

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg

Chirurgische Klinik I

Direktor: Professor Dr. med. C.-T. Germer

**Charakterisierung *in vitro* modifizierter humaner
Blutmonozyten: Überprüfung von Kulturbedingungen
und funktioneller Nachweis von Insulin**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Kay-Renke Meinard Werner Schmidt

aus Alsfeld

Würzburg, Juni 2009

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

Tag der mündlichen Prüfung:

16. September 2009

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Diabetes mellitus Typ I	1
1.2	Therapie des Diabetes mellitus Typ I	4
1.3	Zielsetzung	7
2	Fragestellung	9
3	Material und Methoden	10
3.1	Puffer-Lösungen	10
3.2	Gewinnung humaner Blutmonozyten	10
3.3	Kultur humaner Blutmonozyten	13
3.4	Zellernte und Bestimmung der Zellvitalität	13
3.5	Kultivierung humaner Monozyten auf Deckgläschen	15
3.6	Nachweis von Insulin mit Dithizon	15
3.7	Immunhistochemische Färbungen	16
3.8	Versuchstiere	18
3.9	Induktion von Hyperglykämie	18
3.10	<i>In vivo</i> Testung von „Monozyten“-Insulin	19
3.11	Auswertung von Cytospin-Präparaten	20
3.12	Statistische Auswertung	20
4	Ergebnisse	21
4.1	Charakterisierung <i>in vitro</i> modifizierter Monozyten	21
4.2	Einfluss der Kulturbedingungen auf die Ausbeute <i>in vitro</i> modifizierter Monozyten	31
4.3	Nachweis der biologischen Aktivität von „Monozyten“-Insulin	36
4.4	Funktionsnachweis <i>in vitro</i> modifizierter Monozyten	42
5	Beantwortung der Fragen	49
6	Diskussion	51
6.1	Anforderungen an die „ideale“ Insulin-produzierende Zelle	52
6.2	Technische Anforderungen zum sicheren Nachweis Insulin-positiver Zellen	53
6.3	Kultivierte Monozyten entwickeln sich mit den Cytokinen des „Kieler-Protokolls“ zu Insulin-positiven Monozyten	54
6.4	Funktion <i>in vitro</i> modifizierter, Insulin-positiver Monozyten <i>in vivo</i>	56
7	Ausblick	59

8	Zusammenfassung	61
9	Abbildungsverzeichnis.....	63
10	Literaturverzeichnis	64
11	Anhang	69
	Danksagung	
	Lebenslauf	

Abkürzungsverzeichnis

Aph	Apherese
AS	Aminosäure
DAB	3,3 Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTZ	Dithizon
EGF	Epidermal growth factor
FCS	Fetal calf serum
FDA	Fluoresceindiacetat
HGF	Hepatocyte growth factor
HS	Humanserum
IE	Internationale Einheit
IEQ	Langerhans-Inselequivalente
IL-3	Interleukin-3
M-CSF	Monocyte-colony stimulating factor
MHC	Major histocompatibility complex
n	Anzahl
PBL	Periphere Blutleukozyten
PBS	Phosphate buffered saline
PI	Propidiumiodid

1 Einleitung

Diabetes mellitus ist eine chronische Stoffwechselkrankheit, die durch das Missverhältnis von Glukoseangebot und Insulinsekretion charakterisiert ist. Nach der Definition der *Deutschen Diabetes Gesellschaft* spricht man von einem Diabetes mellitus, wenn die Plasmaglukose-Konzentration einer nicht nüchternen Person über 200 mg/dL (dies entspricht 11,1 mmol/L) liegt. Seit 1998 unterscheidet die Weltgesundheitsorganisation WHO vier verschiedene Formen des Diabetes (Kerner W et al., 2004 „www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de“/Evidenzbasierte Leitlinien/Definition). Der Diabetes mellitus Typ I beruht auf der immunologischen Zerstörung der für die Insulinproduktion verantwortlichen Betazellen. Diese sind im Pankreas in den Langerhans-Inseln zu finden. An dieser Form des Diabetes sind allein in Deutschland ca. 300.000 Menschen (2001) erkrankt (Hauner H et al., 2003).

1.1 Diabetes mellitus Typ I

Am Typ I Diabetes sind zwar nur ca. 5 bis 10 Prozent der Diabetiker erkrankt, doch sind sehr häufig Kinder betroffen – allein in Europa ca. 90.000 (*International Diabetes Federation*, 2003). Zudem steigt die Inzidenz (Neuerkrankungsrate) jedes Jahr um ca. 3 Prozent (Eurodiab Ace Study Group, 2000). Vom Diabetes mellitus Typ I werden zwei weitere Untergruppen unterschieden: Typ I_A – ausgelöst durch die autoimmunologische Zerstörung der Langerhans-Inseln des Pankreas – und Typ I_B, der idiopathisch zumeist bei Afrikanern und Asiaten auftritt.

In mehr als 90 Prozent der Fälle ist die Ursache für Diabetes mellitus Typ I (Typ I_A) eine genetische Prädisposition (Eisenbarth GS, 1986), die am häufigsten auf Chromosom 6 in einem Abschnitt zu finden ist, der zum Bereich des Haupt-histokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex* oder MHC) gehört (Todd JA und Bain SC, 1992). Hier befinden sich die Gene für MHC-Klasse-I und Klasse-II Moleküle, die eine wichtige Rolle bei der Antigenpräsentation und der Aktivierung von CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Lymphozyten spielen. Wegen ihrer zentralen Bedeutung bei der Immunantwort führen Aberrationen in den

MHC-Genen häufig zu Autoimmunerkrankungen (Dalton TA und Bennett JC, 1992). Eine Prädisposition für Diabetes mellitus Typ I bedeutet aber nicht, hieran auch zu erkranken. Erst in Kombination mit verschiedensten Umweltfaktoren kommt es zur Zerstörung der Betazellen. Als mögliche Faktoren werden Infektionen während der Schwangerschaft mit Rötel- oder Enteroviren (Forrest JM et al., 1971; Yoon JW et al., 1979) diskutiert. Aber auch Nahrungsmittel (Harrison LC und Honeyman MC, 1999) oder Toxine (Åkerblom HK et al., 2002) können die Autoimmunerkrankung auslösen.

Mononukleäre Immunzellen infiltrieren die Langerhans-Inseln des Pankreas („Insulinitis“) und zerstören die Insulin-produzierenden Betazellen. Das Zusammenspiel von Makrophagen, T- und B-Lymphozyten wird für diese Zerstörung verantwortlich gemacht (Yoon JW et al., 1998). Im Verlauf der Krankheit sind autoreaktive Antikörper, so genannte Inselzell-Autoantikörper (*Islet cell autoantibodies* oder ICA) nachzuweisen, die gegen Insulin (Insulinautoantikörper oder IAA), Glutaminsäuredecarboxylase (GADA) oder Thyrosinphosphatase (IA-2A) gerichtet sein können und die Zerstörung der Langerhans-Inseln beschleunigen (Seissler J und Scherbaum WA, 2006). Sind ca. 80% der Insulin-produzierenden Zellen zerstört, manifestiert sich die Erkrankung mit einem absoluten Insulinmangel.

In der Regel wird beim Typ I Diabetes das fehlende Insulin dem Körper von außen durch Injektionen zugeführt. Ein wesentlicher Nachteil dieser Insulinerersatztherapie sind die schwer zu kontrollierenden hypoglykämischen Phasen (*The Diabetes Control and Complications Trial Research Group*, 1993). Diese Episoden der „Unterzuckerung“ können gravierende und sogar tödliche Folgen für den Diabetiker haben. Auch eine Verschlechterung der kognitiven Funktionen nach wiederkehrenden Hypoglykämien wird diskutiert (Fanelli CG et al., 1998). Nach Untersuchungen der *Diabetes Control and Complications Trial Research Group* kommt es auch bei guter Insulineinstellung zu 20 bis 60 hypoglykämischen Episoden pro 100 Patientenjahre (*The Diabetes Control and Complications Trial Research Group*, 1997). Eine weitere gefürchtete akute

Komplikation der Hypoglykämie ist das ketoazidotische Koma ($\text{pH} < 7,3$; Bicarbonat $< 15 \text{ mmol/L}$) mit einer Letalität von bis zu 5 Prozent (Umpierrez GE und Kitabchi AE, 2003). Auf Grund des absoluten Insulinmangels wird die Lipolyse in der Körperperipherie nicht verhindert, und in der Leber werden Fettsäuren zu Ketonkörpern oxidiert. Dies führt zur metabolischen Azidose, einer stoffwechselbedingten Übersäuerung des Blutes.

Auch wenn die Insulinersatztherapie ständig optimiert wird, z.B. durch neue Insulinpräparate, so ist doch eine physiologische Blutzuckerregulation kaum zu erreichen und Phasen der Hyper- aber auch Hypoglykämie sind nicht immer vermeidbar. Zu den langfristigen Komplikationen der chronischen Hyperglykämie gehören mikro- und makrovaskuläre Gefäßerkrankungen. Die Pathophysiologie hierzu wird wie folgt erklärt: Hohe Blutzuckerspiegel führen dazu, dass extrazelluläre Proteine der Basalmembran in hohem Maße glykosyliert, d.h. mit Zuckerketten versehen werden, was die Eigenschaft dieser Proteine beeinflussen kann. Zudem werden freie Radikale gebildet, die besonders reaktionsfreudig sind und das Endothel langfristig schädigen. Vom Endothel ausgeschüttete Wachstumsfaktoren lösen die Proliferation von Muskelzellen in der Media aus, die anschließend in die Intima einwandern. Die zusätzliche Einlagerung von Fett führt über kurz oder lang zur Plaquebildung und im fortgeschrittenen Stadium zur Arteriosklerose (Basta G et al., 2004).

Bei Diabetikern ist die diabetische Nephropathie der häufigste Grund für ein Nierenversagen. Das absolute Nierenversagen tritt bei unter 20-jährigen Diabetikern zu 2,2 Prozent und bei unter 30-jährigen zu 7,7 Prozent auf (Finne P et al., 2005). Eine weitere mikrovaskuläre Komplikation, die diabetische Retinopathie, ist für 30 Prozent der erworbenen Erblindung in der westlichen Welt verantwortlich (Fong DS et al., 2004). Die diabetische Neuropathie, von der ca. ein Viertel der Typ I Diabetiker betroffen ist, geht mit sensomotorischen Ausfällen an den Extremitäten und nachfolgenden Wundheilungsstörungen („diabetischer Fuß“), sowie gastrointestinalen und erektilen Dysfunktionen einher (Tesfaye S et al., 2005). Das relative Risiko eines Diabetikers für

kardiovaskuläre Erkrankungen ist gegenüber der Normalbevölkerung um das dreifache erhöht (Stamler J et al., 1993). Die Diagnose Diabetes mellitus Typ I bedeutet heute zwar kein Todesurteil mehr, doch ist die durchschnittliche Lebenserwartung eines Diabetikers immer noch um fast 19 Lebensjahre verkürzt (Narayan KMV et al., 2003).

1.2 Therapie des Diabetes mellitus Typ I

Die Entdeckung des Insulins durch Frederick Banting und Charles Best (Banting FG und Best CH, 1922) im Jahr 1922 bildete die Grundlage für die Insulinersatztherapie^{*)}. Hierdurch verbesserten sich die Lebensumstände von Diabetikern ungemein, auch wenn diese Therapie nicht zur Heilung führt. Auch sei an dieser Stelle nochmals an die im Abschnitt 1.1 aufgeführten Folgeerkrankungen erinnert, die darauf zurückzuführen sind, dass die Insulinersatztherapie den Blutzuckerspiegel nicht physiologisch reguliert.

Zurzeit werden klinisch zwei Formen des Betazell-Ersatzes durchgeführt: die Transplantation des gesamten Pankreas (*American Diabetes Association*, 2004) und isolierter Langerhans-Inseln^{**)}, die so genannte Inselzelltransplantation. Bei den Langerhans-Inseln handelt es sich um kompakte und abgegrenzte Zellverbände mit einem Durchmesser von 50 bis 500 µm. Während die Pankreastransplantation eine große chirurgische Bauchoperation darstellt, werden die Langerhans-Inseln lediglich endoskopisch in den Patienten eingebracht. Von Nachteil ist, dass, um ausreichende Mengen von Langerhans-Inseln für eine Transplantation zu erhalten, mehrere Pankreata aufgearbeitet werden müssen (Scharp DW et al., 1999).

Die Überlebensrate von Pankreastransplantaten hat sich in den letzten Jahren erheblich verbessert und liegt aktuell bei ca. 80 Prozent ein Jahr nach Trans-

^{*)} Für die Entdeckung des Insulin wurde 1923 der Nobelpreis für Physiologie und Medizin an Frederick Grant Banting und John James Richard Mcleod verliehen (www.nobelprize.org).

^{**)} Paul Langerhans, Doktorand bei Rudolf Virchow, beschrieb in seiner Dissertationsschrift 1869 erstmals eigenartige, in die Bauchspeicheldrüse eingestreute "Zellhaufen". Dabei hatte er aber keinerlei Vorstellungen von der Funktion dieser später nach ihm benannten Langerhans-Inseln.

plantation (Sutherland DE et al., 2001). Mit Einführung des „Edmonton Protokolls“ verbesserte sich auch die Überlebensrate transplantierte Langerhans-Inseln: Nach einem Jahr hatten noch über 96 Prozent der Patienten ein funktionierendes Transplantat und nach 3 Jahren über 80 Prozent (Shapiro AM et al., 2000). Bei ihnen ist C-Peptid im Serum zu finden, was auf die Aktivität der Zelltransplantate zurückgeführt wird. Jedoch können nur 10 Prozent der Patienten auf zusätzliche, exogene Insulininjektionen verzichten (Ryan EA et al., 2005).

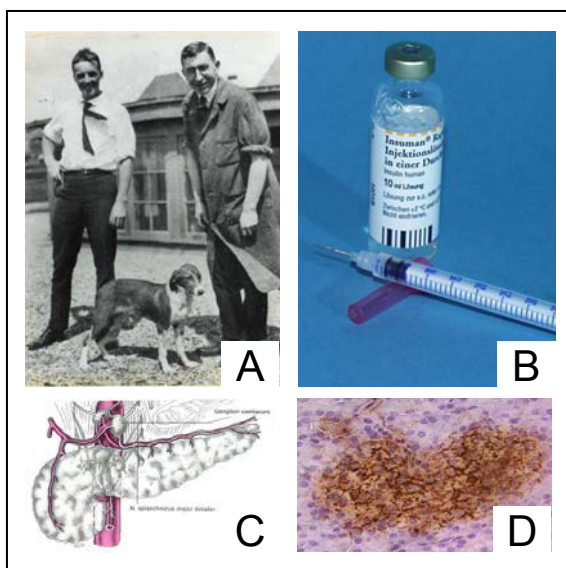


Abb. 1.1: Möglichkeiten der Therapie des Typ I Diabetes mellitus. Seit der Entdeckung des Insulins durch F. Banting und C. Best (A) werden Patienten mit tierischem Insulin behandelt (B). Heutzutage wird in aller Regel gentechnologisch hergestelltes Humaninsulin verwendet. Alternativ zur Insulinersatztherapie stehen zudem die Pankreas- und Inselzelltransplantation (C) und die Inselzelltransplantation (D) zur Verfügung. Beide Verfahren sind jedoch nur für bestimmte Patientengruppen vorgesehen (s. auch Text).

Auch eine internationale Studie mit deutscher Beteiligung, veröffentlicht im *New England Journal of Medicine*, belegt, dass die Inselzelltransplantation Diabetes auf Dauer zwar nicht heilt, doch ließ sich der Insulinbedarf bei 26 von 36 Patienten (dies entspricht 72 Prozent) deutlich senken. Da das primäre Therapieziel der Inselzelltransplantation, die Heilung des Diabetes mellitus, derzeit nicht zu erreichen ist, gibt es Überlegungen, das Therapieziel dahingehend zu ändern, um mit der Inselzelltransplantation zumindest die gefährlichen hypoglykämischen Episoden zu vermeiden (Shapiro AM et al., 2006).

Der allgemeine Mangel an humanen Spenderorganen bringt es mit sich, dass beide Verfahren, die Pankreas- und Inselzelltransplantation, nur für bestimmte

Personen vorgesehen ist; hierzu gehören zum Beispiel dialysepflichtige Diabetiker. Im Jahr 2006 erhielten im Raum von Eurotransplant – der Vermittlungsstelle für Organspenden in den Benelux-Ländern, Deutschland, Österreich, Slowenien und Kroatien – 226 Patienten ein Pankreastransplantat und 5 Patienten humane Langerhans-Inseln (www.eurotransplant.nl). Die Transplantatempfänger müssen, da sie durch beide Verfahren mit Fremdproteinen in Kontakt kommen – man spricht hierbei von einer so genannten Allotransplantation –, ein Leben lang immunsuppressive Medikamente einnehmen. Zu den Nebenwirkungen der Immunsuppressiva gehören eine vermehrte Infektanfälligkeit und ein gesteigertes Krebsrisiko. Zudem sind viele Immunsuppressiva auch diabetogen, d.h. sie sind an der Zerstörung der übertragenen Langerhans-Inseln beteiligt. Aus diesen Gründen wird nach Alternativen gesucht, um auf eine Immunsuppression dauerhaft zu verzichten (Stainier D, 2006).

Insbesondere an solche Zellersatzverfahren, die darauf basieren, Langerhans-Inseln bzw. Betazellen aus embryonalen oder adulten Stammzellen zu differenzieren, werden hohe Erwartungen gesetzt. Dass dies prinzipiell möglich ist, wurde bereits in zahlreichen experimentellen Arbeiten gezeigt (Segev H et al., 2004; Soria B et al., 2000, Lumelsky N et al., 2001). Ethische Bedenken wie auch Fragen zur biologischen Sicherheit und klinischen Umsetzbarkeit werden zurzeit intensiv diskutiert (u.a. Hug K, 2005). Embryonale Stammzellen werden der Blastocyste entnommen, wobei ein potentieller Embryo zerstört wird. Die gezielte Differenzierung von Stammzellen in Zielzellen mit Hilfe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren gelingt weiterhin nur zu einem geringen Prozentsatz. Zudem ist nicht sicher, ob die aus Stammzellen ausdifferenzierten Insulin-positiven Zellen nicht doch unter den *in vivo* Bedingungen die Fähigkeit zur Insulinproduktion verlieren. Nicht vollständig ausdifferenzierte Stammzellen bergen zudem die Gefahr der malignen Entartung und der Teratombildung (Przyborski SA, 2005). Ebenso ist die Züchtung ausreichender Mengen hochreiner Insulinproduzierender Zellen ein bisher noch ungelöstes Problem (Roche E et al., 2005).

Eine Alternative zu embryonalen Stammzellen könnten die so genannten adulten Pankreas-Stammzellen sein (Dor Y et al., 2004). Diese Zellen scheinen auch für die geringe Regenerationsfähigkeit des Pankreas verantwortlich zu sein. So wurden Vorläuferzellen innerhalb der Pankreasgänge, aber auch in den Langerhans-Inseln selbst identifiziert (Bonner-Weir S et al., 2000; Zulewski H et al., 2001; Hao E et al., 2006). Während der Regeneration ist die Expression des Transkriptionsfaktors IDX-1 erhöht (Sharma A et al., 1999). Jedoch sind die Mechanismen, die die Regeneration von Betazellen steuern, noch weitgehend ungeklärt (Kojima H et al., 2003).

1.3 Zielsetzung

Nach einer Publikation von Professor F. Fändrich, Universität Kiel, scheint es zusätzlich zu embryonalen und adulten Stammzellen noch reprogrammierbare Monozyten zu geben, die sich in Insulin-produzierende Zellen differenzieren lassen. Hierzu werden Monozyten *in vitro* mit verschiedenen Zytokinen inkubiert, um sie zu dedifferenzieren („reprogrammieren“) und anschließend zu Insulin-positiven Zellen zu differenzieren (Ruhnke M et al., 2005).

Dieses Verfahren, sollte es klinisch umgesetzt werden, bietet ungeahnte Möglichkeiten für die regenerative Therapie. Hierzu notwendige Blutmonozyten lassen sich in großer Anzahl aus dem peripheren Blut des Patienten gewinnen. Im Anschluss an die *in vitro* Kultivierung können sie dem Patienten als autologes Zelltransplantat zurückgegeben werden.

In der vorliegenden Arbeit wird die Reproduzierbarkeit der Kulturmethode überprüft. Zusätzlich wird der Einfluss der verwendeten Kulturmedien auf die Entwicklung Insulin-positiver Zellen sowie die biologische Aktivität des „Monozyten“-Insulins geprüft.

Die experimentellen Ziele dieser Arbeit waren:



- Züchtung Insulin-positiver Monozyten aus peripheren Blutleukozyten verschiedener Spender.



- Einfluss von Kulturbedingungen auf die Anzahl Insulin-positiver Monozyten.



- Testung Insulin-positiver Monozyten in diabetischen Mäusen.

2 Fragestellung

Folgende Fragen sollen im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden.

- 1) Welche Morphologie weisen die mit dem „Kieler-Protokoll“ kultivierten Insulin-positiven Monozyten auf?
- 2) Welchen Einfluss haben die im „Kieler-Protokoll“ verwendeten Cytokine für die Kultivierung Insulin-positiver Monozyten?
- 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 Puffer- Lösungen

PBS (Phosphate buffered saline)

PBS (10-fach konzentriert von Invitrogen/Gibco, Karlsruhe, Deutschland) wurde zum Gebrauch 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und der pH-Wert auf 7,2 eingestellt. Die Endkonzentration der Salze im PBS beträgt: 140 mmol/L Natriumchlorid, 2,7 mmol/L Kaliumchlorid, 7,2 mmol/L Natriumdihydrogenphosphat-dihydrat, 1,47 mmol/L Kaliumdihydrogenphosphat.

Tris-HCL

Tris-HCl Puffer enthält 138,6 mmol/L Natriumchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland), 3,81 mmol/L Tris HCl (Merck) und 2 g/L bovines Serumalbumin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland). Die Substanzen wurden in destilliertem Wasser gelöst und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

3.2 Gewinnung humaner Blutmonozyten

Periphere Blutleukozyten gesunder Spender wurden mit einer Leukozytapherese im Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie des Universitätsklinikums Würzburg gewonnen. Das Blut wurde aus einer peripheren Vene entnommen, mit Natriumcitrat versetzt und die Leukozyten im Zellseparator angereichert. Nach diesem Sammelschritt wurde das Blut dem Spender zurückgeführt. Die Dauer der Zellspende betrug 3 bis 4 Stunden, dabei wurden 80-100 ml Zellsuspension mit einem Leukozytenanteil von 70-80 Prozent (entsprechend 80.000 bis 100.000 Zellen pro μL) gewonnen. Insgesamt spendeten 10 gesunde, männliche Probanden im Alter von 22-57 Jahren (Tab. 3.1). Für diese Versuche liegt ein positives Votum der Ethikkommission vor.

Tab. 3.1: Zellspender. Der Anteil der Monozyten an den angereicherten Leukozyten betrug durchschnittlich 2-8 Prozent.

Apherese	Initialien	Geburtsdatum	Versuche
10	KS	23.01.1982	Immunhistologie, <i>in vivo</i>
11	CS	27.05.1981	Immunhistologie, <i>in vivo</i>
12	DS	11.06.1981	Immunhistologie, <i>in vivo</i>
14	RS	28.09.1981	Immunhistologie, <i>in vivo</i>
15	JP	24.02.1982	<i>in vivo</i>
17	BP	09.11.1981	Immunhistologie, <i>in vivo</i>
19	WK	01.11.1980	Immunhistologie, <i>in vivo</i>
20	FM	11.08.1979	Immunhistologie, <i>in vivo</i>
21	AS	04.07.1981	Immunhistologie, <i>in vivo</i>
22	CD	17.07.1948	Immunhistologie, <i>in vivo</i>

Die Zellsuspensionen aus den Apheresen wurden mit 2 Teilen PBS verdünnt, vorsichtig auf 15 ml FicoLite-H (Dichte: 1,077 g/mL und 290 mOs/Kg; Linaris, Wertheim, Deutschland) geschichtet und für 20 Minuten bei 850 xg ohne Bremse zentrifugiert. Die auf dem FicoLite-H angereicherten Leukozyten wurden entnommen, dreimal mit PBS für jeweils 10 Minuten bei 100 xg gewaschen⁽¹⁾ und anschließend ihre Zellzahl in einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt. Die Zellen wurden entweder in Kultur genommen ($2-4 \times 10^7$ Zellen/ml) oder in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Hierzu wurden $3-5 \times 10^8$ Zellen in 1-1,5 ml Einfriermedium (95% FCS (Cell Concepts, s. S.12), 5% DMSO (Sigma) portioniert und in Einfrier Röhrchen (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) überführt.

