

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und
Kinderchirurgie
Chirurgische Klinik I
Direktor: Professor Dr. med. C.-T. Germer

**Untersuchungen zum Differenzierungspotential humaner
Monozyten *in vitro*:
Nachweis Insulin- und C-Peptid-positiver Zellen**

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

vorgelegt von
Carolin Steinack
aus Würzburg

Würzburg, November 2010

Referent: Prof. Dr. rer. nat. C. Otto
Korreferent: Prof. Dr. med. C.-T. Germer
Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.02.2011

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Insulin-Ersatztherapien	1
1.2	Insulin-positive Blutmonozyten als potentieller Betazell-Ersatz	6
1.3	Zielsetzung	7
2	Fragen	9
3	Material und Methoden	10
3.1	Gewinnung humaner Blutmonozyten	10
3.2	Kulturmedien für humane Blutmonozyten	10
3.3	Kultivierung humaner Blutmonozyten	11
3.4	Ernte kultivierter Blutmonozyten mit HyQ-Tase und Trypsin.....	11
3.5	Anfertigen von Cytospin-Präparaten	12
3.6	Inkubation von Monozyten mit aufgereinigtem Insulin	12
3.7	Immunhistochemische Färbung nach Standardprotokoll	13
3.8	Alternatives immunhistochemisches Färbeprotokoll	14
3.9	Immunhistochemische Färbung von Pankreasschnitten.....	15
3.10	Testung der Wirksamkeit von „Monozyten-Insulin“	15
3.11	Mikroskopische Beurteilung immunhistochemischer Präparate.....	16
3.12	Datenauswertung.....	16
3	Ergebnisse	17
4.1	Morphologische und immunhistochemische Charakteristika kultivierter humaner Monozyten	17
4.2	Vorgehensweise zur Optimierung immunhistochemischer Ergebnisse	27
4.3	Immunhistochemische Unterscheidung zwischen de novo Insulin und exogenem Insulin.....	29
4.4	Überprüfung der Monozyten-Kulturmedien auf exogenes Insulin	35
4.5	Nachweis der biologischen Aktivität von „Monozyten-Insulin“ <i>in vivo</i>	38
5	Beantwortung der Fragen	43
6	Diskussion	45
6.1	Das Differenzierungspotential humaner Blutmonozyten	45
6.2	Der Monozyt als ideale Insulin-produzierende Zelle?	48
6.3	Embryonale und adulte Stammzellen	51
7	Ausblick	54
8	Zusammenfassung	55
9	Literaturverzeichnis	57
10	Appendix	61
	Danksagung	
	Lebenslauf	

1 Einleitung

Unter dem Begriff Diabetes mellitus (auch *Zuckerkrankheit* genannt) wird eine Gruppe von Stoffwechselerkrankungen zusammengefasst, für die der Nachweis von Glukose im Urin charakteristisch ist. Das Missverhältnis von Glukoseangebot und Insulinsekretion ist hierfür verantwortlich. Aus dem aktuellen Gesundheitsbericht der Deutschen Diabetes-Union geht hervor, dass allein in Deutschland bis zu 10 Prozent der Bevölkerung an Diabetes mellitus leiden – dies sind gegenwärtig ca. 6 Millionen Menschen. Neueste Daten belegen zudem, dass für jeden dritten Deutschen das Risiko besteht, an Diabetes mellitus zu erkranken (Deutsche Diabetes-Union, Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2008).

1.1 Insulinersatz-Therapien

Mit der Entdeckung von Insulin durch Frederick Banting und Charles Best im Jahr 1922 begann die Ära der Insulinersatz-Therapie zur Substitution des fehlenden körpereigenen Insulins. Nachfolgend werden klinisch-relevante und experimentelle Ansätze zur Kompensierung der fehlenden körpereigenen Insulinproduktion beschrieben. Hierzu gehören die Pankreas-Organtransplantation und verschiedene Beta-Zell-Ersatzverfahren wie die Transplantation isolierter Langerhans-Inseln^{*)}, aber auch zelltherapeutische Ansätze mit Insulinproduzierenden Zellen, die aus Stammzellen gewonnen werden.

Das Ziel sämtlicher Insulinersatz-Therapien ist es, einen physiologischen Blutzuckerspiegel einzustellen, um hyperglykämisch bedingte Folgeschäden – Ursache über Jahre inadäquat eingestellter Blutzuckerspiegel – zu mindern. Hierzu gehören diabetische Nephropathie, Retinopathie, Neuropathie und das diabetische Fußsyndrom (Leitlinien Clearing-Bericht „Diabetes mellitus Typ-1“).

Insulin-Injektionen

Noch vor hundert Jahren waren die typischen Symptome eines entgleisten Glukosestoffwechsels wie extreme Gewichtsabnahme, Polydipsie, Polyurie und

^{*)} Abgegrenzte Zellverbände mit einem Durchmesser von 50 bis 500 µm. In diesen Zellverbänden befinden sich neben Betazellen noch Alpha- und Deltazellen sowie PP-Zellen.

Erbrechen keiner organischen Ursache zuzuordnen. Die Betroffenen verstarben am ketoazidotischem Koma. Im Jahr 1922 isolierten Frederick Banting und Charles Best aus Bauchspeicheldrüsen von Hunden erstmals Insulin, das sie als „Pankreatin“ bezeichneten. Weltweiten Ruhm erlangten beide Forscher mit der ersten erfolgreichen Insulin-Behandlung (Abb. 1). Daraufhin begann im folgenden Jahr die Produktion des ersten Insulinpräparates „Iletin“ aus bovinen und porcinen Bauchspeicheldrüsen. Nachdem die Aminosäuresequenz von Insulin 1955 durch den Chemiker Frederick Sanger aufgeklärt worden war, begann in den folgenden Jahren die enzymatische Synthese von Humaninsulin (Banting-Best-Institut, Universität Toronto). Heute wird Insulin gentechnisch hergestellt.



Abb. 1.1: Therapie des Diabetes mellitus Typ-1.

(A) Das im Jahr 1923 aus bovinen und porcinen Pankreata isolierte „Iletin“ war das erste kommerziell erhältliche Insulinpräparat. Insulin besitzt eine relative Molekülmasse von etwa 5700 g/Mol. Es enthält zwei Polypeptidketten: die Alpha-Kette mit 21 und die Beta-Kette mit 30 Aminosäuren – zusammengehalten durch zwei Disulfidbrücken.

(B) Für den 13-jährigen Leonhard Thomson war „Iletin“ lebensrettend, denn er wurde als erster Diabetiker hiermit behandelt. Dies war der Startschuss zur weltweit erfolgreichen Therapie des Diabetes mellitus Typ-1: „Dieser 3 Jahre alte Junge war an Diabetes erkrankt und wog nur noch 7,5 kg. Nur 2 Monate nach Beginn der Insulinbehandlung mit Iletin hatte der Junge sein Gewicht verdoppelt und konnte ein normales Leben führen (Zitat aus [www. diabsite.de](http://www.diabsite.de)).“

In der Insulintherapie des Typ-1 Diabetes wird zwischen konventioneller und intensivierter Therapie unterschieden. Bei der konventionellen Therapie spritzt sich der Patient ein- bis zweimal täglich eine Mischung aus einem schnell wirksamen Insulin und einem Verzögerungsinsulin. Zwar entfällt bei dieser Behandlungsform häufiges Blutzuckermessen, dafür sind aber strenge Essens-

zeiten einzuhalten. Bei der intensivierten Insulintherapie spritzt sich der Patient für den Tag und die Nacht Verzögerungsinsulin in einer festgesetzten Dosis sowie zusätzlich ein auf die Hauptmahlzeiten und den aktuellen Blutzuckerspiegel abgestimmtes kurzwirksames Insulin. Die intensivierte Therapie setzt mehrmals tägliche Blutzuckerkontrollen sowie häufige Insulininjektionen voraus. Dafür können aber die Mahlzeiten unabhängig von der Insulintherapie eingenommen werden (www.diabetes-news.de).

Im Hinblick auf eine langfristige Reduktion und verzögerte Progression diabetischer Folgeschäden hat sich die intensivierte Insulintherapie bewährt. So wurde in der zehn Jahre dauernden, randomisierten amerikanischen Studie „Diabetes Control and Complications Trial“ (auch als DCCT bezeichnet) die intensivierte Insulintherapie mit der konventionellen Insulintherapie verglichen. Unter den 1 441 Typ-1 Diabetikern, die die intensivierte Insulintherapie erhielten, wurden durchschnittliche Blutzuckerwerte von 155 mg/dL (8,6 mmol/L) gemessen, während die Diabetiker mit der konventionellen Insulintherapie Blutzuckerspiegel von 231 mg/dL (12,8 mmol/L) aufwiesen. Dies ist eine Steigerung um 49 Prozent. Weiterhin sank bei Teilnehmern der intensivierten Insulintherapie das Risiko diabetischer Retino- und Nephropathien um 76 bzw. 50 Prozent und das von Polyneuropathien um 60 Prozent. Die mehrmals täglichen Blutzuckerkontrollen und Insulininjektionen setzen neben fundierten Kenntnissen, die in intensiven Schulungen vermittelt werden müssen, auch ein hohes Maß an Eigendisziplin voraus. Wesentliche Nachteile sind aber die Gewichtszunahme sowie das gehäufte Auftreten von Unterzuckerungen (Nathan D et al., 2005). Die durch Hypoglykämie unterschätzte Gefahr kann zu lebensbedrohlichen Situationen führen. Studien zufolge befinden sich diabetische Patienten pro Monat zwischen 6 und 13-mal im Zustand der Hypoglykämie. Diese werden von den Betroffenen häufig nicht oder nur in Extremsituationen wahrgenommen (www.diabetes-news.de).

Pankreas-Organtransplantation

Eine klinisch relevante Alternative zur Insulintherapie stellt die Pankreas-Transplantation dar, die ein Leben ohne das tägliche Spritzen von exogenem

Insulin ermöglicht. Da die meisten Typ-1 Diabetiker sich bereits im Stadium des dialysepflichtigen oder kurz bevorstehenden Nierenversagens befinden, werden über 90 Prozent der Pankreas-Organtransplantationen mit einer simultanen Nierentransplantation kombiniert (Wullstein C et al., 2003). Die Überlebensrate 5 Jahre nach diesem Eingriff liegt bei ca. 88 Prozent und nach 10 Jahren bei ca. 76 Prozent. Auch die Funktion der Pankreastransplantate weist gute Ergebnisse auf: So haben 78 Prozent der Patienten nach 5 Jahren noch ein voll funktionstüchtiges Pankreastransplantat und 67 Prozent nach 10 Jahren. Die Patienten weisen ein normales Blutzuckertagesprofil auf, ohne dass mehrmalige tägliche Insulin-Injektionen notwendig werden und ohne eine strenge Diät. Nach erfolgreicher Pankreastransplantation ist bei fast allen Patienten eine zunehmende Leistungssteigerung und ein subjektives Wohlbefinden feststellbar (Witzigmann H et al., 2005). Da aber der Anteil an verfügbaren Organtransplantaten stark begrenzt ist, steht diese Art der Therapie nur einem kleinen Patientenkreis zur Verfügung. So meldete Eurotransplant – die Vermittlungsstelle für Organspenden in den Benelux-Ländern, Deutschland, Österreich, Slowenien und Kroatien – einen dramatischen Rückgang der simultanen Pankreas-/Nierentransplantation von 302 im Jahr 2000 auf 180 im Jahr 2007 – ein Rückgang um 40 Prozent (Annual Report 2007, Eurotransplant). Weiterhin weist unter allen Organtransplantationen die Pankreastransplantation die höchste Komplikationsrate auf. Um eine Abstoßung des Transplantats zu verhindern, hierunter wird der Funktionsverlust durch Zerstörung durch das körpereigene Immunsystem verstanden, muss der Patient lebenslang Immunsuppressiva einnehmen. Diese verursachen starke Nebenwirkungen, die Patienten leiden vermehrt an Infekten und sie zeigen zudem eine gesteigerte Krebshäufigkeit. Zudem sind viele Immunsuppressiva auch diabetogen, d.h. sie sind an der Zerstörung der übertragenen Langerhans-Inseln beteiligt.

Betazell-Ersatzverfahren – Transplantation humaner Langerhans-Inseln

Die humane Inselzelltransplantation ist ein gering invasives Verfahren, bei dem mit einem Katheter die isolierten und aufgereinigten Langerhans-Inseln über die Portalvene in die Leber eingebracht werden. Bei den Langerhans-Inseln handelt es sich um kompakte und abgegrenzte Zellverbände mit einem Durch-

messer von 50 bis 500 µm Jedoch ist mit diesem Verfahren bisher nur in einigen Fällen eine dauerhafte Unabhängigkeit von exogenen Insulininjektionen erreicht worden (Bretzel R. et al., 1998). Ein weiterer Nachteil ist, dass, um ausreichende Mengen von Langerhans-Inseln für eine Transplantation zu erhalten, mehrere Pankreata aufgearbeitet werden müssen (Scharp DW et al., 1999). Auch mit Einführung des „Edmonton Protokolls“ – eine auf die Langerhans-Inseln angepasste Immunsuppression – können nur ca. 10 Prozent der transplantierten Patienten auf zusätzliche, exogene Insulininjektionen verzichten (Ryan EA et al., 2005).

Betazell-Ersatzverfahren – Transplantation porciner Langerhans-Inseln

Im Gegensatz zur Transplantation humaner Langerhans-Inseln unterliegt die Transplantation porciner Langerhans-Inseln keiner Limitierung durch Spenderorgane. Nach Einschätzung der eigenen Arbeitsgruppe wird die Transplantation porciner Langerhans-Inseln ohne Maßnahmen zur Immunprotektion durch Verkapselung nicht erfolgreich sein (pers. Mitteilung Prof. Ulrichs). Durch die Verkapselung werden die porcinen Langerhans-Inseln vor den Attacken des Immunsystems geschützt, wobei der Transfer von Nährstoffen und Insulin nicht behindert wird (Otto C, Moskalenko V, Ulrichs K, 2004). Im Jahr 2007 erhielt das Unternehmen „Australia-based Living Cell Technologies“ von der neuseeländischen Gesundheitsbehörde die Genehmigung, eine klinische Studie mit neonatalen porcinen Langerhans-Inseln durchzuführen (www.biospectrum-asia.com).

Betazell-Ersatzverfahren – Transplantation differenzierter Stammzellen

Zusätzlich zu ausdifferenzierten Langerhans-Inseln als Ersatz für zerstörte körpereigene Langerhans-Inseln beim Diabetes mellitus, werden seit einigen Jahren auch humane embryonale und adulte Stammzellen als Quelle für Insulin-produzierende Zellen intensiv untersucht (Soria B et al., 2000, Assady S et al., 2001; Abraham EJ et al., 2002; Hao E et al., 2006; Santana A et al., 2006; Kroon E et al., 2008). Stammzellen haben das Potential, sich selbst zu erneuern, also Tochterzellen mit Stammzeleigenschaften zu bilden, und sich in unterschiedliche Zelltypen zu differenzieren. So normalisieren Knochenmark-

Stammzellen, die mit bestimmten Zytokinen und Wachstumsfaktoren *in vitro* kultiviert wurden, den Blutzuckerspiegel diabetischer Tiere (Hussain M. et al., 2004). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, Stammzellen durch Gentherapie zu Insulin-produzierenden Zellen zu differenzieren (Yu J et al., 2009). Ohne an dieser Stelle auf die ethische Dimension der Stammzell-Forschung einzugehen, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht geklärt, ob sich die viel versprechenden experimentellen Ergebnisse auch klinisch umsetzen lassen. Um ausreichend große Mengen an Insulin-produzierenden Zellen zu erhalten, müssen sie sich *in vitro* vermehren lassen, wobei ein unkontrolliertes Wachstum (Tumorwachstum) auszuschließen ist. Weiterhin ist sicherzustellen, dass die Zellen keine infektiösen Erreger übertragen. Auch ist nicht geklärt, wie lange *in vitro* gezüchtete Betazellen nach ihrer Transplantation im Organismus überleben.

1.2 Insulin-positive Blutmonozyten als potentieller Betazell-Ersatz

Zusätzlich zu den Perspektiven, die die Stammzelltechnologie eröffnet, beschäftigen sich Wissenschaftler seit einigen Jahren mit Monozyten und deren Differenzierungspotential. So gelang der Kieler Arbeitsgruppe um Professor Dr. F. Fändrich die Differenzierung peripherer Blutmonozyten zu pankreasähnlichen Inselzellen (Ruhnke M. et al., 2005).

Bereits die Arbeiten von Zhao et al. haben gezeigt, dass Monozyten über ein weit größeres Potential verfügen, als bisher angenommen. Unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren und Kultivierungsbedingungen differenzieren sie sich in unterschiedliche Zellen (Zhao Y et al., 2003). Einen Überblick zu den bisherigen Ergebnissen gibt Tabelle 1.1.

Monozyten entwickeln sich wie alle Immunzellen aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks. Unter dem Einfluss lokaler gewebsspezifischer Faktoren entwickeln sie sich zu Makrophagen, Osteoklasten, Dendritischen Zellen und Microgliazellen. Aus dieser Aufzählung wird ersichtlich, dass es sich bei den Monozyten um eine Zellpopulation handelt, die das Potential besitzt, sich in verschiedene Zelltypen zu entwickeln (Seta N et al., 2007). Monozyten unterscheiden sich je nach Differenzierungsstadium sehr stark in Form und

Größe sowie in der Expression von Zytokinen, die sie zur Interaktion mit anderen Immunzellen benötigen (Wang SY et al., 1992).

Tabelle 1.1 Übersicht über das Differenzierungspotential *in vitro* modifizierter Blutmonozyten.

Zelleigenschaften	Publikation
Inselzellen, Hepatozyten	Ruhnke M. et al., 2005
Hepatozyten, Neurone, epitheliale und endotheliale Zellen	Zhao Y. et al., 2003
Endotheliale Zellen	Schmeisser A. et al., 2000; Elsheikh E. et al., 2005; Kuwana M. et al., 2006; Murdoch C. et al., 2007
Knochen-, Muskel-, Knorpel-, Fettzellen	Kuwana M. et al., 2003
Neuronale Zellen, Kardiomyozyten	Kodama H. et al., 2006

1.3 Zielsetzung

In Kooperation mit der Kieler Arbeitsgruppe um Professor F. Fändrich beschäftigt sich auch die eigene Arbeitsgruppe mit dem Differenzierungspotential peripherer Blutmonozyten. Hierzu sind bereits zwei Inauguraldissertationen erschienen^{*)}, die bestätigen, dass sich Monozyten in Insulin-positive Zellen umwandeln lassen. Diese entwickeln sich aber im Gegensatz zu Daten der Kieler Arbeitsgruppe letztlich zu Makrophagen. Beide Dissertationen zeigen, dass *in vitro* modifizierte Monozyten Insulin produzieren und dass dieses biologisch aktiv ist. Unter die Nierenkapsel diabetischer Mäuse transplantierte Insulin-positive Monozyten regulieren aktiv deren Blutzuckerspiegel, während Insulin-negative Monozyten hierzu nicht in der Lage sind.

Diesen überaus interessanten Ergebnissen stehen weitere Herausforderungen gegenüber: In mehreren Versuchsansätzen konnte weder das aus Monozyten

^{*)} **Andreas Sebastian Herbst:** „Charakterisierung *in vitro* modifizierter humaner peripherer Blutmonozyten: Immunhistochemisch-morphologische Charakterisierung und funktioneller Nachweis von Insulin“.
Kay-Renke Meinard Werner Schmidt: „Charakterisierung *in vitro* modifizierter humaner Blutmonozyten: Überprüfung von Kultivierungsbedingungen und funktioneller Nachweis von Insulin“.

extrahierte Insulin im ELISA, noch im Westernblot nachgewiesen werden. Auch der Nachweis Insulin-spezifischer mRNA schlug bisher fehl. In beiden Dissertationen war deshalb die Immunhistochemie eine grundlegende Analysemethode. Doch soll an dieser Stelle nicht verschwiegen werden, dass Daten von Rajagopal et al. den Schluss zulassen, dass der immunhistochemische Nachweis von Insulin zu falsch positiven Ergebnissen führen kann (Rajagopal J et al., 2003).

Die Autoren zeigten, dass Zellen, insbesondere solche in Apoptose, in der Lage waren, Insulin aus dem Kulturmedium aufzunehmen und zu speichern. Deshalb war eine wesentliche Zielsetzung dieser Arbeit, unterschiedliche Kulturbedingungen hinsichtlich der Generierung „falsch-positiver“ Signale in der Immunhistochemie zu untersuchen. Es sollte die Frage geklärt werden, ob immunhistochemisch zu unterscheiden ist, wann ein positiver Insulinnachweis auf *de novo* Insulin oder unspezifisch aufgenommenes Insulin hinweist.

Darüber hinaus wurden kultivierte Monozyten nach ihrer Morphologie und ihrem Oberflächenprofil charakterisiert. Die untersuchten Marker waren CD14, CD68 und CD83 sowie die intrazellulären Marker Insulin, C-Peptid und Glukagon.

Auch wurde die Wirksamkeit des aus kultivierten Monozyten isolierten Insulins in diabetischen Mäusen getestet.

2 Fragen

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war zu klären, ob immunhistochemisch unterschieden werden kann, wann ein positiver Insulinnachweis auf *de novo* Insulin oder unspezifisch aufgenommenes Insulin hinweist. Folgende Fragen sollten in dieser Arbeit beantwortet werden:

1. Welche morphologischen und immunhistochemischen Charakteristika weisen die mit dem „Kieler-Protokoll“ kultivierten Insulin-positiven Monozyten auf?
2. Welche Fehlerquellen sind beim immunhistochemischen Nachweis von *de novo* Insulin zu beachten?
3. Ist das in den *in vitro* modifizierten Monozyten nachweisbare Insulin biologisch aktiv und senkt es den Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse?

3 Material und Methoden

3.1 Gewinnung humaner Monozyten aus dem peripheren Blut

Monozyten wurden aus dem peripheren Blut männlicher, gesunder Spender im Alter zwischen 20 und 26 Jahren mittels Leukapherese unter der Leitung von Dr. A. Opitz im Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie der Universität Würzburg gewonnen. Die verbliebenen Blutzellen wurden dem Blutkreislauf wieder zugeführt. Nachdem die Zellsuspensionen im Labor aufgearbeitet worden waren, wurden diese im flüssigen Stickstoff (-196°C) aufbewahrt. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden von der örtlichen Ethikkommission genehmigt.

Tabelle 3.1: Übersicht der untersuchten Apheresen.

