy* 234: 137-146, 2009
- 111 J. A. Palero, H. S. de Bruijn, A. van der Ploeg van den Heuvel, H. J. C. M. Sterenborg, H. C. Gerritsen. Spectrally Resolved Multiphoton Imaging of In Vivo and Excised Mouse Skin Tissues. *Biophysical Journal* 93: 992-1007, 2007



## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Experimentelle Transplantations-Immunologie der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie (Direktor: Professor Dr. med. C.-T. Germer) der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Leitung von Frau Professor Dr. rer. nat. K. Ulrichs angefertigt. Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die großzügige finanzielle Unterstützung möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Professor Emeritus Dr. med. A. Thiede, dem ehemaligen Direktor der Klinik, bedanken. Ebenso herzlich bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. med. C.-T. Germer für die Übernahme des Korreferates.

Für die Vergabe des Themas, die konstruktive Betreuung und Unterstützung sowie die aus zahlreichen Diskussionen hervorgegangenen Anregungen bedanke ich mich sehr herzlich bei Frau Professor Dr. rer. nat. K. Ulrichs.

Für die Hilfe bei der Gestaltung der Versuche, die konstruktive Betreuung und Unterstützung bei allen Fragen im Zusammenhang mit den praktischen Arbeiten sowie wertvolle Hinweise zur Diskussion gilt Frau Dr. rer. nat. S. Krol mein ganz besonders herzlicher Dank.

Ausserdem möchte ich mich bei Frau S. Gahn, Frau Dr. med. vet. I. Chodnevskaja, Frau B. Schneiker und Frau S. Eber für die hervorragende technische und sehr freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken, ohne die das Gelingen der Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Im Übrigen möchte ich allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Experimentelle Transplantations-Immunologie danken, die mir jederzeit mit ihrer Hilfe unterstützend zur Seite standen.