⁽¹⁾ Der Begriff Waschen beschreibt folgende Arbeitsschritte: Auffüllen der Zellsuspension mit Kulturmedium bzw. Pufferlösung, Pelletieren durch Zentrifugieren, Verwerfen des Überstandes und Resuspendieren der Zellen mit Kulturmedium bzw. Pufferlösung.

Tab. 3.2: Zusammensetzung der zur Kultivierung humaner Blutmonozyten eingesetzten Kulturmedien (X-Medium und Y-Medium).

	Endkonzentration	Firma
X-Medium		
RPMI-Medium 1640		Cell Concepts ²⁾
Humanserum, hitzebehandelt ¹⁾	1% bzw. 10%	PAA Laboratories ³⁾
L-Glutamin	2 mmol/L	Invitrogen ⁴⁾
Penicillin/Streptomycin	100 U/mL bzw. 100 µg/mL	Invitrogen ⁴⁾
2-Mercaptoethanol	50 µmol/L	Invitrogen ⁴⁾
M-CSF	5 ng/mL	R&D Systems ⁵⁾
IL-3	0,4 ng/mL	R&D Systems ⁵⁾
Y-Medium		
RPMI-Medium 1640		Cell Concepts ²⁾
Humanserum, hitzebehandelt ¹⁾	1% bzw. 10%	PAA Laboratories ³⁾
L-Glutamin	2 mmol/L	Invitrogen ⁴⁾
Penicillin/Streptomycin	100 U/mL 100 µg/mL	Invitrogen ⁴⁾
EGF	10 ng/mL	R&D Systems ⁵⁾
HGF	20 ng/mL	R&D Systems ⁵⁾
Nicotinamid	10 mmol/L	Sigma ⁶⁾

¹⁾ bei 56 °C für 30 Minuten

²⁾ Umkirch, Deutschland

³⁾ Cölbe, Deutschland

⁴⁾ Karlsruhe, Deutschland

⁵⁾ Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

⁶⁾ Deisenhofen, Deutschland

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

3.3 Kultur humaner Blutmonozyten

Blutmonozyten wurden nach dem Protokoll von Ruhnke et al. (2005) kultiviert. Hierzu wurden bis zu 4×10^8 periphere Blutleukozyten mit 10 ml X-Medium (Tab. 3.2) in eine „mittlere“ Zellkulturflasche (75 cm² Wachstumsfläche von Greiner bio-one) überführt und für 2-16 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert (NUAIRE, Plymouth, USA über Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland). Die nicht-adhärennten Zellen wurden verworfen und die adhärennten Zellen weiter in X-Medium kultiviert (Mediumwechsel am Tag 4). Am Tag 6 wurde das X-Medium gegen Y-Medium (Tab. 3.2) ausgetauscht und die Zellen in der Regel für weitere 4 Tage kultiviert (mit Mediumwechsel am Tag 8) (Abb. 3.1).

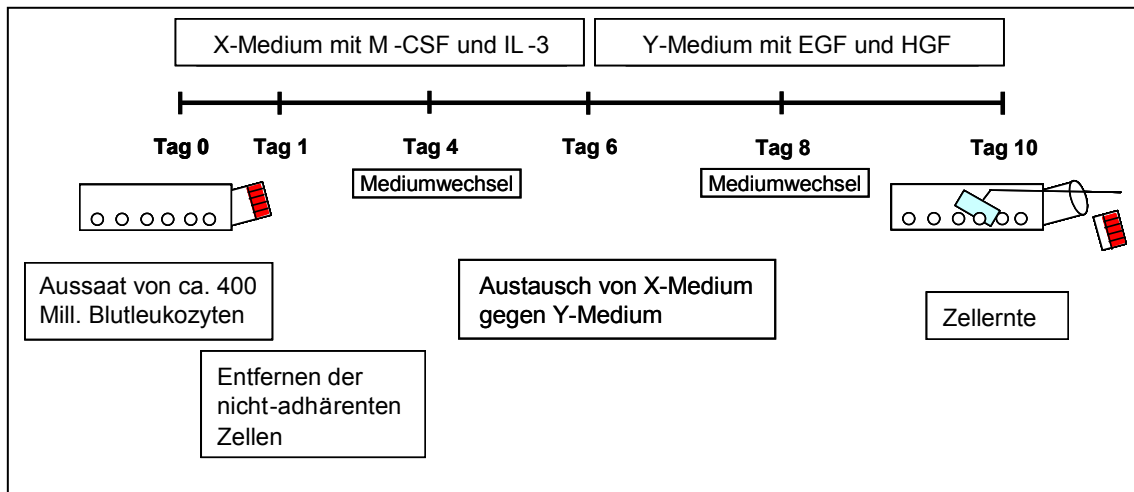


Abb. 3.1: Kultivierung humaner Blutmonozyten mit dem „Kieker-Protokoll“. Humane Monozyten wurden für sechs Tage in X-Medium und anschließend für weitere vier Tage in Y-Medium kultiviert.

3.4 Zellernte und Bestimmung der Zellvitalität

Monozyten der Kulturtag 1, 6, 10 und 18 wurden mit HyQ-Tase, einem Gemisch aus proteolytischen und kollagenolytischen Enzymen (HYClone, South Logan, USA, über Perbio Science, Bonn, Deutschland), geerntet. Das Kulturmedium wurde von den Zellen entfernt und durch 5 ml Enzymlösung ersetzt. Nach 30-minütiger Inkubation im Brutschrank wurden die abgelösten Zellen entnommen und die weiterhin adhärennten Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber

(Nunc, Wiesbaden, Deutschland) vom Untergrund abgelöst. Die Zellausbeute für eine mittlere Zellkulturflasche betrug nach 10 Kulturtagen $1,4 \times 10^6 \pm 0,4 \times 10^6$ Monozyten ($n=22$). Zur Überprüfung ihrer Vitalität wurden $2-5 \times 10^5$ Zellen auf Objektträger zentrifugiert (Cytospins) und mit FDA/PI der Anteil lebender und toter Zellen bestimmt. FDA oder Fluoresceindiacetat (Sigma; Abb. 3.2 A) ist ein unpolares, nicht fluoreszierendes Reagenz. Im Cytoplasma spalten Esterasen die Acetatgruppen vom FDA ab, wodurch das grün fluoreszierende Fluorescein entsteht. Nur Zellen mit einer intakten Zellmembran und funktionierendem Zellmetabolismus können Fluorescein anreichern. Propidiumjodid oder PI (Sigma; Abb. 3.2 B) ist polar und kann nur die Zellmembran nekrotischer Zellen passieren. Es interkaliert in die DNA im Zellkern und zeigt eine rote Farbe im Fluoreszenzlicht.

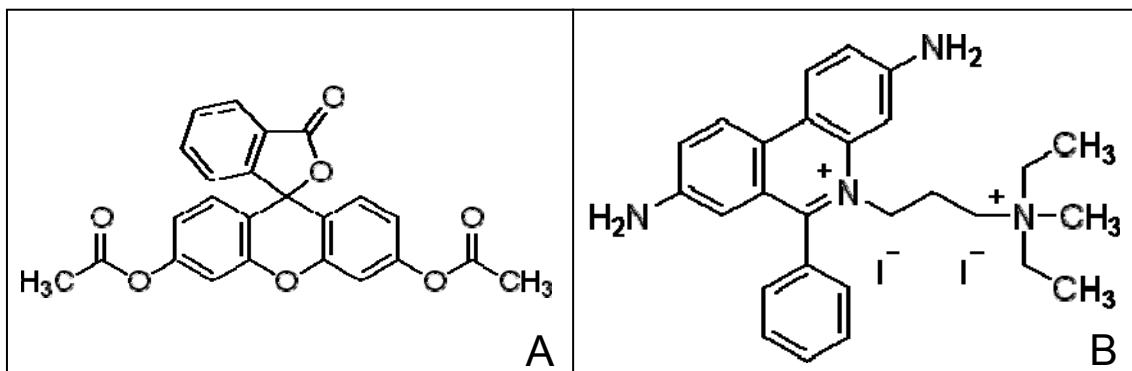


Abb. 3.2: Strukturformeln von Fluoresceindiacetat (A) und Propidiumjodid (B). Fluoresceindiacetat (A) passiert wegen seiner apolaren Eigenschaften die intakte Zellmembran und färbt das Cytoplasma nach Abspaltung der Acetatgruppen grün. Propidiumjodid (B) ist ein polarer Farbstoff, der in die DNA von toten Zellen interkaliert und im Fluoreszenzlicht rot erscheint.

Die FDA-Lösung wurde stets frisch angesetzt. In einem lichtgeschützten Reaktionsgefäß (1,5 mL) wurden 1 mg FDA in 1 mL Aceton gelöst. Von dieser 1 mg/mL Stammlösung wurden 1,5 μ L in 1 mL PBS überführt (Endkonzentration: 1,5 μ g/mL) und jeweils 60 μ L (=90 ng) pro Objektträger eingesetzt. Zudem wurden 20 μ L einer 0,05-prozentigen Propidiumjodid-PBS-Lösung zugegeben (Endkonzentration: 0,5 mg/mL). Die Propidiumjodid-Lösung wurde vor Licht geschützt und im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Die Zellvitalität wurde mit

einem BX 50 Fluoreszenzmikroskop der Firma Olympus (Hamburg) bei 200-400 facher Vergrößerung bestimmt.

3.5 Kultivierung humaner Monozyten auf Deckgläschen

Sterile Deckgläschen (24x24 mm; Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland) wurden in die Vertiefungen von Zellkulturschalen („Sechs-Loch-Platten“ Greiner bio-one) verteilt und $2,6 \times 10^7$ Zellen in 5 mL X-Medium ausgesät. Die Zusammensetzung der Kulturmedien sowie Kulturdauer entsprachen den in Abschnitt 3.3 beschriebenen Angaben. An den Erntetagen wurden die Deckgläschen aus den Vertiefungen herausgenommen und mit Entellan (Merck, Deutschland) auf Objektträger fixiert. Vitalitätsüberprüfungen und immunhistochemische Färbungen wurden so durchgeführt, wie in den Abschnitten 3.4 und 3.6 beschrieben.

3.6 Nachweis von Insulin mit Dithizon

Dithizon (1,5-Diphenylthiocarbazon; DTZ; Sigma) ist ein Chelatbildner, der mit zweiwertigen Ionen einen rotfarbenden Komplex bildet. Mit Dithizon wird Insulin indirekt nachgewiesen. In den Betazellen gruppieren sich jeweils 6 Moleküle Insulin um ein zentrales Zinkion. Der Dithizon-Zinkkomplex erscheint unter dem Lichtmikroskop leuchtend rot. Insulin/Zink-negative Zellen werden von DTZ nicht angefärbt.

10 mg Dithizon wurden in 1,05 mL DMSO (Sigma) gelöst, mit PBS auf 10 mL aufgefüllt und steril filtriert (Porengröße 0,2µm). Pro Cytospin wurden von dieser gebrauchsfertigen Dithizon-Lösung (950 µg/mL) 100 µL (95 µg) entnommen. Die Rotfärbung der Monozyten wurde nach 24 Stunden mikroskopisch beurteilt.

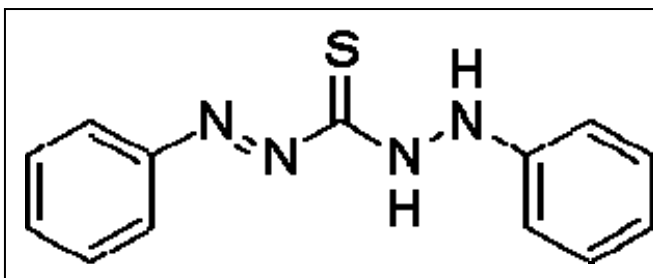


Abb. 3.3: Der Chelatbildner Dithizon. Dithizon bildet mit zweiwertigen Ionen, z.B. Zink, einen rot leuchtenden Komplex.

3.7 Immunhistochemische Färbungen

Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung ist in Abb. 3.4 gezeigt. Cytospin- bzw. Deckgläschen-Präparate wurden für 5 Minuten in Aceton (J.T. Baker, Deutschland) bei Raumtemperatur fixiert und anschließend für 10 Minuten getrocknet. Nach dreimaligem Waschen – hierzu wurden die Präparate für jeweils fünf Minuten in Tris-HCl geschwenkt – wurden mögliche Fc-Rezeptoren mit 30 Prozent Humanserum blockiert. Nach erneutem Waschen wurden die in Tab. 3.3 aufgeführten Primärantikörper auf die Präparate gegeben und über Nacht (ca. 16 Stunden) in einer feuchten Kammer bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

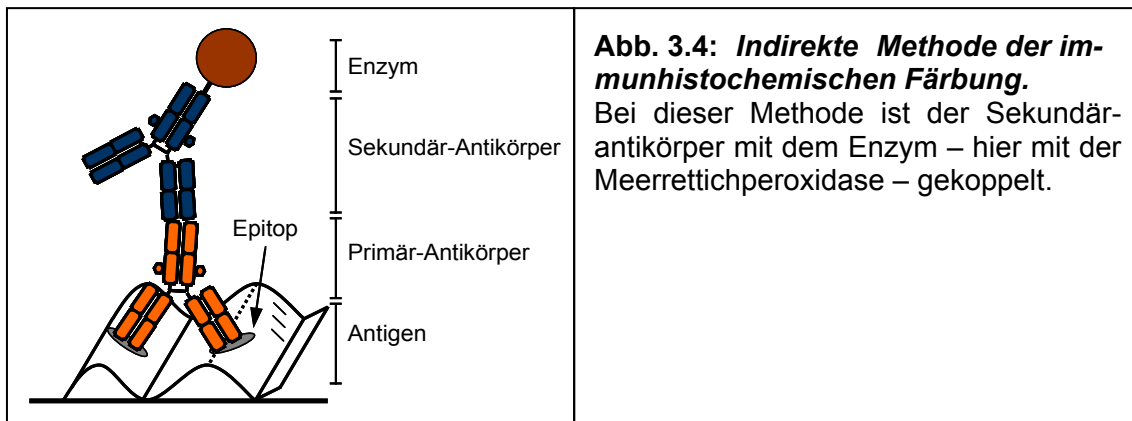


Abb. 3.4: Indirekte Methode der immunhistochemischen Färbung. Bei dieser Methode ist der Sekundärantikörper mit dem Enzym – hier mit der Meerrettichperoxidase – gekoppelt.

Nach dreimaligem Waschen in Tris-HCl wurden die Präparate mit dem Sekundärantikörper *Rabbit-anti-Mouse*, konjugiert mit Meerrettichperoxidase, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden 3 Tropfen frisch angesetztes Liquid DAB (3,3 Diaminobenzidin, BioGenex, San Ramon, USA) auf die Präparate gegeben und die Reaktion nach 3-6 Minuten gestoppt. Nach der Kernfärbung in Mayer's Hämalaun (Merck, Darmstadt) für 90 Sekunden und dem anschließenden „Bläuen“ unter Leitungswasser wurden die Objektträger in aufsteigender Alkoholreihe (der hierzu verwendete Alkohol wurde über die Apotheke des Universitätsklinikums Würzburg bezogen) und abschließend in Xylol (J.T. Baker) entwässert. Anschließend wurden die Präparate mit Entellan eingedeckt. Hierbei handelt es sich um das Standardfärbeprotokoll. Die in Tab. 3.3 angegebenen Primär-

antikörper wurden an folgenden Zellen/Geweben getestet: humanen Fibroblasten (n=5), humanen exokrinen Pankreaskarzinomzellen (Linie BxPC-3; n=3), Insulinomzellen (Linie Ins-1; n=4), Kryoschnitten von Schweinepankreatata (n=5), isolierten Langerhans-Inseln aus Schweinepankreatata (n=4). Parallel zu jeder immunhistochemischen Färbung wurde an einem Cytospinpräparat der Sekundärantikörper *Rabbit-anti-Mouse* auf mögliche Kreuzreaktionen getestet. Hierzu wurden die Zellen, anstatt mit den Primärantikörpern, nur mit der Antikörperverdünnungslösung (*Antibody Diluent*; Tab. 3.3) über Nacht inkubiert. Die weiteren Färbeschritte wurden nach dem Standardprotokoll durchgeführt.

Anmerkung: Die porcinen Pankreaskryoschnitte wurden nach ihrer Fixierung in konzentrierter methanolischer Lösung mit 0,45 Prozent Wasserstoffperoxid für 30 Minuten inkubiert. Hierdurch wurde die endogene Peroxidase blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit Tris-HCL wurden die Schnitte für 20 Minuten mit einem Proteinblock (Dako) behandelt. Die anschließende Inkubation mit den Antikörpern wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die immunhistochemischen Färbungen von Ins-1 Zellen und porcinen Langerhans-Inseln wurden ohne Blockade der endogenen Peroxidase durchgeführt.

Tab. 3.3: In dieser Arbeit verwendete primäre und sekundäre Antikörper.

Primäre Antikörper				Sek. Antikörper	
Antigen	Bezeichnung	Firma	Verdünnung	Spezifität	
Insulin	IN-05	Exbio ¹⁾	1 : 100	Maus-anti-Human	Rabbit-anti-Mouse
C-Peptid	C-Pep-01	Acris ²⁾	mit Antibody Diluent Dako ⁴⁾		1:100 Dako ⁴⁾
CD14	B365.1	Biomeda ³⁾			

¹⁾ Prag, Tschechische Republik; Bestellung über Biozol, Eching, Deutschland

²⁾ Hiddenhausen, Deutschland

³⁾ Foster City, USA; Bestellung über Biozol, Eching, Deutschland

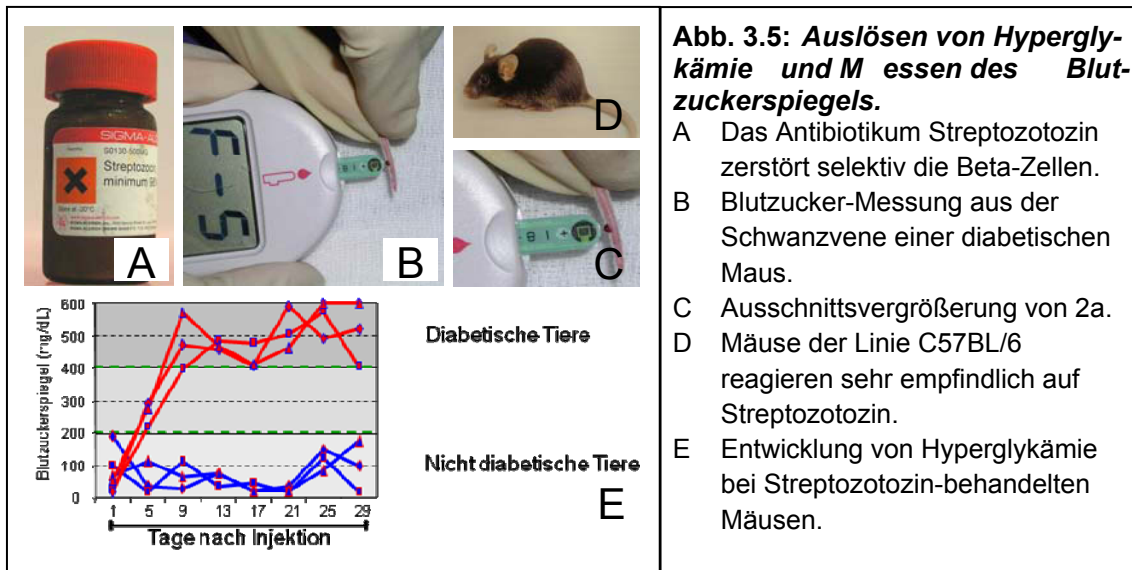
⁴⁾ Hamburg, Deutschland

3.8 Versuchstiere

Versuchstiere waren männliche C57BL/6 („Black 6 Mäuse“) (Harlan Winkelmann, Paderborn, Deutschland) bzw. B6.129S7-Rag1 Mäuse („Rag-Mäuse“) (Jackson, USA über Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht zwischen 20-25 g. Sie wurden in Laminar-Flow Schränken (Scanbur, Dänemark) in Makrolon-Käfigen mit Sägemehleinstreu bei Wasser und Altromin-Pressfutter (Standarddiät) gehalten. Die Tiere wurden bei einer Umgebungstemperatur von $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-60 Prozent und einem 12 stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten.

3.9 Induktion von Hyperglykämie

Zur Auslösung permanenter Hyperglykämie (Abb. 3.5) wurde das Antibiotikum Streptozotozin (Sigma) verwendet, das selektiv die Betazellen in den Langerhans Inseln zerstört. Die Mäuse erhielten eine Streptozotozin-Dosis von 0,2 mg/g Körpergewicht. Streptozotozin wurde stets in frisch angesetztem Zitratpuffer gelöst. Zur Herstellung dieses Puffers wurden 1 mol/L Zitronensäure (Merk) und 1 mol/L Tri-Natriumzitat-Dihydrat (Merk) im Verhältnis 1:1,3 gemischt, um einen pH-Wert von 4,5 zu erhalten. Der Zitratpuffer wurde mit physiologischer Kochsalzlösung (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) 1:10 verdünnt und Streptozotozin in diesem Puffer (0,1 mol/L unmittelbar vor der intraperitonealen Injektion gelöst. Der Blutzuckerspiegel wurde mit Hilfe des Blutzuckermessgerätes Ascensia Elite XL der Firma Bayer bestimmt. Hierzu wurde der Messsensor mit 2 μL Blut aus der Schwanzvene gefüllt. Die Tiere wurden zuvor mit Isofluran kurzzeitig (<3 Minuten) narkotisiert. Der Glukose-Messbereich beträgt 20-600 mg/dL (1,1-33,3 mmol/L). Zum Zeitpunkt der Blutzuckerspiegel-Messung waren die Tiere nicht nüchtern.



3.10 *In vivo* Testung von „Monozyten“-Insulin

Um das in den kultivierten Monozyten gespeicherte Insulin auf seine biologische Wirksamkeit zu überprüfen, wurden die Zellen nach 10 Tagen in Kultur mit HyQ-Tase (Abschnitt 3.4) geerntet und im Ultraschallbad aufgeschlossen. Hierzu wurden 3×10^6 *in vitro* modifizierte Monozyten in 100 μ L PBS resuspendiert. Die zellulären Bestandteile wurden bei 7500 xg für 2 Minuten abzentrifugiert, der Insulin-haltige Überstand (=zellfreies Lysat) abgenommen und anschließend diabetischen Mäusen subkutan injiziert. Zur Injektion wurden Einmal-Insulinspritzen mit integrierter Kanüle ohne Totvolumen (Omnican Braun, Melsungen) verwendet. Unmittelbar vor Injektion, sowie eine Stunde und fünf Stunden nach Injektion wurde der Blutzuckerspiegel gemessen; zudem 24 Stunden vor und nach Injektion. Als Negativkontrollen wurden 100 μ L PBS sowie zellfreier Überstand humaner Fibroblasten injiziert. Als Positivkontrolle wurden 0,4 internationale Einheiten (IE) aufgereinigtes porcines Insulin sowie zellfreie Lysate von Zellen der Ratten-Insulinomzelllinie Ins-1 bzw. porcinen Langerhans-Inseln verwendet.

Auch lebende *in vitro* modifizierte Monozyten vom Kulturtag 10 wurden in diabetischen Mäusen überprüft. Hierzu wurden pro Tier ca. $0,5-1 \times 10^7$ Zellen, die in 100 μ L PBS suspendiert waren, subkutan injiziert. Als Kontrolle erhielten die

Tiere entweder frisch isolierte periphere Blutleukozyten (Negativkontrolle) oder lebende Zellen der Insulinomzelllinie Ins-1 (Positivkontrolle). Die Langzeitfunktion *in vitro* modifizierter Monozyten wurde in diabetischen immuninkompetenten B6.129S7-Rag1 Mäusen überprüft.