Aph.-Nr.	Spender-Initialen	Geburtsdatum	Versuche
1	AC	-----	Immunhistologie
2	DK	-----	Immunhistologie
3	UF	-----	Immunhistologie, <i>in vivo</i>
4	CO	-----	Immunhistologie, <i>in vivo</i>
5	LM	-----	Immunhistologie, <i>in vivo</i>
6	TM	-----	Immunhistologie
7	PS	03.07.1983	Immunhistologie
8	SC	21.06.1984	Immunhistologie, <i>in vivo</i>

3.2 Kulturmedium für humane Monozyten

Humane Monozyten wurden in RPMI 1640-Medium (Cell Concepts, Umkirch) kultiviert, das mit 1 Prozent AB/Rhesus negativem Humanserum (hitzeinaktiviert für 30 Minuten bei 56°C; PromoCell, Heidelberg), 2 mmol/L L-Glutamin, 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin, 0,05 mmol/L 2-Mercaptoethanol (alle Reagenzien von Invitrogen, Karlsruhe), 5 ng/mL M-CSF (*human recombinant macrophage colony stimulating factor*; Fa. R&D Systems, Wiesbaden) und 4 ng/mL Interleukin 3 (IL-3, R&D) ergänzt wurde. Dieses Medium wurde als X-Medium bezeichnet. Ein als Y-Medium bezeichnetes Kulturmedium enthielt 1

Prozent hitzeinaktiviertes Humanserum AB/Rhesus negativ (s. o.), 2 mmol/L L-Glutamin, 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin (s. o.), 10 ng/mL EGF (*human recombinant epidermal growth factor*, R&D Systems), 20 ng/mL HGF (*human recombinant hepatocyte growth factor*, R&D Systems), 1,24 mg/mL Nicotinamid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen). Beide Medien sind Bestandteil des „Kieler Protokolls“ (Ruhnke M et al., 2005).

3.3 Kultivierung humaner Blutmonozyten

In flüssigem Stickstoff konservierte Bluteleukozyten wurden im Wasserbad angetaut und in 40 mL vorgewärmtes RPMI 1640 Medium gegeben. Die Zellsuspension wurden anschließend 6 Minuten bei 402 g und 20°C zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde verworfen und je Zellkulturflasche (Greiner bio-one, Frickenhausen) 4×10^8 Zellen in 10 mL X-Medium ausgesät. Anschließend wurden die Kulturflaschen 1 Stunde bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die nicht-adhärenten Zellen wurden mit dem Kulturmedium vorsichtig abgesaugt und die adhärenen Zellen mit jeweils 10 mL frischem X-Medium für 6 Tage im Brutschrank kultiviert. Am 6. Tag wurde das X-Medium gegen Y-Medium ausgetauscht und die Zellen bis maximal Tag 21 kultiviert.

3.4 Ernte kultivierter Blutmonozyten mit HyQ-Tase und Trypsin

Mit Dauer der Kultur wurden die Monozyten immer stärker adhärenent. Um am jeweiligen Kultivierungstag die Zellen ernten zu können, wurde das X-Medium gegen 5 mL HyQ-Tase (Fa. HyClone, South Logan, USA, über Perbio Science, Bonn, Deutschland) oder gegen 5 mL Trypsin-EDTA (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) je Kulturflasche ausgetauscht und 30 Minuten bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. HyQ-Tase ist eine Lösung kombiniert aus proteolytischen und kollagenolytischen Enzymen, die das Ablösen adhärenenter Zellen vom Boden der Kulturflasche ermöglicht. Die gleiche Wirkung besitzt Trypsin-EDTA, womit sich durchschnittlich mehr Zellen ablösen ließen.

3.5 Anfertigen von Cytospin-Präparaten

Die Monozyten wurden an den Tagen 1, 4, 11, 14, 18 und 21 geerntet. Hierzu wurden die Überstände in den Zellkulturflaschen verworfen und die adhärenen Zellen durch Inkubation mit 5 mL HyQ-Tase (s. o.) oder 5 mL Trypsin EDTA (s. o.) vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst. Nach 30 Minuten wurden die Überstände in 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt und 6 Minuten bei 402 g und 20°C mit Bremse zentrifugiert. Zellen, die sich durch oben beschriebenen Protokoll nicht ablösen ließen, wurden mit einem Zellschaber (s. o.) in Lösung gebracht und anschließend durch Zentrifugation pelletiert. Die Überstände wurden verworfen und das Zellpellet in 1 mL PBS (Phosphate buffered saline, Invitrogen/Gibco, Karlsruhe) resuspendiert. Anschließend wurden 10 µL der Zellsuspension und 10 µL Trypanblau (0,4 %) mit 80 µL PBS gemischt und hieraus 10 µL für die Bestimmung der Zellzahl in der Zählkammer nach Neubauer verwendet. Fünfzigtausend Zellen (5×10^4) wurden auf einen Objektträger bei 200 g für 1 Minute zentrifugiert (Shandon Cytospin® 4 Cytozentrifuge, Thermo Fisher Scientific). Die fertigen Cytospin-Präparate wurden über Nacht getrocknet und am nächsten Tag immunhistologisch angefärbt oder bei -18°C aufbewahrt.

3.6 Inkubation von Monozyten mit aufgereinigtem Insulin

In flüssigem Stickstoff konservierte Monozyten wurden – wie in Abschnitt 3.3 beschrieben – aufgetaut und aufgearbeitet. Nach 24-stündiger Kultur im X-Medium im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂, wurde dieses gegen 10 mL X-Medium mit Humaninsulin (Sigma) ausgetauscht und die Zellen für weitere 2 Tage im Brutschrank inkubiert. Folgende Konzentrationen an Insulin wurden eingestellt: 5 µg/mL, 20 µg/mL, 50 µg/mL und 100 µg/mL. Die Cytospin-Präparate dieser Zellen wurden mit den Antikörpern gegen Insulin und C-Peptid (siehe Tabelle 3.2) immunhistochemisch analysiert. Auch bereits auf Objektträger zentrifugierte Zellen wurden mit unterschiedlichen Insulin-Konzentrationen inkubiert. Hierzu wurden die Cytospin-Präparate 5 Minuten in Aceton fixiert und anschließend für 10 Minuten getrocknet. Nach dreimaligem Waschen mit Tris-NaCl wurden diese für eine Stunde in der feuchten Kammer bei 4°C mit folgenden Insulinkonzentrationen inkubiert: 5 µg/mL, 20 µg/mL, 50 µg/mL und 100 µg/mL. Anschließend wurden die Präparate in Tris-HCl (Merck, Darmstadt)

für jeweils 5 Minuten gewaschen und immunhistochemisch auf Insulin und C-Peptid untersucht. Zusätzlich wurden Makrophagen (J774.2 von European Collection of Cell Cultures ECACC) sowie Nabelschnurendothelzellen (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells* oder HUVEC) 2 Tage mit 5 µg/mL und 20 µg/mL Humaninsulin inkubiert. Die Cytospinpräparate dieser Zellen wurden ebenfalls immunhistochemisch auf Insulin und C-Peptid untersucht.

3.7 Immunhistologische Färbungen nach Standardprotokoll

Die Cytospin-Präparate wurden 5 Minuten in Aceton (J.T. Baker, Deutschland) fixiert und 10 Minuten getrocknet. Anschließend wurden diese dreimal für jeweils 5 Minuten in Tris-NaCl geschwenkt und mit jeweils 200 µL des mit Antibody Diluent (Dako, Hamburg) verdünnten Antikörpers über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden ungebundene Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit Tris-NaCl für jeweils 5 Minuten von den Präparaten entfernt und mit 200 µL des Sekundärantikörpers, der mit Tris-NaCl 1:100 verdünnt wurde, 1 Stunde in feuchter Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (3 x 5 Minuten mit Tris-NaCl) wurden die Präparate mit 2 Tropfen Liquid DAB (3,3-Diaminobenzidin, BioGenex, San Ramon, USA) 3 bis 5 Minuten beschichtet und anschließend 5 Minuten mit Tris-NaCl gewaschen. Die Präparate wurden kurz im destillierten Wasser geschwenkt, 1 Minute in Meyer's Hämalaun (Merck, Darmstadt) gefärbt und 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser "gebläut". Daraufhin wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, 10 Minuten in Xylol (J.T. Baker) inkubiert und mit Entellan (Merck) eingedeckt. Ebenso wurden nach diesem Verfahren zur Austestung des anti-Insulin Antikörpers IN-05 porcine Inselzellen (LabVision) angefärbt.

Tabelle 3.2: Primäre Antikörper. Die Sekundärantikörper (Rabbit anti-FITC von AbD Serotec, Rabbit anti-Maus und Goat anti-Rabbit von DAKO) wurden in eine Verdünnung von 1:100 angewendet. Sämtlich verwendete Antikörper wurden mit Antibody Diluent von DAKO verdünnt.

Antigen	Klon	Firma	Verdünnung	Spezies
Insulin	IN-05	Exbio	1:100	Maus
C-Peptid	C-PEP-01	Acris	1:100	Maus
CD14	B365.1	Biomeda	1:100	Maus
CD68	KP1	Dako	1:100	Maus
CD83	HB 15e	AbD Serotec	1:100	Kaninchen
Glukagon	V2025 *)	Biomeda	1:800	Kaninchen

Exbio: www.exbio.cz; **Acris:** www.acris-antibodies.com; **Biomeda:** www.biomeda.com

Dako: www.dako.com; **AbD Serotec:** www.ab-direct.com

*) Bestellnummer

3.8 Alternatives immunhistochemisches Färbeprotokoll

Die in dieser Arbeit präsentierten immunhistochemischen Ergebnisse wurden mit einem weiteren Färbeverfahren verglichen, das freundlicherweise unter der Leitung von Frau Prof. Dr. U. Krämmerer, Universitäts-Frauenklinik Würzburg, an Monozyten vom 10. Kulturtag mit Antikörpern gegen Insulin, C-Peptid, Glukagon und CD14 (Tab. 3.2) durchgeführt wurde. Für die Inkubation mit dem anti-CD14 Antikörper wurden die gefrorenen Cytospins 10 Minuten in Aceton fixiert und anschließend luftgetrocknet. Daraufhin wurden Präparate mit PBS gespült und mit einem Prozent H₂O₂ in PBS für 10 Minuten (Peroxidase-Block) inkubiert, um die endogene Peroxidase zu blockieren. Nach erneutem Waschen in PBS, wurden die Präparate für 15 Minuten mit Immunglobulin (1:50 mit PBS verdünnt) inkubiert, um „unspezifische“ Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurden die Präparate mit dem anti-CD14 Antikörper TÜK4 (Dako) in der Verdünnung 1:75 für 30 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS wurde die Bindung von TÜK4 mit dem LSAB2-Kit von Dako nachgewiesen. Hierbei handelt es sich um eine Nachweismethode, bei der nacheinander ein biotinylierter Brückenantikörper und mit Meerrettich-

peroxidase konjugiertes Streptavidin hinzugefügt wird. Die Inkubationsdauer betrug jeweils 10 Minuten. Anschließend wurden die Cytospins mit dem Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin von Dako für weitere 5 Minuten inkubiert. Nachdem die Präparate in deionisiertem Wasser gespült wurden, wurden sie mit Hämalaun für 2 Minuten gefärbt.

Für die Antikörper gegen Insulin, C-Peptid und Glukagon wurden die gefrorenen Cytospins 10 Minuten mit 2% Formalin in PBS fixiert und in PBS gespült. Anschließend wurden sie mit 0,1% Triton-X-100 in PBS für 10 Minuten permeabilisiert und in PBS gespült. Der Peroxidase-Block erfolgte durch Inkubation in 1% H₂O₂ in PBS für 10 Minuten. Die weiteren Schritte sind in Abschnitt 3.7 beschrieben. Die Inkubation mit dem anti-Insulin Antikörper IN-05 erfolgte in der Verdünnung 1:50 für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die anderen Antikörper wurden in der Tab. 3.2 aufgeführten Verdünnung eingesetzt.

3.9 Immunhistologische Färbung von Pankreaskryoschnitten

Pankreaschnitte wurden in absolutem Alkohol entparaffiniert, in destilliertem Wasser geschwenkt und nach dreimaligem Waschen in Tris-NaCl-Puffer mit dem anti-Glukagon Antikörper V2025 (Tab. 3.2) inkubiert. Die immunhistochemischen Färbungen wurden so durchgeführt wie unter 3.7 beschrieben.

3.10 Testung der Wirksamkeit von „Monozyten-Insulins“ *in vivo*

Die Wirksamkeit des „Monozyten-Insulins“ wurde in diabetischen Versuchstieren getestet. Hierzu wurden männlichen Mäusen vom Stamm C57BL/6NCrl das auf Beta-Zellen toxisch wirkende Streptozotozin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) – gelöst in Citratpuffer, pH 4,5 – in einer Dosis von 200 µg/g Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Mit dem Blutzuckermessgerät Elite der Firma Bayer wurden die Blutglukosewerte in ca. 2 µL Vollblut, das den Tieren aus der Schwanzvene entnommen wurde, bestimmt. Anschließend wurde den diabetischen Mäusen das zellfreie Lysat aus 1×10^6 bis 1×10^7 Monozyten injiziert. Hierzu wurden Monozyten zwischen dem 6. und 11. Kulturtag im Ultraschallbad aufgeschlossen und der zellfreie Überstand den diabetischen Mäusen intraperitoneal/subcutan verabreicht. Die Messung der Blutzucker-

spiegel erfolgte vor Injektion des „Monozyten-Insulins“ sowie 1 und 5 Stunden nach Injektion. Als Negativkontrollen dienten humane Fibroblasten und Lymphozyten. Positivkontrolle war porcines Insulin in Konzentrationen von 0,4 mIE bis 4 IE Insulin.

3.11 Mikroskopische Beurteilung immunhistochemischer Präparate

Immunhistochemische Präparate wurden mit dem Mikroskop BH-2 der Firma Olympus ausgewertet und mit Hilfe der Kamera BX51 von Olympus und dem Softwareprogramm Cell[^]F, ebenfalls Olympus, fotografisch festgehalten. Zellen in Kultur wurden mit der Kamera Camedia C-5050 Zoom (Olympus) fotografiert.

3.12 Datenauswertung

Die *in vivo* Versuche wurden statistisch ausgewertet. In den jeweiligen Diagrammen sind Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Morphologische und immunhistochemische Charakteristika kultivierter humaner Monozyten

Humane Monozyten wurden nach dem Protokoll der Kieler Arbeitsgruppe kultiviert (Ruhnke M et al., 2005). Pro Kulturflasche wurden ca. 4×10^8 Leukozyten ausgesät und nach 24 Stunden die nicht-adhärenenten Zellen verworfen, während die adhärenenten Zellen (überwiegend Monozyten) für 6 Tage im X-Medium und anschließend für weitere 15 Tage im Y-Medium kultiviert wurden.

Morphologische Charakteristika

Am 2. Kulturtag zeigten sich neben überwiegend kleinen runden Zellen auch fusiforme Zellen mit Zellausläufern (Anhang A1). Mit Dauer der Kultur nahm ihre Zellzahl zu, sicherlich Ursache der im Kulturmedium befindlichen Cytokine – zudem entwickelten sich Zellkluster. Insbesondere während der Kultivierung im Y-Medium nahmen die Zellen an Größe zu (Abb. 4.1). Monozyten und Vorstadien von Makrophagen entwickelten sich zu großen „spiegeleierförmigen“ Zellen; hierbei handelt es sich vermutlich um ausdifferenzierte Makrophagen.

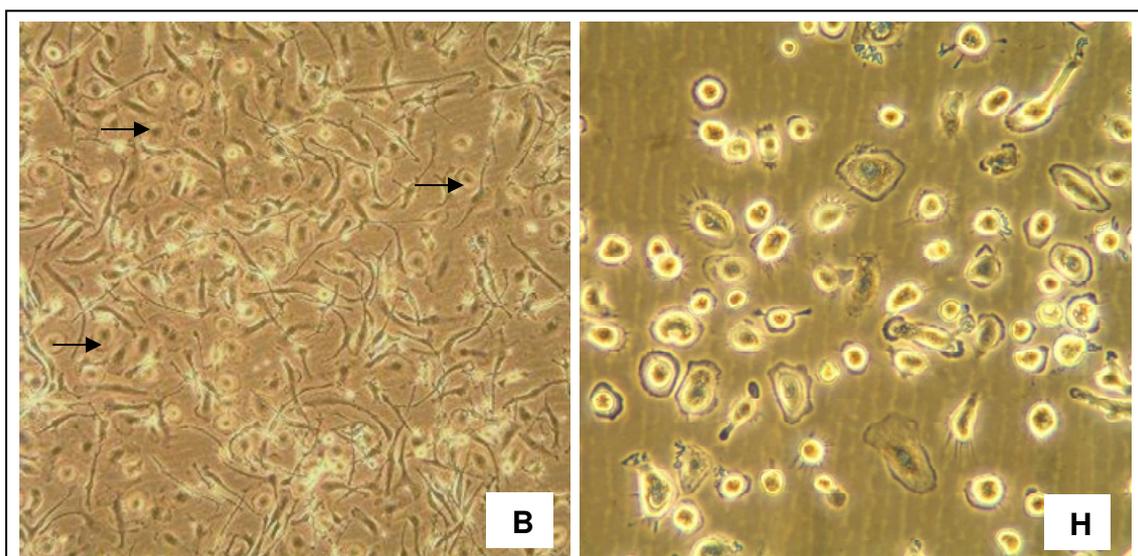


Abbildung 4.1: Vergleich der Zellpopulation der Kulturtage 8 (B, 100x) und 21 (H, 200x). Zur besseren Darstellung der „Entwicklungsdynamik“ sind die Teilabbildungen B und H aus Abbildung 4.2 hier vergrößert dargestellt. Am 8. Kulturtag (B) dominierten langgestreckte, fibroblastoide Monozyten, vermutlich mobile Stadien der Monozyten,

die Kultur, während am 21. Kulturtag fast ausschließlich adhärente „spiegeleierförmige“ Makrophagen (*H*) zu beobachten waren. Vereinzelt waren diese Zellen auch am Tag 8 sichtbar (Pfeil). Diese Zellmorphologien wurden bereits von Packard BS et al., 1982; Wang SY et al., 1985 und Young DA et al., 1990 beschrieben.

Im weiteren Verlauf der Kultur veränderte sich die Zellpopulation hinsichtlich der Zellzahl und der Zellgröße. Bis zum 21. Kulturtag war eine zunehmend dichter wachsende Population erkennbar. Es zeigten sich vereinzelt mehrkernige Zellen, die vermutlich durch Zellteilungen und Fusionen entstanden waren.

Während der ersten 10 Kulturtage waren überwiegend fibroblastoide Monozyten (spindelförmigen Zellen mit langen Plasmafortsätzen) und ovale Zellen zu beobachten. Die unterschiedlichen Zellformen sind vermutlich Ausdruck unterschiedlicher Differenzierungsstadien. Die in Abb. 4.2 gezeigten Phasenkontrastaufnahmen verschiedener Kulturzeiten sind charakteristisch für die Monozyten-Makrophagen-Reifung (Zuckerman SH et al., 1979).

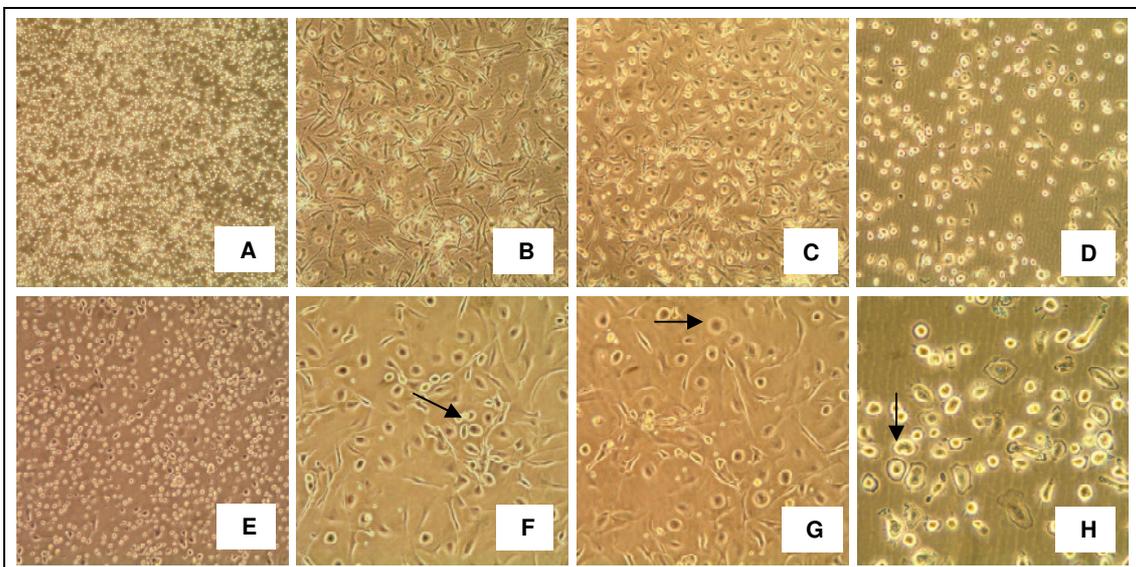


Abbildung 4.2: Morphologie kultivierter Monozyten zu unterschiedlichen Zeiten in Kultur. Die gezeigten Phasenkontrastaufnahmen sind repräsentativ für die Kulturtage 1 (*A, E*), 8 (*B, F*), 10 (*C, G*) und 21 (*D, H*). Die Zellgröße nahm mit Dauer der Kultur zu. Neben runden, adhären Zellen (siehe Pfeil) bildeten sich auch langgestreckte, fibroblastoide Zellen (mobile Vorstufen der Makrophagen) aus. Am 21. Kultivierungstag dominierten große Zellen mit starker Adhärenz die Kultur. *A-D*: 100x; *E-H*: 200x.

Mit Dauer der Kultur wurden die Monozyten/Makrophagen immer stärker adhärent. Ließen sich „Tag-2-Monozyten“ noch enzymatisch mit HyQ-Tase oder Trypsin-EDTA (Abschnitt 3.4) nahezu vollständig vom Boden der Kulturflaschen lösen, mussten die Zellen vom 21. Kulturtag mit einem Zellschaber geerntet werden – sie widerstanden der enzymatischen Behandlung.

Immunhistochemische Charakteristika

Kultivierte Monozyten wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 1, 4, 11, 14, 18 und 21) geerntet und immunhistologisch auf die Anwesenheit von Insulin, C-Peptid, Glukagon, CD14, CD68 und CD83 analysiert.

In „Tag-1“-Monozyten – sie wurden 24 Stunden nach Ansetzen der Kultur geerntet – wurde kein Insulin, C-Peptid und Glukagon nachgewiesen und sie waren negativ für CD83. Dafür waren die Zellen positiv für CD14 und CD68, beides Marker für die Monozyten-Makrophagen-Linie. Ab dem 4. Kulturtag wurde Insulin und C-Peptid in den Zellen nachgewiesen (s. auch Tab. 4.1).

Auch das Team des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Würzburg untersuchte freundlicherweise „Tag-11-Monozyten“ mit ihrem Färbeprotokoll. Zur Anfärbung intrazellulärer Marker wurden die Zellen mit Triton X-100 permeabilisiert. Die mit diesem alternativen Protokoll (Abschnitt 3.8) erzielten Ergebnisse bestätigten die eigenen hier präsentierten Daten (Abb. 4.3 - 4.7). Die Zellen waren positiv für Insulin, C-Peptid und Glukagon (Abb. A2 im Anhang). Die Präparate zeigen zudem, dass sich die kleineren Zellen hinsichtlich ihrer Größe sehr stark unterschieden und dass sich die kleineren Zellen sehr intensiv färbten, während sich die größeren Zellen schwach anfärbten oder negativ waren.

Die Überprüfung des eigenen Färbeprotokolls stellte somit sicher, dass die mit dem „Kieler Protokoll“ kultivierten Monozyten tatsächlich in der Lage waren, Insulin und Glukagon zu exprimieren (s. hierzu auch den Abschnitt 4.4).