3.11 Auswertung von Cytospin-Präparaten

Die Cytospins wurden mikroskopisch begutachtet (Olympus BX 50) und bei 400- und 600-facher Vergrößerung digital fotografiert (Color View 12, Olympus). Als Software wurde das Programm „Analysis“ 3.2 (Soft Imaging System GmbH, Münster) eingesetzt. Der interne Vergrößerungsfaktor des Mikroskops betrug 2,5. Die in dieser Arbeit präsentierten Bilder stellen repräsentative Ausschnitte des gesamten Präparates dar und wurden durch zwei unabhängige Beobachter ausgewählt. Um die Anzahl an immunhistochemisch positiv gefärbten Zellen zu bestimmen, wurden bei vier Cytospin-Präparaten jeweils drei repräsentative Gesichtsfelder (Vergrößerung: 600x) ausgezählt. Die Photos wurden mit der Bildbearbeitungssoftware Paint (Version 5.1; Microsoft Corporation) zu JPG-Dateien konvertiert, die mit PowerPoint 2003 (Microsoft Corporation) geöffnet wurden; einzig Helligkeit und Kontrast wurden nachbearbeitet.

3.12 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mit dem Programm Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation 1985-2003) statistisch ausgewertet. Alle Werte sind als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben.

4 Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es, Insulin-positive Monozyten aus peripheren Blutleukozyten unterschiedlicher Spender nach dem „Kieler-Protokoll“ (Tab. 3.2) *in vitro* zu kultivieren. Zudem wurde das „Monozyten“-Insulin auf seine biologische Aktivität in diabetischen Mäusen getestet.

4.1 Charakterisierung *in vitro* modifizierter Monozyten

Morphologische Charakterisierung

Zweihundert bis vierhundert Millionen periphere Blutleukozyten wurden pro mittlere Kulturflasche mit 75 cm² Wachstumsfläche in X-Medium (Tab. 3.2) ausgesät. Nach 2 bis 16 Stunden wurden die nicht-adhärenen Zellen entfernt, und die adhärenen Monozyten für weitere 5 Tage in X-Medium kultiviert (Abb. 3.1). Während dieser Zeit veränderte sich ihr Aussehen, was u.a. darauf zurückzuführen ist, dass sich ein Großteil der Monozyten zu Makrophagen differenzierte. Längliche Zellen mit kleinem Zellkörper und Zellausläufern dominierten dabei die Kultur. Der zweite Zelltyp, dessen Anteil kontinuierlich zunahm, wies einen großen Zellkörper ohne Ausläufer auf (Abb. 4.1).

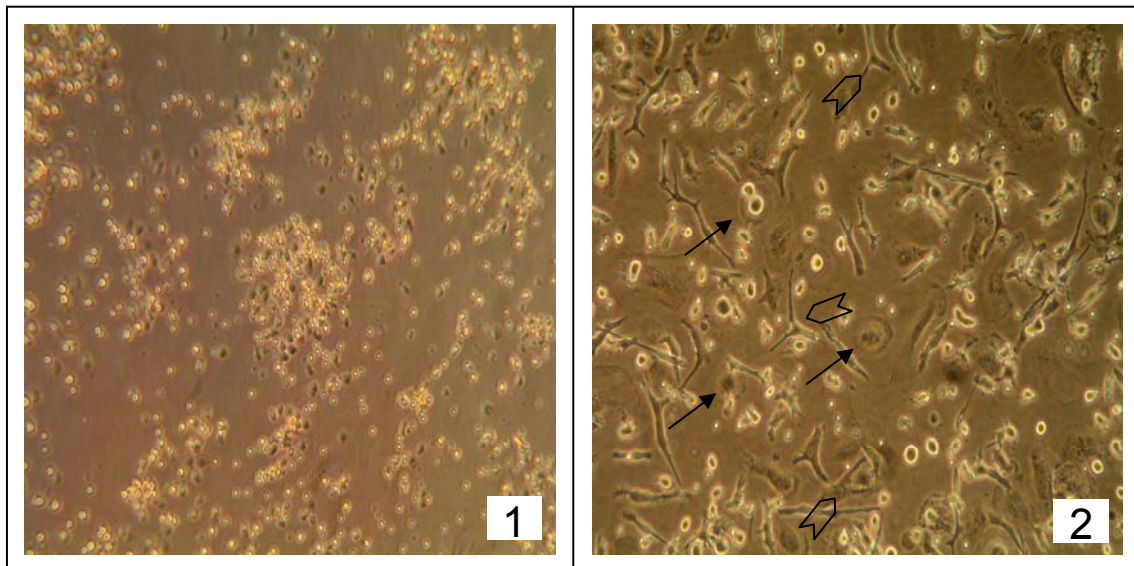


Abb. 4.1: Morphologie kultivierter humaner Monozyten nach 24 Stunden (Bild 1; Aph 10.2) und 10 Tagen (Bild 2; Aph 10.2) in Kultur. Bild 1 zeigt durch Adhärenz angereicherte Monozyten und kontaminierende Leukozyten. Am Tag 10 (Bild 2) waren zwei (Makrophagen-) Zelltypen zu identifizieren: Zelltyp 1 (\blacktriangleright) und Zelltyp 2 (\blacktriangleright)

Phasenkontrastaufnahmen mit 200-facher (Bild 1) und 400-facher (Bild 2) Vergrößerung.

Kultivierte Monozyten^{*)} wurden in der Regel nach zehn Tagen mit dem Enzymgemisch HyQ-Tase geerntet. Während sich ca. 80% der Zellen ablösten (siehe auch Abb. A1 im Anhang), wurden die verbliebenen Zellen, hierbei handelte es sich überwiegend um Zellen des Zelltyps 2, vorsichtig mit einem Zellschaber gelöst. Durch die Kombination beider Verfahren wurden aus einer mittleren Zellkulturflasche $1,4 \times 10^6 \pm 0,4 \times 10^6$ Zellen geerntet (n=22 Zellernten). Von diesen Zellen waren $87 \pm 3,6$ Prozent vital. Wurden die Zellen hingegen ausschließlich mit einem Zellschaber abgelöst, so waren nur $49 \pm 6,3$ Prozent (n=2) der Zellen vital (Abb. 4.2).

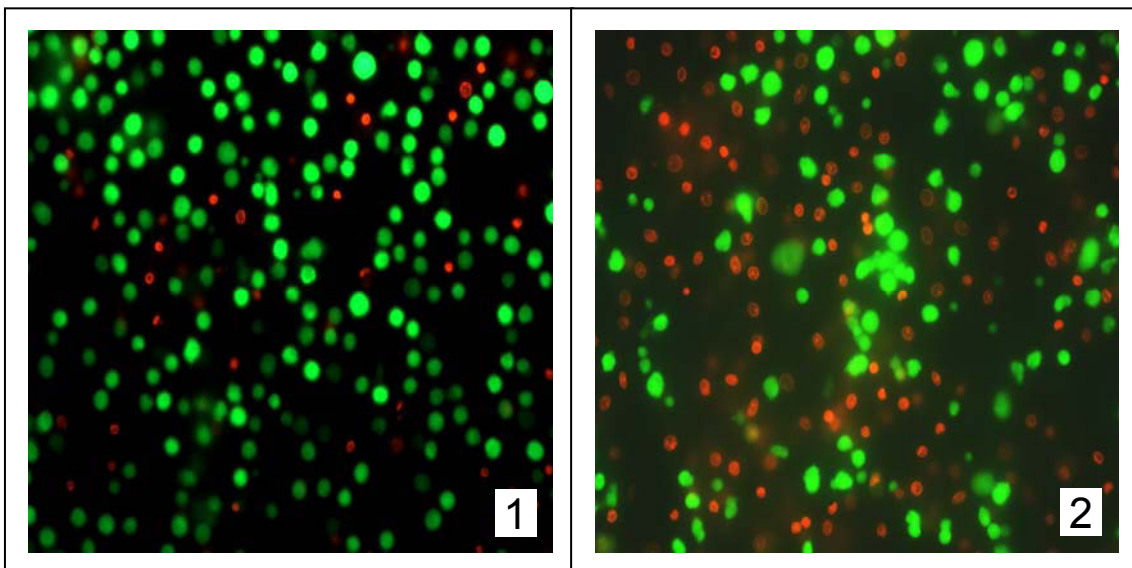


Abb. 4.2: Verteilung von vitalen (grün-gefärbten) und nicht vitalen (rot-gefärbten) Insulin-positiven Monozyten in Abhängigkeit vom Zellernteverfahren. (1) Kombination aus HyQ-Tase plus Zellschaber (siehe auch Abschnitt 4.1) und (2) nur Zellschaber. Deutlich ist zu erkennen, dass beim kombinierten Verfahren aus HyQ-Tase und Zellschaber der Anteil vitaler Zellen mit 87 Prozent größer ist als beim Ablösen nur mit einem Zellschaber. Hier waren noch 49 Prozent der Zellen vital. Repräsentative FDA/PI-Fluoreszenzaufnahmen von 16 Untersuchungen. Bild 1: Aph 10.1^{*)}; 200x und Bild 2: Aph 15.2; 400x.

^{*)} Zur Bezeichnung der Zellen siehe auch Seite 12.

^{*)} Zur Nomenklatur der Apheresen: 10.1 bedeutet 10. Apherese und 1. Auftauchcharge dieser Apherese.

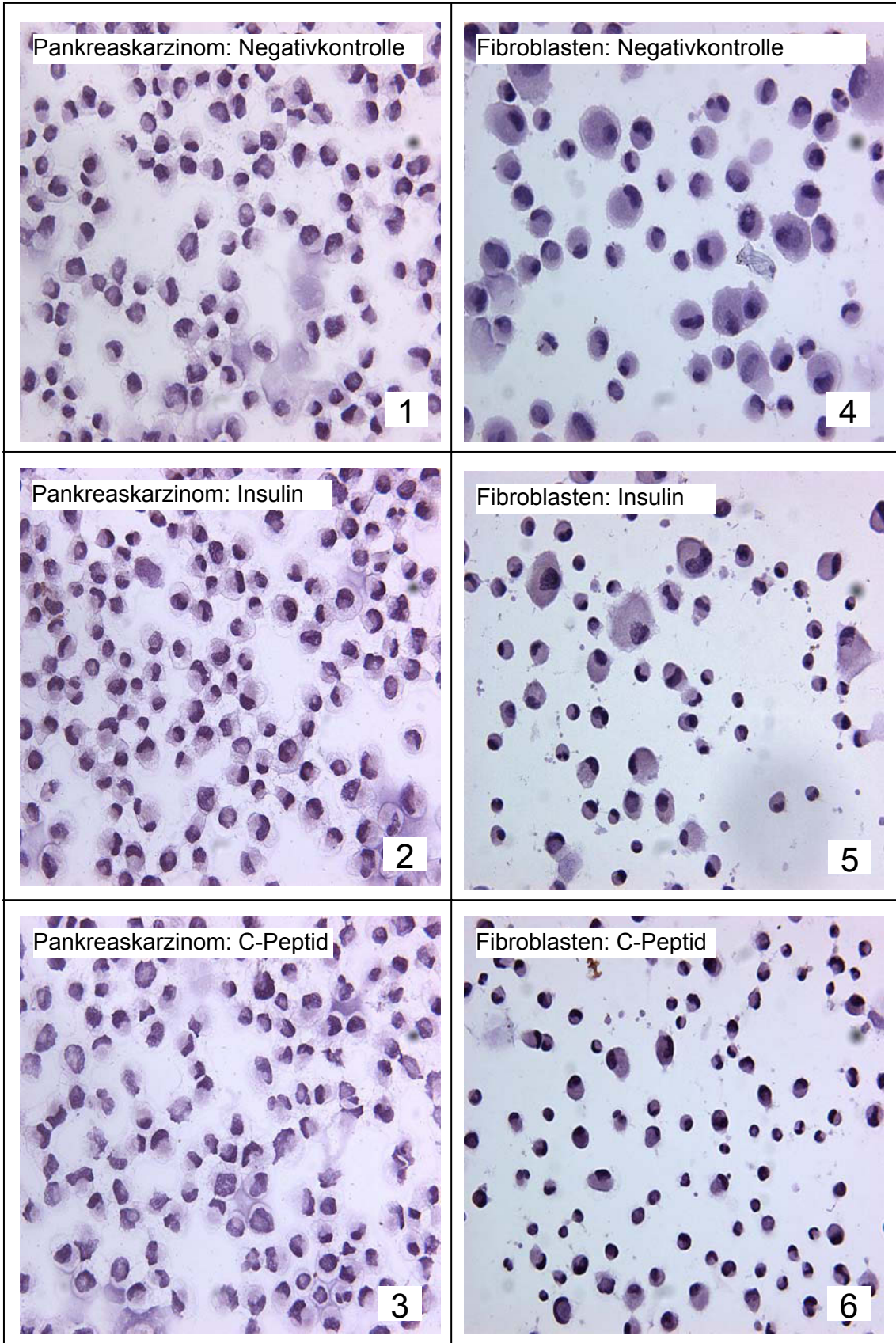
Immunhistochemische Analysen

In vitro modifizierte Monozyten wurden am 6., 10. und 18. Kulturtag geerntet und immunhistochemisch auf Insulin und C-Peptid untersucht. Frisch isolierte periphere Blutleukozyten wurden als Negativkontrollen eingesetzt.

Um sicher zu gehen, dass die Behandlung der Zellen mit HyQ-Tase (s. oben) nicht zu falsch positiven Ergebnissen in der Immunhistochemie führt, wurden Monozyten für 10 Tage auf Deckgläschen kultiviert und anschließend immunhistochemisch untersucht. Die so kultivierten Zellen unterschieden sich weder in ihrer Morphologie noch in ihrem Wachstum von den in Zellkulturflaschen gezogenen Zellen (Daten nicht gezeigt). Wie die mit HyQ-Tase abgelösten Monozyten, so waren auch diese Zellen positiv für Insulin und C-Peptid. Somit scheint die Behandlung der in Zellkulturflaschen kultivierten Monozyten mit HyQ-Tase die Färbeergebnisse nicht zu beeinflussen. Die Ergebnisse hierzu sind in Abb. A2 im Anhang gezeigt.

Um mögliche Kreuzreaktionen der verwendeten Primärantikörper (Tab. 3.3) zu erkennen, wurden sie an verschiedenen Negativkontrollen ausgetestet. Dies waren humane Fibroblasten (n=5) und Zellen einer humanen exokrinen Pankreaskarzinomlinie (n=3). Beide Zelltypen waren zu keiner Zeit positiv für Insulin und C-Peptid (Abb. 4.3). Zudem wurde zu jeder immunhistochemischen Färbung der sekundäre Antikörper (Tab. 3.3) auf eine mögliche Kreuzreaktivität hin überprüft. Die Ergebnisse hierzu waren stets negativ (s. hierzu Abb. 4.3).

Abb. 4.3 (S. 24): Die monoklonalen Antikörper IN-05 (anti-Insulin) und C-Pe p-01 (anti-C-Peptid) färben keine Insulin-negativen Zellen. An den untersuchten Zelllinien wurde keine Reaktion der beiden Antikörper beobachtet. (1-3) Humane exokrine Pankreaskarzinomzellen; (4-6) Humane Fibroblasten. Vergrößerung: 600x.

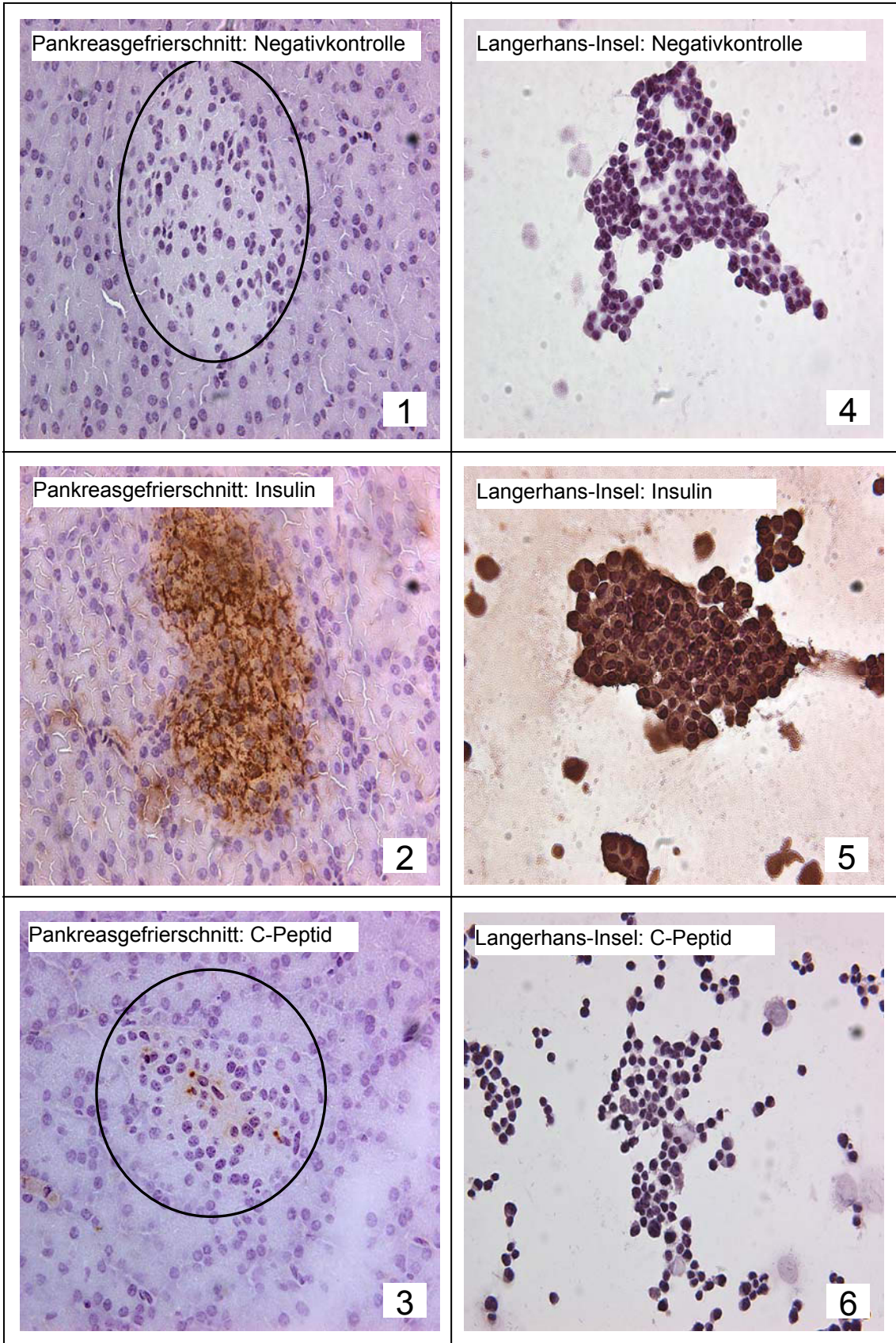


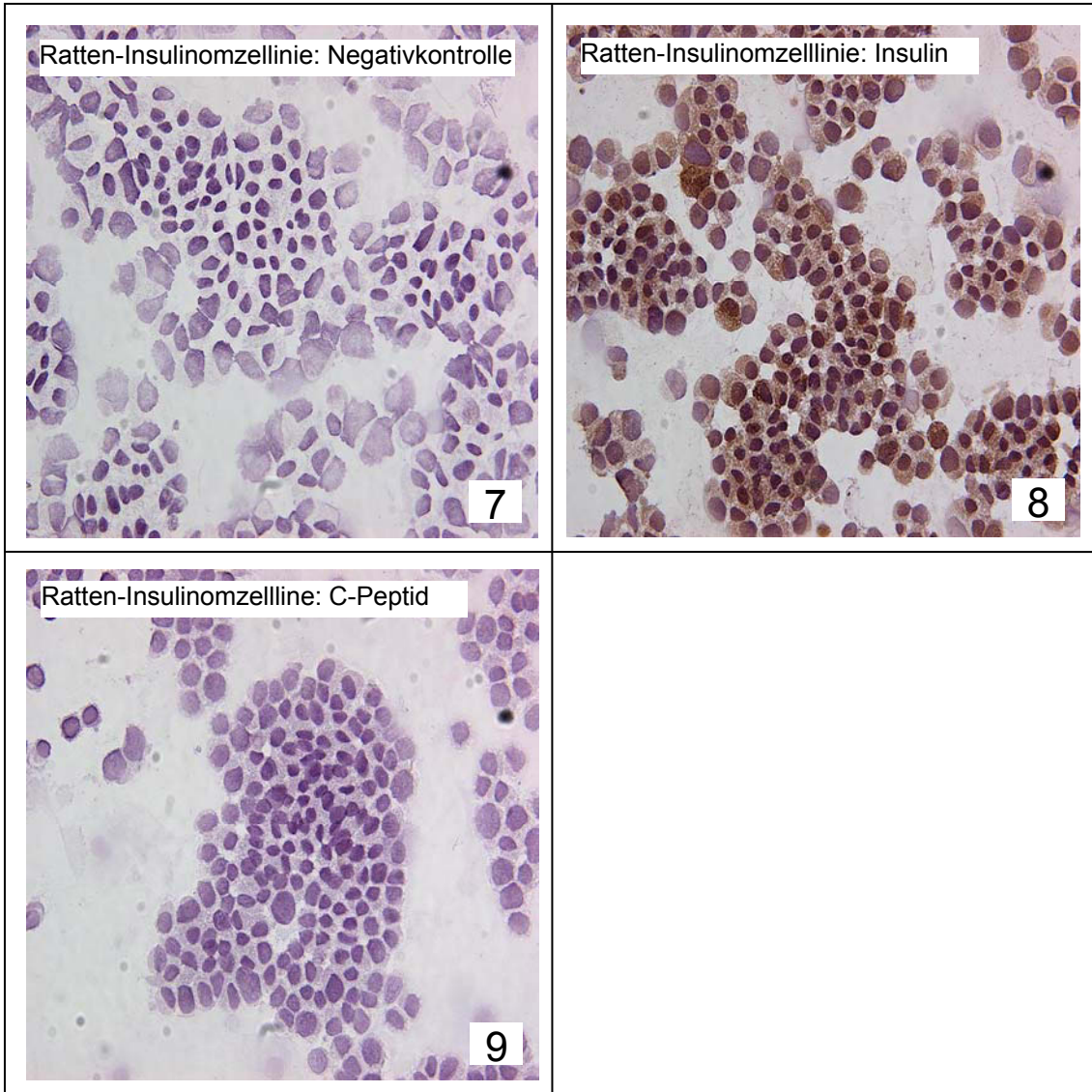
Weiter wurden die beiden monoklonalen Antikörper an Gefrierschnitten von Schweinepankreatata (n=3) und isolierten porcinen Langerhans-Inseln (n=4) überprüft. Da der anti-Insulin Antikörper IN-05 auch Schweineinsulin erkennt (Horejsi V et al., 1984), färbte er sowohl Pankreas-Gefrierschnitte als auch isolierte Langerhans-Inseln vom Schwein (Abb. 4.4).

Hingegen war keine Reaktion mit dem Antikörper C-Pep-01 zu beobachten (Abb. 4.4). C-Pep-01 bindet an die Aminosäurereste der Positionen 8-13 und 25-31 in der C-Kette (Hilgert I et al., 1991). In diesen Sequenzabschnitten unterscheiden sich humanes und porcines C-Peptid in einer bzw. zwei Positionen, so dass dies möglicherweise die ausbleibende Reaktion von C-Pep-01 auf porcines C-Peptid erklären könnte (Tab. A1 im Anhang).

Als weitere Positivkontrolle wurden Insulin-positive Zellen der INS-1 Linie, einer Insulinomzelllinie der Ratte, untersucht. Auch diese Zellen färbte der IN-05 Antikörper aufgrund seiner Kreuzreaktivität mit Ratten-Insulin, während der C-Pep-01 Antikörper keine Reaktion zeigte (Abb. 4.4).