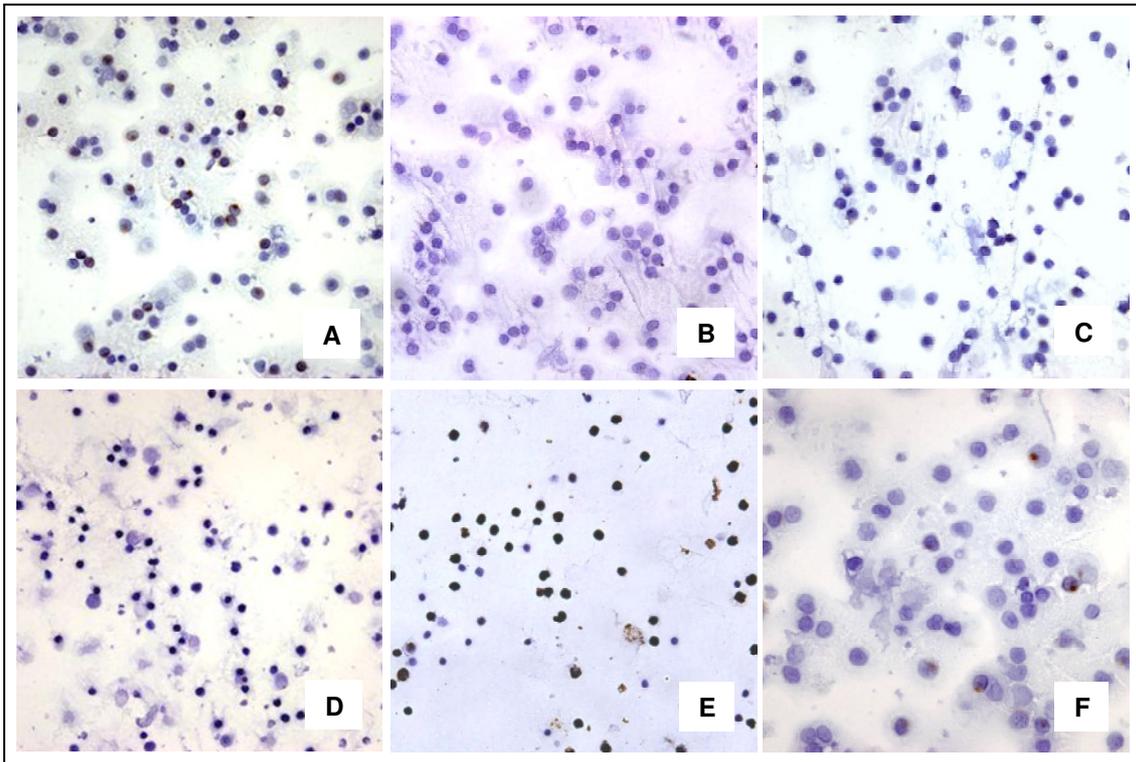


Abbildung 4.3: „Tag-1“-Monozyten enthalten weder Insulin noch Glukagon und sind negativ für C-Peptid und CD83. „Tag-1“-Monozyten waren 24 Stunden in Kultur und wurden, nachdem die nicht-adhärenenten Zellen entfernt wurden, geerntet. *A*: CD14, *B*: Insulin, *C*: C-Peptid, *D*: Glukagon, *E*: CD68, *F*: CD83. Da es sich vermutlich bei den „Tag-1“-Monozyten noch um eine Mischpopulation aus Leukozyten und Monozyten handelt, sind nicht alle Zellen CD14-positiv (*A*).

Immunhistochemische Charakteristika: Nachweis von INSULIN

Am 4. Kultivierungstag wurden erstmals Insulin-positive Zellen nachgewiesen, während am Tag 11 über 90 Prozent der Monozyten Insulin-positiv waren. In den sich bildenden Zellklustern war der kleinere Zelltyp positiv für Insulin, der größere hingegen negativ (Abb. 4.4).

An Tag 21 waren kleine, Insulin-positive Zellen neben großen, Insulin-negativen Zellen zu erkennen.

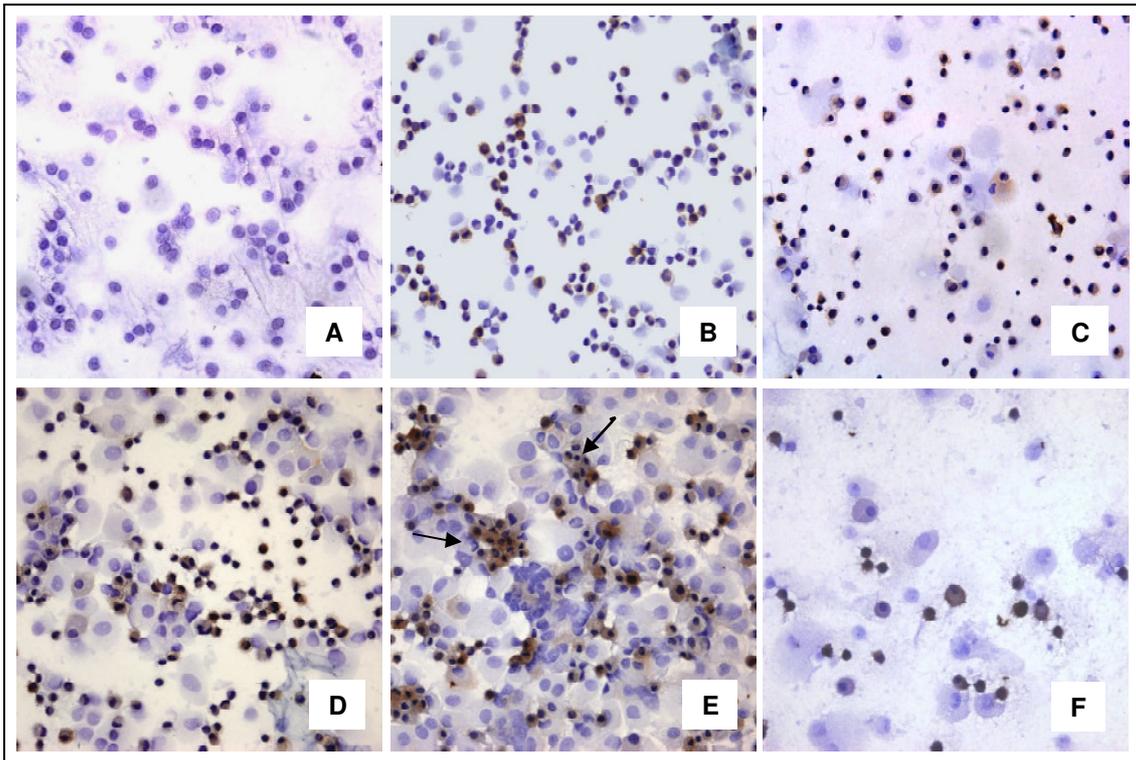


Abbildung 4.4: Nachweis von Insulin in kultivierten humanen Monozyten. Bereits ab dem 4. Kulturtag waren ca. 50 Prozent der Monozyten Insulin-positiv. Die gezeigten immunhistologischen Abbildungen sind repräsentativ für die Kulturtage 1 (A), 4 (B), 11 (C), 14 (D), 18 (E) und 21 (F). Am 14. Kultivierungstag (D) waren Insulin-positive Monozyten in Zellverbänden (Pfeil) erkennbar, umgeben von großen Insulin-negativen Zellen.

Immunhistochemische Charakteristika: Nachweis von C-PEPTID

Das 31 Aminosäuren umfassende C-Peptid (englisch: *connecting-peptide*) wird in den β -Zellen der Bauchspeicheldrüse durch Proteasen vom Proinsulin abgespalten. Der Nachweis von C-Peptid wird als Indiz gewertet, dass Insulin von der Zelle exprimiert wird („*de novo* Insulin“).

Am Tag 4 wurden die ersten C-Peptid-positiven Monozyten beobachtet. Bereits zu diesem Zeitpunkt war deutlich, dass überwiegend die kleineren Zellen C-Peptid-positiv waren. Das Maximum positiver Zellen lag um den Tag 11.

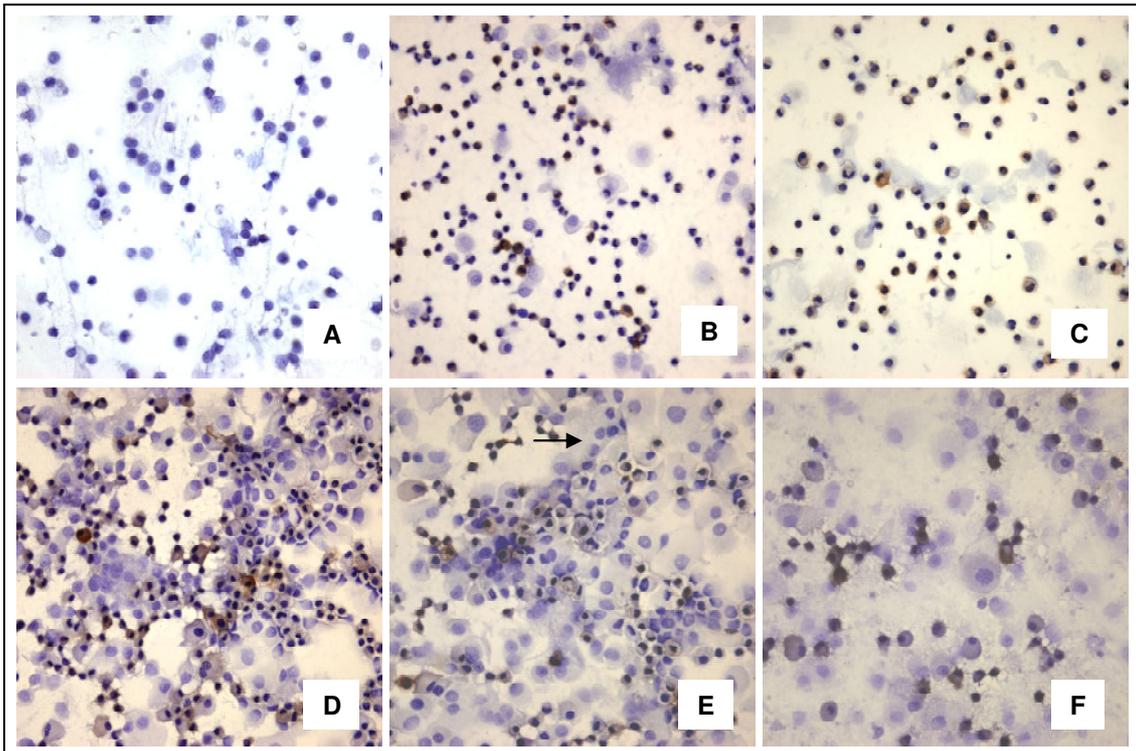


Abbildung 4.5: Nachweis von C-Peptid in kultivierten humanen Monozyten. Wie beim Nachweis von Insulin (Abb. 4.4) war C-Peptid bereits ab dem 4. Kulturtag in den kleinen Zellen nachzuweisen. Die gezeigten immunhistologischen Abbildungen sind repräsentativ für die Kulturtage 1 (A), 4 (B), 11 (C), 14 (D), 18 (E) und 21 (F). Wie bereits beim Nachweis von Insulin beobachtet, waren die großen Zellen negativ für C-Peptid (Pfeil).

Immunhistochemische Charakteristika: Nachweis von GLUKAGON

Das Peptidhormon Glukagon wird in den α -Zellen der Bauchspeicheldrüse gebildet. Als Gegenspieler des Insulins bewirkt Glukagon einen Blutzuckeranstieg.

Glukagon-positive Monozyten wurden am Tag 7 beobachtet (im Gegensatz zu Insulin-positiven Monozyten) und am Tag 11 erreichten sie ihr Maximum. Mit zunehmender Zellgröße färbten sich die Zellen schwächer an. Das schwach angefärbte Zytoplasma der großen Zellen kann als Hintergrundfärbung interpretiert werden. Die Zellpopulation bestand neben großen schwach gefärbten Einzelzellen aus kleinen intensiv gefärbten Monozyten.

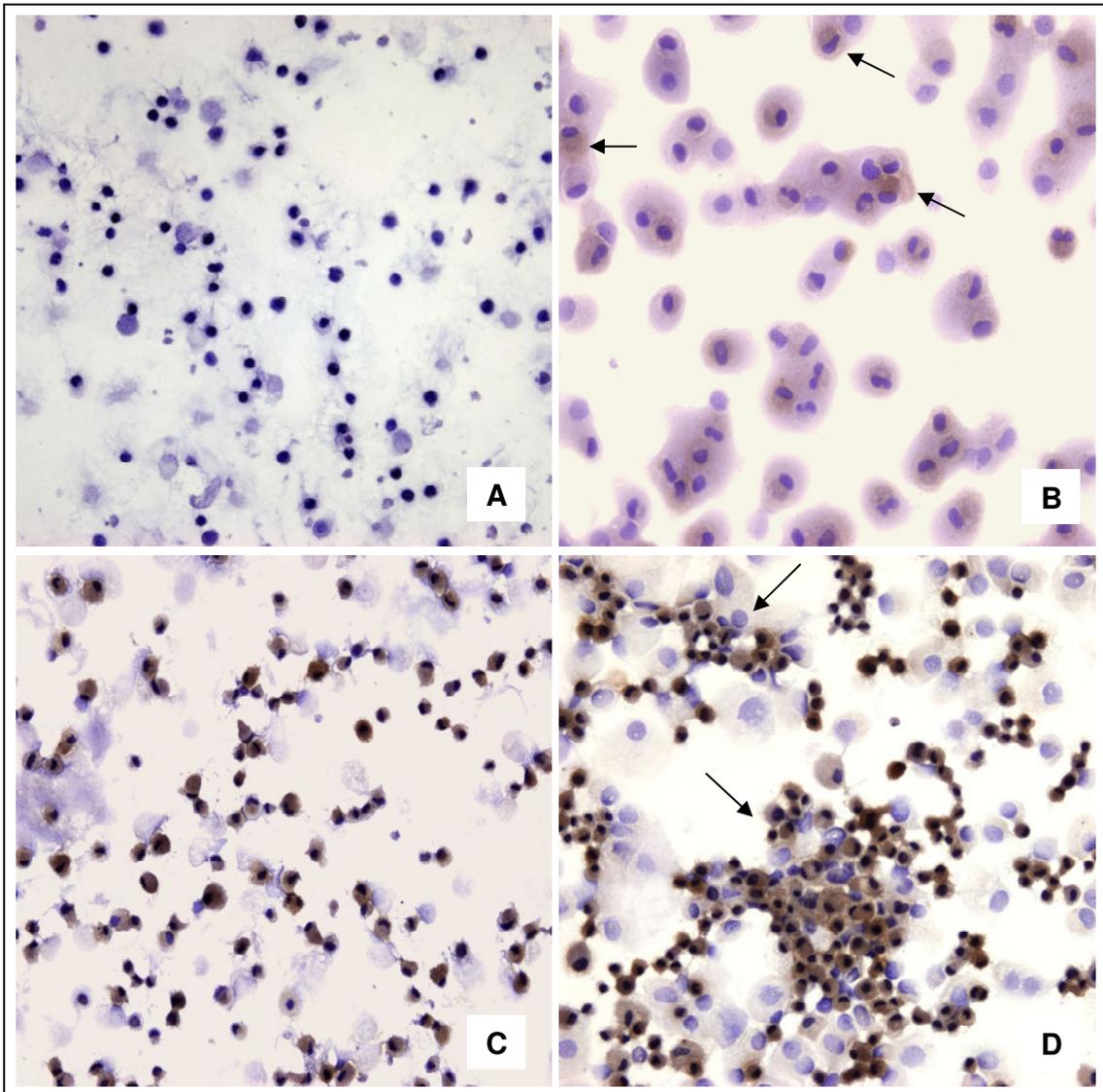


Abbildung 4.6: Nachweis von Glukagon in kultivierten humanen Monozyten. Die gezeigten immunhistologischen Abbildungen sind repräsentativ für die Kulturstage 1 (A), 7 (B), 11 (C) und 14 (D). Am 7. Kulturtag (B) waren die Monozyten Glukagon-positiv (Pfeil). Die Teilabbildung D zeigt Glukagon-positive Monozytencluster (Pfeil).

Immunhistochemische Charakteristika: Nachweis von CD14

CD14 ist ein Membranprotein, das bevorzugt auf der Oberfläche von Makrophagen und Monozyten exprimiert wird. Als Rezeptor für das Endotoxin Lipopolysaccharid werden über CD14 Entzündungsreaktionen ausgelöst (Lacroix S. et al., 1998).

Während der Kultivierung nahm der Anteil CD14-positiver zu und an sämtlichen Kulturtagen waren CD14-positive Zellen nachweisbar, wobei das Maximum mit

über 90 Prozent am 11. Tag erreicht war. Danach nahm der Anteil CD14-positiver Zellen ab (Abb. 4.7) und großvolumige CD14-negative Makrophagen dominierten die Kultur.

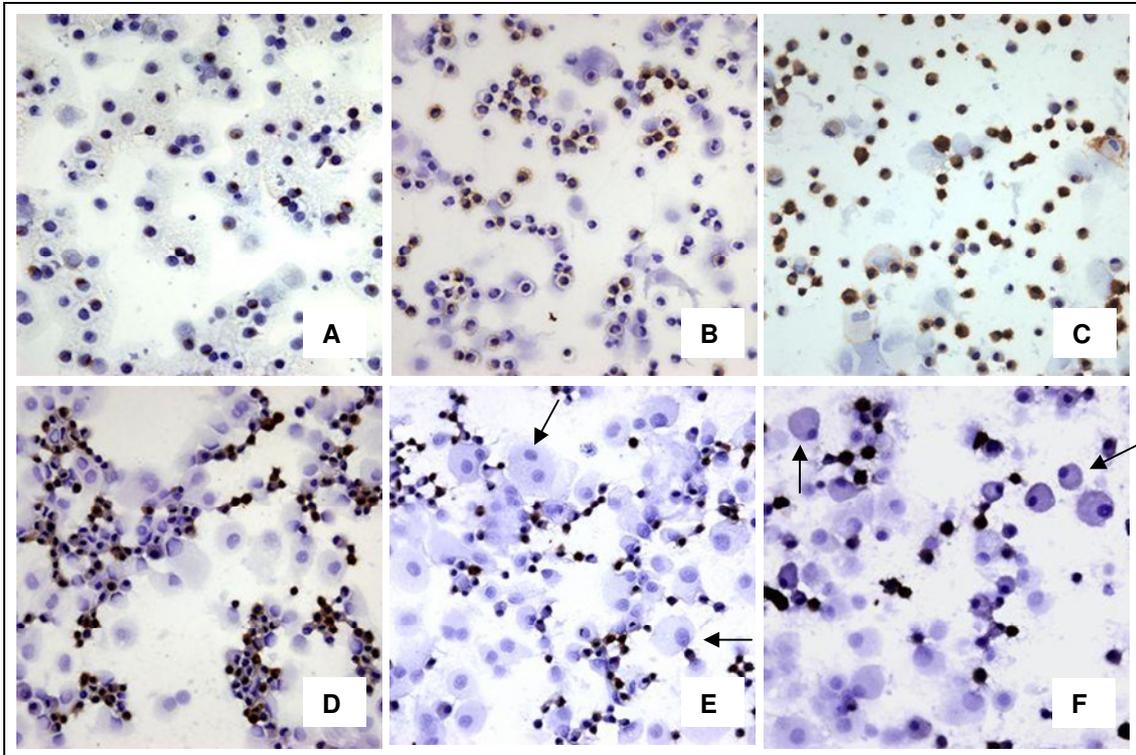


Abbildung 4.7: Nachweis der Expression von CD14 in kultivierten humanen Monozyten. Ab Tag 14 dominieren große CD14-negative Zellen (Pfeil), während die kleinen Zellen auch am 21. Kulturtage CD14-positiv waren. Die gezeigten immunhistologischen Abbildungen sind repräsentativ für die Kulturtage 1 (A), 4 (B), 11 (C), 14 (D), 18 (E) und 21 (F).

Immunhistochemische Charakteristika: Nachweis von CD68

Das Membranprotein CD68 wird von Makrophagen und Monozyten sowie deren Vorläuferzellen exprimiert.

Über 95 Prozent der „Tag-1“-Monozyten waren CD68-positiv. Mit zunehmender Dauer der Kultur nahm die Anzahl positiver Zellen ab. Auch hier war, wie bereits beschrieben, ein Anstieg der größeren Zellen zu erkennen, die überwiegend CD68-negativ waren. Vermutlich wurde CD68 auf den Monozyten und Vorläuferstadien der Makrophagen exprimiert. Die ausdifferenzierten Makrophagen des 21. Kulturtages waren negativ für CD68, was als Hinweis

darauf gedeutet werden kann, dass CD68 zwar auf den verschiedenen Makrophagen-Vorstadien exprimiert wird (Teilabbildungen A bis E), nicht jedoch von reifen Makrophagen.

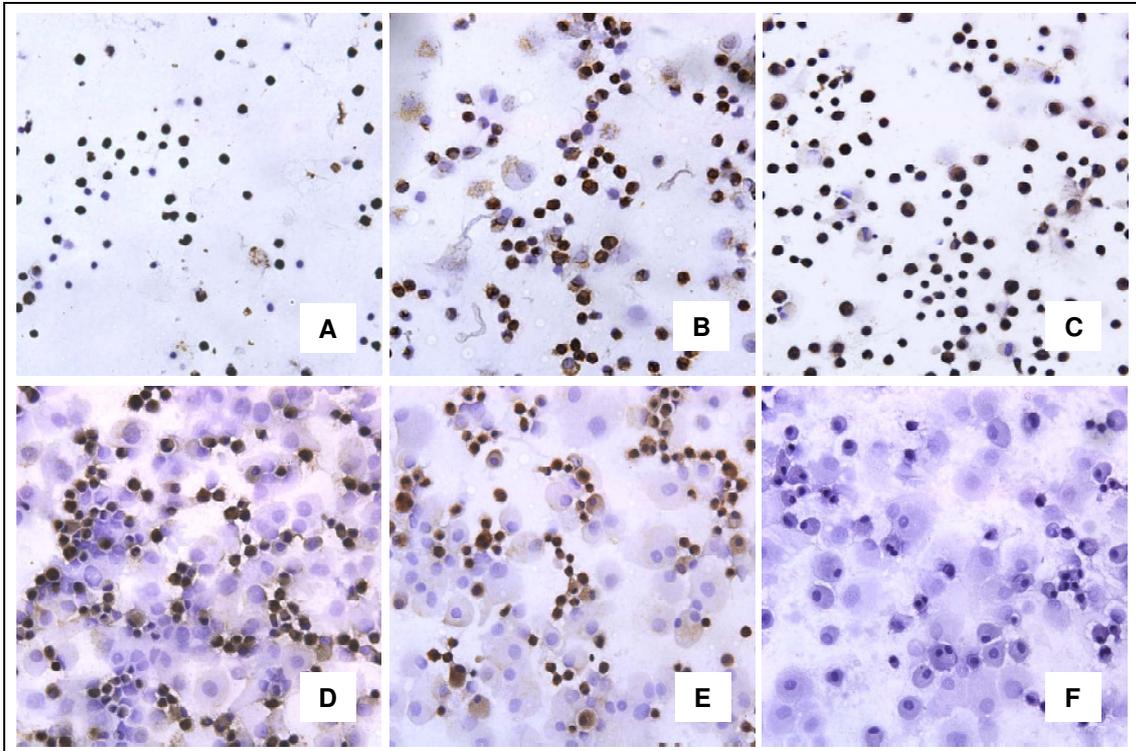


Abbildung 4.8: Nachweis der Expression von CD68 in kultivierten humanen Monozyten. Nahezu sämtliche Zellen waren am 1. Kulturtag CD68-positiv (A). An den folgenden Kulturtagen nahm die Anzahl und Intensität CD68-positiver Zellen mit zunehmender Kultivierungsdauer ab, bis alle Zellen am 21. Tag negativ waren. Reife Makrophagen des 21. Kulturtages waren CD68-negativ (F). Die gezeigten immunhistologischen Abbildungen sind repräsentativ für die Kulturtage 1 (A), 4 (B), 11 (C), 14 (D), 18 (E) und 21 (F).