Abb. 4.4 (Seite 26-27): Der monoklonale Antikörper IN-05 (anti-Insulin) erkennt auch Insulin anderer Spezies, während der monoklonale Antikörper C-Pep-01 (anti-C-Peptid) ausschließlich mit humanem C-Peptid reagiert. Der Antikörper IN-05 erkannte sowohl Schweine- als auch Ratteninsulin. Hingegen erkannte der Antikörper C-Pep-01 nicht das C-Peptid beider Spezies (s. auch Tab. A1 und A2 im Anhang). (1-3) Gefrierschnitte vom Schweine-Pankreas; (4-6) Cytospins isolierter Langerhans-Inseln vom Schwein; (7-9) Cytospins von Zellen der Insulinomzelllinie INS-1. Vergrößerung: 600x.





Um einen möglichen Einfluss des Fixierungsmittels Aceton auf das immunhistochemische Färbeargebnis auszuschließen, wurden *in vitro* modifizierte Monozyten auch mit Formaldehyd fixiert. Der Fixierungslösung wurde zudem Tween 20 zur Permeabilisierung der Zellmembran zugesetzt (jeweils n=2). Die Färbeargebnisse zeigten keine Unterschiede zwischen beiden Fixierungsmethoden. Auch der Zusatz von Tween 20 zum Formaldehyd beeinflusste nicht das Färbeargebnis (Abb. A3 im Anhang). Damit kann ausgeschlossen werden, dass der intrazelluläre Nachweis von Insulin und C-Peptid auf einem Färbeartefakt beruht. Wenn im Text nicht anders erwähnt, wurde die Fixierung mit Aceton durchgeführt.

Frisch isolierte periphere Blutleukozyten wurden auf Insulin und C-Peptid getestet, und sie waren – wie erwartet – für beide Marker negativ. Ausschließlich ein geringer Anteil CD14-positiver Zellen war nachzuweisen (Abb. 4.5).

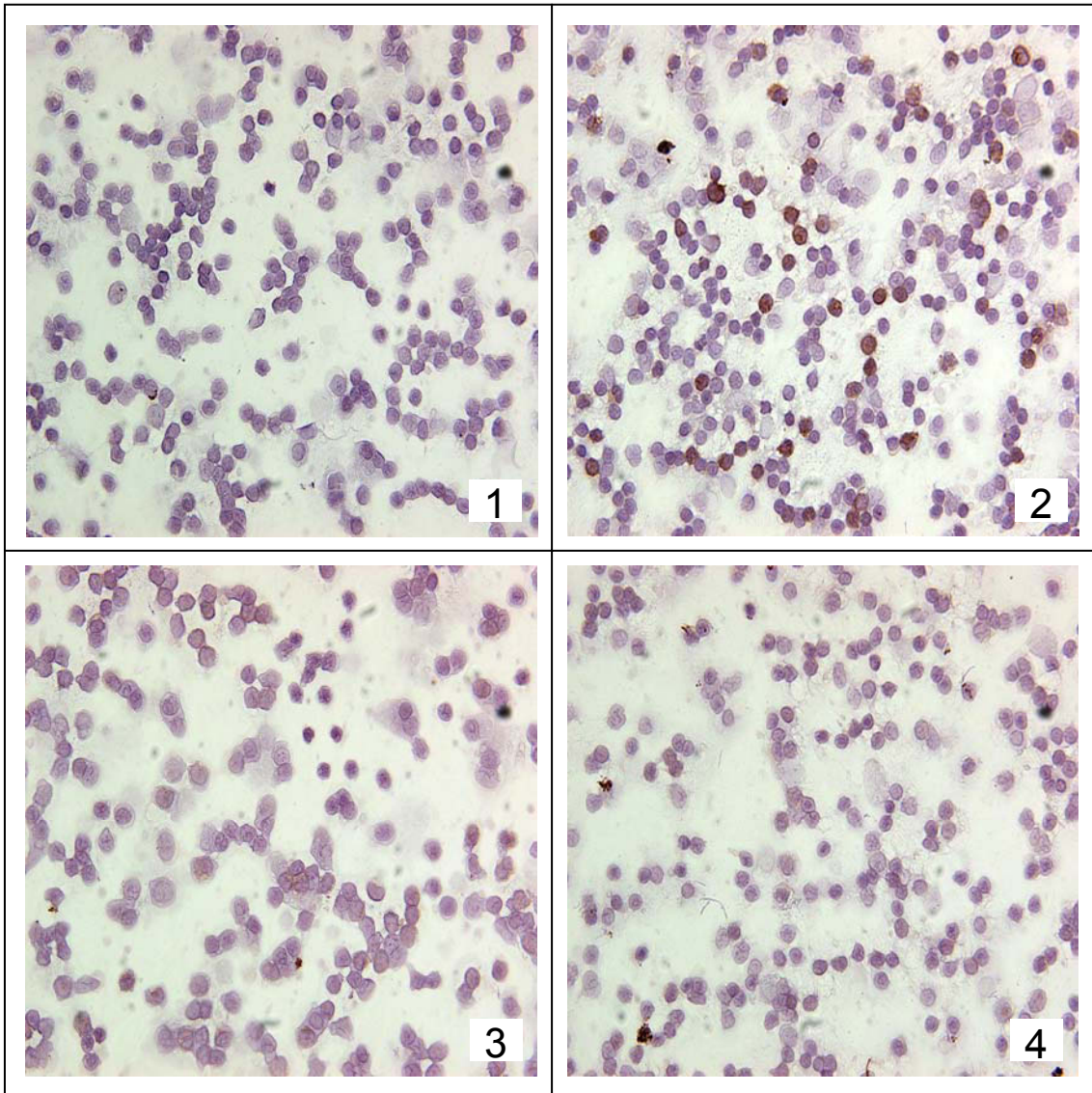


Abb. 4.5: Frisch isolierte periphere Blutleukozyten sind negativ für Insulin und C-Peptid. Während der anti-CD14 Antikörper mit den Monozyten der Leukozytenpräparate reagierte, waren Insulin und C-Peptid erwartungsgemäß nicht nachzuweisen. (1) Negativkontrolle (Aph 22); (2) CD14 (Aph 22); (3) Insulin (Aph 22); (4) C-Peptid (Aph 22). Vergrößerung: 600x. Auch frisch isolierte Blutmonozyten anderer Leukapheresen (Tab. 3.1) waren negativ für Insulin und C-Peptid.

Im Gegensatz dazu färbten *in vitro* modifizierte Monozyten vom 10. Kulturtag immunhistochemisch positiv für Insulin und C-Peptid (Abb. 4.6). Hierzu wurden 24 Präparate von zehn gesunden Spendern untersucht. In jedem Präparat waren ca. 69 ± 8 Prozent der Zellen positiv für Insulin und ca. 49 ± 30 Prozent der Zellen positiv für C-Peptid. CD14-positive Zellen machten einen Anteil von 60 ± 4 Prozent aus. Zusätzlich wurden Monozyten vom Kulturtag 18 immunhistochemisch untersucht. Die Ergebnisse von Kulturtag 18 und 10 unterschieden sich nicht wesentlich (Abb. A4 im Anhang).

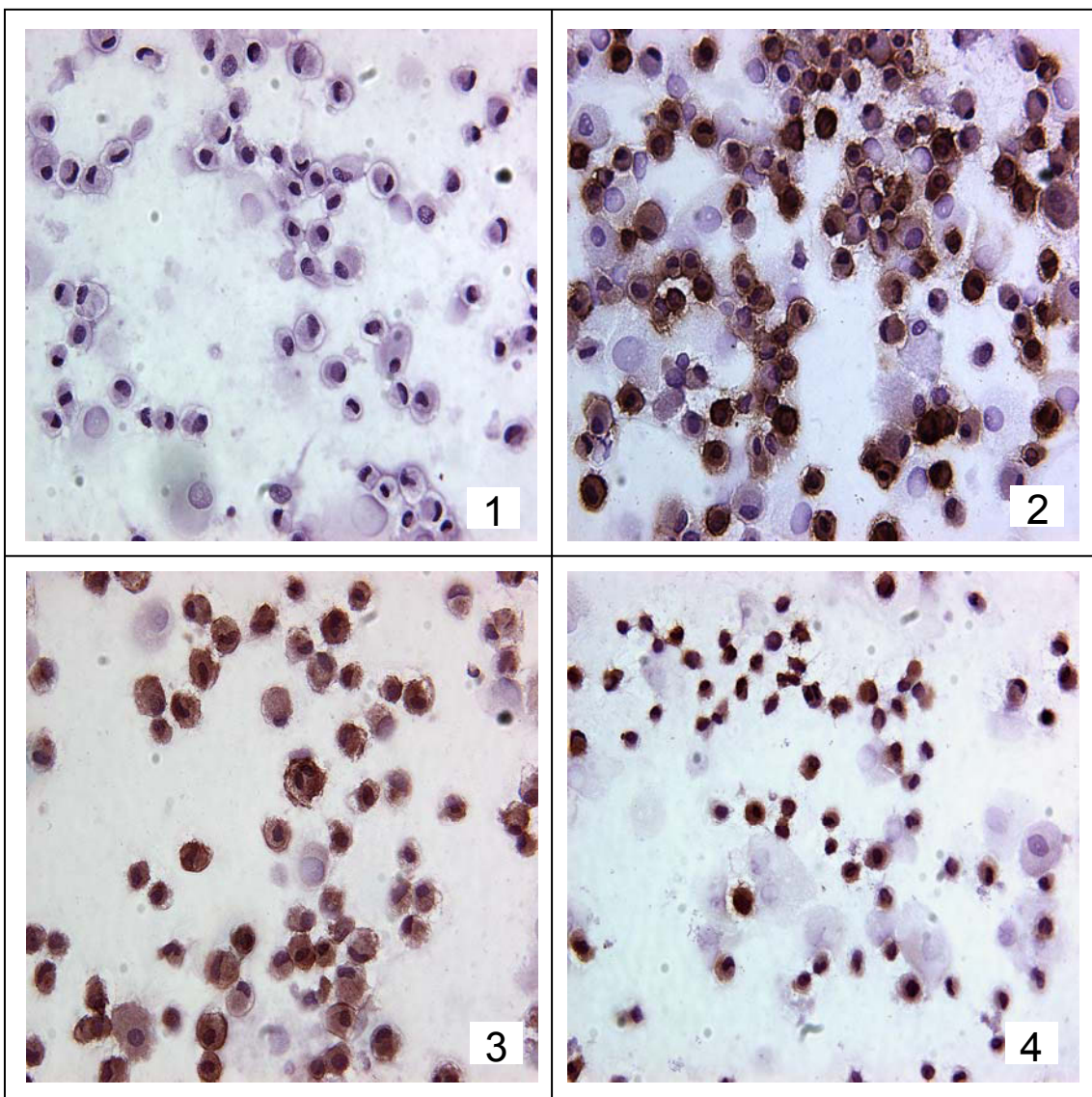


Abb. 4.6: Monozyten vom 10. Kulturtag sind positiv für Insulin und C-Peptid. Die Zellen wurden im X-Medium für 6 Tage und im Y-Medium für weitere 4 Tage kultiviert („Kieler-Protokoll“; Tab. 3.2). Die Zellen wurden in Aceton fixiert (Abschnitt 3.7). Siehe

auch den Kommentar zum Einfluss des Fixierungsmittels auf das Färbeergebnis auf Seite 27. (1) Negativkontrolle (Aph 11.1); (2) CD14 (Aph 9.2); (3) Insulin (Aph 21.1); (4) C-Peptid (Aph 9.2). Vergrößerung: 600x.

Nachweis Insulin-positiver Monozyten mit Dithizon

Die Färbung mit Dithizon ist ein einfacher indirekter Nachweis von Insulin (Abschnitt 3.6). Tatsächlich nachgewiesen werden Zinkionen, um die sich jeweils 6 Insulin-Moleküle gruppieren. Monozyten, die sich für 24 Stunden in Kultur befanden, färbten sich nicht mit Dithizon an (Abb. 4.7; Bild 1), während Monozyten vom Kulturtag 10 sich leuchtend rot färbten (Abb. 4.7; Bild 2, n=4). Zum Vergleich: In Pankreas-Gewebeschnitten färben sich Langerhans-Inseln innerhalb weniger Minuten mit Dithizon an (nicht gezeigt)*).

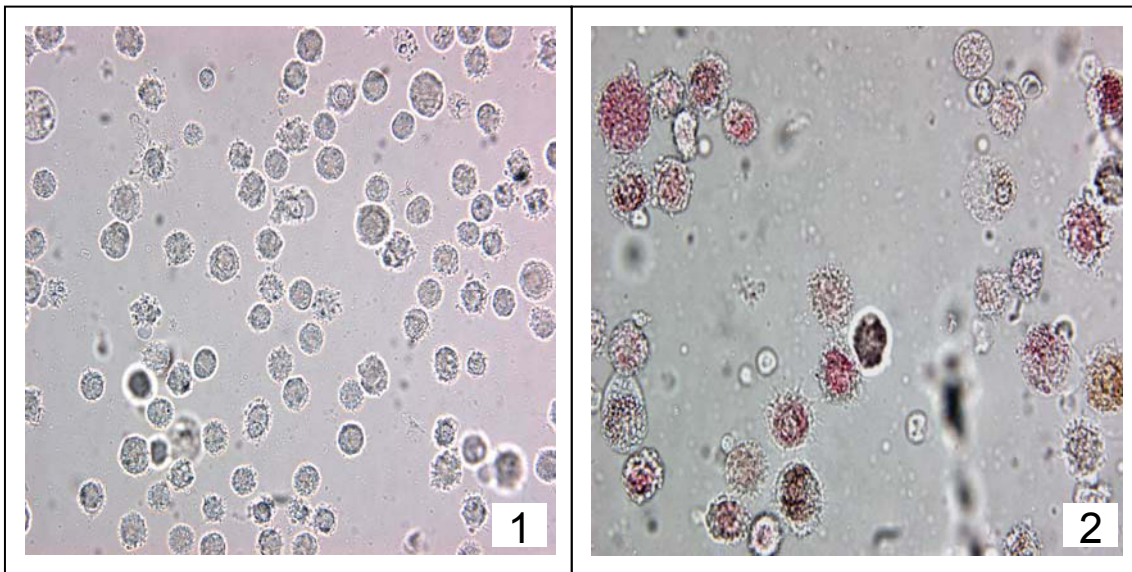


Abb. 4.7: Nachweis Insulin-positiver Monozyten mit Dithizon. Während Monozyten, die für 24 Stunden kultiviert wurden, sich nicht mit Dithizon anfärbten (Bild 1, Aph 9.c), färbten sich *in vitro* modifizierte Monozyten vom 10. Kulturtag rot an (Bild 2, Aph 9.c). Diese Färbung ist ein indirekter Nachweis für Insulin (s. auch Text). Die Zellen wurden für ca. 16 Stunden mit Dithizon inkubiert. Vergrößerung: 600x.

*) Siehe hierzu Abb. 10.2 der Promotionsschrift von Andreas Herbst „Untersuchungen zu *in vitro* modifizierten humanen Blutmonozyten: Immunhistochemisch-morphologische Charakterisierung und funktioneller Nachweis von Insulin“. Inaugural-Dissertation der Medizinischen Fakultät Würzburg, Juni 2008.

4.2 Einfluss der Kulturbedingungen auf die Ausbeute *in vitro* modifizierter Monozyten

Einfluss von Human- bzw. Kälberserum

Monozyten wurden mit Humanserum in einer Endkonzentration von 1 und 10 Prozent kultiviert. Dabei war der Anteil Insulin-positiver Monozyten bei beiden Konzentrationen nahezu identisch (Abb. A5 im Anhang). Als nächstes wurden die Zellen in Medium mit fetalem Kälberserum (1 Prozent) kultiviert. Auch hier waren nach 10 Tagen Insulin- und C-Peptid-positive Monozyten nachzuweisen (Abb. A6 im Anhang). Im Kommentar zur Abb. A6 wird dargelegt, dass dieses Ergebnis die Annahme unterstützt, dass *in vitro* kultivierte Monozyten in der Lage sind, Insulin zu synthetisieren.

Einfluss von Cytokinen

Ruhnke et al. (2005) bezeichneten in ihrer Publikation das X-Medium als „Dedifferenzierungsmedium“, in dem sich periphere Blutmonozyten dedifferenzieren, d.h. sie gehen in ein Stadium der Plastizität und Programmierbarkeit über. Hierfür wichtig scheinen die Cytokine M-CSF und IL-3 zu sein (Tab. 3.2). Wir sind davon ausgegangen, dass sich in diesem „Dedifferenzierungsmedium“ zwar Vorläuferzellen, aber noch keine Insulin- und C-Peptid-positiven Monozyten nachweisen lassen. Nach den Ausführungen von Ruhnke et al. wären solche Monozyten erst im Y-Medium (Tab. 3.2), dem „Differenzierungsmedium“, zu erwarten gewesen. Um dies zu überprüfen, wurden Monozyten für 6 Tage im X-Medium kultiviert und anschließend analysiert (Abb. 4.8 und Tab. 4.1). In den Präparaten waren 46 ± 11 Prozent der Zellen CD14-positive Monozyten, 61 ± 9 Prozent positiv für Insulin und 43 ± 10 Prozent positiv für C-Peptid (Abb. 4.8).

Weiter wurde überprüft, ob sich der Anteil Insulin-positiver Zellen auch ohne den Wechsel in das Y-Medium am 6. Kulturtag erhöht. Hierzu wurden Monozyten bis Tag 10 in X-Medium kultiviert. Der Anteil CD14-positiver Monozyten nahm von 46 Prozent am Tag 6 auf 59 Prozent am Tag 10 leicht zu (Tab. 4.1, Abb. 4.9). Dementsprechend nahm auch der Anteil C-Peptid-positiver Zellen leicht zu, während der Anteil Insulin-positiver Zellen leicht abnahm (Tab. 4.1).

Verglichen mit den Färbeergebnissen von Monozyten, die nach dem „Kieler-Protokoll“ (Tab. 4.1) gezüchtet wurden, ist auffällig, dass sich beide Protokolle in der Anzahl Insulin- und C-Peptid-positiver Monozyten kaum unterscheiden. Dies lässt vermuten, dass für die Entwicklung Insulin-positiver Monozyten die Cytokine des Y-Mediums nicht zwingend erforderlich sind.

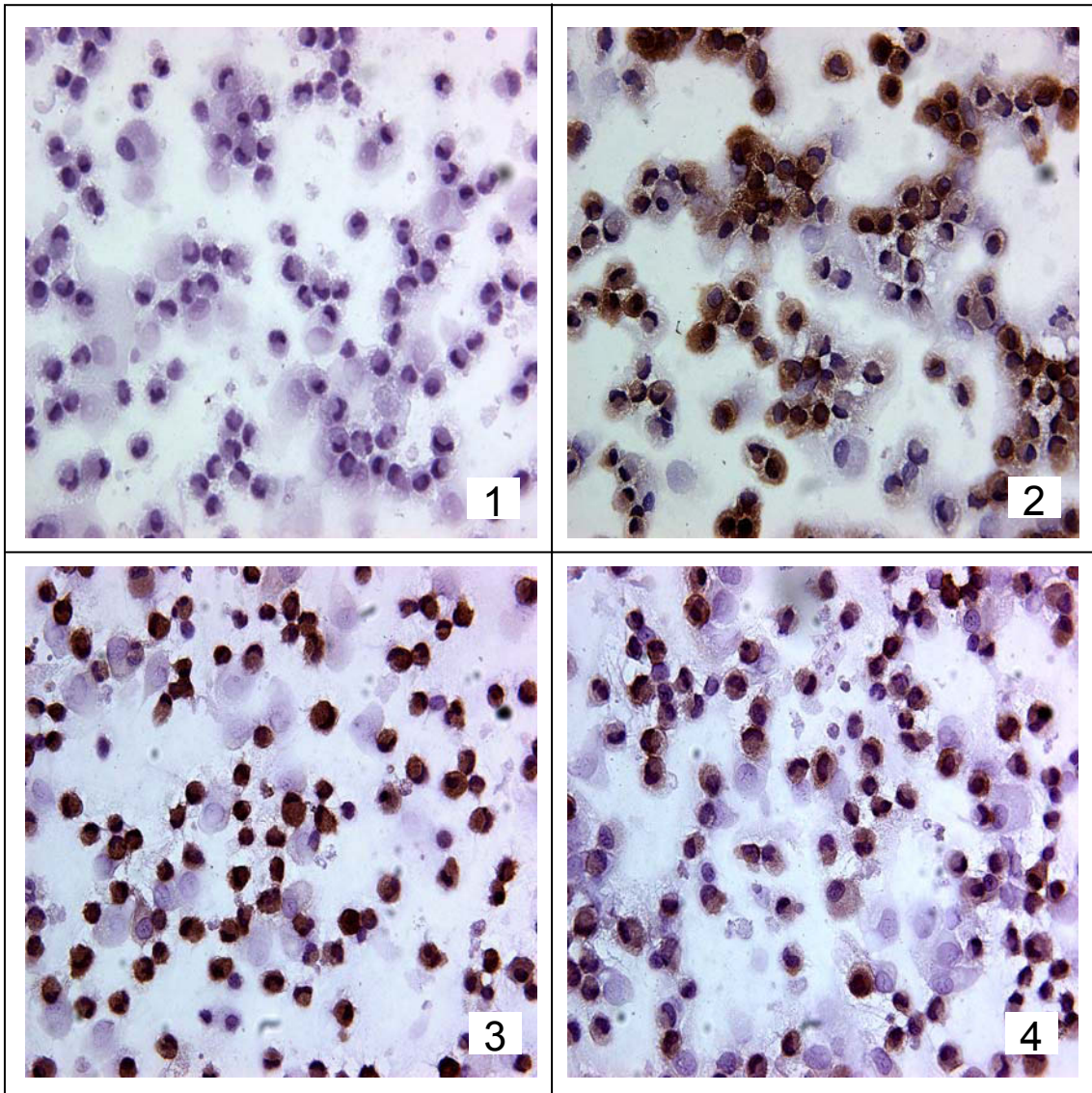


Abb. 4.8: Monozyten vom 6. Kulturtag sind positiv für Insulin und C-Peptid. (1) Negativkontrolle (Aph 10.2); (2) CD14 (Aph 10.2); (3) Insulin (Aph 10.1); (4) C-Peptid (Aph 10.1). Die Zellen wurden in X-Medium kultiviert (Tab. 3.2). Siehe hierzu auch die Ausführungen auf S. 31. Vergrößerung: 600x.