Immunhistochemische Charakteristika: Nachweis von CD83

Das Antigen CD83 wird von reifen Dendritischen Zellen exprimiert. Mit diesem Marker wurde überprüft, ob sich unter den vorgegebenen Kulturbedingungen (M-CSF und IL-3) Monozyten auch zu Dendritischen Zellen entwickeln.

CD83-positive Zellen waren erstmals am Tag 4 zu beobachten, Anzahl und Intensität nahmen mit Dauer der Kultur zu. Im Gegensatz zu den bereits erwähnten Antigenen, bei denen sich das Maximum positiver Zellen am 11. Kulturtag zeigte, wurde das Maximum von ca. 50 Prozent der CD83-positiven

Zellen erst am Tag 18 erreicht. Sowohl die kleinen als auch großen Zellen waren CD83-positiv.

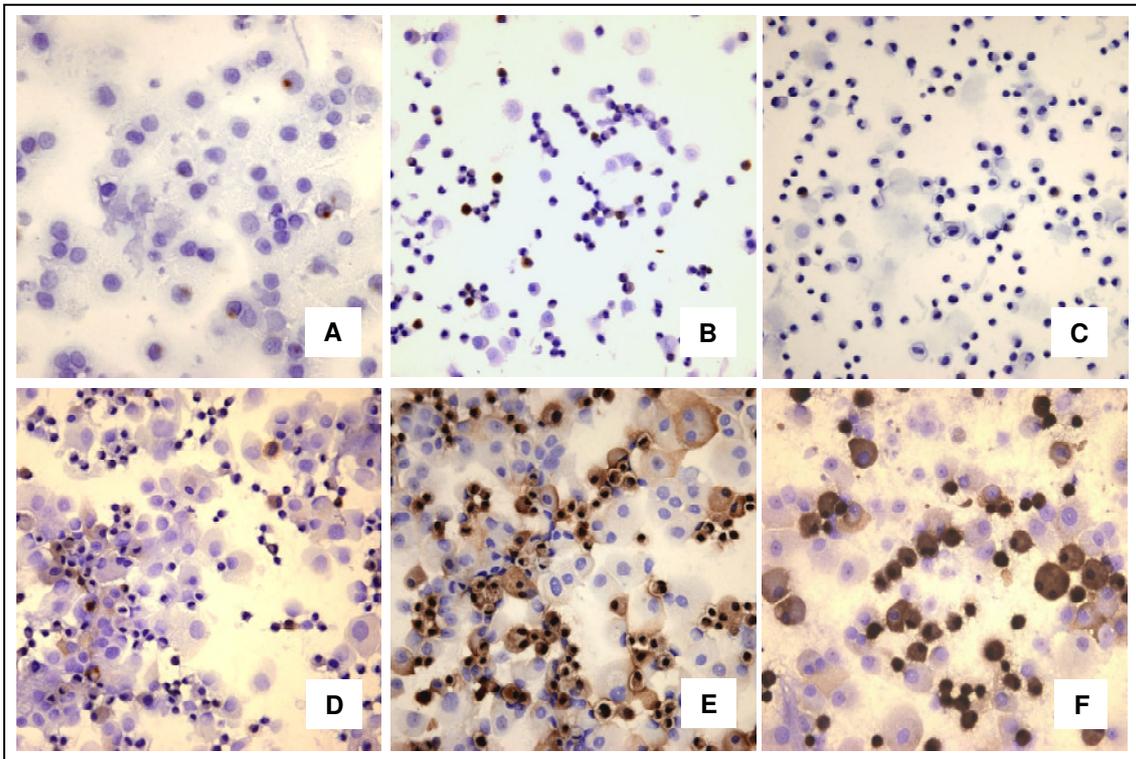


Abbildung 4.9: Nachweis der Expression von CD83 in kultivierten humanen Monozyten. Am 18. Kulturtag wurde das Maximum CD83-positiver Monozyten mit ca. 50% erreicht. Am 21. Tag waren sowohl kleine und große Zellen CD83-positiv. Die gezeigten immunhistologischen Abbildungen sind repräsentativ für die Kulturstage 1 (A), 4 (B), 11 (C), 14 (D), 18 (E) und 21 (F).

Immunhistochemische Charakteristika: ZUSAMMENFASSUNG

In Tabelle 4.1 sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Charakterisierung semiquantitativ ausgewertet. Folgende wesentliche Aussagen sind der Tabelle zu entnehmen: (1) Der Nachweis der Marker war dynamisch, d.h. die durch Adhärenz angereicherten CD14 und CD68 positiven Monozyten waren nicht direkt am Tag 1 für die Marker Insulin, C-Peptid, Glukagon und CD83 positiv. Dies wird zum jetzigen Zeitpunkt dahingehend interpretiert, dass die kultivierten Monozyten Zeit benötigen, um die besonders in dieser Arbeit interessierenden Marker Insulin und Glukagon zu exprimieren. (2) Die Expression beider Marker ist zudem nicht stabil, was zumindest gegen eine von

der Kieler Arbeitsgruppe postulierte dauerhafte Dedifferenzierung spricht. Interessanterweise scheint Tag 11 das Maximum für die Expression verschiedener Marker zu sein. Ausschließlich der DC-Marker CD83 macht hier eine Ausnahme.

Tabelle 4.1: Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse. Siehe hierzu auch die Abbildungen 4.3-4.9. Vermutlich sind die gleichen Zellen positiv für die Marker, da es sich bei allen positiven Zellen um den kleinen Zelltyp handelt und in der dynamischen Entwicklung das Maximum positiver Zellen für alle Marker (Ausnahme CD68) an Tag 11 zu erkennen war.

Marker	Tag 1	Tag 4	Tag 11	Tag 14	Tag 18	Tag 21
Insulin	-	+	+++	+	+	+
C-Peptid	-	+	++	+	+	+
Glukagon	-	n. u.	+++	+++	n. u.	n. u.
CD14	+	+	+++	++	+	+
CD68	+++	+++	+++	+	+	-
CD83	-	-	-	+	++	++

(-) 0% bis 10% positive Zellen, (+) 11% bis 50% positive Zellen, (++) 51% bis 80% positive Zellen, (+++) über 80% positive Zellen, n. u.: nicht untersucht.

4.2 Vorgehensweise zur Optimierung immunhistochemischer Ergebnisse

In diesem Abschnitt wird die Vorgehensweise am Beispiel der beiden Antikörper „V2025“ (anti-Glukagon) und „IN-05“ (anti-Insulin) beschrieben, wie die optimierten Antikörperkonzentrationen für die immunhistochemischen Analysen ermittelt wurden. Hierzu wurden die Antikörper auf humanem Pankreasgewebe (LabVision) bzw. porcinen Langerhans-Inseln getestet, die freundlicherweise von Frau Prof. Dr. K. Ulrichs zur Verfügung gestellt wurden.

Zur Bestimmung der optimalen Arbeitskonzentration des anti-Glukagon Antikörpers wurden die Pankreasschnitte mit folgenden Antikörperverdünnungen inkubiert: 1:100, 1:200, 1:400 und 1:800. Mit diesen Konzentrationen wurden ebenfalls Monozyten („Tag-0“-Monozyten) inkubiert. Bei der Verdünnung von

1:100 wurde neben stark gefärbten Inselzellen auch das umliegende exokrine Gewebe unspezifisch angefärbt. Ebenso erwiesen sich „Tag-0“-Monozyten bei dieser Konzentration als Glukagon-positiv. Eine optimale Antikörperkonzentration wurde bei einer Verdünnung von 1:800 erreicht, bei der einzelne Glukagon-positive Zellen in den Langerhans-Inseln nachzuweisen waren. Das umgebende exokrine Pankreasgewebe sowie die „Tag-0-Monozyten“ waren Glukagon-negativ. Dieses Beispiel zeigt, wie wichtig es ist, für jeden Antikörper die optimale Antikörperkonzentration zu finden, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden.

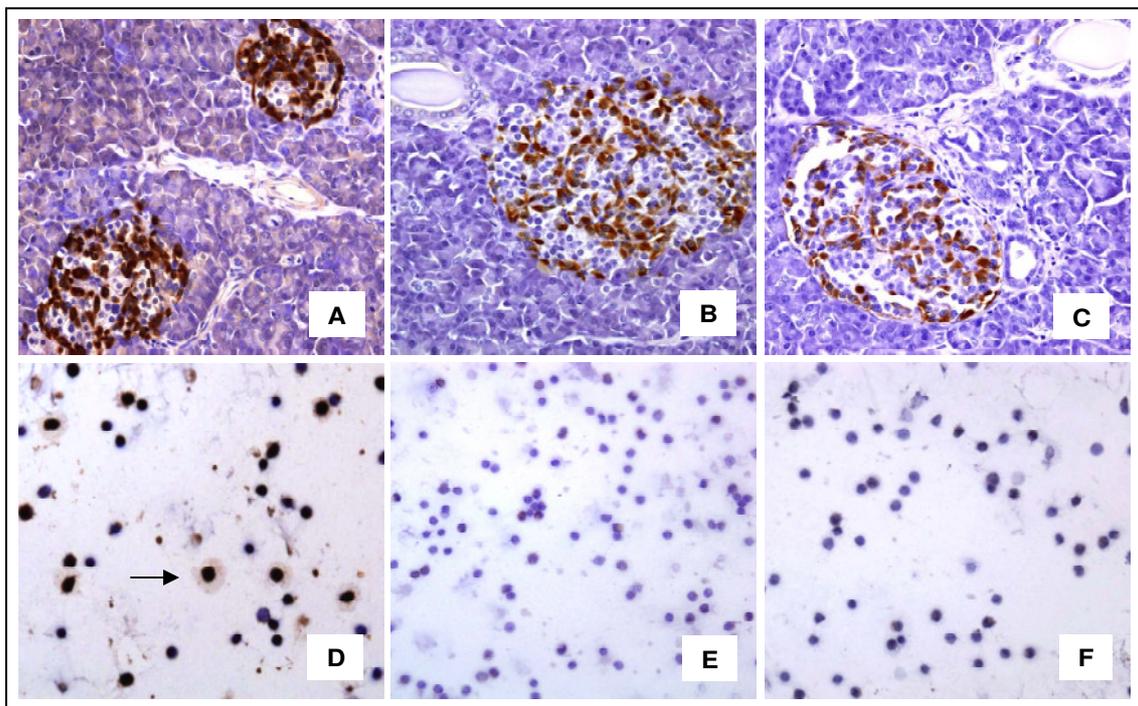


Abbildung 4.10: Der polyklonale anti-Glukagon Antikörper V2025 erkennt Glukagon in humanen Pankreasgeweben und kultivierten Monozyten. Der Antikörper wurde in folgenden Verdünnungen eingesetzt: 1:100 (A), 1:200 (siehe Anhang A3), 1:400 (B), 1:800 (C) sowie auf „Tag-0-Monozyten“ in 1:100 (D), 1:200 (siehe Anhang A2), 1:400 (E), 1:800 (F). In der Teilabbildung A sind sowohl die Inselzellen als auch unspezifisch umgebendes exokrines Pankreasgewebe gefärbt. „Tag-0-Monozyten“ (E) weisen ebenso eine unspezifisch intensive Färbung auf, teilweise mit starkem Randsaum (Pfeil). Optimale Ergebnisse wurden mit einer Antikörperverdünnung von 1:800 erzielt (D, H). Bei dieser Konzentration sind einzelne Inselzellen deutlich Glukagon-positiv. Dem gegenüber waren „Tag-0-Monozyten“ Glukagon-negativ.

Der monoklonale anti-Insulin Antikörper IN-05 wurde an porcinen Langerhans-Inseln getestet. IN-05 erkennt nicht nur humanes, sondern auch porcines Insulin, weshalb sich die porcinen Langerhans-Inseln stark anfärbten (Abb. 4.11). Mit Hilfe von Negativkontrollen wurden mögliche Kreuzreaktivitäten des Sekundärantikörpers ausgeschlossen. Zur Bestimmung der optimalen Antikörperkonzentration wurde vorgegangen wie oben beschrieben. Für sämtliche in dieser Arbeit eingesetzten Antikörper wurde die optimale Arbeitskonzentration bestimmt.

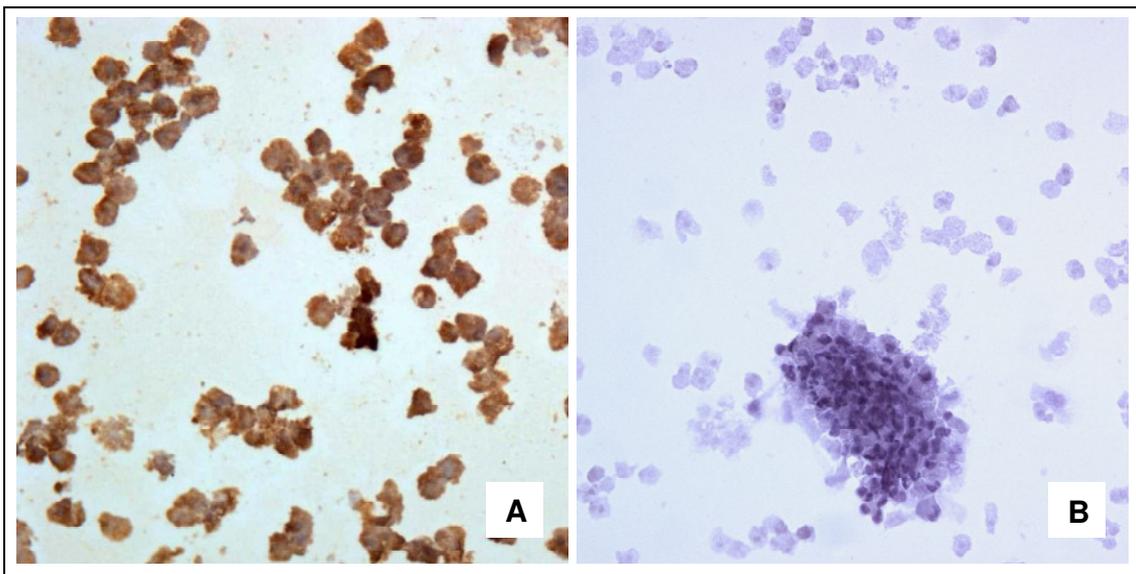


Abbildung 4.11: Der anti-human Insulin Antikörper IN05 erkennt porcines Insulin. Die Teilabbildung A zeigt, dass IN05 auch mit Schweineinsulin reagiert. Die porcinen Langerhans-Inseln färbten sich stark positiv. Mit Hilfe der Negativkontrolle (B) wurde eine Kreuzreaktivität des Sekundärantikörpers Goat anti-Rabbit ausgeschlossen.

4.3 Immunhistochemische Unterscheidung zwischen de novo Insulin und exogenem Insulin

Kultivierte Monozyten waren bis zum 2. Kulturtag eindeutig negativ für Insulin und C-Peptid (Abb. 4.3) und ab dem 4. Kulturtag positiv für Insulin und C-Peptid (Abb. 4.4 und 4.5, Tab. 4.1).

An den „Tag 2-Monozyten“ wurde deshalb untersucht, ob zwischen exprimiertem (*de novo*) Insulin und aufgenommenem (exogenem) Insulin immunhistochemisch unterschieden werden kann. In diesem Zusammenhang kommt dem erfolgreichen Nachweis von C-Peptid eine große analytische Bedeutung zu. In Insulin-produzierenden Zellen ist, wie hier gezeigt, neben Insulin auch C-Peptid nachzuweisen. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen Proinsulin exprimieren und hieraus, durch Abspaltung des C-Peptids, aktives Insulin gebildet wird. Im Gegensatz dazu sollten Zellen, die aufgereinigtes Insulin aufgenommen haben, zwar Insulin-positiv, aber C-Peptid-negativ sein. Um diesen Zusammenhang zu untersuchen, wurden sowohl bereits geerntete und fixierte Monozyten, aber auch noch in Kultur befindliche lebende Monozyten mit Insulin inkubiert.

Acetonfixierte „Tag 2“-Monozyten wurden mit 5, 20, 50 und 100 µg/mL Insulin für eine Stunde in der feuchten Kammer bei 4°C inkubiert und anschließend immunhistochemisch untersucht. Die Daten in Abb. 4.12 belegen, dass die normalerweise am Tag 2 Insulin-negativen Monozyten nach der Inkubation mit aufgereinigtem Insulin eindeutig Insulin-positiv waren – und zwar für alle getesteten Insulin-Konzentrationen. Um mögliche Kreuzaktivitäten des Sekundärantikörpers ausschließen zu können, wurde dieser auf mögliche Kreuzreaktionen mit Insulin-inkubierten „Tag 2-Monozyten“ als auch Insulin-negativen „Tag 2-Monozyten“ überprüft. In sämtlichen Kontrollen verursachte der Antikörper keine Hintergrundfärbung (siehe hierzu Anhang A4).

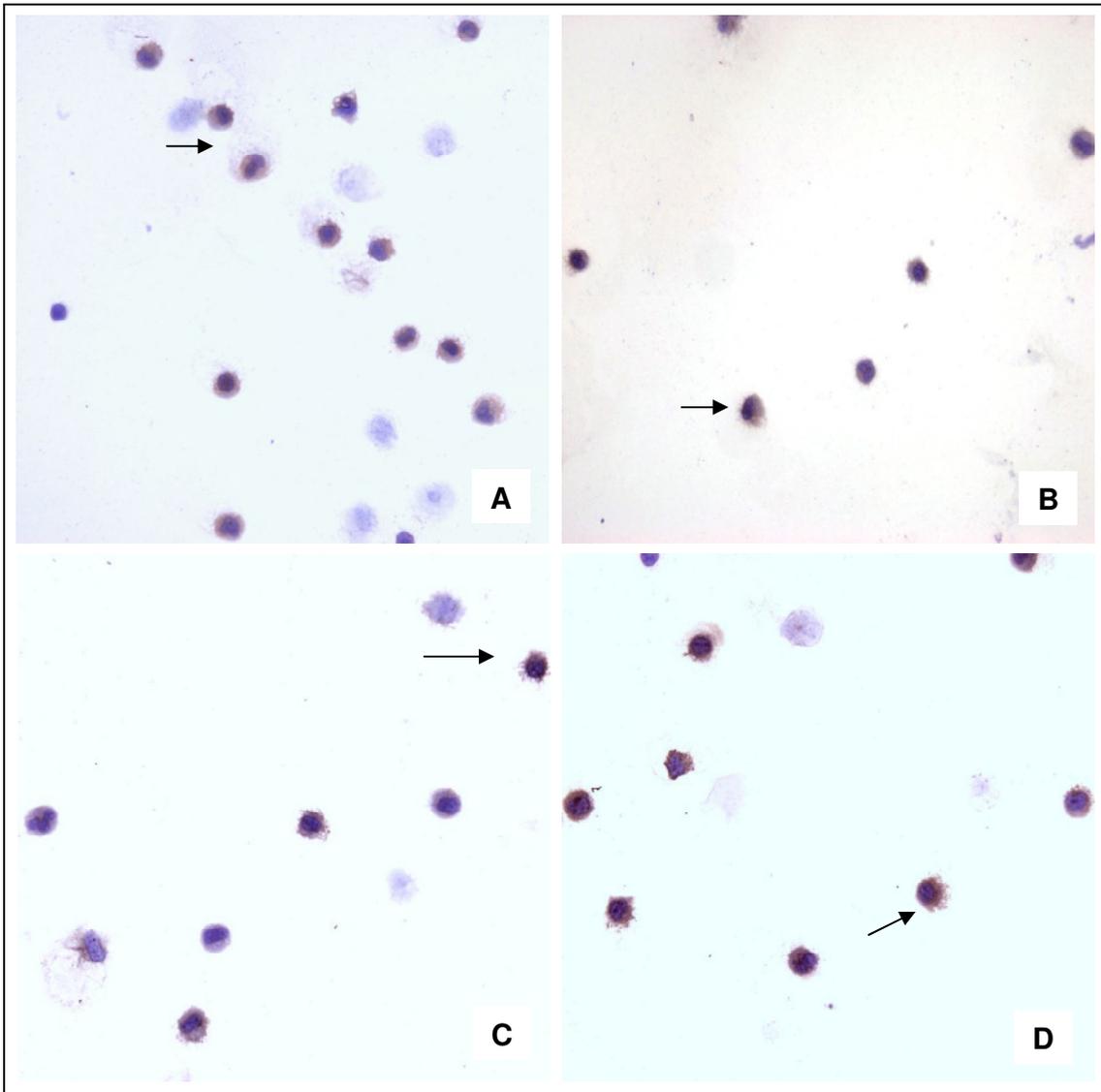


Abbildung 4.12: Nachweis Insulin-positiver Monozyten nach Inkubation mit Insulin. Acetonfixierte „Tag 2-Monozyten“ wurden mit 5 µg/mL Insulin (A), 20 µg/mL Insulin (B), 50 µg/mL Insulin (C) und 100 µg/mL Insulin (D) inkubiert. Die normalerweise Insulin-negativen „Tag 2“-Monozyten waren bereits ab einer Insulinkonzentration von 5 µg/mL positiv für Insulin (Pfeil). Die Negativkontrollen mit und ohne Insulininkubation wiesen keine Färbung auf (siehe Anhang A4).

Diese Zellen wurden auch immunhistochemisch auf C-Peptid untersucht. Die Ergebnisse in Abb. 4.13 belegen, dass diese Zellen C-Peptid-negativ waren. Damit ist die oben formulierte Hypothese, dass zum Nachweis von *de novo* Insulin der Nachweis von C-Peptid gehört, bestätigt.

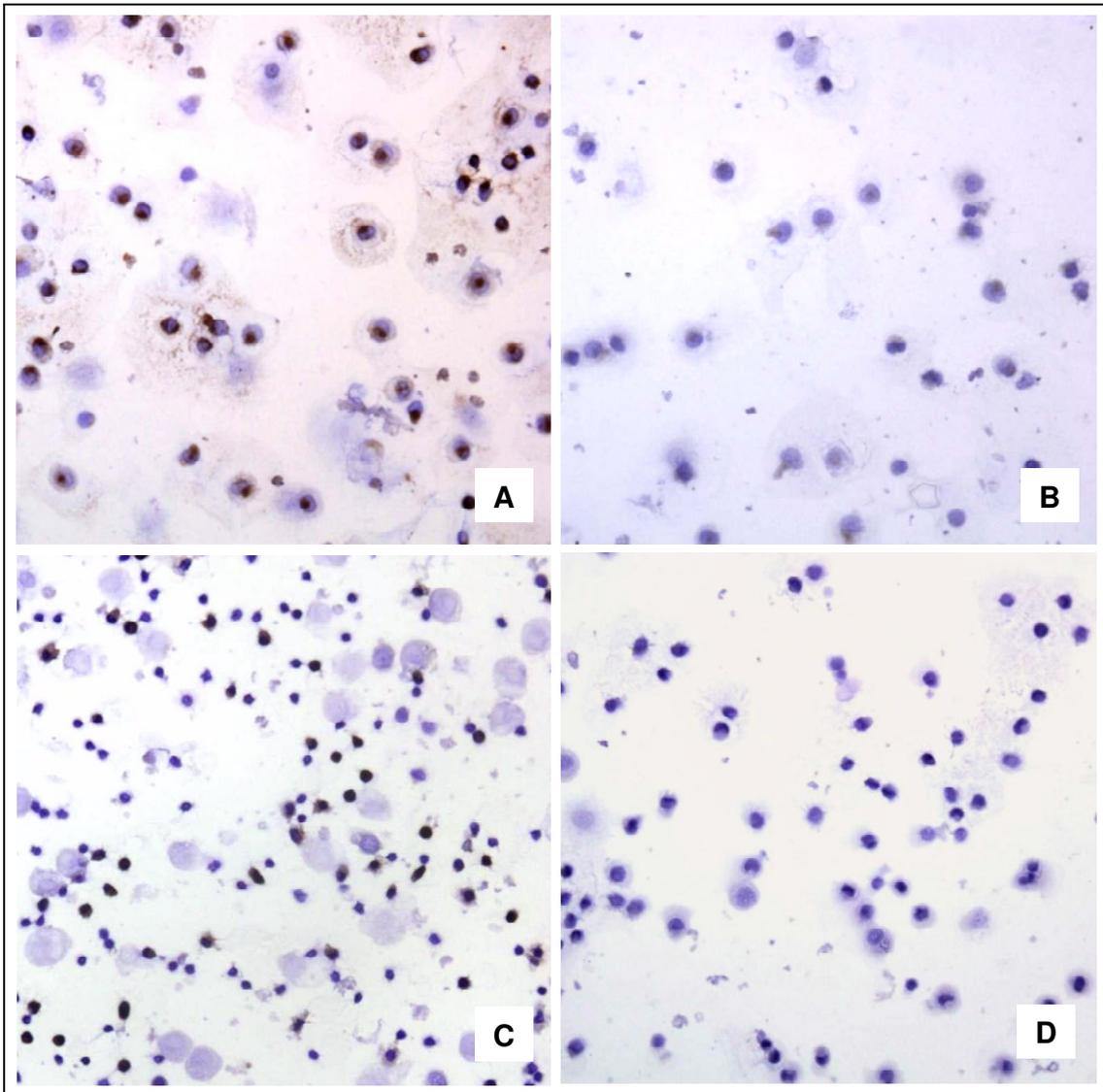


Abbildung 4.13: Mit exogenem Insulin inkubierte acetonfixierte Monozyten und kultivierte Monozyten sind Insulin-positiv, nicht aber C-Peptid-positiv. Acetonfixierte „Tag 2“-Monozyten (A bis C) wurden für eine Stunde und frisch ausgesäte Monozyten (D bis F) für 2 Tage mit 5 µg/mL Insulin inkubiert. (A & D): Insulinnachweis; (B & E): C-Peptid-Nachweis, Negativkontrolle (Kontrolle des Sekundärantikörpers) im Anhang A5.

Makrophagen (J774.2) und Endothelzellen (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells* oder HUVEC) wurden nach 2-tägiger Kultivierung in insulinhaltigem Medium (5 µg/mL und 20 µg/mL Insulin) auf Insulin und C-Peptid hin untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass bereits bei einer Insulinkonzentration von 5 µg/mL die Zellen deutlich positiv für Insulin waren, nicht aber für C-Peptid.

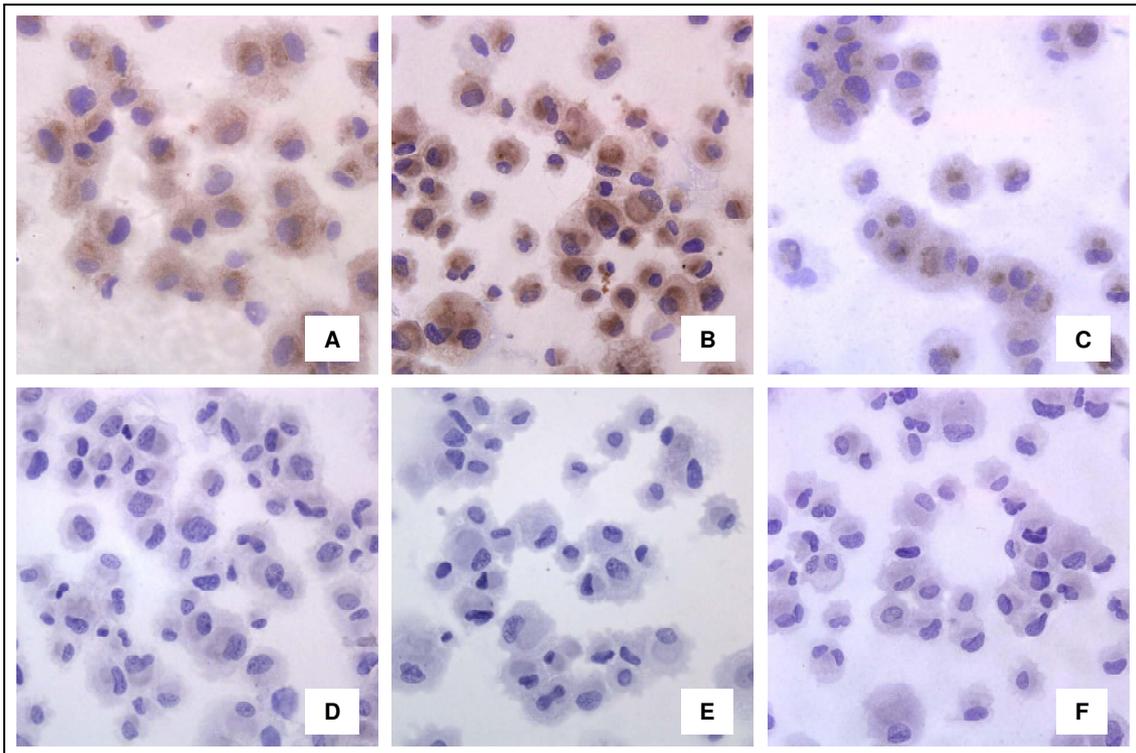


Abbildung 4.14: Nachweis Insulin-positiver, aber C-Peptid-negativer Endothelzellen (HUVEC) nach Inkubation mit gereinigtem Insulin. HUVEC wurden mit 5 µg/mL Insulin (A, D) und 20 µg/mL Insulin (B, E) inkubiert. Anschließend wurden sie immunhistochemisch auf Insulin (A, B) und C-Peptid getestet (D, E). In insulinfreiem Medium (C, F) waren sie negativ für Insulin (C) und C-Peptid (F). Die schwache Färbung in Teilabbildung C ist Ursache einer verstärkten Hintergrundfärbung.

Ebenfalls waren Makrophagen, die für 2 Tage mit 5 und 20 µg/mL Insulin kultiviert wurden, positiv für Insulin, aber negativ für C-Peptid. Makrophagen kultiviert in Medium ohne Insulinzusatz waren hingegen negativ für beide Marker.

Die hier beschriebenen Experimente belegen somit, dass exogenes Insulin, das z.B. als Wachstumsfaktor dem Kulturmedium zugesetzt wird, zu falsch-positiven Ergebnissen führt. Der Nachweis von C-Peptid fiel dabei stets negativ aus.

Das Ergebnis belegt, dass der anti-C-Peptid Antikörper biologisch aktives Insulin nicht erkennt und eindeutig die Abwesenheit von C-Peptid anzeigt. Ob dieser Antikörper das C-Peptid im Proinsulin oder das bereits abgespaltene C-

Peptid erkennt, kann nicht sicher beantwortet werden. Jedenfalls waren die kultivierten Monozyten, die Insulin-positiv waren, auch C-Peptid-positiv.

Somit ist *de novo* Insulin von aufgenommenem Insulin immunhistologisch nur dann sicher zu unterscheiden, wenn ein Test auch auf C-Peptid durchgeführt wird. Da weder im X- noch Y-Medium Insulin vorhanden war, bestätigten diese Untersuchungen auch die bisherigen Ergebnisse, dass nach dem „Kieler Protokoll“ kultivierte Monozyten *de novo* Insulin bilden, da nur bei diesen Zellen sowohl der Insulin- als auch C-Peptid-Nachweis eindeutig war.

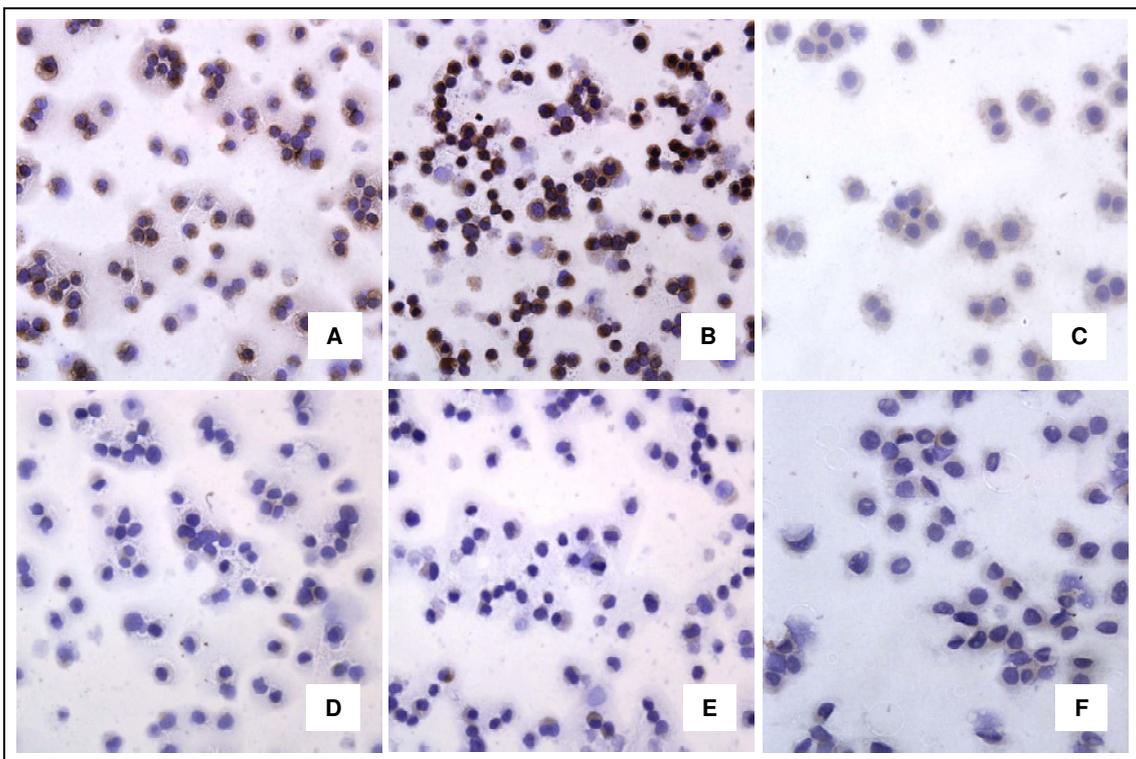


Abbildung 4.15: Nachweis Insulin-positiver, aber C-Peptid-negativer Makrophagen. Makrophagen wurden für 2 Tage mit 5 µg/mL Insulin (A, D) und 20 µg/mL Insulin (B, E) inkubiert. Anschließend wurden sie immunhistochemisch auf Insulin (A, B) und C-Peptid getestet (D, E). In insulinfreiem Medium (C, F) waren sie negativ für Insulin (C) und C-Peptid (F). Hier war eine verstärkte Hintergrundfärbung zu erkennen.

4.4 Überprüfung der Monozyten-Kulturmedien auf exogenes Insulin

Wie bereits erwähnt, wurde weder dem X-Medium noch dem Y-Medium Insulin zugesetzt. Um aber auszuschließen, dass nicht über andere Quellen, z.B. durch das FCS, exogenes Insulin in die Medien gekommen ist, hat die Arbeitsgruppe einen sensitiven Insulin-ELISA etabliert, mit dem Insulinkonzentrationen von 0,1 ng/mL Insulin nachgewiesen werden. Mit diesem ELISA wurde gezeigt, dass die zur Monozytenkultivierung eingesetzten Medien frei von Insulin waren. Die Sensitivität des ELISA wurde zuvor mit Proben von Kulturmedien mit definierten Mengen an Insulin getestet (Tab. 4.2).

Monozyten wurden von Tag 0 bis 2 mit folgenden Insulinkonzentrationen inkubiert: 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 und 1,563 ng/mL. Anschließend wurden die Zellen immunhistochemisch auf die Anwesenheit von Insulin und C-Peptid überprüft und der Insulingehalt der Medien im ELISA gemessen. Mit abnehmender Insulinkonzentration wurde auch die immunhistochemische Färbung schwächer (Fig. 4.16). Erstaunlich war das Ergebnis, dass auch bei der geringsten Insulinkonzentration von 1,563 ng/mL Insulin-positive Zellen nachzuweisen waren. Auch bei diesen Experimenten waren die mit Insulin-inkubierten Makrophagen negativ für C-Peptid.

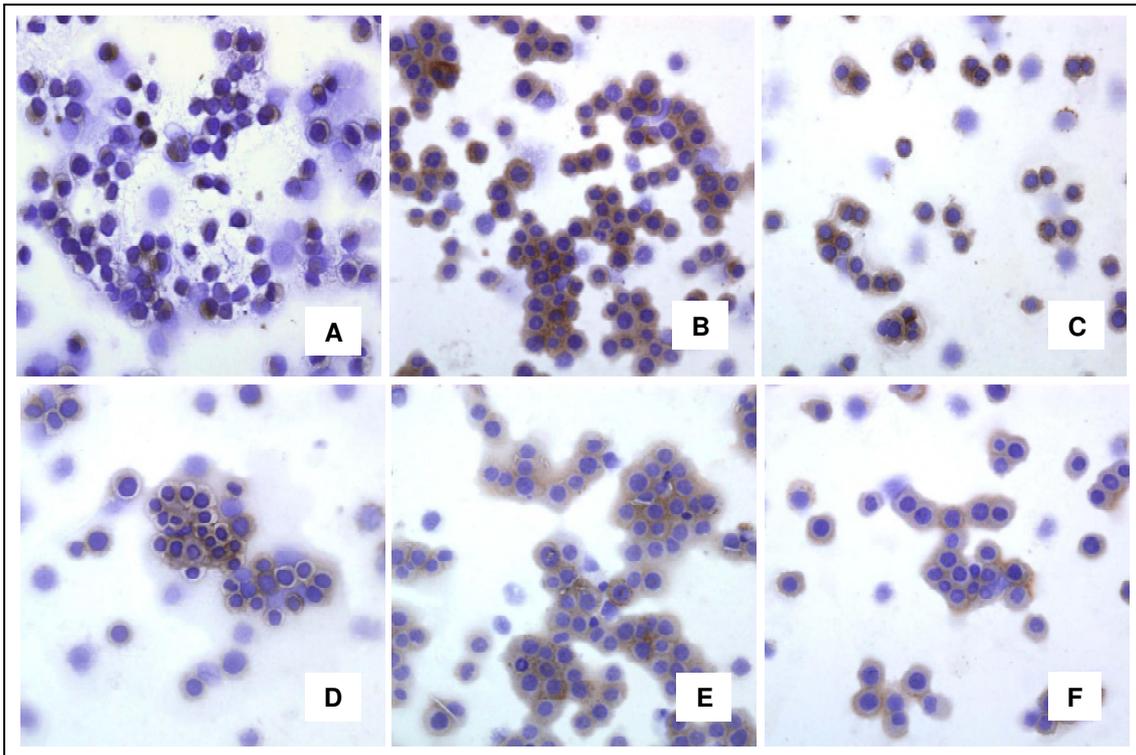


Abbildung 4.16: Für 2 Tage mit Insulin kultivierte Monozyten sind immunhistochemisch positiv für Insulin. Folgende Insulin-Konzentrationen wurden getestet: 50 ng/mL (A), 25 ng/mL (B), 12,5 ng/mL (C), 6,25 ng/mL (D), 3,125 ng/mL (E) und 1,563 ng/mL (F).

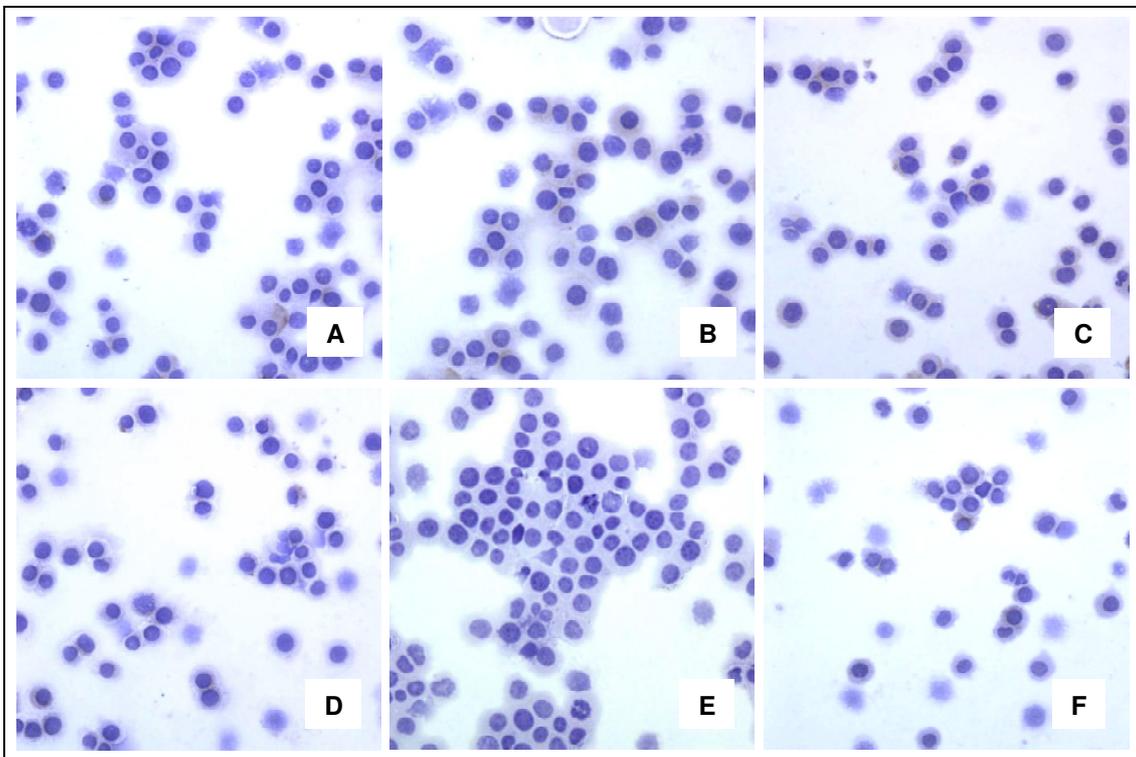


Abbildung 4.17 (S. 36): Für 2 Tage mit Insulin kultivierte Makrophagen sind immunhistochemisch negativ für C-Peptid. Folgende Insulin-Konzentrationen wurden ausgetestet: 50 ng/mL (A), 25 ng/mL (B), 12,5 ng/mL (C), 6,25 ng/mL (D), 3,125 ng/mL (E) und 1,563 ng/mL (F). Vergleich mit Abb. 4.16.

Mit dem sensitiven ELISA wurden die Monozyten-Kulturmedien mehrfach überprüft (n=5) und zu keinem Zeitpunkt wurde Insulin in diesen Medien nachgewiesen. Insulin wurde ausschließlich in den Medien gemessen, zu denen Insulin hinzugegeben wurde.

Diese Daten, dass kein Insulin in X- und Y-Medien nachzuweisen war, sind ein weiterer Hinweis dafür, dass die kultivierten Monozyten *de novo* Insulin bilden. Der gelungene Nachweis von C-Peptid in diesen Zellen ist ein weiteres wichtiges Indiz. Diese Daten ergänzen somit die bisherigen immunhistochemischen Analysen (Abschnitt 4.3).

Tabelle 4.2: Der hochsensitive Insulin-ELISA weist Insulinkonzentrationen von mindestens 0,1 ng/mL nach.

Soll (ng/mL)	Gemessen (ng/mL)			
6,25	6,10	6,01	7,07	6,66
3,12	3,38	3,29	4,43	3,58
1,56	1,49	1,47	2,01	1,61
0,78	0,68	0,59	0,80	0,68
0,39	0,28	0,29	0,35	0,33
0,20	0,16	0,24	0,17	0,18
0,10	0,11	0,18	0,10	0,14
0	0,07	0,04	0,06	0,08

4.5 Nachweis biologischer Aktivität von „Monozyten-Insulin“ *in vivo*

Kultivierte Monozyten wurden geerntet, im Ultraschallbad zerstört und der zellfreie Überstand diabetischen Mäusen vom Stamm C57BL/6 injiziert.

Zum Zeitpunkt der Injektion und 1 bzw. 5 Stunden nach Injektion wurde der Blutzuckerspiegel dieser Tiere bestimmt. In Tabelle 4.3 sind Positiv- sowie Negativkontrollen aufgeführt. Die Positivkontrolle, es wurde aufgereinigtes porcines Insulin verwendet, wurde in unterschiedlichen Konzentrationen verabreicht. Eine Stunde nach Injektion von 4 IE (entsprechen 170 µg Insulin pro Maus) fiel der Blutzuckerspiegel deutlich auf normoglykämische Werte (Kerner W. et al., 2004) von unter 126 mg/dl ab. Fünf Stunden nach Injektion war der Blutzuckerspiegel bei der Mehrzahl der diabetischen Mäuse in der Regel wieder angestiegen.

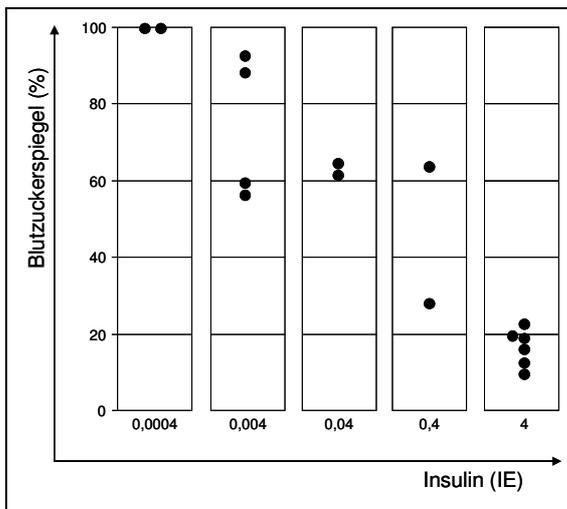


Abbildung 4.18: Veränderung des Blutzuckerspiegels diabetischer Mäuse 1 Stunde nach Injektion von porcinem Insulin. Getestet wurden 5 unterschiedliche Konzentrationen an aufgereinigtem Insulin (4×10^{-4} , 4×10^{-3} , 4×10^{-2} , 4×10^{-1} , 4×10^0 IE). Die Stammlösung betrug 40×10^3 IE/L. Für weitere Berechnungen sind folgende Formeln hilfreich: 1 IE/L Insulin = $41,67 \mu\text{g/L} = 7,3 \text{ nmol/L}$. Die 4 IE entsprechen somit ca. $166,7 \mu\text{g}$ Insulin. Ein Blutzuckerspiegel von 600 mg/dL wurde gleich 100 Prozent gesetzt (s. auch Tab. 4.3).