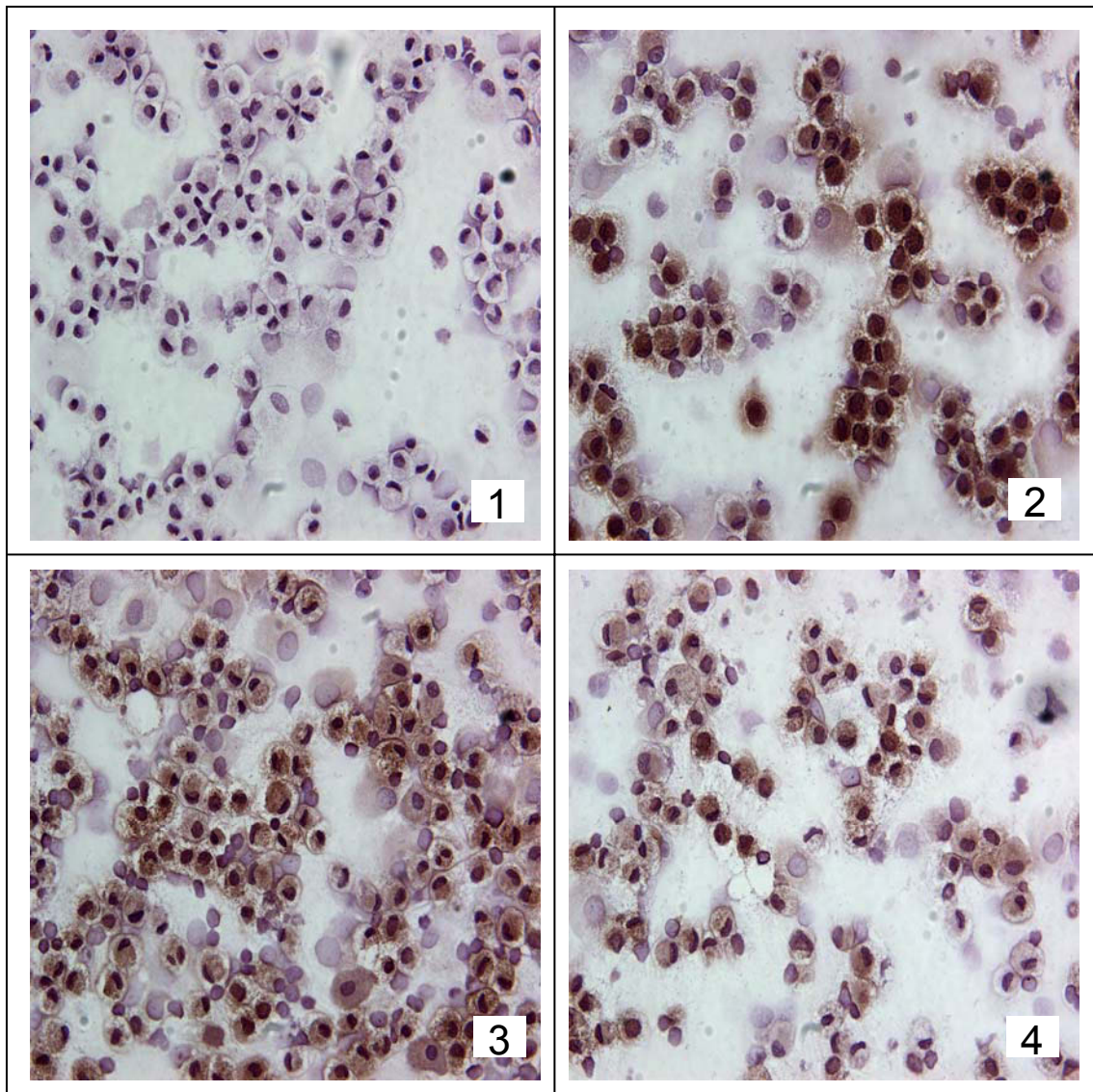


Abb. 4.9: Monozyten vom 10. Kulturtag sind auch dann positiv für Insulin und C-Peptid, wenn sie ausschließlich in X-Medium kultiviert wurden. (1) Negativkontrolle (Aph 19.2); (2) CD14 (Aph 19.2); (3) Insulin (Aph 19.2); (4) C-Peptid (Aph 19.2). Vergrößerung: 600x. Die Zellen wurden in X-Medium kultiviert (Tab. 3.2). Siehe hierzu auch die Ausführungen auf S. 31.

Tab. 4.1: Einfluss von Kulturmedium und Kulturdauer auf die Anzahl Insulin- und C-Peptid-positiver Monozyten. Der Anteil Insulin-, C-Peptid- und CD14-positiver Monozyten ist in Prozent (Mittelwert \pm Standardabweichung) angegeben. Die Anzahl Insulin-positiver Zellen nach zehn Tagen Kultur in X-Medium ist mit der Anzahl Insulin-positiver Zellen, die in X- bzw. Y-Medium kultiviert wurden, vergleichbar. Bei diesen Versuchen wurde darauf geachtet, dass jeweils Monozyten eines Spenders mit den Medien (X-Medium; X/Y-Medium) kultiviert wurden.

	X-Medium	X- / Y-Medium ^{*)}	X-Medium
	Tag 6	Tag 10	Tag 10
Insulin	61 \pm 9	69 \pm 8	54 \pm 6
C-Peptid	43 \pm 10	49 \pm 30	48 \pm 7
CD14	46 \pm 11	60 \pm 4	59 \pm 11
Anzahl Präparate ^{**)}	13	24	6
Anzahl Spender ^{***)}	4	10	3

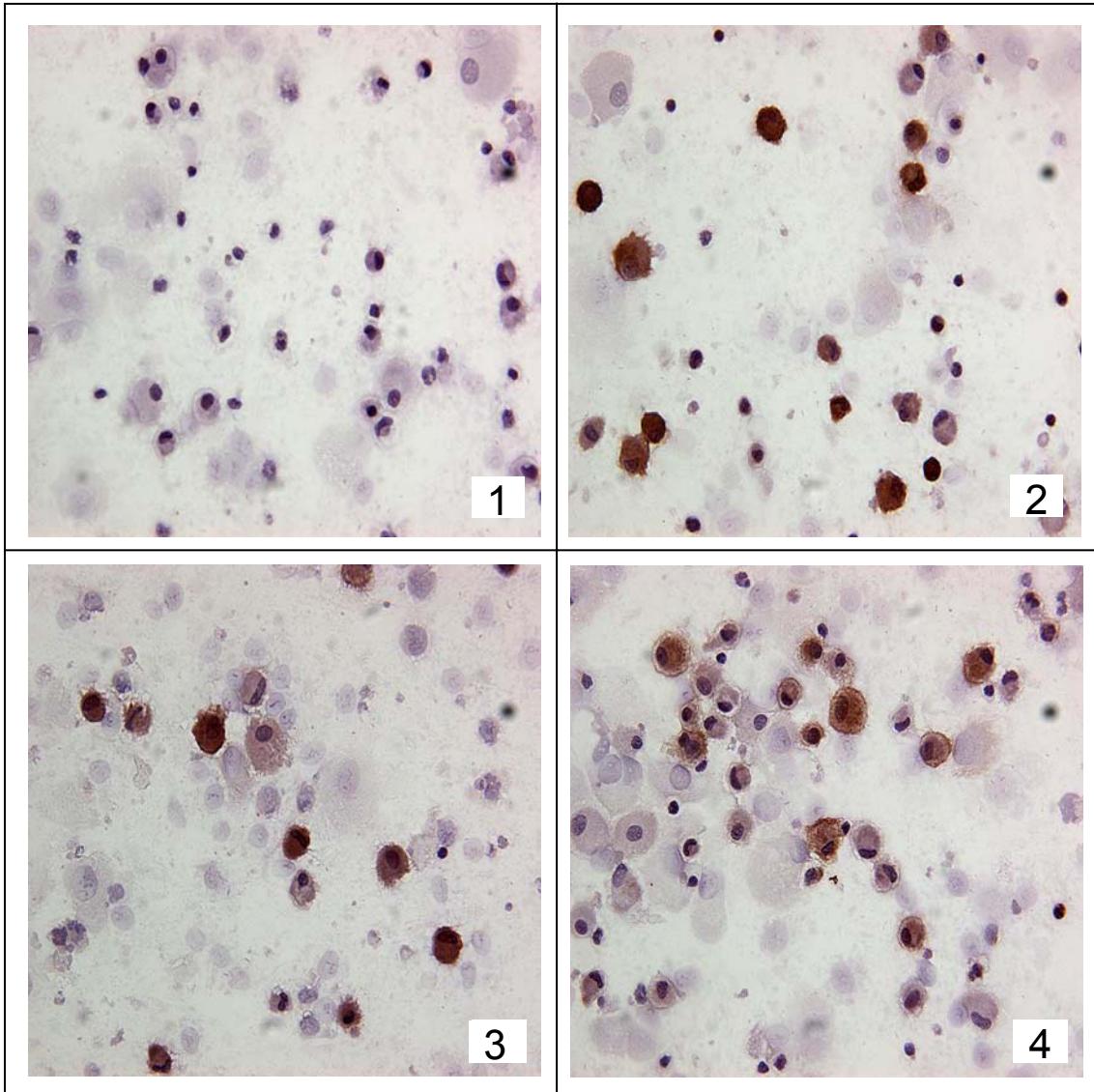
^{*)} Hierbei handelt es sich um das Original „Kieler-Protokoll“: Die Monozyten werden für 6 Tage in X-Medium und für weitere 4 Tage in Y-Medium kultiviert (Tab. 3.2).

^{**)} Hierbei handelt es sich um die Anzahl der untersuchten Präparate.

^{***)} Hierbei handelt es sich um die Anzahl der untersuchten Spender.

Des Weiteren wurde untersucht, ob Insulin-positive Monozyten auch ohne den Einfluss der im X-Medium befindlichen Cytokine M-CSF und IL-3 nachzuweisen sind. Hierzu wurden Monozyten für zehn Tage in RPMI-Medium (mit 1 Prozent Humanserum) ohne Zugabe der beiden Cytokine kultiviert. Auch unter diesen Bedingungen wurden Insulin- und C-Peptid-positiv Monozyten nachgewiesen (Abb. 4.10). Sie unterschieden sich morphologisch nicht von den Monozyten, die mit dem „Kieler-Protokoll“ kultiviert wurden, jedoch war ihr Anteil deutlich verringert (Abb. 4.11).

Abb. 4.10 (S. 35): Monozyten vom 10. Kulturtag sind Insulin-positiv, auch wenn sie ohne die Cytokine des X-Mediums (Tab. 3.2) kultiviert werden. Repräsentative Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen. Das Kulturmedium enthielt ein Prozent Humanserum (zuzüglich Glutamin und PenStrep; Tab. 3.2). Auch mit diesem Medium wurden Insulin- und C-Peptid-positiv Monozyten nachgewiesen. (1) Negativkontrolle (Aph 20); (2) CD14 (Aph 20); (3) Insulin (Aph 20); (4) C-Peptid (Aph 20). Vergrößerung: 600x.



Um die Vermutung zu überprüfen, dass die Cytokine des X-Mediums (M-CSF und IL-3) die Zellteilung kultivierter Monozyten stimulieren, wurden die Zellen nach zehn Tagen in Kultur mit HyQ-Tase abgelöst und die Gesamtzellzahl mit einer Neubauerzählkammer bestimmt. Mit dem „Kieler-Protokoll“ (sechs Tage X-Medium + vier Tage Y-Medium) wurden $1,4 \times 10^6 \pm 0,4 \times 10^6$ Zellen ($n=22$) aus einer mittleren Zellkulturflasche geerntet (Abb. 4.11). Die größte Zellausbeute mit $3,3 \times 10^6 \pm 0,9 \times 10^6$ Zellen erhielt man nach einer zehntägigen Kultur in X-Medium ($n=15$ Zellernten). Dies ist, im Vergleich zum „Kieler-Protokoll“, eine Zunahme der Zellzahl um 236 Prozent. Ohne Zusatz der Cytokine IL-3 und M-CSF wurden $0,5 \times 10^6 \pm 0,5 \times 10^6$ ($n=4$ Zellernten) geerntet.

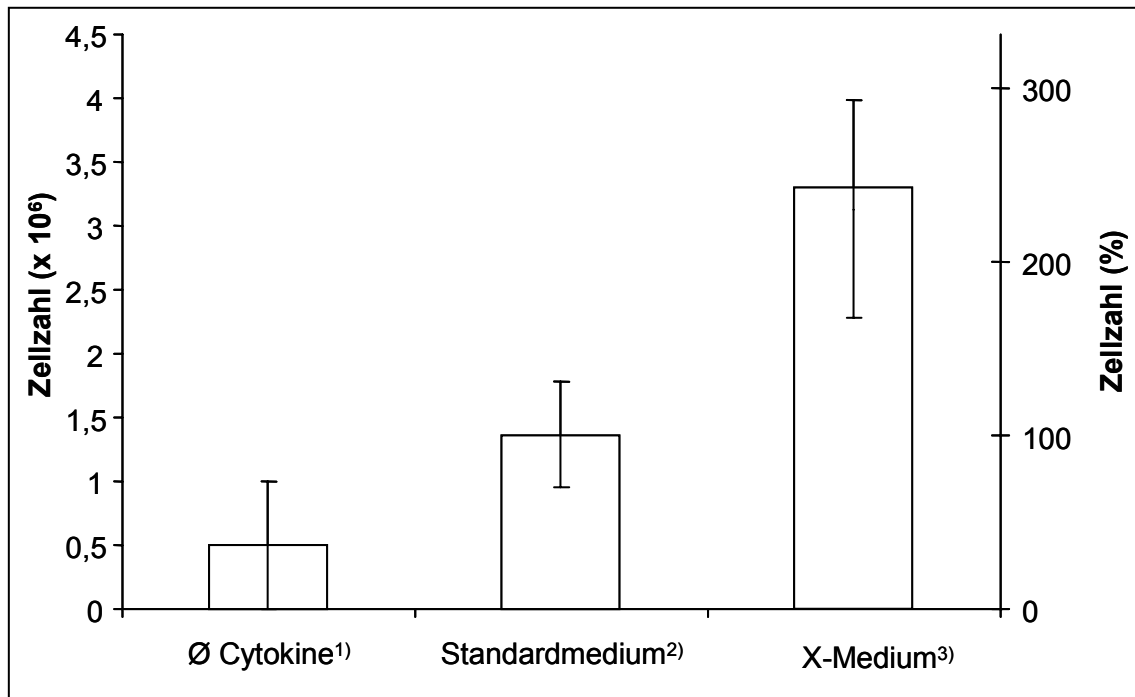


Abb. 4.11: Abhängigkeit der Ausbeute Insulin-positiver Monozyten von den Cytokinen im Kulturmedium. Die Zellen wurden am 10. Kulturtag geerntet und gezählt. ¹⁾Kulturmedium ohne Cytokine; ²⁾Kulturmedium mit Cytokinen des X- und Y-Mediums („Kiel-Protokoll“, Tab. 3.2). Die Zellen wurden für 6 Tage in X-Medium und für 4 Tage in Y-Medium kultiviert (Abb. 3.1); ³⁾Kulturmedium mit Cytokinen des X-Mediums (Tab. 3.2). Die Zellzahlen sind im Text aufgeführt. Auffällig ist der mehr als doppelt so starke Anstieg geernteter Monozyten, wenn diese ausschließlich 10 Tage in X-Medium und nicht wie im „Kiel-Protokoll“ beschrieben, mit Y-Medium kultiviert wurden. Ohne die Cytokine des X-Mediums reduzierte sich die Zellausbeute auf die Hälfte.

4.3 Nachweis der biologischen Aktivität von „Monozyten“-Insulin

Um die biologische Aktivität des „Monozyten“-Insulins zu bestätigen, wurde das isolierte Insulin diabetischen C57BL/6 Mäusen verabreicht. Die Negativkontrollen sind in Tab. 4.2 und Abb. 4.12, die Positivkontrollen in Tab. 4.3 und Abb. 4.13 gezeigt. Wie erwartet, senkten weder PBS, noch zellfreie Überstände aus humanen Fibroblasten und peripheren Blutzellen (jeweils n=4) die Blutzuckerspiegel diabetischer Tiere. Die Schwankungen der Blutzuckerspiegel nach „oben“ bzw. „unten“ lagen bei max. 15 Prozent (Tab. 4.2) und sind vermutlich damit zu erklären, dass die Tiere zum Zeitpunkt der Blutzuckermessung nicht nüchtern waren. Um die Blutzucker-senkenden Eigenschaften zellfreier Überstände sicher beurteilen zu können, wurde der *cutoff* auf 15 Prozent gesetzt; d.h. der Blutzuckerspiegel muss ≥ 15 Prozent vom Ausgangs-

wert abfallen. Ein derartiger starker Abfall des Blutzuckerspiegels wurde bei keiner der Negativkontrollen beobachtet (Tab. 4.2).

Tab. 4.2: Zellfreie Lysate Insulin-negativer Zellen senke *n* nicht den Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse. Getestet wurden zellfreie Lysate humaner Fibroblasten und frisch isolierter peripherer Blutleukozyten (PBL). Zudem wurde PBS (Abschnitt 3.1) als garantiert insulinfreie Salzlösung getestet. Gezeigt sind die Blutzuckerspiegel in mg/dL vor und nach subkutaner Injektion. Das Injektionsvolumen betrug jeweils 100 µL (s. auch Abb. 4.12). ZC: Zellcharge.

ZC	Tiernummer/ Aph-Nr.	24 Stunden vor Injektion	Injektion	Zeit nach Injektion		
				1 Stunde	5 Stunden	24 Stunden
Zellfreie Lysate¹⁾ von jeweils 1,5x10⁷ PBL						
1	25;1/ 24	460	444	460	445	514
2	25;4/ 24	353	375	404	468	472
3	25;4/ 25	320	304	326	404	375
4	25;3/ 25	574	549	536	516	534
Mittelwert:		427	418	432 (3,3↑) ^{*)}	458 (9,6↑)	474 (13,4↑)
Standardabweichung:		115	104,5	88,7	46,7	70,7
Zellfreie Lysate von jeweils 1x10⁷ humanen Fibroblasten						
1	12;4	510	466	389	391	368
2	23;1	537	586	571	543	600
3	23;3	512	600	583	591	600
4	25;3	534	523	536	589	581
Mittelwert:		523	544	520 (4,4↓) ^{*)}	529 (2,8↓)	537 (1,3↓)
Standardabweichung:		14,2	61,7	89,4	94,3	113,2
PBS 100 µL						
1	15;5	453	425	451	600	358
2	14;1	---	401	457	469	489
3	12;4	391	368	349	373	437
4	11;4	320	390	406	394	484
Mittelwert:		388	396	416 (5↑) ^{*)}	459 (16,9↑)	442 (11,6↑)
Standardabweichung:		66,6	23,7	50	102,6	60,7

^{*)} Zahlen in der Klammer: Prozentuale Abnahme des Blutzuckerspiegels (Δ%). Zur Berechnung siehe Tab. 4.3. Zur Beurteilung möglicher Blutzucker-senkender Eigenschaften zellfreier Lysate bzw. Pufferlösungen sind nur die mit „↓“ markierten Prozentzahlen von Bedeutung.

¹⁾ Siehe hierzu auch Kapitel 3.10 „In vivo Testung von „Monozyten-Insulin“.

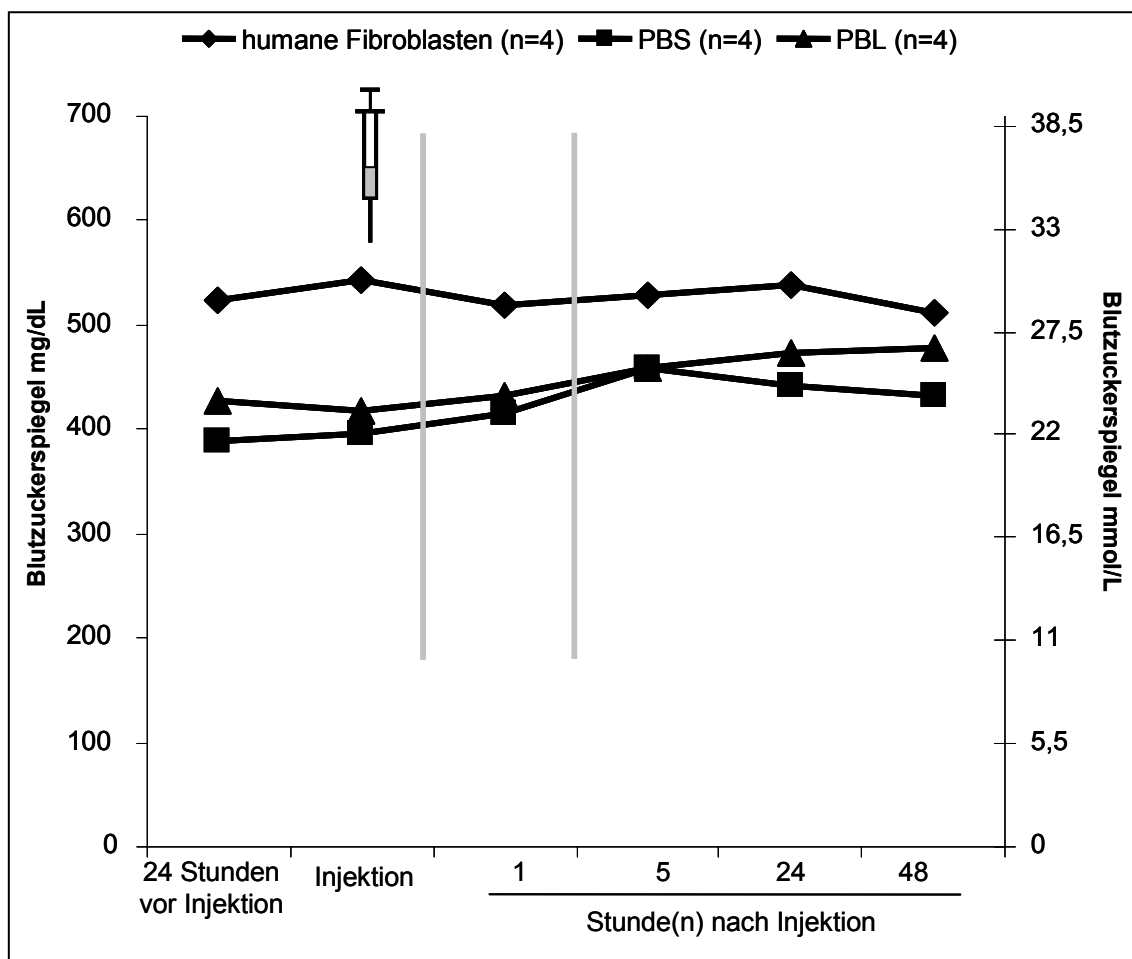


Abb. 4.12: Zellfreie Lysate Insulin-negativer Zellen senken nicht den Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse. Getestet wurden zellfreie Lysate humaner Fibroblasten (h. Fibroblasten) und frisch isolierter peripherer Bluteukozyten (PBL). Hierzu wurden jeweils 1×10^7 Zellen im Ultraschallbad lysiert (s. hierzu auch Abschnitt 3.10). Eine weitere Negativkontrolle war PBS. Gezeigt sind die Blutzuckerspiegel in mg/dL vor und nach subkutaner Injektion (s. auch Tab. 4.2).

Als Positivkontrolle wurden 0,4 IE (Abschnitt 3.10) aufgereinigtes porcines Insulin (n=4) verwendet^{*)}. Hiermit wurden die Blutzuckerspiegel um 76 ± 9 Prozent eine Stunde nach Injektion gesenkt (Tab. 4.3). Nach 24 Stunden erreichten die Blutzuckerspiegel wieder ihre Ausgangswerte. Weitere Positivkontrollen waren zellfreie Überstände von aufgeschlossenen Insulinomzellen (ca. 1×10^7 ; n=4) und isolierten Langerhans-Inseln (ca. 3000 IEQ; n=4). Das aus Insulinomzellen isolierte Insulin senkte kurzfristig den Blutzuckerspiegel der Mäuse um 45 ± 17

^{*)} Folgende Beziehung wurde für die Berechnung zugrunde gelegt: 1 IE/L Insulin = 41,67 µg/L = 7,3 nmol/L.

Prozent eine Stunde nach Injektion; das aus porcinen Langerhans-Inseln isolierte Insulin um 66 ± 20 Prozent (Tab. 4.3).

Tab. 4.3: Zellfreie Lysate Insulin- positiver Zellen senke *n* den Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse. Getestet wurden zellfreie Lysate porciner Langerhans-Inseln und Ins-1-Zellen. Die porcinen Langerhans-Inseln mit den Isolierungsnummern I-08-06 (Tier 1-3) und I-10-06 (Tier 4) wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. K. Ulrichs zur Verfügung gestellt. Als Kontrolle wurde porcines Insulin (Calbiochem/Merk Biosciences GmbH, Deutschland) getestet. Gezeigt sind die Blutzuckerspiegel in mg/dL vor und nach subkutaner Injektion; Injektionsvolumen: 100 μ L.