Als nächstes wurde die biologische Aktivität zellfreier Lysate unterschiedlicher Kulturstage in diabetischen Tieren getestet.

Tabelle 4.3: Veränderung des Blutzuckerspiegels diabetischer Mäuse nach Injektion von porcinem Insulin. Der Insulingehalt ist in Internationalen Einheiten (IE) angegeben. Die Konzentration der Stammlösung betrug 40 IE/mL (1 IE/L Insulin = 41,67 µg/L = 7,3 nmol/L). Vier Internationale Einheiten Insulin senkten den Blutzuckerspiegel um durchschnittlich 84 Prozent. Dem gegenüber zeigten die Negativkontrollen, hierbei handelte es sich um zellfreie Lysate humaner Fibroblasten und Lymphozyten, keinen Effekt auf den Blutzuckerspiegel. Zur Berechnung der prozentualen Abnahme des Blutzuckerspiegels ($\Delta\%$) siehe Kommentar zur Tab. 4.4. Zur graphischen Auswertung siehe Abb. 4.18.

	Tier	Injektion	Stunde(n) nach Injektion			
			1	$\Delta\%$	5	$\Delta\%$
0,0004 IE	29;1	600	600	0	600	0
	29;2	600	600	0	600	0
Mittelwert		600	600	0	600	0
0,004 IE	29;1	600	553	-7,8	600	
	29;3	600	341	-43,2	524	-12,7
	29;5	600	351	-41,5	600	
	32;1	600	527	-12,2	600	
Mittelwert		600	443		581	
0,04 IE	29;2	600	386	-35,7	600	
	32;3	600	381	-36,5	600	
Mittelwert		600	383	-36,1	600	
0,4 IE	29;5	600	164	-72,7	600	
	32;2	600	278	-53,7	600	
Mittelwert		600	221	-63,2	600	
4 IE	29;1	600	74	-87,7	600	
	29;2	600	96	-84,0	600	
	29;3	600	55	-90,8	226	(-62,3)
	29;5	478	89	-81,4	530	(+10,9)
	33;5	600	118	-80,3	600	
	35;5	268	55	-79,5	33	(-87,8)
Mittelwert		524	81		431	
Negativkontrolle: Humane Fibroblasten						
	31;5		600		600	
Negativkontrolle: Lymphozyten						
	33;2		600		600	

Um die blutzuckersenkenden Eigenschaften zellfreier Überstände sicher beurteilen zu können, wurde der *cutoff* auf 15 Prozent gesetzt; d.h. der Blutzuckerspiegel muss stärker als 15 Prozent vom Ausgangswert abfallen.¹⁾ Wird dieser *cutoff* zugrunde gelegt, so zeigen 11 der 31 zellfreien Lysate (35,5 Prozent) einen blutzuckersenkenden Effekt. Bezogen auf die 18 Proben, die einen Effekt gezeigt haben, sind es sogar 61 Prozent.

¹⁾ Kay-Renke Schmidt. *Charakterisierung zu in vitro modifizierten humanen Blutmonozyten: Überprüfung von Kultivierungsbedingungen und funktioneller Nachweis von Insulin.* Inaugural-Dissertation der Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2009.

Tabelle 4.4: Zellfreie Lysate (n=31) Insulin-positiver Zellen senken den Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse. Die Injektion von zellfreiem Überstand (aus ca. 1×10^6 bis 1×10^7 Monozyten) senkte den Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse innerhalb einer Stunde nach Injektion. Bei einem cutoff von ≥ 15 Prozent des Ausgangswerts wiesen insgesamt 11 von 31 Proben einen Effekt auf. Nach 5 Stunden war bei dem Großteil der Tiere der Blutzuckerspiegel wieder angestiegen. Gezeigt sind die Blutzuckerspiegel in mg/dL vor und nach subkutaner Injektion; Injektionsvolumen: 100 μ L.

Apherese	Tier	Injektion	Stunde(n) nach Injektion			
			1	$\Delta\%$	5	$\Delta\%$
25.2 (T11)	29;3	600	600	0	600	0
25.3 (T11)	31;2	600	600	0	600	0
	31;1	600	600		600	0
	31;2	497	329	-33,8	501	+0,8
	31;3	600	474	-21,0	464	-22,7
26E (T12)	31;4	600	600	0	600	0
	30;2	600	600	0	600	0
30.7 (T11)	30;3	600	600	0	598	-0,3
	34;1	600	500	-16,7	600	0
	34;2	600	499	-16,8	600	0
	34;3	528	500	-5,3	594	0
	34;4	600	515	-14,2	600	0
	35;1	600	503	-16,2	533	-11,2
	35;2	600	477	-20,5	600	0
31.2 (T11)	35;4	600	600	0	600	0
31.3 (T10)	31;3	600	600	0	600	0
	31;1	600	479	-20,2	558	-7,0
31.4 (T10)	31;2	600	531	-11,5	600	0
	29;3	600	563	-6,2	600	0
31.5 (T7)	29;5	600	524	-12,7	600	0
	29;1	600	600	0	600	0
	29;2	588	525	-12,5	600	+2,0
31.6 (T6)	30;1	600	550	-8,3	600	0
	29;1	600	600	0	600	0
	29;2	600	600	0	600	0
32 (T11)	29;3	600	600	0	600	0
	31;1	559	472	-15,6	532	(-4,8)
	32.2 (T12)	31;4	600	495	-17,5	579
	36;1	600	173	-71,2	364	(-39,3)
	36;2	600	600	0	600	0
33.2 (T10)	36;5	349	140	-59,9	450	+0,2

Die prozentuale Abnahme des Blutzuckerspiegels ($\Delta\%$) wird nach folgender Formel berechnet: $(a-b/a) \times 100$, a = Blutzuckerspiegel zum Zeitpunkt der Injektion und b = Blutzuckerspiegel nach Injektion. Prozentwerte mit „-“ bzw. „+“ markieren abfallende bzw. ansteigende Blutzuckerwerte. T= Tag. Zur Nomenklatur der Apheresen: 25.2 bedeutet z.B. 25. Apherese und 2. Auftauchcharge dieser Apherese.

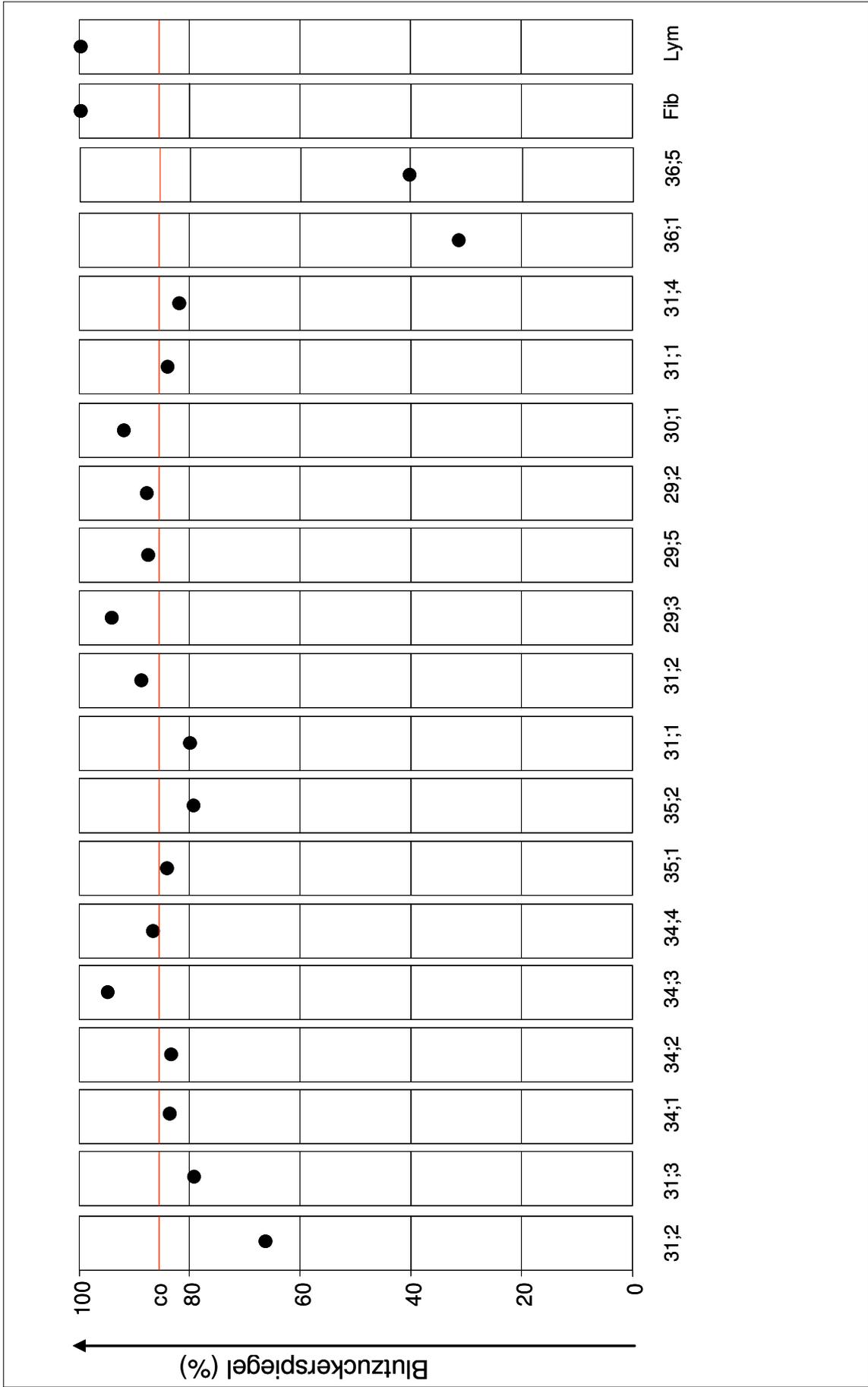


Abbildung 4.19 (S. 41): Zellfreie Lysate Insulin-positiver Zellen senken den Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse. Übersicht zur blutzuckersenkenden Wirkung von 18 zellfreien Lysaten. Siehe auch Tab. 4.4. *co*: cutoff. In Vorarbeiten wurde dieser *cutoff* bei 15 Prozent gesetzt; d.h. der Blutzuckerspiegel muss stärker als 15 Prozent vom Ausgangswert abfallen, damit eine blutzuckersenkende Wirkung sicher erkannt wird. Fib: humane Fibroblasten; Lym: humane Lymphozyten. Zur Nomenklatur der Apherese siehe Tab. 4.4.

5 Beantwortung der Fragen

In der vorliegenden Arbeit wurden humane Monozyten nach dem „Kieler Protokoll“ kultiviert und immunhistochemisch sowie funktionell untersucht. Mit den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen lassen sich folgende Fragen beantworten:

1. Welche morphologischen und immunhistochemischen Charakteristika weisen die mit dem „Kieler-Protokoll“ kultivierten Insulin-positiven Monozyten auf?

Die Cytokine des X-Mediums, IL-3 und M-CSF, induzieren eine Zellproliferation und führen zu einer Zunahme der Zellzahl. So stieg die Ausbeute an Monozyten, die am Tag 10 aus einer mittleren Zellkulturflasche geerntet wurden, von $1,4 \times 10^6 \pm 0,4 \times 10^6$ Zellen (n=22) auf $3,3 \times 10^6 \pm 0,9 \times 10^6$ Zellen (Schmidt K, 2009). Aus den langgestreckten, fibroblastoiden Monozyten entwickelten sich zwischen Tag 8 und 10 (zu diesem Zeitpunkt wurden sie im Y-Medium kultiviert) sehr variable Differenzierungsstadien von Makrophagen. Nach Tag 21 dominierten stark adhärenente Makrophagen die Kultur. Ab dem 4. Kulturtag wurden Insulin und C-Peptid in den kultivierten Makrophagen immunhistochemisch nachgewiesen.

Die Expression von Insulin war jedoch nicht stabil und während am Tag 11 der Anteil Insulin-positiver Zellen noch bei ca. 80 Prozent lag, waren am Tag 14 nur noch ca. 30 Prozent der Zellen Insulin-positiv. Diese Dynamik wurde ebenfalls für C-Peptid und Glukagon beobachtet. Diese Instabilität der Genexpression lässt vermuten, dass die Monozyten nur während einer bestimmten Phase ihrer Entwicklung temporär Insulin exprimieren und je mehr sie sich in Richtung Makrophagen differenzieren diese Eigenschaft verlieren (Abb. 4.4 und 4.5).

2. Welche Fehlerquellen sind beim Nachweis von *de novo* Insulin zu beachten?

In dieser Arbeit wurden Insulin und C-Peptid in „Tag-4“-Monozyten zum ersten Mal nachgewiesen. Da Rajagopal et al. 2003 auf die Möglichkeit aufmerksam machten, dass Zellen exogenes Insulin aufnehmen und speichern können, sollte in dieser Arbeit die Frage geklärt werden, ob immunhistochemisch zu unterscheiden ist, wann ein positiver Insulinnachweis auf *de novo* Insulin oder auf unspezifisch aufgenommenes (exogenes) Insulin hinweist. Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist zum eindeutigen Nachweis von *de novo* Insulin die Präsenz von C-Peptid unbedingt zu fordern. Dabei unterscheidet sich *de novo* Insulin von exogenem Insulin durch den erfolgreichen Nachweis von C-Peptid.

3. Ist das in den *in vitro* modifizierten Monozyten nachweisbare Insulin biologisch aktiv und senkt es den Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse?

Das aus *in vitro* kultivierten Monozyten isolierte Insulin war in diabetischen Mäusen biologisch aktiv, d.h. es senkte den Blutzuckerspiegel kurzfristig (Tab. 4.4 und Abb. 4.19). Hierzu wurden Monozyten zwischen den Kulturtagen 6 und 12 geerntet, im Ultraschallbad aufgeschlossen und der zellfreie Überstand diabetischen Mäusen injiziert. Insgesamt senkten 18 der 31 in dieser Arbeit getesteten Überstände den Blutzuckerspiegel diabetischer Tiere; dies entspricht 58 Prozent. Hierunter befanden sich 11 Überstände (=35,5 Prozent), die den Blutzuckerspiegel sogar um mehr als 15 Prozent senkten. Bezogen auf die 18 Proben mit einem eindeutigen biologischen Effekt waren dies sogar 61 Prozent. Dieses Ergebnis bestätigt somit frühere Beobachtungen (Herbst A, 2008; Schmidt K, 2009).

6 Diskussion

Die Ziele dieser Arbeit waren die morphologische und immunhistochemische Charakterisierung humaner Monozyten, die nach dem „Kieler Protokoll“ kultiviert wurden (Abb. 6.1). Dieses zweistufige „Kieler Protokoll“ (Ruhnke M et al, 2005) „reprogrammiert“ in der ersten Stufe (X-Medium) die Monozyten in so genannte „programmable cells of monocytic origin“, um sie anschließend in der zweiten Stufe (Y-Medium) zu Betazellen zu differenzieren (Ruhnke M et al., 2005). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, zwischen *de novo* Insulin und exogenem Insulin immunhistochemisch zu differenzieren. Diese Untersuchungen sind bedeutsam für die Unterscheidung, ob eine Zelle Insulin „aktiv“ bildet (exprimiert) oder „passiv“ von außen aufnimmt. Des Weiteren wurde die biologische Aktivität von „Monozyten-Insulin“ in diabetischen Mäusen getestet.

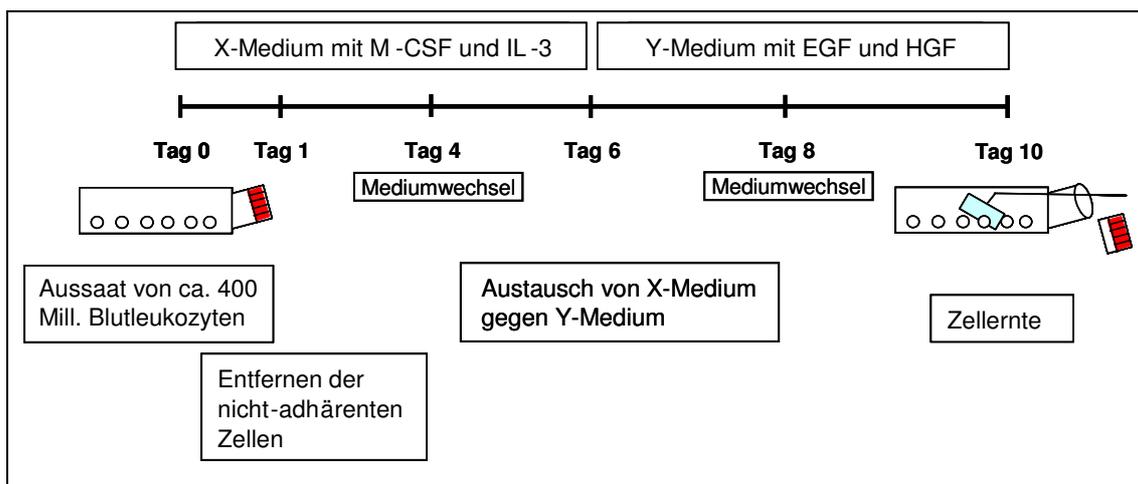


Abb. 6.1: Kultivierung humaner Blutmonozyten mit dem „Kieler-Protokoll“. Humane Monozyten wurden für sechs Tage in X-Medium und anschließend für weitere vier bis elf Tage in Y-Medium kultiviert.

6.1 Das Differenzierungspotential humaner Blutmonozyten

Periphere Blutmonozyten verfügen über die Fähigkeit, sich in unterschiedliche Makrophagensubtypen zu differenzieren. Hierzu wandern sie aus dem Blut in das Gewebe ein – die so genannte Transmigration. Für die Differenzierung sind lokale, gewebespezifische Stimuli (z.B. Wachstumsfaktoren) von grundlegender Bedeutung (Waldo S et al., 2008). Der Einfluss gewebespezifischer Faktoren

auf die Differenzierung von Monozyten ist so dominant, dass die gewebe-spezifischen Makrophagen unterschiedliche Bezeichnungen erhielten: Alveolar-makrophagen, Kupffer-Zellen, Osteoklasten, Synoviazellen, um nur einige Bei-spiele zu nennen. Die biologische Bedeutung dieser Makrophagenheterogenität liegt nach Rutherford in den vielfältigen Aufgaben dieser Zellen und in ihren un-terschiedlichen Funktionen in verschiedenen Phasen von Entzündungen (Rutherford MS et al., 1993).

Seit einigen Jahren wird immer deutlicher, dass Monozyten auch über pluripo- tente Eigenschaften verfügen und, ähnlich den Stammzellen, unter dem Ein- fluss verschiedener Zytokine ein weitreichendes Differenzierungspotential auf- weisen (Zhao Y et al., 2003; Kuwana M et al., 2003; Kodama H et al., 2006; Kuwana M et al., 2006; Schmeisser A et al., 2000; Elsheikh E et al., 2005; Murdoch C et al., 2007). Die besondere Fähigkeit humaner Monozyten, sich in weit mehr Zelltypen differenzieren zu können, als „nur“ in die unterschiedlichen Makrophagentypen, verdeutlicht Tabelle 1.1 in der Einleitung. Danach können sich Monozyten auch in Zellen der drei Keimblätter differenzieren.

Mit dem zweistufigen „Kieler Protokoll“ (Abb. 6.1) gelang es der Arbeitsgruppe um Professor Fändrich durch Modifizierungen des Y-Mediums sowohl pankreatische Betazellen, die Autoren bezeichnen sie als „Neoislets“, als auch in Hepatozyten („Neohepatozyten“) zu differenzieren (Ruhnke M et al., 2005). Während sich die endokrinen Hormonzellen (z.B. Betazellen) des Pankreas ent- wicklungsgeschichtlich vom äußeren Keimblatt (Ektoderm) ableiten, entwickeln sich Leberzellen vom inneren Keimblatt (Entoderm) (www.neue-mediz.in). Das Potential einer Zelle, sich in Gewebe aller drei Keimblätter zu differenzieren, war bisher nur von Stammzellen bekannt. Die „Neohepatozyten“ ähneln nicht nur morphologisch Hepatozyten, sie verfügen auch über wichtige ihrer meta- bolischen Eigenschaften wie z.B. die Produktion von Albumin. So überlebten von hepatektomierten Mäusen, die zusätzlich „Neohepatozyten“ erhielten, 7 von 10 Tieren mehr als 100 Tage, während in der nicht-therapierten Kontrollgruppe (sie erhielten keine „Neohepatozyten“) nur 2 von 10 Tieren überlebten (Glance- man M et al., 2009). Der eigenen Arbeitsgruppe gelang erstmalig, die langfris-

tige Funktion (> 100 Tage) Insulin-positiver Zellen, die nach dem „Kieler Protokoll“ kultiviert wurden, in diabetischen immuninkompetenten Mäusen zu zeigen (Schmidt K-R, 2009). Trotz dieser beeindruckenden Ergebnisse ist nach den Daten der eigenen Arbeitsgruppe nicht klar, ob das von der Kieler Arbeitsgruppe postulierte Konzept so zu halten ist. Wie auch in dieser Arbeit gezeigt, bleibt der Phänotyp der kultivierten Monozyten nicht stabil und sie entwickeln sich zu Makrophagen (Herbst A, 2008; Schmidt, K-R, 2009). Auch ist nicht geklärt, ob die ausgeprägte Proliferation im X-Medium auf „programmable cells of monocytic origin“ hindeutet.

Trotzdem gelang der Nachweis von Insulin und C-Peptid in kultivierten Monozyten. Wie erwähnt, lassen sich die Beobachtungen der Kieler Gruppe, dass die kultivierten Monozyten sich in so genannte „Neoislets“ differenzieren, durch die eigenen Versuche nicht bestätigen. Die Monozyten organisierten sich zwar zeitweilig zu Zellklustern, jedoch differenzierten sie sich stets zu Makrophagen (Tab. 4.1). CD68-positive Zellen (Makrophagen) sind sowohl während der Kultivierung im X-Medium (bis einschließlich Tag 6) als auch im Y-Medium zu finden. Auch gibt es Hinweise, dass sich ein Teil der Monozyten zu unreifen Dendritischen Zellen entwickelt hat.

Die morphologischen Veränderungen während der Differenzierung humaner Monozyten zu Makrophagen sind gut in der Zellkultur dokumentiert. Hierbei lassen sich mobile und sessile Stadien unterscheiden. Insbesondere die lang gestreckten Zellformen sind typisch für mobile Stadien der Zelle, die auf chemotaktische Stimuli reagieren und gezielt ihre Bewegungsrichtung ändern können. Ihre polaren Plasmafortsätze ermöglichen unter stetiger Veränderung ihrer Gestalt eine Fortbewegung. Neben diesem Zelltyp zeigen sich nach einigen Tagen in Kultur größer werdende Makrophagen, die häufig mehrere Kerne aufweisen. Durch Fusion und Amitosen (Zellkernteilung ohne Plasmateilung) nehmen die Zellen an Größe zu. Dies führt zur Ausbildung großer sessiler Makrophagen (www.iwf.de).

Insbesondere die im X-Medium befindlichen Cytokine IL-3 und M-CSF induzieren eine starke Zellproliferation. Monozyten, die ohne diese Cytokine bzw. nur mit M-CSF kultiviert wurden, zeigten weder eine Proliferation noch die Bildung von Zellklustern (Ruhnke M et al., 2005). Beide Cytokine sind an der Differenzierung von Monozytenvorläuferzellen zu reifen Monozyten und deren Ausdifferenzierung zu Gewebsmakrophagen beteiligt (Abb. 6.2). Wie diese beiden wichtigen Cytokine im X-Medium des „Kieler Protokolls“ die Reprogrammierung humaner Monozyten induzieren, ist zum jetzigen Zeitpunkt jedoch nicht geklärt. Doch, und dies belegen eigene Literaturrecherchen, wandelt sich der Blick auf das Monozyten / Phagozyten-System weg von der „primitiven“ Fresszelle hin zu einer Zelle mit einem bisher unterschätzten Differenzierungspotential, das es ihr erlaubt, die vielfältigen Aufgaben – jenseits der ebenso elementaren Phagozytose – im Bereich Wundheilung und Gewebeumbau zu erfüllen (Stan N und Kuwana M, 2007).

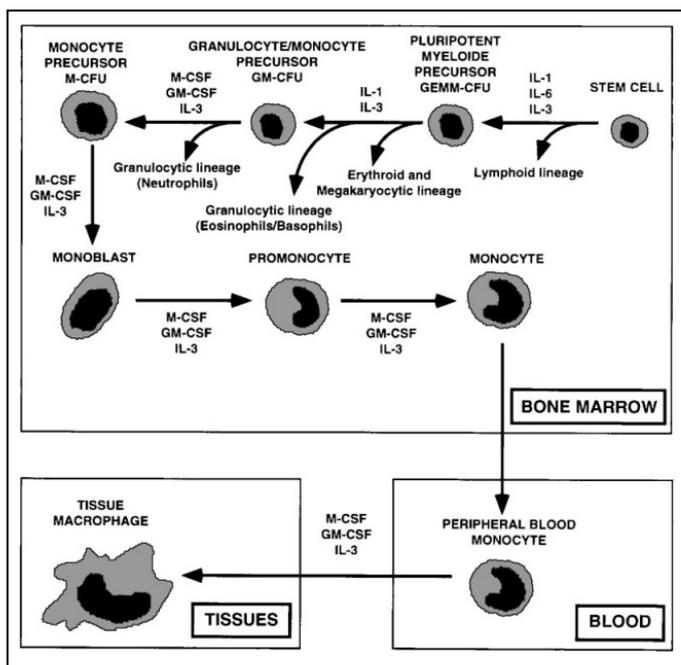


Abb. 6.2. Wege der Differenzierung zu Monozyten/ Makrophagen. Die Abbildung verdeutlicht die Bedeutung von IL-3 und M-CSF für die unterschiedlichen Differenzierungsvorgänge bei der Entwicklung von Monozyten / Makrophagen (aus: Valledor AF et al., 1998). Monozyten entwickeln sich aus Progenitorzellen im Knochenmark, wobei drei unterschiedliche „Entwicklungsstufen“ unterschieden werden, bevor die Monozyten in den Blutkreislauf übertreten und dort zirkulieren: Monoblast, Promonozyt und Monozyt (Cohn Z, 1978).

6.2 Der Monozyt als „ideale“ Insulin-produzierende Zelle?

Wie in dieser Arbeit gezeigt, reicht der alleinige immunhistochemische Nachweis von Insulin nicht aus, um Insulin-produzierende Zellen sicher zu identi-

fizieren. Wesentlich für die Bestätigung der in dieser Arbeit präsentierten immunhistochemischen Ergebnisse sind die ebenfalls in dieser Arbeit gezeigten funktionellen Daten (Tab. 4.3 u. 4.4). Aus Monozyten, die nach dem „Kieler Protokoll“ kultiviert wurden, wurde ein Blutzuckerspiegel-senkender Faktor isoliert, nicht aber aus frisch isolierten Monozyten (Tab. 4.4 u. Abb. 4.19). Insgesamt senkten 11 der 31 in dieser Arbeit getesteten Überstände (dies entspricht 35,5 Prozent der Überstände) den Blutzuckerspiegel diabetischer Tiere um mehr als 15 Prozent. Bezogen auf die 18 Proben, die einen biologischen Effekt zeigten, waren dies sogar 61 Prozent. Nach aktuellem Wissensstand kann es sich bei diesem den Blutzuckerspiegel-senkenden Faktor nur um Insulin handeln, auch wenn „Monozyten“-Insulin bisher noch nicht erfolgreich im Immunoblot nachzuweisen war. Dieser Umstand weist möglicherweise darauf hin, dass die Zellen zwar Insulin bilden, doch dass ihre Syntheseleistung aber noch nicht optimal ist.

Die immunhistochemischen Daten dieser Arbeit werden durch weitere Ergebnisse gestützt:

- (1) Mit einem modifizierten Färbeprotokoll wurden die eigenen immunhistochemischen Ergebnisse bestätigt (Abb. A2).
- (2) In frisch isolierten Monozyten (Schmidt, K-R, 2009) und „Tag-1“-Monozyten (Abb. 4.3 und Tab. 4.1) war kein Insulin und C-Peptid nachzuweisen. Dies deutet darauf hin, dass eine *de novo* Insulin-Synthese induziert wurde; möglicherweise durch die Cytokine des X-Mediums.
- (3) Die Kulturmedien des „Kieler Protokolls“ wurden zu keinem Zeitpunkt mit Insulin versetzt. Auch wurde mit einem hochsensitiven ELISA zu keinem Zeitpunkt Insulin in diesen Medien nachgewiesen.
- (4) Wurden dem Medium Insulin zugesetzt, so führte dies tatsächlich zu falsch-positiven Ergebnissen bei den kultivierten Zellen (Fig. 4.12), doch misslang der Nachweis von C-Peptid (4.13-4.15). Ausschließlich die mit dem „Kieler Protokoll“ kultivierten Monozyten waren Insulin- und C-Peptid-positiv (Abb. 4.4).

Von der eigenen Gruppe war bereits untersucht worden, ob das verwendete Serum (Humanserum, fetales Kälberserum) das Färbeergebnis beeinflusst

(Schmidt K-R et al., 2009). Hierzu wurde sich zunutze gemacht, dass der zum Nachweis von C-Peptid verwendete Antikörper C-Pep-01 streng spezies-spezifisch ist und nicht z.B. mit bovinem C-Peptid reagiert. Wäre das Serum die Quelle für exogenes Insulin und C-Peptid gewesen, dann hätte das Färbegergebnis bei Verwendung von fetalem Kälberserum für den C-Peptid-Nachweis negativ ausfallen müssen. Zudem waren Insulin-negative Vergleichszellen (Fibroblasten) unabhängig vom verwendeten Serum immer negativ.

Diese Ergebnisse stützen die immunhistochemischen Daten, dass die mit dem „Kieler Protokoll“ kultivierten Monozyten Insulin exprimieren. Auch bestätigen die Daten, dass der alleinige Nachweis von Insulin ohne den positiven Nachweis von C-Peptid nicht zwangsläufig für *de novo* Insulin spricht, sondern dass die Möglichkeit in Betracht gezogen werden muss, dass es sich hierbei um aus dem Medium aufgenommenes Insulin handelt (Hussain MA et al., 2004).

Die Anforderungen an eine ausdifferenzierte Betazelle sind die Fähigkeit, Insulin zu synthetisieren und zu speichern und adäquat auf veränderte Serumglukosespiegel zur Aufrechterhaltung der Homöostase im Blut zu reagieren (Datt N, 1992). Betazellen sind in Langerhans-Inseln zusammen mit weiteren, Hormon-sezernierenden Zelltypen organisiert: Alphazellen (Glukagon), Deltazellen (Somatostatin) und PP-Zellen (Pankreatisches Polypeptid). Nach Untersuchungen von Pipeleers D et al. (1982) scheint dabei die Gruppierung unterschiedlicher Zellen sowohl Insulingehalt als auch Insulin-Ausschüttung zu beeinflussen. So schütten Betazellen, die in Langerhans-Inseln organisiert sind, 30-mal mehr Insulin auf einen Glukosereiz hin aus als isolierte Betazellen. Die Anordnung der Insulin-positiven Monozyten in einem dreidimensionalen Gerüst (z.B. durch Mikroverkapselung) könnte möglicherweise den Insulingehalt der Zellen beeinflussen.

Die immunhistochemischen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen auch, dass die kultivierten Monozyten ab Kulturtag 11 ebenfalls positiv für Glukagon waren (Tab. 4.1). Dies mag erstaunlich erscheinen, doch belegen Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, dass aus humanen und murinen Stammzellen differenzierte

Zellen neben Insulin auch Glukagon ausschütten (Peck A.B. und Ramiya V., 2004; Seaberg R.M. et al., 2004).

Die Insulinsekretion des Pankreas ist ein fein regulierter Prozess um die Glukosehomöostase prä- und postprandial ständig aufrechterhalten zu können. Insulin hat einen anabolen Effekt und fördert die Aufnahme von Glukose, Aminosäuren und Fettsäuren in die Zelle (Datt N, 1992). Die Transplantation Insulin-produzierender Zellen kann den Plasmaglukosespiegel normalisieren. Monozyten wären aufgrund ihres Differenzierungspotentials (u.a. Neohepatozyten, Neoislets), ihrer hohen Anzahl und der leichten Verfügbarkeit aus dem venösen Blut (autologe Zelltransplantation) hilfreich bei der Entwicklung neuer Behandlungsstrategien. Zwar wurde eine Speicherfunktion von Insulin bei den kultivierten Monozyten in dieser Arbeit nachgewiesen, doch ist vermutlich die Menge des gebildeten „Monozyten-Insulins“ im Vergleich zu einer reifen Inselzelle des Pankreas (gemessen werden konnten zwischen 117 ng bis 5500 ng Insulin/ μ g DNA) zu gering, um den Blutglukosespiegel beim Menschen im Normbereich zu halten (Seaberg RM et al., 2004). Hinzu kommt, dass es sich bei kultivierten Monozyten um eine Mischkultur handelt, bei der ab Tag 11 eine Abnahme der Insulin-positiven Zellen zu beobachten war. Die Insulinproduktion in den Monozyten scheint daher nicht stabil zu sein (Yang L et al., 2002). Ob humane kultivierte Monozyten überhaupt für die systemische Zellersatztherapie eingesetzt werden können, bleibt noch zu klären.

6.3 Embryonale und adulte Stammzellen

Der Mangel an Spender-Pankreata und die steigende Zahl insulinpflichtiger Diabetiker fordert neue Behandlungsstrategien wie die Regeneration Insulin-produzierender Zellen aus pankreatischen Vorläuferzellen oder Stammzellen. Es gibt Hinweise, dass sich Langerhans-Inseln aus duktalem Pankreaszellen differenzieren können, wenn diese bestimmten Bedingungen wie Hyperglykämie und Entzündungen ausgesetzt werden (Martin-Pagola A et al., 2008; Teitelman G et al., 1993). Eine weitere „Quelle“ für Betazellen sind embryonale und adulte Stammzellen, die über ein unbegrenztes Differenzierungspotential verfügen (Kobayashi K et al., 2004).

Bei der Gewinnung embryonaler Stammzellen aus der inneren Zellmasse wird die äußere Zellschicht der Blastozyste, der Trophoblast, eröffnet. Da hierbei die Blastozyste zerstört wird, ist diese Art der Stammzellgewinnung ethisch sehr umstritten. Zwar wird intensiv nach Alternativen gesucht, doch gibt es bisher noch kein Verfahren, mit dem ausreichende Mengen an embryonalen Stammzellen gewonnen werden, ohne dabei die Blastozyste zu zerstören. In Deutschland ist laut dem Embryonenschutzgesetz von 1991 die Erzeugung und Verwendung von Embryonen außerhalb der Herbeiführung einer Schwangerschaft verboten. Die Schutzwürdigkeit des Embryos wird auch in Zukunft Mittelpunkt ethischer Diskussionen sein (www.drze.de).

Auch sollte an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben, dass es nicht nur Probleme bei der effizienten Gewinnung embryonaler Stammzellen gibt, sondern auch bei der kontrollierten Differenzierung dieser Zellen *in vitro*. So muss sichergestellt sein, dass sämtliche Zellen, die auf den Menschen übertragen werden sollen, ausdifferenziert sind, um unkontrolliertes Wachstum und Tumorbildung durch noch so geringe Mengen an mit übertragenden Stammzellen auszuschließen.

Adulte Stammzellen sind, im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen, in ihrer Fähigkeit, sich vielfältig zu differenzieren, zwar eingeschränkt, doch können sie direkt vom Patienten gewonnen werden (www.wipo.int). Adulte Stammzellen werden bereits für Knochenmarktransplantationen nach Strahlentherapien sowie für die Regeneration der Haut aus dermalen Stammzellen in der Klinik eingesetzt. Der Anteil adulter Stammzellen ist mit 1:10 000 im Knochenmark und mit 1:25 000 im peripheren Blut extrem selten.

Eine Alternative zu „nativen“ Stammzellen ist die Induktion von Stammzellen aus somatischen Zellen. So gelang es Takahashi et al. erstmals, die 4 Gene Oct3/4, Klf4, Sox2 und c-Myc zunächst in murine somatische Zellen, später auch in humane Zellen, einzuschleusen und zu exprimieren. Diese „induzierten pluripotenten Stammzellen“ sind in der Lage, sich in Gewebe aller 3 Keimblätter zu differenzieren (Takahashi K et al., 2006). Allerdings kann es bei der gene-

tisch veränderten Empfängerzelle zu unkontrollierten Mutationen kommen. Daher wurde verhindert, dass sich die vier Gene stabil in das Genom der Wirtszelle integrieren. Da die benötigten Gene das Risiko der Krebsentstehung steigern, selektierten die Autoren ausschließlich solche Zellen, die nach einigen Zellteilungen die Plasmide, mit deren Hilfe die Gene in die Zellen geschleust wurden, wieder verloren hatten. Dennoch kann nicht ganz ausgeschlossen werden, dass Plasmid-Reste verbleiben und die Zelle zu unkontrolliertem Wachstum anregen. Weiterhin war die Anzahl der auf diese Weise gewonnen „induzierten pluripotenten Stammzellen“ gering. Aus insgesamt einer Millionen Hautzellen konnten gerade mal 3 bis 6 Zellkolonien gezüchtet werden. In Zukunft müssen die reprogrammierten Zellen auf ihre Fähigkeit, sich in unterschiedliche Gewebe zu differenzieren, getestet werden (Yu J et al., 2009). Neueste Daten zeigen, dass bereits die Proteine der vier Reprogrammierung-Gene, wenn sie in die Zelle eingeschleust werden, eine Reprogrammierung induzieren. Diese Zellen werden als „Protein induzierte pluripotente Stammzellen“ (PiPS) bezeichnet. Bisher konnten aus den PiPS bereits Nerven- und Herzmuskelzellen generiert werden (Zhou H et al., 2009).

7 Ausblick

In dieser Arbeit wurden *in vitro* modifizierte Monozyten nach dem „Kieler Protokoll“ kultiviert.

Von kultivierten Betazellen ist bekannt, dass die Insulinausschüttung durch unterschiedliche Glukosekonzentrationen zu steigern ist. Diese Vorgehensweise sollte auch an den *in vitro* modifizierten Monozyten überprüft werden, um so ihre Insulinausschüttung zu steigern. Hierdurch lassen sich möglicherweise die bisherigen *in vivo* Daten verbessern (Abb. 4.19). Auch der Nachweis von Insulin-spezifischer mRNA und Insulin als Protein im Immunoblot könnte mit diesen Zellen erleichtert werden; bislang scheiterte der Nachweis.

Eine wichtige Beobachtung dieser Arbeit ist, dass die Expression von Insulin in den kultivierten Monozyten nicht stabil ist (Tab. 4.1). Dies beruht möglicherweise darauf, dass die kultivierten Monozyten nur temporär über die Eigenschaft verfügen, Insulin zu bilden. Somit sind die *in vitro* Bedingungen der Monozytenkultur zu optimieren, um sowohl die Insulinexpression zu erhalten als auch ihre Differenzierung zu Makrophagen zu verhindern.

Eine sehr wichtige und spannende Frage ist die nach dem biologischen Sinn, warum Monozyten Insulin produzieren. Möglicherweise fördern sie mit der Insulinausschüttung die lokale Regeneration geschädigter Gewebe. Hierzu sind wahrscheinlich sehr viel geringere Konzentrationen an Insulin notwendig als für die Blutzuckerregulation. Dass Insulin im Wundbereich vorhanden ist, wurde bereits beschrieben (Shearer JD et al., 1997, Robertson JG et al., 1999). Möglicherweise ließen sich die in dieser Arbeit gezüchteten Insulin-positiven Monozyten zur Verbesserung der Wundheilung einsetzen.

8 Zusammenfassung

Monozyten lassen sich *in vitro* nicht nur zu Makrophagen und Dendritischen Zellen differenzieren, sondern auch in eine Vielzahl nicht-phagozytierender Zellen. Monozyten scheinen somit über pluripotente Eigenschaften zu verfügen. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich kultivierte Monozyten tatsächlich in Insulin-exprimierende Zellen differenzieren lassen.

Monozyten von gesunden Spendern im Alter zwischen 20 und 26 Jahren wurden untersucht. Die über eine Leukozytenapherese gewonnenen Monozyten wurden über Adhärenz angereichert und für sechs Tage in X-Medium mit den Cytokinen M-CSF und IL-3 und für weitere 15 Tage in Y-Medium mit den Cytokinen HGF und EGF inkubiert. Die Zellen wurden immunhistochemisch und funktionell untersucht.

Frisch isolierte Blutmonozyten waren vor ihrer Kultivierung negativ für Insulin, C-Peptid und Glukagon. Am 4. Kulturtag wurden Insulin und C-Peptid in den kultivierten Monozyten nachgewiesen. Die Expression von Insulin war jedoch nicht stabil: während am Tag 11 der Anteil Insulin-positiver Zellen bei ca. 80% lag, waren am Tag 14 nur noch ca. 30% der kultivierten Zellen Insulin-positiv. Dies wurde ebenfalls für den Nachweis von C-Peptid beobachtet. Auch die Expression von Glukagon war nicht stabil. Diese Beobachtung wird darauf zurückgeführt, dass sich die Monozyten zu Makrophagen differenzierten und diese eindeutig kein Insulin produzieren.

Da Zellen Insulin aufnehmen und speichern können, sollte in dieser Arbeit die Frage geklärt werden, ob immunhistochemisch zu unterscheiden ist, ob Zellen Insulin gebildet (*de novo* Insulin) oder unspezifisch aufgenommen haben. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass zum eindeutigen Nachweis von *de novo* Insulin der Nachweis von C-Peptid unbedingt zu fordern ist. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit aufgereinigtem Insulin belegen, dass für aufgenommenes Insulin – im Gegensatz zu *de novo* Insulin – C-Peptid immunhistochemisch nicht nachzuweisen ist.

Das aus *in vitro* kultivierten Monozyten isolierte Insulin war in diabetischen Mäusen biologisch aktiv, d.h. es senkte den Blutzuckerspiegel kurzfristig. Hierzu wurden geerntete Monozyten der Kulturtage 6-12 im Ultraschallbad aufgeschlossen und der zellfreie Überstand diabetischen Mäusen injiziert. Insgesamt senkten 11 der 31 (35,5%) in dieser Arbeit getesteten Überstände den Blutzuckerspiegel dieser Tiere um mehr als 15%. Bezogen auf die 18 Proben, die einen Effekt zeigten, sind dies sogar 61%.

In dieser Arbeit wurde somit erfolgreich gezeigt, dass *in vitro* modifizierte Monozyten Insulin exprimieren, das den Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse senkt.

9 Literaturverzeichnis

- Abraham EJ, Leech CA, Lin JC, Zulewski H, Habener JF. **Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 differentiation of human pancreatic islet-derived progenitor cells into insulin-producing cells.** *Endocrinology* 2002; **143**: 3152-3161.
- Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M. **Insulin production by human embryonic stem cells.** *Diabetes* 2001; **50**, 1691-1697.
- Bretzel RG, Brandhorst D, Brandhorst H, Eckhard M, Ernst W, Friemann S, Rau W, Weimar B, Rauber K, Hering BJ, Brendel MD. **Improved survival of intraportal pancreatic islet cell allografts in patients with type-1 diabetes mellitus by refined peritransplant management.** *Journal of Molecular Medicine* 1999; **77**(1): 140-143.
- Datt N. **Insulin Pharmacotherapy.** *Journal of Pharmacy Practice* 1992; **5**(5): 260-270.
- Eurotransplant. **Jahresbericht 2006 Dynamics of the Eurotransplant pancreas + kidney and islet + kidney waitinglist, pancreas + kidney, islet + kidney, pancreas and islet-only transplants between 1991 and 2006.** <http://www.eurotransplant.nl/?id=jahresbericht> (aufgerufen: 15.05.2009)
- Hao E, Tyrberg B, Itkin-Ansari P, Lakey JR, Geron I, Monosov EZ, Barcova M, Mercola M, Levine F. **Beta-cell differentiation from nonendocrine epithelial cells of the adult human pancreas.** *Nat Med* 2006; **12**: 310-316.
- Herbst AS. **Charakterisierung *in vitro* modifizierter humaner peripherer Blutmonozyten: Immunhistochemisch-morphologische Charakterisierung und funktioneller Nachweis von Insulin.** Inaugural-Dissertation der Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg. 2008
- Hussain MA, Theise ND. **Stem-cell therapy for diabetes mellitus.** *Lancet* 2004; **346**: 203-205.
- Kerner W, Brückel J, Böhm BO. **Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus.** Aktualisierte Version auf den Webseiten der DDG. www.deutsche-gesellschaft-diabetes.de (aufgerufen am 12.03.2009).
- Kobayashi K, Kobayashi N, Okitsu T, Yong C, Fukazawa T, Ikeda H, Kosaka Y, Narushima M, Arata T, Tanaka N. **Development of a Porcine Model of Type 1 Diabetes by Total Pancreatectomy and Establishment of a Glucose Tolerance Evaluation Method.** *Artificial Organs* 2004; **28**(11): 1035-1042.
- Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazzer S, Young H, Richardson M, Smart NG, Cunningham J, Agulnick AD, D'Amour KA, Carpenter MK, Baetge E. **Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells *in vivo*.** *Nature Biotechnology* 2008; **26**(4): 443-452.