ZC	Tiernummer	24 Stunden vor Injektion	Injektion ^{*)}	Stunde(n) nach Injektion		
				1 ($\Delta\%$) ^{**)}	5 ($\Delta\%$)	24
Zellfreie Lysate^{***)} von jeweils 1×10^7 Ins-1 Zellen						
1	19;3	563	421	279 (33,8 \downarrow)	517 (22,8 \uparrow)	456
2	20;4	---	571	354 (38,0 \downarrow)	600 (5,1 \uparrow)	600
3	19;1	403	482	298 (38,2 \downarrow)	314 (34,9 \downarrow)	438
4	20;1	445	430	125 (70,9 \downarrow)	508 (18,1 \uparrow)	466
Mittelwert:		470	476	264 (45,2 \downarrow)	485 (2,8 \uparrow)	490
Standardabweichung:		83,0	68,8	98,0 (17,2 \downarrow)	121,1 (26,2)	74,2
Zellfreie Lysate von jeweils 3000 Inseläquivalenten^{****)}						
1	20;3	---	399	92 (76,9 \downarrow)	234 (41,4 \downarrow)	424
2	19;3	456	320	80 (75,0 \downarrow)	108 (66,3 \downarrow)	345
3	20;5	600	462	109 (76,4 \downarrow)	368 (20,4 \downarrow)	472
4	21;5	600	600	385 (35,8 \downarrow)	594 (1,0 \downarrow)	582
Mittelwert:		552	445	167 (66,0 \downarrow)	326 (42,6 \downarrow)	456
Standardabweichung:		83,1	118,4	146,1 (20,2)	207,8 (23)	99,1
Porcines Insulin (0,4 IE)						
(1) ¹⁾	20;3	424	454	91 (80,0 \downarrow)	514 (13,2 \uparrow)	600
(2)	20;4	600	600	115 (80,8 \downarrow)	375 (37,5 \downarrow)	600
(3)	20;4	600	600	224 (62,7 \downarrow)	600	600
(4)	20;1	438	347	68 (80,4 \downarrow)	306 (11,8 \downarrow)	502
Mittelwert:		516	500	156 (76,0 \downarrow)	449 (24,7 \downarrow)	576
Standardabweichung:		97,7	123,2	69,0 (8,9)	132,9 (18,2)	49

^{*)}Zum Zeitpunkt der Injektion ^{**)}Die prozentuale Abnahme des Blutzuckerspiegels ($\Delta\%$) wurde nach folgender Formel berechnet: $(a-b/a) \times 100$, a = Blutzuckerspiegel zum Zeitpunkt der Injektion und b = Blutzuckerspiegel nach Injektion. Prozentwerte mit „ \downarrow “ bzw. „ \uparrow “ markieren abfallende bzw. ansteigende Blutzuckerwerte. ^{***)}Siehe hierzu auch Abschnitt 3.10 „In vi vo Testung von „Monozyten“-Insulin.“ ^{****)}Inseläquivalente: Maß zur Quantifizierung von Langerhans-Inseln. ¹⁾Anzahl der Wiederholungen mit einer Stammlösung. ZC: Zellcharge.

Zellfreie Lysate Insulin-positiver Zellen (Ins-1 Zellen) bzw. Gewebe (porcine Langerhans-Inseln) senkten, im Gegensatz zu zellfreien Lysaten Insulin-negativer Zellen (Tab. 4.3), den Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse. Zudem verliert Insulin, das im Ultraschallbad aus Zellen herausgelöst wurde, nicht seine biologische Aktivität.

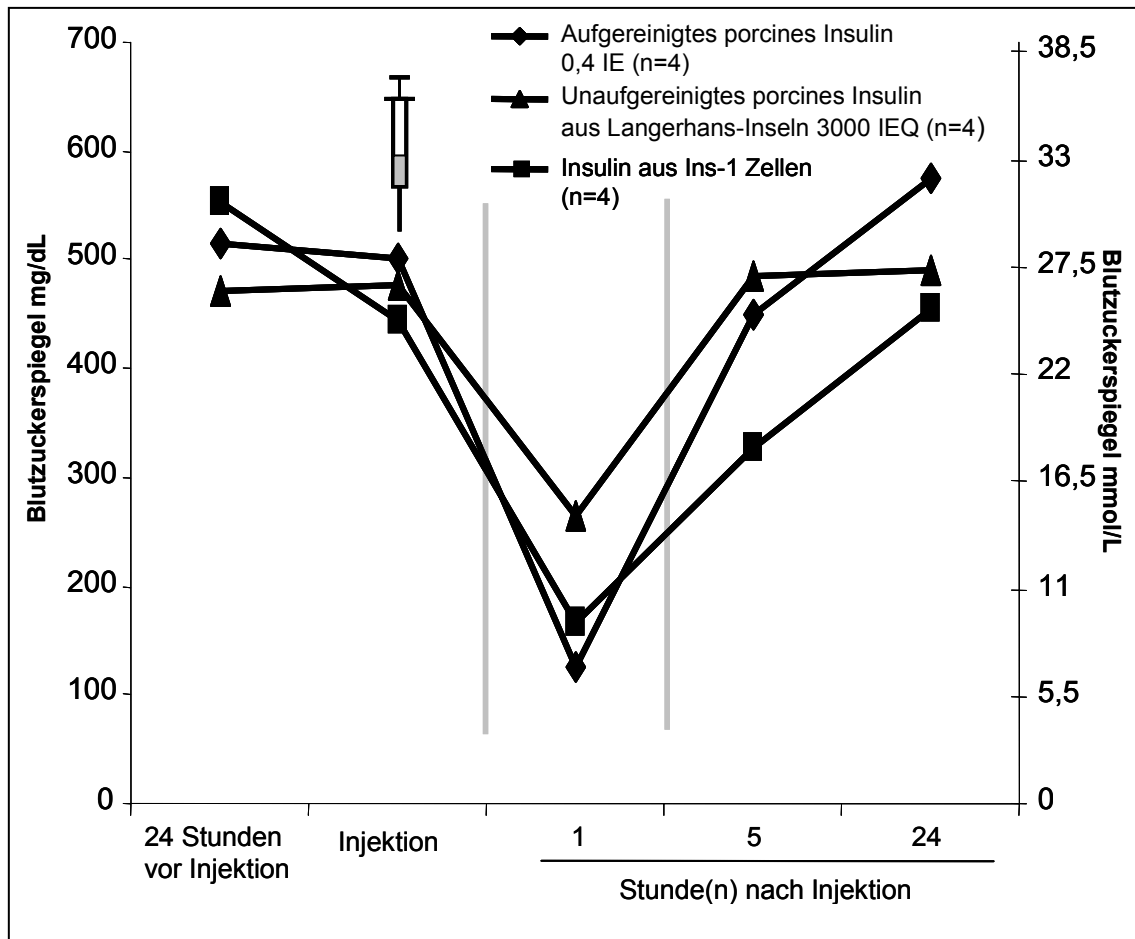


Abb. 4.13: Zellfreie Lysate Insulin-positiver Zellen senken den Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse. Getestet wurden zellfreie Lysate porciner Langerhans-Inseln (p. Insulin) und Ins-1-Zellen (r. Insulin; siehe auch Tab. 4.3). Gezeigt sind die Blutzuckerspiegel in mg/dL vor und nach subkutaner Injektion. Als Kontrolle wurden 0,4 IE porcines Insulin getestet. Siehe auch die Erläuterungen zur Tab. 4.3.

Nach diesen Vorexperimenten wurde nun das Insulin *in vitro* modifizierter Monozyten getestet. Das aus jeweils 3×10^6 kultivierten Monozyten (vom Kulturtag 10) isolierte Insulin senkte den Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse um 45 ± 17 Prozent eine Stunde nach Injektion ($n=8$; Tab. 4.4). Als nächstes wurden

zellfreie Überstände von Monozyten überprüft, die entgegen dem „Kieler-Protokoll“ (Tab. 3.2), für zehn Tage im X-Medium kultiviert wurden. Wie in Tab. 4.1 gezeigt, unterschieden sich Monozyten dieser Kultur nicht von jenen, die mit dem „Kieler-Protokoll“ gezüchtet wurden. Das aus diesen Monozyten isolierte Insulin war ebenfalls biologisch aktiv; es senkte den Blutzuckerspiegel um $28 \pm 0,9$ Prozent ($n=2$; Tab. 4.4). Ob aus diesen Monozyten weniger Insulin isoliert wurde, als aus solchen Monozyten, die mit dem „Kieler-Protokoll“ gezüchtet wurden, ist wegen der geringen Fallzahl abschließend nicht zu beurteilen.

Tab. 4.4: Zellfreie Lysate in vitro modifizierter Monozyten senken den Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse Injektion. Drei Millionen vitale und Insulin-positive Zellen vom 10. Kulturtag wurden im Ultraschallbad aufgeschlossen und das im Überstand befindliche Insulin (= zellfreies Lysat) getestet. Monozyten wurden mit Cytokinen des X- und Y-Mediums („Kieler-Protokoll“, Tab. 3.2) oder ausschließlich mit Cytokinen des X-Mediums kultiviert (Tab. 3.2). Gezeigt sind die Blutzuckerspiegel in mg/dL vor und nach subkutaner Injektion (s. auch Abb. 4.14). ZC: Zellcharge.

ZC	Tiernummer/ Aph-Nr.	24 Stunden vor Injektion	Injektion *)	Stunde(n) nach Injektion		
				1 ($\Delta\%$ **)	5 ($\Delta\%$)	24
Zellfreie Überstände aus 3×10^6 Insulin-positiven Monozyten: „Kieler-Protokoll“						
1	8;2/ 9.d	413	470	186 (60,4↓)	297 (36,8↓)	428
2	8;5/ 10.1	377	488	161 (67,0↓)	292 (40,2↓)	356
3	11;2/ 11.2	408	600	248 (58,7↓)	600	445
4	12;2/ 15.2	600	512	338 (34,0↓)	331 (35,4↓)	379
5	14;2/ 19.1	564	600	325 (45,8↓)	505 (15,8↓)	502
6	21;1/ 23	364	369	240 (35,0↓)	329 (10,8↓)	387
7	25;1/ 25	561	569	256 (55,0↓)	468 (17,8↓)	444
8	25;2/ 24	400	423	225 (46,8↓)	530 (25,9↑)	479
Mittelwert:		461	504	247 (50,3↓)	419 (16,4↓)	428
Standardabweichung:		96,5	83,6	61,1 (12,0)	120,6 (22,0)	50,6
Zellfreie Überstände aus 3×10^6 Insulin-positiven Monozyten: X-Medium						
9	21;3/ 21.1	387	356	260 (27,0↓)	379 (6,4↑)	363
10	21;4/ 21.1	547	600	430 (28,3↓)	600	580
Mittelwert:		467	478	345 (27,7↓)	490 (3,2↑)	467
Standardabweichung:		113,1	172,5	120 (0,92)	156,3	153,4

*) Zum Zeitpunkt der Injektion. **) Prozentuale Abnahme des Blutzuckerspiegels ($\Delta\%$). Zur Berechnung siehe Tab. 4.3. Prozentwerte mit „↓“ bzw. „↑“ markieren abfallende bzw. ansteigende Blutzuckerwerte.

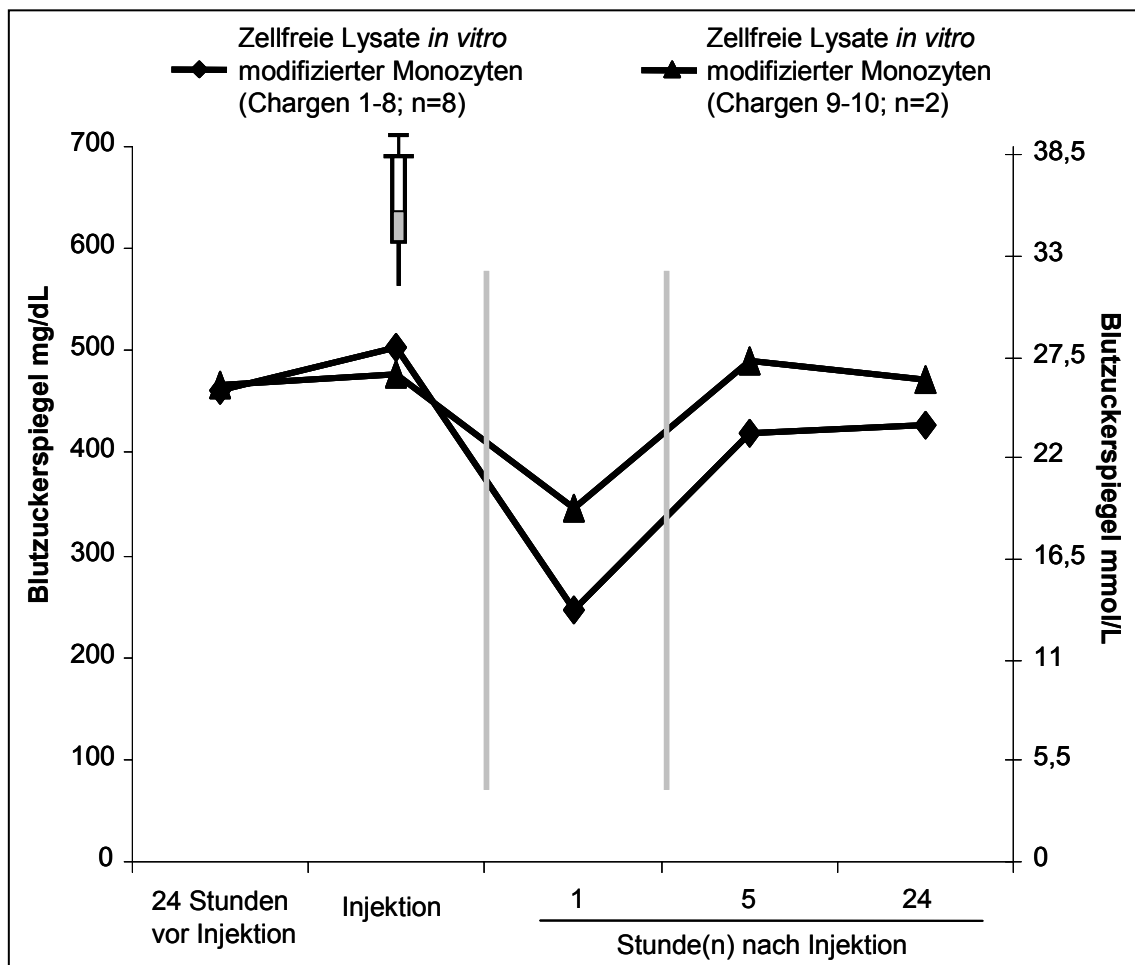


Abb. 4.14: Zellfreie Lysate *in vitro* modifizierter Monozyten senken den Blut - zuckerspiegel diabetischer Mäuse. Getestet wurde das aus jeweils 3×10^6 *in vitro* modifizierten Monozyten isolierte Insulin. Monozyten wurden mit Cytokinen des X- und Y-Mediums („Kieler-Protokoll“, Tab. 4.4) kultiviert und zwar für 6 Tage im X-Medium und für 4 Tage im Y-Medium (Abb. 3.1) (Charge: 1-8). Ebenfalls wurden Monozyten ausschließlich mit Cytokinen des X-Mediums kultiviert (Tab. 4.4) (Charge 9-10). Gezeigt sind die Blutzuckerspiegel in mg/dL vor und nach subkutaner Injektion (s. auch Tab. 4.4).

4.4 Funkti onsnachweis *in vitro* modifizierter Monozyten

Nachdem die biologische Aktivität des zellfreien „Monozyten“-Insulins gezeigt wurde, sollte überprüft werden, ob auch transplantierte Insulin-positive Monozyten in der Lage sind, den Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse zu senken. Als Negativkontrolle wurden $1,0 \times 10^7$ periphere Blutleukozyten pro Maus ($n=4$) transplantiert und als Positivkontrolle $1,0 \times 10^7$ Zellen der Insulinomzelllinie Ins-1 ($n=3$). Während die in der Immunhistochemie Insulin-negativen Blutleukozyten erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die

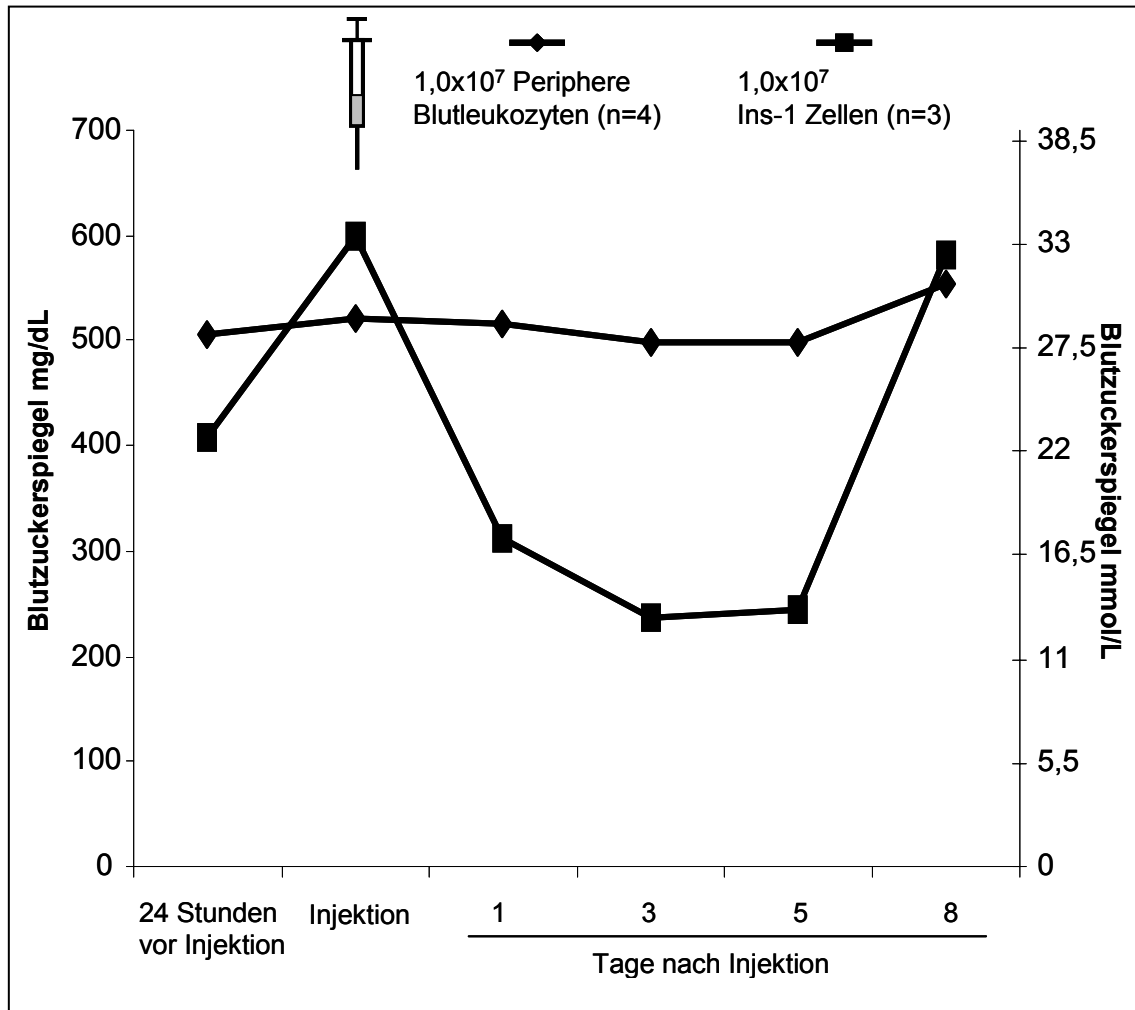
Blutglukosespiegel hatten, senkten die Zellen der Insulinomzelllinie Ins-1 den Blutzuckerspiegel bis zum Zeitpunkt der Abstoßung am Tag 6 (Abb. 4.15 und Tab. 4.5). Da die durch periphere Blutleukozyten ausgelösten Schwankungen größer als 15 Prozent waren (S. 37), wurde der *cutoff* für Zelltransplantate auf 20 Prozent erhöht (Tab. 4.5).

Tab. 4.5: Insulin-positive Zellen (nicht aber Insulin-negative Zellen) senken den Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse. Zellen der Insulinomzelllinie Ins-1 senkten den Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse bis Tag sechs. Periphere Blutleukozyten senkten hingegen die Blutzuckerspiegel nicht. Gezeigt sind die Blutzuckerspiegel in mg/dL vor und nach subkutaner Injektion. ZC: Zellcharge.

ZC	Tiernummer/ Aph-Nr.	24 h vor Injektion	In- jektion ^{*)}	Tag(e) nach Injektion			
				1 ($\Delta\%$) ^{**)}	3 ($\Delta\%$)	5 ($\Delta\%$)	8
Positivkontrolle: $1,0 \times 10^7$ Insulinom-Zellen der Linie INS-1							
1	18;1	506	600	241 (59,8↓)	141 (76,5↓)	207 (65,5↓)	547
2	18;2	377	600	293 (51,2↓)	233 (61,2↓)	228 (62,0↓)	600
3	18;4	338	600	403 (32,8↓)	333 (44,5↓)	296 (50,7↓)	597
Mittelwert:		407	600	312 (48,0↓)	236 (70,7↓)	244 (59,4↓)	581
Standardabweich.:		87,9	0	82,7	96	46,5	29,8
Negativkontrolle: $1,0 \times 10^7$ periphere Blutleukozyten							
1	11;5/ 14.1	460	476	453 (4,8↓)	600 (26,1)	451 (5,2↓)	600
2	11;4/ 14.2	503	573	468 (18,3↓)	496 (13,4↓)	489 (14,7↓)	529
3	11;4/ 14.2	489	529	545 (3,0↑)	487 (7,9↓)	471 (11,0↓)	487
4	11;3/ 14.1	574	505	600 (18,8↑)	497 (1,6↓)	585 (15,8)	600
Mittelwert:		506	521	517 (0,8↑)	498 (3,2↓)	499 (3,8↑)	554
Standardabweich.:		48,4	41	68,7	79,6	59,4	55,8

^{*)} Zum Zeitpunkt der Injektion. ^{**)} Prozentuale Abnahme des Blutzuckerspiegels ($\Delta\%$). Zur Berechnung siehe Tab. 4.3. Prozentwerte mit „↓“ bzw. „↑“ markieren abfallende bzw. ansteigende Blutzuckerwerte. Standardabweich.: Standardabweichung.

Abb. 4.15 (S. 44): Insulin-positive Zellen (nicht aber Insulin-negative Zellen) senken den Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse. Ausschließlich Insulin-positive Zellen der Insulinomzelllinie Ins-1 senkten den Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse bis zum Zeitpunkt der Abstoßung am Tag 6. Insulin-negative periphere Blutleukozyten beeinflussten zu keinem Zeitpunkt den Blutzuckerspiegel (siehe auch Tab. 4.5). Gezeigt sind die Blutzuckerspiegel in mg/dL vor und nach subkutaner Injektion.



Als nächstes wurden lebende *in vitro* modifizierte Monozyten *in vivo* untersucht. Hierzu wurden $0,5-1 \times 10^7$ kultivierte Monozyten einer zehntägigen Standardkultur in 100 μ L PBS diabetischen Mäusen subkutan injiziert (n=9). Dabei wurde der Blutzuckerspiegel innerhalb einer 1 Stunde nach Transplantation um 39 ± 16 Prozent (n=9) gesenkt. Bis auf Zellcharge 4, die mit $\Delta=10,5$ Prozent keinen Effekt aufwies (Tab. 4.6, Abb. 4.15), wurde dieser Kurzeiteffekt bei den übrigen 8 Zellchargen beobachtet. Darüber hinaus wurde bei 4 von 9 Zellchargen eine Funktion für mehrere Tage beobachtet (Tab. 4.6, Abb. 4.16). Obwohl nicht alle vier Chargen gleich effektiv waren, wurde doch ein verringerter Blutzuckerspiegel bis zum Zeitpunkt der Abstoßung nachgewiesen; ähnlich wie bei den Insulinomzellen Ins-1 (Abb. 4.15).