- Lacroix S, Feinstein D, Rivest S. **The bacterial endotoxin lipopolysaccharide has the ability to target the brain in upregulating its membrane CD14 receptor within specific cellular populations.** *Brain Pathology* 1998; **8**(4): 625-640.
- Martin-Pagola A, Sisino G, Allende G, Dominguez-Bendala J, Gianani R, Reijonen H, Nepom GT, Ricordi C, Ruiz P, Sageshima J, Ciancio G, Burke GW, Pugliese A. **Insulin protein and proliferation in ductal cells in the transplanted pancreas of patients with type 1 diabetes and recurrence of autoimmunity.** *Diabetologia* 2008; **51**(10): 1803-1813.
- Nathan M, Cleary P, Backlund J, Genuth S, Lachin J, Orchard T, Raskin P, Zinman B. **Intensive Diabetes Treatment and Cardiovascular Disease in Patients with Typ 1 Diabetes.** *N Engl J Med* 2005; **353**: 2643-2653.
- Otto C, Moskalenko V, Ulrichs K. **Transplantationsimmunologische Forschung im Kleintier: Perspektiven für die klinische Praxis.** In: *Chirurgische Forschung* (Hrg. M. G. Krukemeyer, H. U. Spiegel,) Thieme Verlag 2005: 349-367 (ISBN 978-3-13-133661-3).
- Peck A.B. and Ramiya V. **In vitro-generation of surrogate islets from adult stem cells.** *Transpl Immunol* 2004; **12**, 259-272.
- Pipeleers D, In't Veld P, Maes E, Van de Winkel M. **Glucose-induced insulin release depends on functional cooperation between islet cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; **79**: 7322-7325.
- Rajagopal J, Anderson WJ, Kume S, Martinez OI, Melton DA. **Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake.** *Science* 2003; **299**: 363.
- Robertson JG, Belford DA, Ballard FJ. **Clearance of IGFs and insulin from wounds: effect of IGF-binding protein interactions.** *American Physiological Society* 1999; **99**: 663-671.
- Rutherford MS, Witsell A, Schook LB. **Mechanisms generating functionally heterogeneous macrophages: chaos revisited.** *J Leukoc Biol* 1993; **53**(5): 602-618.
- Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, Lakey J, Shapiro J. **Five-Year Follow-Up After Clinical Islet Transplantation.** *Diabetes* 2005; **54**(7): 2060- 2069.
- Santana A, Enseñat-Waser R, Arribas MI, Reig JA, Roche E. **Insulin-producing cells derived from stem cells: recent progress and future directions.** *J Cell Mol Med* 2006; **10**(4): 866-883.
- Scharp DW, Lacy PE, Santiago JV, McCullough CS, Weide LG, Falqui L, Marchetti P, Gingerich RL, Jaffe AS, Cryer PE. **Insulin independence after islet transplantation into type I diabetic patient.** *Diabetes* 1990; **39**(4): 515-518.

- Schmidt KR. **Charakterisierung *in vitro* modifizierter humaner Blutmonozyten: Überprüfung der Kultivierungsbedingungen und funktioneller Nachweis von Insulin.** Inaugural-Dissertation der Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg. 2009.
- Seaberg RM, Smukler SR, Kieffer TJ, Enikolopov G, Asghar Z, Wheeler MB, Korbitt G, van der Kooy D. **Clonal identification of multipotential precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages.** *Nature Biotechnology* 2004; **22**: 1115-1124.
- Seta N, Kuwana M. **Human circulating monocytes as multipotential progenitors.** *Keio J Med* 2007; **56**(2): 41-47.
- Shearer JD, Coulter CF, England WC, Roth RA, Caldwell MD. **Insulin is degraded extracellularly in wounds by insulin-degrading enzyme.** *American Physiological Society* 1997; **97**: 657-664.
- Soria B, Roche E, Berna G, Leon-Quinto T, Reig JA, Martin F. **Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice.** *Diabetes* 2000; **49**: 157-162.
- Takahashi K, Yamanaka S. **Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors.** *Cell* 2006; **126**: 663-676.
- Teitelman G, Alpert S, Polak JM, Martinez A, Hanahan D. **Precursor cells of mouse endocrine pancreas coexpress insulin, glucagon, and the neuronal proteins tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y, but not pancreatic polypeptide.** *Development* 1993; **118**(4): 1031-1039.
- Valledor AF, Borràs FE, Cullell-Young M, Celada A. **Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation.** *J Leukoc Biol* 1998; **63**(4): 405-417.
- Waldo SW, Li Y, Buono C, Zhao B, Billings EM, Chang J, Kruth HS. **Heterogeneity of Human Macrophages in Culture and in Atherosclerotic Plaques.** *American Journal of Pathology* 2008; **172**: 1112-1126.
- Wang SY, Mak KL, Chen LY, Chou MP, Ho CK. **Heterogeneity of human blood monocyte: two subpopulations with different sizes, phenotypes and functions.** *Immunology* 1992; **77**: 298-303.
- Witzigmann H, Uhlmann D, Hauss J. **Aktueller Stand der Pankreas- und Inseltransplantation.** *Nieren- und Hochdruckkrankheiten* 2005; 336-342.
- Wullstein C, Woeste G, Taheri AS, Dette K, Bechstein WO. **Morbidity following simultaneous pancreas/kidney transplantation.** *Chirurg* 2003; **74**(7): 652-656.

- Yang L, Li S, Hatch H, Ahrens K, Cornelius JG, Petersen BE, Peck AB. **In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells.** *Proc Nat Acad Sci USA* 2002; **99**(12): 8078-8083.
- Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin I, Thomson JA. **Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences.** *Science Express* 2009; **324**: 797-801.
- Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. **Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences.** *Science* 2009 [Epub ahead of print]
- Zhao Y, Glesne D, Huberman E. **A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**(5): 2426-2431.
- Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Schöler HR, Duan L, Ding S. **Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins.** *Cell Stem Cell* 2009; **4**(5): 381-384.

Webseiten

www.biospectrum-asia.com

www.diabetes-news.de

www.diabsite.de

www.drze.de

www.iwf.de

www.neue-mediz.in

www.wipo.int

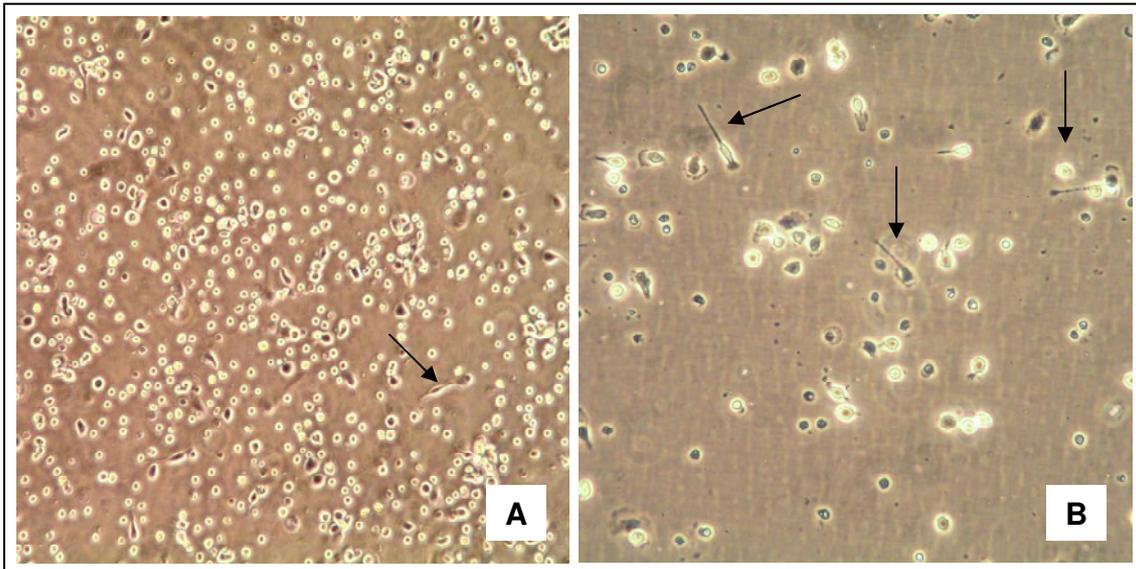


Abb. A1: Morphologie kultivierter humaner Monozyten. Bereits am 2. Kulturtag waren unterschiedliche Zellformen zu beobachten. Die Teilabbildungen A (200x) und B (400x) zeigen fibroblastoide Zellen (Pfeil), also Monozyten mit langgestreckten Zellkörpern (mobile Zellstadien). Daneben sind kleine runde Zellen (adhärente Vorstufen von Makrophagen) zu erkennen. Phasenkontrastaufnahmen (200x).

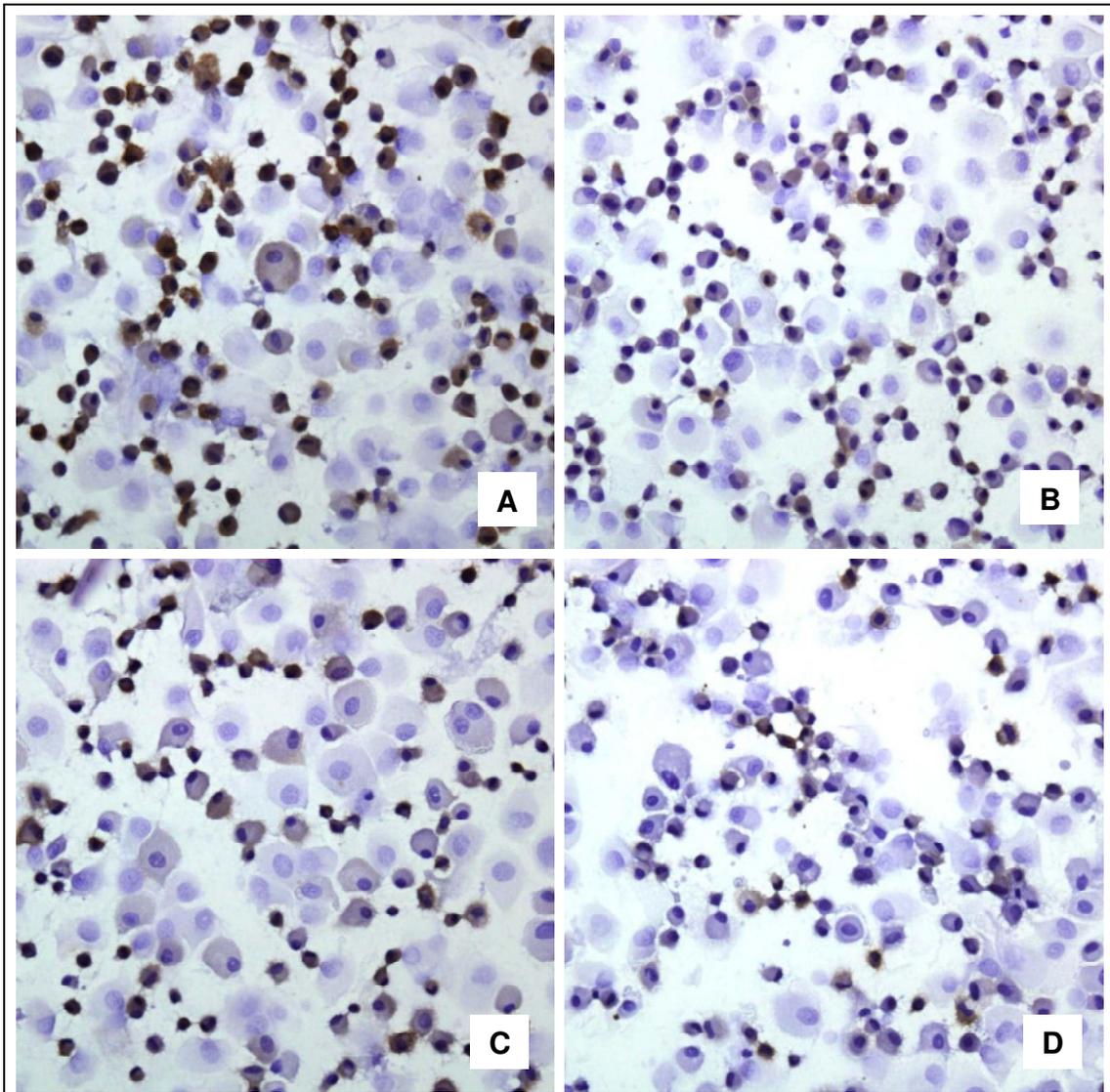


Abb. A2: Mit dem Färbeprotokoll der Universitätsfrauenklinik wurden ebenfalls „Tag-11-Monozyten“ untersucht und auch sie waren positiv für Insulin (A), C-Peptid (B), Glukagon (C) und CD14 (D). Zur Anfärbung intrazellulärer Marker wurden die Zellen mit Triton X-100 permeabilisiert. Die Ergebnisse mit diesem Protokoll unterscheiden sich nicht von den hier präsentierten Daten (Abb. 4.3-4.7 und Abb. A2 im Anhang). Die Überprüfung des eigenen Färbeprotokolls stellt sicher, dass die hier präsentierten Daten ebenfalls mit anderen Färbeprotokollen reproduziert werden können. Dies ist ein Indiz dafür, dass die mit dem „Kieler Protokoll“ kultivierten Monozyten tatsächlich Insulin und Glukagon exprimieren.

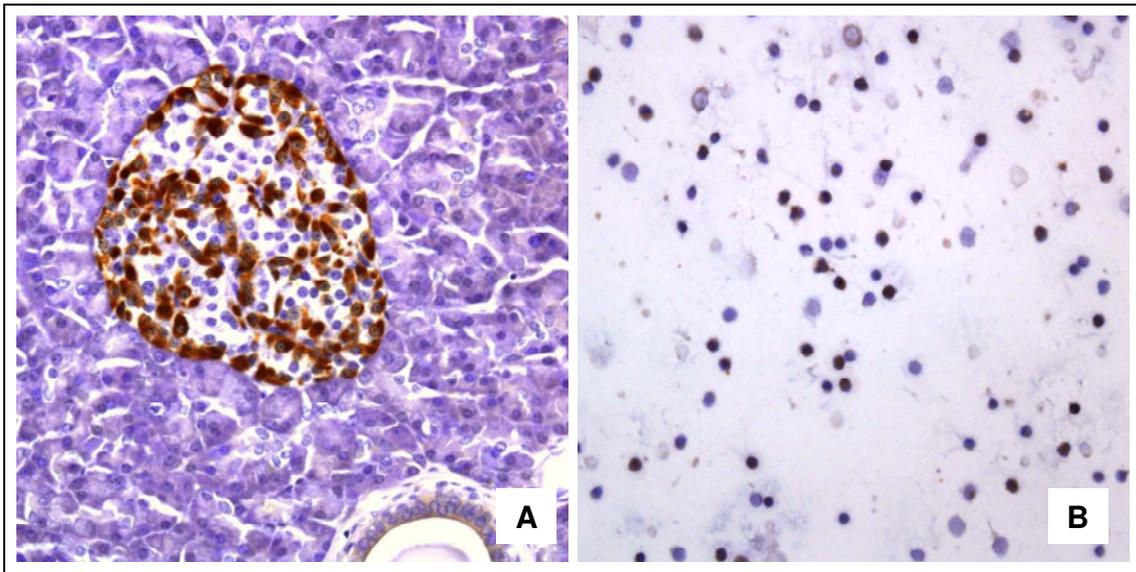


Abb. A3: Der polyklonale anti-Glukagon Antikörper V2025 in der Verdünnung 1:200 erkennt Glukagon in humanem Pankreasgewebe (A) und „Tag-0-Monozyten“ (B). Die Monozyten und die Inselzellen erwiesen sich als Glukagon-positiv. Optimale Ergebnisse wurden mit einer Antikörperverdünnung von 1:800 erzielt (siehe Abb. 4.10). Bei dieser Konzentration sind einzelne Inselzellen deutlich Glukagon-positiv. Dem gegenüber waren „Tag-0-Monozyten“ Glukagon-negativ.

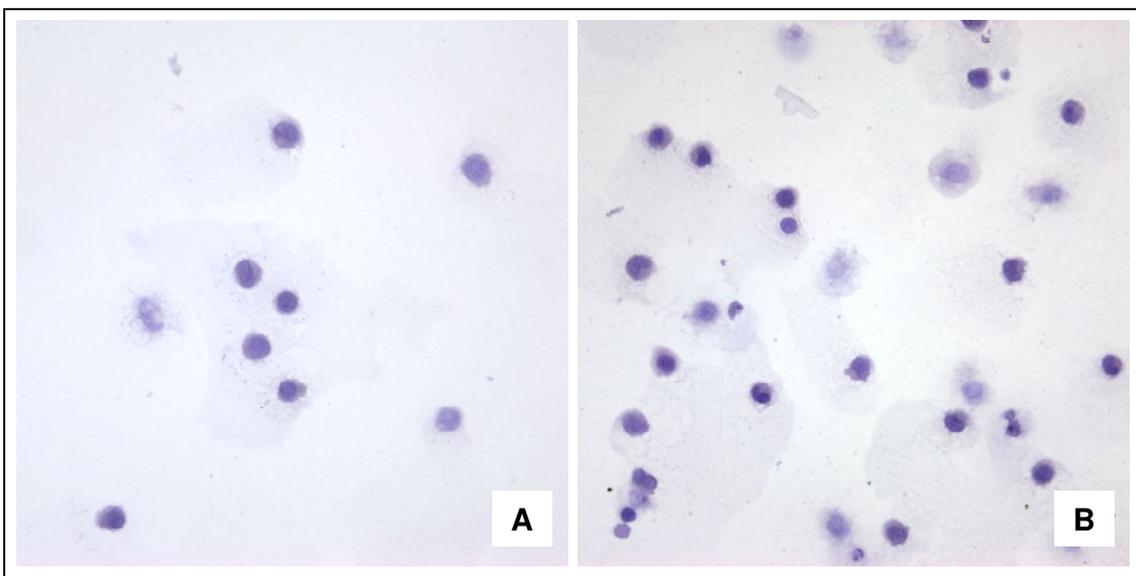


Abb. A4: Nachweis Insulin-positiver Monozyten nach Inkubation mit Insulin (siehe auch Abb. 4.12). Die Negativkontrollen (Kontrolle des Sekundärantikörpers) acetonfixierter „Tag-2-Monozyten“ erwiesen sich mit (A) und ohne (B) Insulininkubation als negativ. Hierdurch kann eine Kreuzreaktivität des Sekundärantikörpers ausgeschlossen werden.

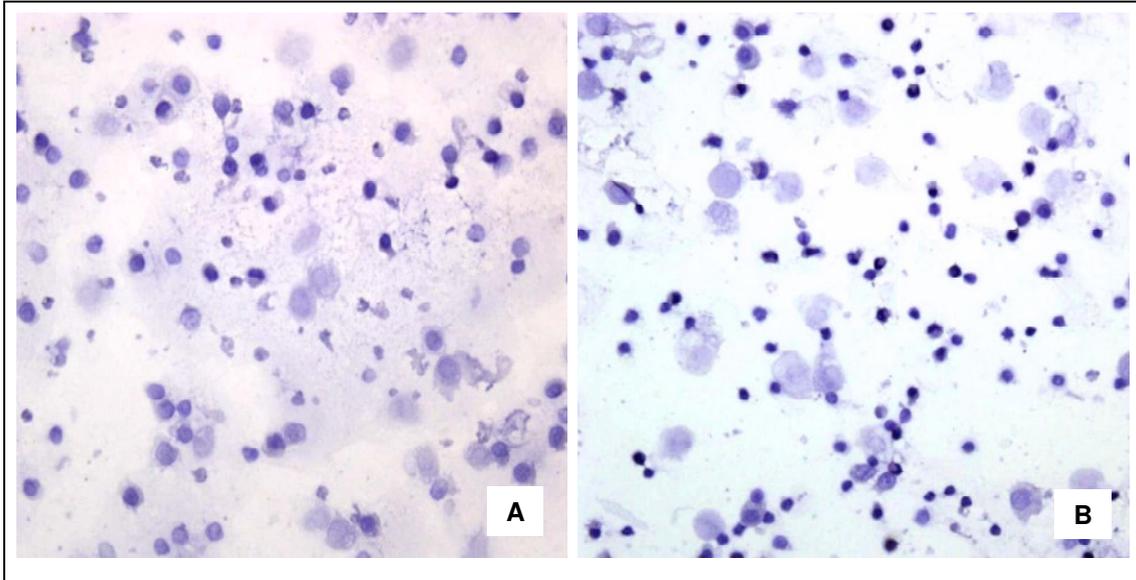


Abb. A5: Mit exogenem Insulin inkubierte Negativkontrollen acetonfixierter Monozyten (*A*) und kultivierter Monozyten (*B*) waren negativ. Eine mögliche Kreuzreaktivität des Sekundärantikörpers konnte ausgeschlossen werden. (Ergänzung zu Abb. 4.13).

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Experimentellen Transplantations-Immunologie der Chirurgischen Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie (Chirurgische Klinik I) des Universitätsklinikums Würzburg unter der Anleitung von Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. Christoph Otto durchgeführt.

Herrn Professor Dr. med. C-T Germer, Direktor der Chirurgischen Klinik I, möchte ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und die finanzielle Unterstützung der Arbeit herzlich danken.

Frau Professor Dr. rer. nat. K. Ulrichs, Leiterin der Transplantationsimmunologie der Chirurgischen Universitätsklinik in Würzburg, möchte ich für die vielfältige Unterstützung meiner Arbeit danken.

Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. C. Otto danke ich sehr herzlich für die engagierte Unterstützung bei den Experimenten und beim Abfassen der Arbeit. Außerdem danke ich Ihm dafür, dass er mir Raum für eigene Ideen gelassen hat. Die vielen inspirierenden Diskussionen haben einen bleibenden Eindruck hinterlassen und meine Begeisterung für die medizinische Forschung dauerhaft geweckt.

Frau M. Schneider, Medizinisch-Technische Assistentin, danke ich besonders für die intensive Einarbeitung in die verschiedenen Methoden. Außerdem bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Gewinnung der *in vivo* Daten. Frau M. Schneider, Frau M. Koospal und Frau B. Schneicker haben mit ihrer freundlichen Art entscheidend zum positiven Arbeitsklima im Labor beigetragen. Erst in diesem Umfeld konnte die Arbeit gelingen.

Lebenslauf

Carolin Steinack

Geboren am 16.09.1984 in Würzburg

Schulbildung

09/1991 – 07/1995
09/1995 – 06/2004
Grundschule Kirchheim
Mozart-Schönborn-Gymnasium Würzburg; Abschluss Abitur

Studium

10/2004 – 09/2006
10/2006 – dato
Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Vorklinischer Abschnitt; Physikum im Sommer 2006
Klinischer Abschnitt

Famulaturen

02/2007 – 03/2007
03/2007 – 04/2007
08/2007 – 10/2007
03/2008 – 04/2008
08/2008 – 09/2008
03/2009 – 04/2009
Abteilung für Orthopädie, Unfall- und Wiederherstellungs-
chirurgie des Juliusspitals Würzburg
Klinik und Poliklinik der Gastroenterologie und Endokrinologie
des Universitätsklinikums Münster
Klinik für Nephrologie und Endokrinologie am Campus Benjamin
Franklin Charité Berlin
Laborfamulatur im Rahmen der Promotion in der Experimen-
tellen Chirurgie der Klinik und Poliklinik für Allgemein-,
Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie Universitätsklinikum
Würzburg
Allgemein- und Viszeralchirurgie in der Klinik und Poliklinik für
Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie
Universitätsklinikum Würzburg
Abteilung für Neurochirurgie im Zentrum für Unfall-, Wieder-
herstellungs- und Neurochirurgie St. Georg-Hospital Hamburg

Praktisches Jahr

1. Tertial
2. Tertial
3. Tertial
Klinik für Viszeral-, Thorax-, Gefäßchirurgie und Traumatologie
des Kantonsspitals Aarau
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin des Universitätsspitals
Zürich
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie des Universitäts-
klinikums Würzburg

Fortbildungen

28.04.2009 -
01.05.2009
27.05.2009
20.04.2010 -
23.04.2010
126. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie in
München
Neue Therapieansätze Plasmozytom in Hagen
127. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie in
Berlin

Würzburg, den 26.11.2010

Carolin Steinack