Tab. 4.6: Insulin-positive Monozyten senken den Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse. Die 9 Chargen Insulin-positiver Monozyten lassen sich in zwei Untergruppen einteilen: Die eine Gruppe (4 von 9 Zellchargen) senkten den Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse für mehrere Tage, während 5 von 9 Zellchargen nur einen Kurzeiteffekt aufwiesen. Gezeigt ist der Blutzuckerspiegel in mg/dL vor und nach subkutaner Injektion. ZC: Zellcharge; TN: Tiernummer;

ZC	TN/ Aph-Nr.	24 h vor Injektion	Injek- tion ^{*)}	Stunde(n)		Tag(e) nach Injektion				
				1(Δ%)	5(Δ%)	1(Δ%)	2(Δ%)	3(Δ%)	5(Δ%)	8(Δ%)
1x10⁷ Insulin-positive Monozyten mit Langzeiteffekt										
1	8;2/ 10.1	470	428	130 (69,6↓)	305 (28,7↓)	300 (30,0↓)	292 (31,8↓)	161 (62,4↓)	100 (76,6↓)	481 (12,4↑)
2	9;3/ 10.2	504	600	301 (49,8↓)	---	284 (52,7↓)	---	413 (31,2↓)	247 (58,8↓)	529 (11,8↓)
3	19;3/ 22.2	415	402	294 (26,9↓)	292 (27,4↓)	406 (1,0↑)	441 (9,7↑)	136 (66,2↓)	398 (1,0↓)	563 (40,1↑)
4	19;2/ 22.2	525	554	496 (10,5↓)	429 (22,6↓)	337 (39,2↓)	336 (39,3↓)	600 (8,3↑)	564 (1,8↑)	572 (3,3↑)
Mittelwert:		479	496	305 (39,2↓)	342 (26,2↓)	332 (30,2↓)	356 (20,5↓)	328 (37,8↓)	327 (33,7↓)	536 (11↑)
Stabw:		48,0	96,0	150	75,6	54,3	76,6	221	199	41,2

1x10⁷ Insulin-positive Monozyten mit Kurzeiteffekt										
5	9;3/ 12.1	502	600	375 (37,5↓)	404 (32,7↓)	504 (16,0↓)	550 (8,3↓)	---	---	600
6	11;5/ 10.2	509	569	361 (36,6↓)	305 (46,4↓)	468 (17,7↓)	---	---	412 (27,6↓)	460 (19,2↓)
7	12;4/ 18.1	373	437	293 (32,9↓)	438 (0,2↑)	---	---	---	---	---
8	20;1/ 21.2	600	583	303 (48,0↓)	445 (23,7↓)	---	430 (26,2↓)	466 (20,1↓)	600 (2,9↑)	600 (2,9↑)
9	21;2/ 21.3	427	338	194 (42,6↓)	600 (77,5↑)	---	600 (77,5↑)	568 (68,1↑)	600 (77,5↑)	529 (56,5↑)
Mittelwert:		482	505	305	438	486	527	517	537	547
Stabw:		86,5	113,7	71,6	106	25,5	87,4	72,1	109	67,1

^{*)} Zum Zeitpunkt der Injektion; ^{**)} Prozentuale Abnahme des Blutzuckerspiegels (Δ%). Zur Berechnung siehe Tab. 4.3. Prozentwerte mit „↓“ bzw. „↑“ markieren abfallende bzw. ansteigende Blutzuckerwerte. (---) keine Messung durchgeführt. Stabw: Standardabweichung.

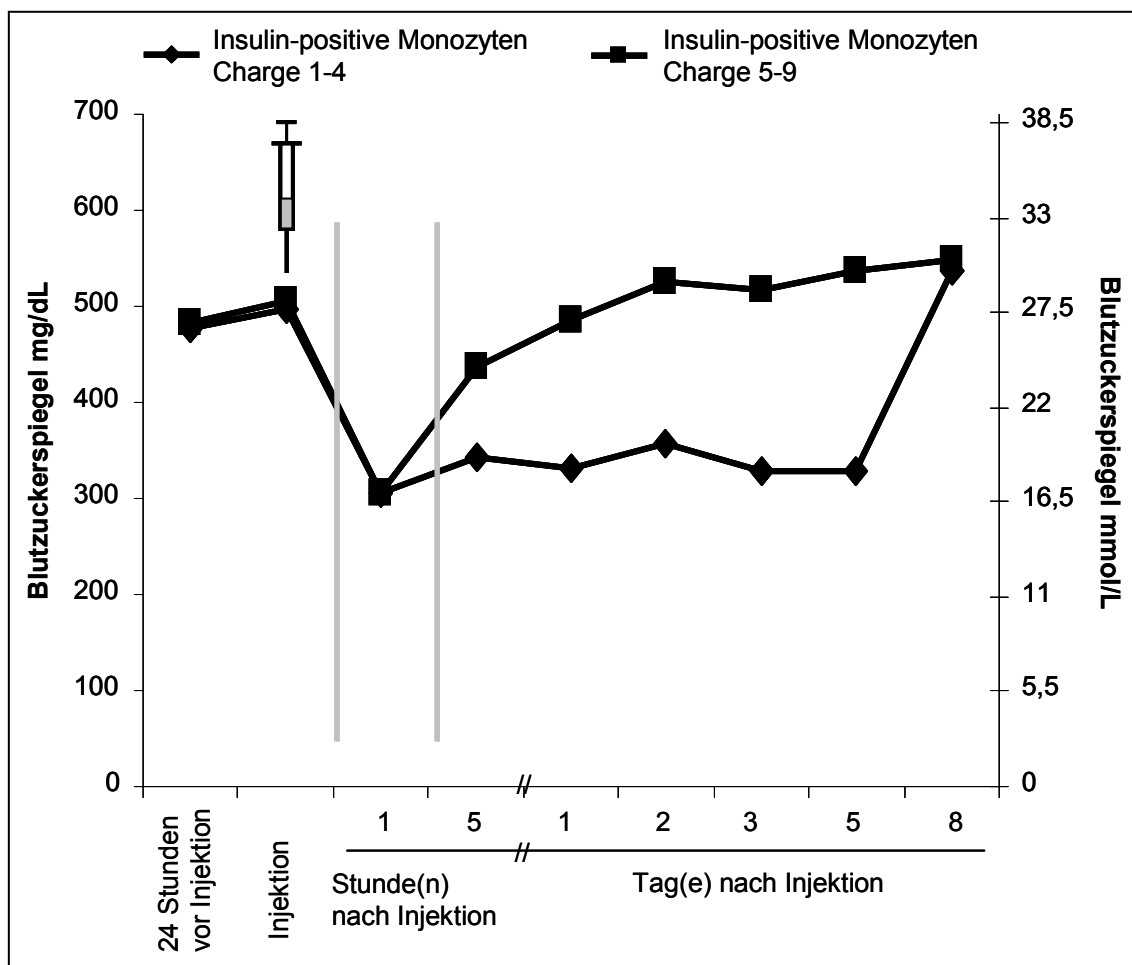


Abb. 4.16: Insulin-positive Monozyten senken den Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse. Hierzu erhielten die Tiere jeweils 1×10^7 Insulin-positive Monozyten. Sämtliche getesteten Zellchargen senkten unmittelbar nach Transplantation den Blutzuckerspiegel der Tiere (Tab. 4.6). Vier von 9 Zellchargen waren zudem für mehrere Tage aktiv. Da immunkompetente Tiere für diese Versuche verwendet wurden, waren die Zelltransplantate am Tag 5 vermutlich soweit durch das Immunsystem zerstört, dass sie ihre Funktion verloren. Gezeigt ist der Blutzuckerspiegel in mg/dL vor und nach subkutaner Injektion. Apheresenummern sind der Tabelle 4.6 zu entnehmen.

Um zu überprüfen, ob der subkutane Transplantationsort möglicherweise doch nicht optimal für Zellen ist, wurden Insulin-positive Monozyten in weiteren Experimenten unter die Nierenkapsel diabetischer immuninkompetenter Mäuse transplantiert. Diese Vorgehensweise erlaubt es, die Funktion der Zelltransplantate unabhängig vom Immunsystem zu untersuchen. Ein weiterer Vorteil dieses Transplantationsortes ist, dass das Zelltransplantat durch eine Nephrektomie wieder entfernt werden kann. Nach Explantation sollte der Blutzucker-

spiegel bei einem ursächlichen Zusammenhang mit dem Zelltransplantat wieder ansteigen. Als Positivkontrolle wurden 5000 Inseläquivalente porciner Langerhans-Inseln unter die Nierenkapsel einer diabetischen Maus transplantiert. Das Zelltransplantat senkte den Blutzuckerspiegel dieses Tiers dauerhaft. Nach 70 Tagen wurde das Zelltransplantat durch Nephrektomie entfernt, worauf hin der Blutzuckerspiegel erneut anstieg (Tab. 4.7, Abb. 4.17). Dies ist ein Beweis dafür, dass die transplantierten Langerhans-Inseln den Blutzuckerspiegel dieser Maus regulierten und nicht etwa Langerhans-Inseln eines möglicherweise sich regenerierten Pankreas.

Tab. 4.7: Langzeitfunktion von Zelltransplantaten in diabetischen, immuninkompetenten Mäusen. In einem Pilotversuch senkten zwei Millionen Insulin-positive Monozyten langfristig den Blutzuckerspiegel (BLZ). Die Monozyten stammten vom 10. Kulturtag und wurden nach dem „Kieler-Protokoll“ kultiviert (Tab. 3.2). Bei der Explantation der Insulin-positiven Monozyten am Tag 100 verstarb das Tier. Die Untersuchung des Pankreas ergab keine Regeneration von Langerhans-Inseln (Daten nicht gezeigt). Als Positivkontrolle wurden porcine Langerhans-Inseln mit der Isolierungsnummer I-15-06 verwendet, die freundlicherweise von Frau Prof. Dr. K. Ulrichs zur Verfügung gestellt wurden. Sie regulierten bis zu ihrer Explantation am Tag 70 den Blutzuckerspiegel. Gezeigt sind die Blutzuckerspiegel in mg/dL; Transplantationsort: Nierenkapsel.

TN/ Aphnr.	24 h vor Injektion	Injektion ^{*)}	Tage nach Injektion									
			10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
2x10⁶ Insulin-positive Monozyten												
4;3	498	445	334	279	265	194	114	214	246	241	192	274
Aph24	Senkung des BLZ (Δ%):		24,9	37,3	40,4	56,4	74,3	52,0	44,7	45,8	56,9	38,4
Positivkontrolle: 5000 IEQ porcine Langerhans-Inseln¹⁾												
1;4	457	521	142	157	209	199	165	170	193	360	507	600
	Senkung des BLZ-Spiegels (Δ%):		72,7	70,0	59,9	61,8	68,3	67,4	63,0	30,9		

^{*)} Zum Zeitpunkt der Injektion. Für die *in vivo* Experimente wurden immuninkompetente Mäuse verwendet. Die prozentuale Abnahme des Blutzuckerspiegels (= Δ%) wurde nach folgender Formel berechnet: $(a-b/a) \times 100$, a = Blutzuckerspiegel zum Zeitpunkt der Injektion und b = Blutzuckerspiegel nach Injektion. ¹⁾ IEQ oder Inseläquivalente sind ein Maß zur Quantifizierung von Langerhans-Inseln.

In einem Pilotversuch wurden zwei Millionen Insulin-positive Monozyten unter die Nierenkapsel einer diabetischen Maus transplantiert (Tab. 4.7, Abb. 4.17).

Diese senkten den Blutzuckerspiegel der diabetischen Maus langfristig um 25 bis 74 Prozent (Tab. 4.7). Der Blutzuckerspiegel blieb dabei langfristig im Bereich von 150-279 mg/dL. Ein möglicher Grund, dass Blutzuckerspiegel unter 100 mg/dL nicht erreicht wurden, könnte die Transplantation einer zu geringen Zellzahl gewesen sein. Dieser Pilotversuch zeigt aber, dass eine langfristige Regulation des Blutzuckerspiegels diabetischer Mäuse durch Insulin-positive Monozyten möglich ist.

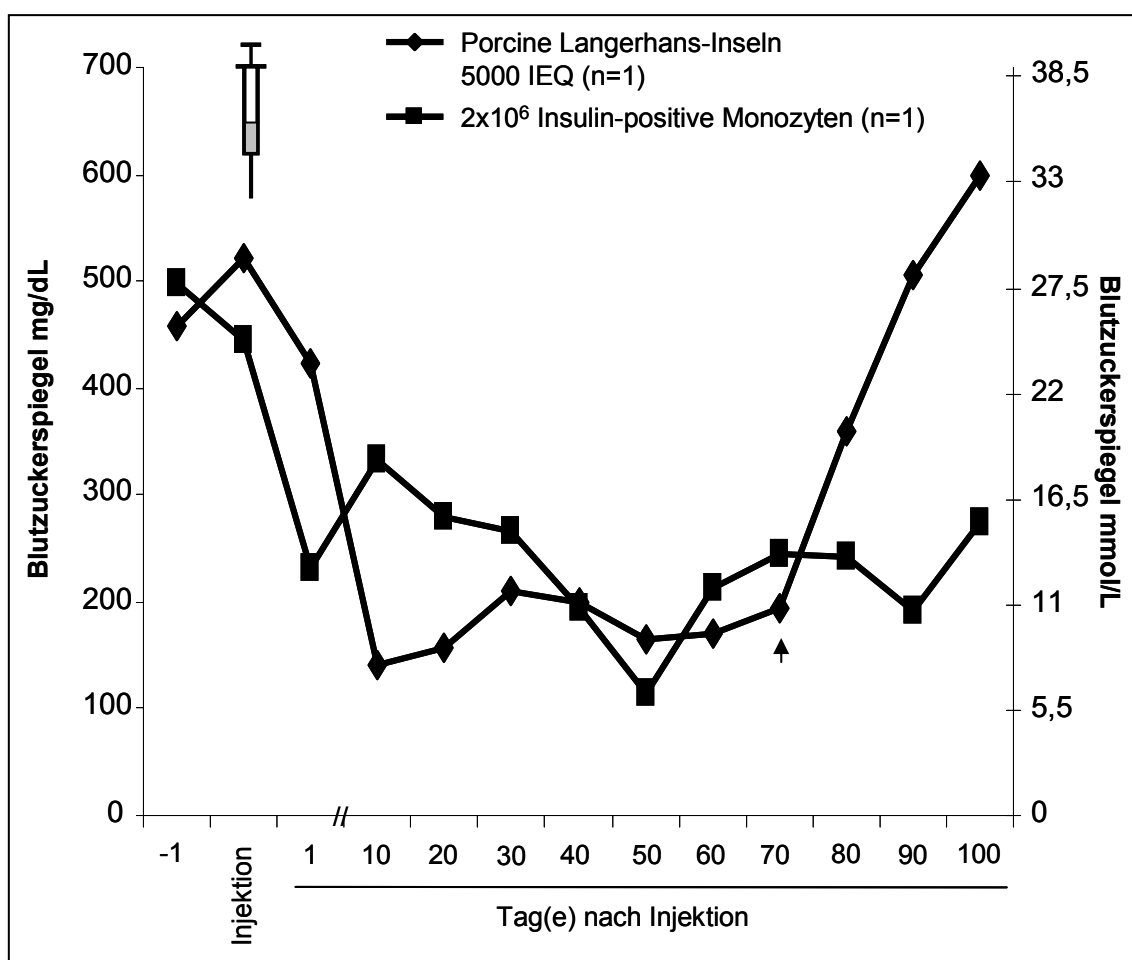


Abb. 4.17: Langzeitfunktion von Zelltransplantaten in diabetischen, immuninkompetenten Mäusen. Die Transplantation porciner Langerhans-Inseln (5000 IEQ) senkte den Blutzuckerspiegel langfristig. Nach Explantation des Zelltransplantates am Tag 70 (Pfeil) stieg der Blutzuckerspiegel erneut an. Auch zwei Millionen Insulin-positive Monozyten senkten den Blutzuckerspiegel langfristig. Siehe auch Anmerkungen zu Tab. 4.7. Gezeigt sind die Blutzuckerspiegel in mg/dL; Transplantationsort: Nierenkapsel.

5 Beantwortung der Fragen

1) Welche Morphologie weisen die mit dem „Kieler-Protokoll“ kultivierten Insulin-positiven Monozyten auf?

In Kooperation mit der Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie wurden Leukozyten gesunder Spender gewonnen und periphere Blutmonozyten durch Adhärenz angereichert. Nach zehntägiger Kultur wurden zwei unterschiedliche Zellformen beobachtet: Zelltyp I wies eine längliche Form auf und war immunhistologisch positiv für Insulin, C-Peptid und CD14. Zelltyp II war kugelförmig und besaß einen großen Cytoplasmasaum. Dieser Zelltyp, der weniger positiv (möglicherweise sogar negativ) für die untersuchten Marker war, wies die Morphologie von Makrophagen in der Dauerkultur auf. Beide Zelltypen wurden zusammen in den Versuchen verwendet. Die von Ruhnke et al. beschriebenen „*Neolslets*“ wurden hingegen nicht nachgewiesen. Hierbei handelt es sich um Zellkluster dedifferenzierter Monozyten, die u.a. für Insulin und Glukagon positiv sind.

2) Welchen Einfluss haben die im „Kieler-Protokoll“ verwendeten Cytokine für die Kultivierung Insulin-positiver Monozyten?

Insulin und C-Peptid wurde in allen kultivierten Monozyten nachgewiesen und zwar unabhängig davon, ob sie mit oder ohne die Cytokine des „Kieler-Protokolls“ (M-CSF, IL-3 sowie HGF und EGF) kultiviert wurden (Abb. 4.9 u. 4.10). Die Cytokine des X-Mediums (M-CSF und IL-3) stimulierten die Zellteilung, weshalb die Zellzahl um mehr als das Doppelte im Vergleich zur Kultur im Standardmedium anstieg. Die Bedeutung der Cytokine des Y-Mediums (HGF und EGF) auf die Entwicklung Insulin-positiver Zellen wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

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 eindeutig biologisch aktiv. Hierzu wurden die Zellen vom Kulturtag 10 untersucht (Abb. 4.14). Die Injektion von „Monozyten“-Insulin, das aus ca. 3×10^6 Zellen isoliert wurde, senkte den Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse innerhalb einer Stunde um durchschnittlich 51 Prozent (Tab. 4.4). Zum Vergleich: Die Injektion von ca. 170 pg Humaninsulin verringerte den Blutzuckerspiegel durchschnittlich um 75 Prozent (Tab. 4.3).

Insulin-positive Monozyten, die subkutan diabetischen, immunkompetenten Mäusen injiziert wurden, beeinflussten bis zu ihrer Abstoßung zwischen Tag 6 und 8 nach Transplantation den Blutzuckerspiegel dieser Tiere (Abb. 4.16). Trotz dieser optimistischen Daten sollte nicht verschwiegen werden, dass 5 von 9 (dies entspricht 56%) getesteten Zelltransplantaten nur eine kurzzeitige Funktion von 24 Stunden zeigten (Abb. 4.16). Der Grund hierfür ist bisher nicht bekannt.

In einem Pilotversuch wurden Insulin-positive Monozyten auch unter die Nierenkapsel einer immuninkompetenten diabetischen Maus transplantiert. Bis zum Zeitpunkt der Explantation (100 Tage nach Transplantation) regulierten die Zellen den Blutzuckerspiegel dieser Maus (Abb. 4.17).

6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war, ein etabliertes Protokoll zur Generierung Insulin-positiver Monozyten zu überprüfen. Zudem wurden die Zellen immunhistochemisch charakterisiert und das aus ihnen isolierte Insulin in diabetischen Mäusen erfolgreich getestet (Abschnitt 4.3). Auch transplantierte Insulin-positive Monozyten senkten den Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse (Abb. 4.16 und 4.17).

Nach einer Publikation von Professor F. Fändrich, Universität Kiel, scheint es möglich, Monozyten *in vitro* zu reprogrammieren, um sie anschließend in Insulin-positive Zellen differenzieren lassen. Hierzu werden Monozyten mit verschiedenen Cytokinen inkubiert (Ruhnke M et al., 2005).

Diabetes mellitus Typ I ist eine Autoimmunerkrankung der Bauchspeicheldrüse, bei der die Insulin-produzierenden Betazellen zerstört werden. Ohne Aussicht auf Heilung sind die Patienten auf die äußere Zufuhr von Insulin angewiesen. Wesentliches Ziel bei der Behandlung von Diabetes ist ein sorgfältig eingestellter Blutzuckerspiegel, um die gefürchteten Spätfolgen der Erkrankung zu vermeiden. Dies ist mit exogenem Insulin bei der Insulinersatztherapie dauerhaft nicht möglich, weshalb häufig schwerwiegende diabetische Komplikationen auftreten (s. auch Einleitung). Häufiges Messen des Blutzuckerspiegels belastet und beeinträchtigt zudem die Lebensqualität („*Writing Team for the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications*“, 2003).

Auch bei sehr gut geschulten Diabetikern kommt es immer wieder zu Hyperglykämien, die Langzeitschäden an den Gefäßen begünstigen (Gerich JE, 2005). Da Insulin-produzierende (Ersatz-) Zellen den Blutzuckerspiegel physiologisch regulieren, werden sie als attraktive Option zur klassischen Insulinersatz-Therapie gesehen. Für den Diabetiker könnte eine solche Betazell-Ersatztherapie eine Verbesserung der Lebensqualität bedeuten und Langzeitschäden verringern oder sogar vermeiden. Verschiedene Ansätze zum Betazell-Ersatz werden daher intensiv erforscht (Jeffcoate W, 2006).

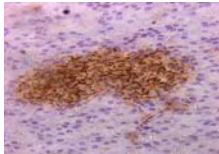
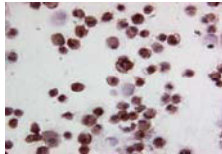
6.1 Anforderungen an die „ideale“ Insulin-produzierende Zelle

Der alleinige immunhistochemische Nachweis von Insulin reicht nicht aus, um Insulin-produzierende Zellen sicher nachzuweisen. Um die Funktion der Betazellen gleichwertig übernehmen zu können, ist für „Ersatzzellen“ die Produktion von Proinsulin und die anschließende Prozessierung zu Insulin zu zeigen. Diese *de novo* Insulin-Synthese wird durch den Nachweis von C-Peptid bestätigt. Dies geschieht entweder immunhistochemisch oder im ELISA. Des Weiteren muss die Insulinsekretion Glukose-abhängig sein, um die komplexe Regulation des Blutzuckerspiegels langfristig zu gewährleisten. Das therapeutische Ziel ist, den Nüchternblutzuckerspiegel in einen physiologischen Bereich von <100 mg/dL bzw. 5,6 mmol/L einzustellen (Deutsche Diabetes Gesellschaft, 2004). Zur Vermeidung postprandialer Blutzuckerspitzen ist die Speicherung von Insulin in Granula unerlässlich, wie sie für Betazellen charakteristisch ist.

In Tabelle 6.1 sind die wesentlichen Anforderungen an die „ideale“ Betazelle aufgelistet. Zudem ist der Tabelle zu entnehmen, welche dieser Anforderungen Insulin-positive Monozyten nach Stand dieser Arbeit erfüllen. So wurden Insulin und C-Peptid in den *in vitro* modifizierten Monozyten immunhistochemisch nachgewiesen (Kapitel 4.1). Auch wurde gezeigt, dass das aus den Monozyten isolierte Insulin biologisch aktiv ist und den Blutzuckerspiegel diabetischer Mäuse kurzfristig senkt (Kapitel 4.3). Hierzu waren auch intakte Insulin-positive Monozyten in der Lage (Kapitel 4.4). Im Rahmen eines Pilotversuchs wurde in einer immuninkompetenten Maus eine langfristige Normoglykämie durch Insulin-positive Monozyten induziert (Abb. 4.17). Trotz dieses Erfolges ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht abschließend geklärt, ob die Zellen wirklich in der Lage sind, langfristig Normoglykämie zu gewährleisten. Ein weiteres zu erfüllendes Kriterium, die Glukose-abhängige Insulinausschüttung, war nicht Gegenstand dieser Arbeit und ist weiterführenden Untersuchungen vorbehalten.*

*Sebastian Heil: Bestimmung der Glukose-abhängigen Insulinausschüttung *in vitro* modifizierter Monozyten. Inaugural-Dissertation der Medizinischen Fakultät der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Fertigstellung 2009.

Tab. 6.1: Anforderung an die „ideale“ Insulin-produzierende Zelle. In dieser Arbeit wurde die Produktion von biologisch aktivem Insulin in humanen Monozyten nachgewiesen.

	Insulin-positive Langerhans Insel	Insulin-positive Monozyten
		
Intrazelluläres Insulin	✓	✓
Intrazelluläres C-Peptid	✓	✓
Biologische Aktivität des isolierten Insulins	✓	✓
Glukose-abhängige Insulinausschüttung	✓	?
Langfristige Normoglykämie	✓	?

6.2 Technische Anforderungen zum sicheren Nachweis Insulin-positiver Zellen

Wie wichtig die kritische Analyse der Daten zu Insulin-positiven Zellen ist, belegen Hinweise aus der aktuellen Literatur. So berichteten Rajagopal et al. (2003), dass das in embryonalen Stammzellen nachgewiesene Insulin nicht immer auf eine zelleigene Synthese hindeutet. Die Autoren wiesen nach, dass es sich hierbei auch um das aus dem Kulturmedium aufgenommene Insulin handeln kann. Für diesen Nachweis setzten die Autoren markiertes Insulin dem Kulturmedium zu. Auch in dieser Arbeit haben wir uns mit der Frage beschäftigt, ob es sich bei dem in kultivierten Monozyten nachgewiesenen Insulin wirklich um *de novo* Insulin handelt, oder ob es von den Zellen aus dem Medium aufgenommen wurde. Da dem Kulturmedium (Tab. 3.2) aber kein Insulin zugesetzt wurde, erscheint diese Annahme nicht sehr wahrscheinlich.

Ein weiteres Indiz dafür, dass es sich beim „Monozyten“-Insulin um *de novo* Insulin handelt, findet sich im Kapitel 4.2 des Ergebnisteils. Unabhängig vom verwendeten Serum (Humanserum, fetales Kälberserum) sind die *in vitro* modifizierten Monozyten positiv für Insulin und C-Peptid. Während der zum Nachweis von Humaninsulin verwendete Antikörper IN-05 auch Insuline anderer Spezies erkennt, ist der anti-C-Peptid-Antikörper C-Pep-01 streng spezies-spezifisch (Abb. 4.4). Sollten mit dem fetalen Kälberserum bovines Insulin und C-Peptid in die Kultur gekommen sein, dann hätten die Monozyten beide Produkte aufnehmen müssen und dies wiederum hätte Konsequenzen für das immunhistochemische Ergebnis: Die Zellen wären IN-05 positiv und C-Pep-01 negativ. Jedoch färbten beide Antikörper die Zellen (Abb. A6 im Anhang). In Vergleichszellen (humanen Fibroblasten) wiederum, deren Kulturmedium 10% Humanserum enthielt, waren weder Insulin noch C-Peptid nachzuweisen. Auch die langfristige Regulation des Blutzuckerspiegels im diabetischen Tier (Abb. 4.16) deutet auf darauf hin, dass *in vitro* modifizierte Monozyten Insulin produzieren.

6.3 Kultivierte Monozyten entwickeln sich mit den Cytokinen des „Kieler-Protokolls“ zu Insulin-positiven Monozyten

Mit dem „Kieler-Protokoll“ gezüchtete Monozyten wurden von den Erstbeschreibern als *NeoIslets* bezeichnet, da sie in Kolonien wachsen und ein Teil dieser Zellen entweder für Insulin oder Glukagon positiv war (Ruhnke et al., 2005). Für ihre Kultur werden zwei Medien benötigt: das Dedifferenzierungsmedium (X-Medium) und das „*Islet conditioning*“ Medium (Y-Medium). Dabei gehen die Autoren davon aus, dass Monozyten in den ersten sechs Tagen im Dedifferenzierungsmedium durch M-CSF und IL-3 in ein so genanntes Stadium der Plastizität und Programmierbarkeit zurückgeführt werden. Die Autoren argumentieren, dass M-CSF und IL-3 für die Dedifferenzierung unerlässlich sind, auch wenn der genaue Mechanismus bisher nicht bekannt ist. Werden die dedifferenzierten Zellen, die das Stadium von Monozyten/Granulozyten-Vorläuferzellen“ aufweisen sollen, anschließend ins Y-Medium überführt, so ent-

wickeln sie sich in Richtung Langerhans-Inseln. Demnach wären Insulin-positive Monozyten nach Ruhnke et al. nicht im X-Medium, sondern erst im Y-Medium zu erwarten gewesen. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch Insulin-positive Monozyten bereits während der Kultur mit X-Medium nachgewiesen (Abb. 4.8/4.9). Ebenso entwickelten sich Insulin-positive Zellen, wenn frisch isolierte Monozyten ohne die beiden Cytokine des X-Mediums kultiviert wurden (Abb. 4.10); auch wenn die Zellausbeute sehr viel geringer war. Es scheint somit, dass keines der Cytokine des X- bzw. Y-Mediums für die Generierung Insulin-positiver Monozyten absolut notwendig ist.

Die von den Autoren beschriebenen proliferationsfördernden Eigenschaften der Cytokine M-CSF und IL-3 wurden auch in dieser Arbeit beobachtet. So verdoppelte sich die Zellausbeute nach 10 Tagen Kultur im X-Medium im Vergleich zur Standardkultur (6 Tage X-Medium und 4 Tage Y-Medium (Abb. 4.11)). Dass M-CSF und IL-3 die Proliferation und Differenzierung von Monozyten stimulieren, wurde auch von Pixley und Bartelmez beobachtet (Pixley FJ und Stanley ER, 2004; Bartelmez SH et al., 1989). Beide Autoren beschreiben, dass diese Cytokine für das Überleben humaner Blutmonozyten notwendig sind.

Tab. 6.2: *In vitro* kultivierte Monozyten enthalten biologisch aktives Insulin und zwar unabhängig von den Cytokinen des „Kieler-Protokolls“. Hierzu wurden die Zellen jeweils für 10 Tage kultiviert. C-Peptid wurde ebenfalls nachgewiesen (Abb. 4.6, 4.8).

	Immunhistochemischer Nachweis von Insulin	Biologische Aktivität des isolierten Insulins
M-CSF + IL-3 & EFG + HGF ^{*)}	+	+
M-CSF + IL-3 ^{**)}	+	+
Keine Cytokine	+	--- ^{***)}

^{*)} Cytokine des „Kieler-Protokolls“: 6 Tage X-Medium + 4 Tage Y-Medium (Tab. 3.2; Abb. 3.1).

^{**)} Cytokine des X-Mediums (Tab. 3.2).

^{***)} Dies wurde nicht untersucht.

Die interessante Frage, warum kultivierte Monozyten Insulin produzieren, war nicht Gegenstand dieser Arbeit. Insulin als natürlicher Wachstumsfaktor könnte auch die Proliferation humaner Monozyten induzieren. So wird Insulin während der Embryogenese in geringen Mengen im Neuroektoderm produziert und fördert dort das Zellüberleben (Hernández-Sánchez C et al., 2006). Möglicherweise löst der Vorgang der Adhärenz vielfältige intrazelluläre Ereignisse in den Monozyten aus, zu der auch die Aktivierung des Insulingens gehört; auch Kodama et al. (2006) vertreten diese Auffassung.

6.4 Funktion *in vitro* modifizierter, Insulin-positiver Monozyten *in vivo*

Langerhans-Inseln weisen eine typische Organisation unterschiedlicher Zelltypen auf. So sind zusätzlich zu Betazellen noch weitere Zelltypen in der Langerhans-Insel zu finden, die jeweils unterschiedliche Hormone sezernieren: Alpha-zellen (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. Eine selbständige Gruppierung Insulin-positiver Zellen wurde in dieser Arbeit nicht beobachtet; im Gegensatz zu den von Ruhnke et al. beschriebenen Ergebnissen. Die Anordnung der Insulin-positiven Monozyten in einem dreidimensionalen Gerüst (z.B. durch Mikroverkapslung) könnte möglicherweise den Insulingehalt der Zellen beeinflussen.

In diabetischen Mäusen war nach Transplantation Insulin-positiver Monozyten eine deutliche Senkung des Blutzuckerspiegels zu beobachten (Abb. 4.16). Ob es sich hierbei um eine physiologische Insulinausschüttung auf einen Glukosereiz hin handelte, oder nur um eine passive Insulinfreisetzung aus toten Zellen – wie bereits von Hansson M et al. (2004) beschrieben – sollte auf jeden Fall in weiterführenden Arbeiten untersucht werden. Die beobachtete langfristige

Regulation des Blutzuckerspiegels durch Insulin-positive Monozyten (Abb. 4.17) scheint aber dieser Annahme zu widersprechen. Doch besteht die Möglichkeit, dass dieser Effekt nicht auf das Zelltransplantat, sondern auf eine Regeneration des Pankreas zurückzuführen ist. Dieser Annahme widerspricht aber die Beobachtung, dass nach Explantation des Zelltransplantates der Blutzuckerspiegel des Tieres erneut anstieg (Abb. 4.17). Auch wurden Insulin-positive Monozyten unter der Kapsel der explantierten Niere nachgewiesen, während im Pankreas kaum Insulin-positive Betazellen vorhanden waren (nicht gezeigt). So ist es nicht sehr wahrscheinlich, dass die langfristige Regulation des Blutzuckerspiegels letztlich auf eine Regeneration des Pankreas zurückzuführen ist. Dass sich das Pankreas regenerieren kann, ist beschrieben (Thyssen S et al., 2006).

Die Übersicht in Tabelle 6.3 zeigt die prozentuale Abnahme des Blutzuckerspiegels nach Injektion von „Monozyten“-Insulin in diabetischen Mäusen. Interessanterweise war das Insulin, das aus Monozyten isoliert wurde, die für 10 Tage im X-Medium kultiviert wurden, nur bedingt wirksam. Da jedoch nur zwei Überstände getestet wurden, ist diese Beobachtung nicht sehr aussagekräftig. Für HGF als Bestandteil des Y-Mediums (Tab. 3.2) wurde eine positive Wirkung auf das Wachstum von Betazellen gezeigt (Otonkoski T et al., 1996). Die Ergebnisse von García-Ocaña et al. zeigen, dass Betazellen, die mit HGF inkubiert wurden, einen doppelt so hohen Insulingehalt aufwiesen wie Zellen, die kein HGF erhielten (García-Ocaña A et al., 2001). Somit ist es sicherlich sinnvoll, die Wirkung von HGF auf die Produktion von Insulin durch Monozyten genauer zu untersuchen.

Tab. 6.3 (S . 58): Wirksamkeit von n zellfreiem, isoliertem „ Monozyten“-Insulin in diabetischen Mäusen. Gezeigt ist die prozentuale Abnahme des Blutzuckerspiegels ($\Delta\%$) 1 und 5 Stunden nach Injektion (Mittelwert \pm Standardabweichung). Grundlage dieser Übersicht bilden die Daten der Tab. 4.2-4.5. Der „*cutoff*“ wurde auf 15 Prozent gesetzt, d.h. die prozentuale Abnahme des Blutzuckerspiegels muss über 15 Prozent liegen, um den Abfall des Blutzuckerspiegels sicher beurteilen zu können (siehe hierzu auch Abschnitt 4.3).

	¹⁾ Δ% (1 Stunde)	Δ% (5 Stunden)
3,0x10 ⁶ Insulin-positive ²⁾ (n=8)	50,3 ± 12,0	16,4 ± 22,0
3,0x10 ⁶ Insulin-positive Monozyten ³⁾ (n=2)	27,7 ± 0,92	kein Effekt
1,0x10 ⁷ Ins-1 Zellen (n=4)	45,2 ± 17,2	kein Effekt
3000 Inseläquivalente (n=4)	66,0 ± 20,2	42,6 ± 23
0,4 IE porcines Insulin (n=4)	76,0 ± 8,9	24,7 ± 18,2
1,5 x10 ⁷ periphere Blutleukozyten	kein Effekt	kein Effekt
1,0x10 ⁷ Fibroblasten	kein Effekt	kein Effekt

¹⁾ Zur Berechnung siehe Tab. 4.3.

²⁾ Kultur für 10 Tage nach dem „Kieler-Protokoll“ (Tab. 3.2).

³⁾ Kultur für 10 Tage in X-Medium.

Die nach dem „Kieler-Protokoll“ kultivierten Monozyten differenzierten sich nicht, wie von Ruhnke et al. beschrieben, zu Langerhans-Insel-ähnlichen Gebilden (sogenannte *Neoislets*). Der Grund hierfür ist nicht bekannt. Zudem ist zu klären, ob sich kultivierte Monozyten für eine Zelltherapie überhaupt eignen. Hierfür sind noch zahlreiche experimentelle Fragen, wie die der Glukose-abhängigen Insulinausschüttung, zu klären. Möglicherweise könnten die *in vitro* modifizierten Monozyten eine interessante Alternative zur Verwendung embryonaler Stammzellen sein. Dafür spricht, dass die Gewinnung autologer Monozyten ethisch unbedenklich ist.

Ob Insulin-positive Monozyten jedoch als vollwertiger Ersatz für zerstörte Betazellen geeignet sind, ist in weiterführenden Versuchen zu klären.

7 Ausblick

In dieser Arbeit wurden *in vitro* modifizierte Monozyten kultiviert, die Insulin positiv waren. In weiterführenden Versuchen sind diese Zellen zu charakterisieren (Abb. 7.1).

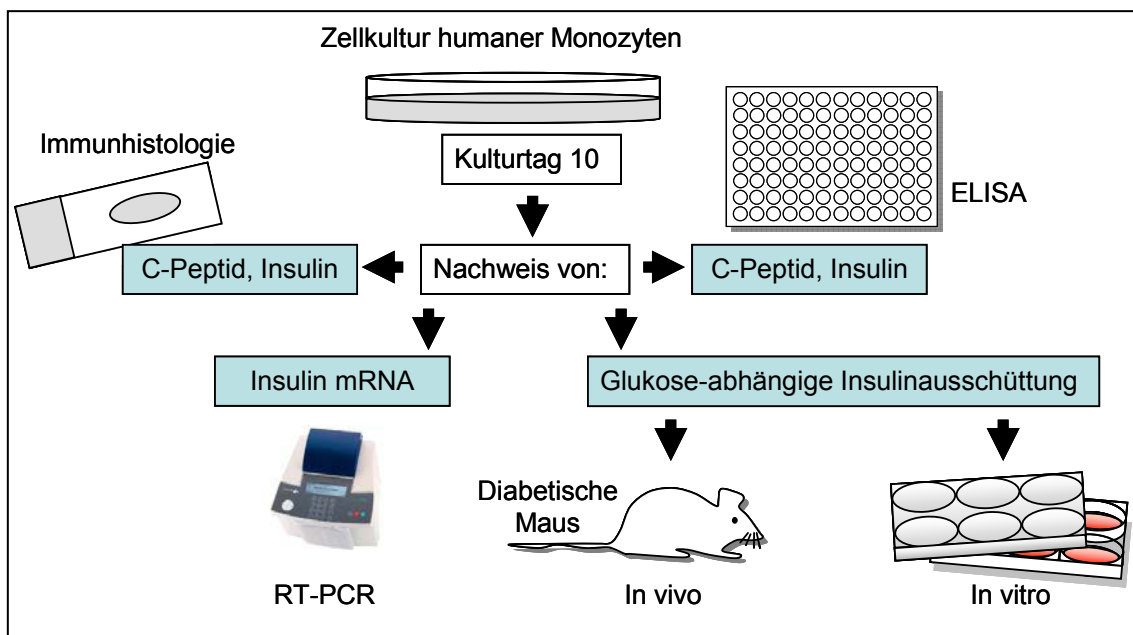


Abb. 7.1: Strategien zur Charakterisierung Insulin-positiver Monozyten. Diese Untersuchungen sind notwendig, um zweifelsfrei zu klären, ob *in vitro* modifizierte Monozyten in der Lage sind, den Blutzuckerspiegel zu messen und mit einer adäquanten Insulinausschüttung zu reagieren. Der immunhistochemische Nachweis von Insulin und C-Peptid, sowie dessen biologische Aktivität, wurde in dieser Arbeit nachgewiesen.

Eine sehr spannende Frage ist die nach dem biologischen Sinn, dass Makrophagen / 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. Deshalb ist es sehr wichtig zu untersuchen, ob Monozyten Glukose-abhängig Insulin ausschütten, und ob es sich hierbei um einen dauerhaften Effekt handelt. Ebenfalls wichtig zu untersuchen ist das Schicksal dieser Zellen, wenn sie dem Patienten zurückgegeben werden. Die Experimente hierzu entscheiden sicherlich darüber, ob diese Zellen, und damit das Konzept, für die Zelltherapie geeignet sind.

Eine sehr wichtige klinische Frage ist, ob sich Insulin-positive Monozyten auch aus peripheren Blutmonozyten von Typ I Diabetikern generieren lassen. So ist z.B. bisher nicht bekannt, ob die Ausbeute an Insulin-positiven Monozyten von der Dauer und Schwere der Erkrankung abhängt. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten stammen ausnahmslos von gesunden Spendern im Alter zwischen 23-57 Jahren. Spannend wäre also zu untersuchen, ob sich Insulin-positive Monozyten aus peripheren Blutmonozyten von Patienten mit Typ I Diabetes differenzieren lassen.

8 Zusammenfassung

Das Konzept, Insulin-produzierende Zellen als Ersatz für zerstörte Beta-Zellen beim Diabetes mellitus Typ I einzusetzen, ist auch weiterhin hoch attraktiv. Eine Alternative zur Herstellung Insulin-produzierender Zellen aus embryonalen oder adulten Stammzellen könnten *in vitro* modifizierte, Insulin-positive Monozyten sein. Seit längerem ist bekannt, dass sich Monozyten in Makrophagen und Dendritische Zellen differenzieren. Weniger bekannt ist, dass sich Monozyten auch in eine Vielzahl nicht-phagozytierender Zellen differenzieren können. Hierzu gehören auch Insulin-positive Zellen.

Für die optimale Zelltherapie ist zu fordern, dass die Zellen nicht nur ihre Funktion im Patienten beibehalten, sondern dass von ihnen auch kein immunologisches Risiko ausgeht. Blutmonozyten lassen sich einfach gewinnen und stünden somit als autologer Zellersatz für eine mögliche Zelltherapie zur Verfügung.

Monozyten von zwölf gesunden Spendern im Alter zwischen 23 und 57 Jahren wurden untersucht. Die Monozyten wurden durch Adhärenz angereichert und für sechs Tage in X-Medium mit den Cytokinen M-CSF und IL-3 und für weitere vier Tage in Y-Medium mit den Cytokinen HGF und EGF inkubiert.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich Insulin-positive Monozyten routinemäßig aus peripheren Blutmonozyten gesunder Spender mittels Leukaphrese gewinnen lassen. Frisch isolierte periphere Blutmonozyten waren vor ihrer Kultivierung negativ für Insulin und C-Peptid. Nach zehntägiger Kultur wurden $77\pm 16\%$ Insulin-positive und $49\pm 30\%$ C-Peptid-positive Monozyten nachgewiesen. Weiterhin exprimierten $60\pm 4\%$ der Zellen den Monozytenmarker CD14. Auch wurde gezeigt, dass die Kulturbedingungen die Ausbeute an Insulin-positiven Monozyten beeinflussen.

Aus jeweils drei Millionen Insulin-positiven Monozyten wurde das Insulin isoliert und diabetischen Mäusen mit einem Blutzuckerspiegel von 300-600 mg/dL

subkutan injiziert (n=8). Daraufhin sank der Blutzuckerspiegel um $51\% \pm 12\%$ innerhalb einer Stunde. Auch Insulin-positive Monozyten, die diabetischen Mäusen subkutan injiziert wurden, waren in der Lage, den Blutzuckerspiegel bis zum Zeitpunkt Ihrer Abstoßung aktiv zu regulieren (n=4). In einem Pilotversuch wurde zudem gezeigt, dass transplantierte Insulin-positive Monozyten langfristig (> 100 Tage) den Blutzuckerspiegel einer diabetischen immuninkompetenten Maus regulieren.

In dieser Arbeit wurde somit erfolgreich gezeigt, dass *in vitro* modifizierte Monozyten biologisch aktives Insulin enthalten.

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1; S. 5

- Teilbild 1: <http://digital.library.utoronto.ca/insulin/highlights.cfm>
Teilbild 2: Bild der Arbeitsgruppe ETI (Prof. Dr. K. Ulrichs)
Teilbild 3: <http://www.klinikum-konstanz.de/kliniken/chirurgie1/bauchsp/pankreas.jpg>
Teilbild 4: Eigene immunhistologische Färbung und Fotografie

Graphik; S. 8

- Teilbild 1: Erstellt mit PowerPoint (PD Dr. C. Otto)
Teilbild 2: Erstellt mit PowerPoint (PD Dr. C. Otto)
Teilbild 3: Abbildung aus einem Verkaufskatalog von Harlan Winkelmann

Abb. 3.1; S. 13

Eigene Arbeitsgruppe (PD Dr. C. Otto)

Abb. 3.2; S. 14

- Teilbild 1: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/ALDRICH/201642>
Teilbild 2: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIAL/287075>

Abb. 3.3; S. 15

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIAL/D5130>

Abb. 3.4; S. 16

Erstellt mit PowerPoint (eigene Abbildung)

Abb. 3.5; S. 19

- Teilbild A: Abbildung der Arbeitsgruppe (PD Dr. C. Otto)
Teilbild B,C: Abbildung der Arbeitsgruppe (PD Dr. C. Otto)
Teilbild D: http://www.harlaneurope.com/main_du.htm
Teilbild E: Abbildung der Arbeitsgruppe (Auswertung von Pilotversuchen; PD Dr. C. Otto)

Abb. im Ergebnisteil, ab S. 21

Alle im Ergebnisteil gezeigten Abbildungen sind eigene Abbildungen

Abb. 7.1; S. 59

Abbildung der Arbeitsgruppe (PD Dr. C. Otto)

Anhang; ab S. 69

Alle im Anhang gezeigten Abbildungen sind eigene Abbildungen

10 Literaturverzeichnis

- Åkerblom HK, Vaarala O, Hyöty H, Ilonen J, Knip M. **Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes.** *Am J Med Genet* 2002; 115: 18-29.
- American Diabetes Association. **Pancreas transplantation for patients with type 1 diabetes.** *Diabetes Care* 2004; 27 (Suppl. 1): 105.
- Basta G, Schmidt AM, De Caterina R. **Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes.** *Cardiovasc Res* 2004; 63: 582-592.
- Banting FG, Best CH: **The internal secretion of the pancreas.** *J Lab Clin Invest* 1922; 7: 251-266.
- Bartelmez SH, Bradley TR, Bertoncello I, Mochizuki DY, Tushinski RJ, Stanley ER, Hapel AJ, Young IG, Kriegler AB, Hodgson GS. **Interleukin 1 plus interleukin 3 plus colony-stimulating factor 1 are essential for clonal proliferation of primitive bone marrow cells.** *Exp Hematol* 1989; 17(3): 240-245.
- Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil J. **In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue.** *PNAS* 2000; 97: 7999-8004.
- Chance RE, Ellis RM, Bromer WW. **Porcine proinsulin: characterization and amino acid sequence.** *Science* 1968; 12: 165-167.
- Dalton TA, Bennett JC. **Autoimmune disease and the major histocompatibility complex: therapeutic implications.** *Am J Med* 1992; 92: 183-188.
- Dor Y, Brown J, Martinez O I, Melton D A. **Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation.** *Nature* 2004 429, 41-46.
- Eisenbarth GS. **Type I diabetes mellitus.** *N Engl J Med* 1986; 314: 1360-1368.
- EURODIAB ACE Study Group. **Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe.** *Lancet* 2000; 355: 873-876.
- 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: 13.12.2007).
- Fanelli CG, Paramore DS, Hershey T, Terkamp C, Ovalle F, Craft S, Cryer PE. **Impact of nocturnal hypoglycemia on hypoglycemic cognitive dysfunction in type I diabetes.** *Diabetes* 1998; 47: 1920-1927.
- Finne P, Reunanen A, Stenman S, Groop PH, Grönhagen-Riska C. **Incidence of end-stage renal disease in patients with type 1 diabetes.** *JAMA* 2005; 294: 1782-1787.
- Fong DS, Aiello LP, Ferris FL, Klein R. **Diabetic retinopathy.** *Diabetes Care* 2004; 27: 2540-2553.

- Forrest JM, Menser MA, Burgess JA. **High frequency of diabetes mellitus in young adults with congenital rubella.** *Lancet* 1971; 2: 332-334.
- Garcia-Ocaña A, Takane KK, Syed MA, Philbrick WM, Vasavada RC, Stewart AF. **Hepatocyte growth factor overexpression in the islet of transgenic mice increases beta cell proliferation, enhances islet mass, and induces mild hypoglycemia.** *J Biol Chem* 1999; 275: 1226-1232.
- Gerich JE. **The importance of tight glycemic control.** *Am J Med* 2005; 118; 7S-11S
- Hansson M, Tonning A, Frandsen U, Petri A, Rajagopal J, Englund MCO, Heller RS, Håkansson J, Fleckner J, Nilsson Sköld H, Melton D, Semb H, Serup P. **Artificial insulin release from differentiated embryonic stem cells.** *Diabetes* 2004; 53: 2603-2609.
- Hao E, Tyberg B, Itkin-Ansari P, Lakey JRT, 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
- Harrison LC, Honeyman MC. **Cow's milk and type 1 diabetes.** *Diabetes* 1999; 48: 1501-1507.
- Hauer H, Köster I, von Ferber I. **Prävalenz des Diabetes mellitus in Deutschland 1998-2001. Sekundärdatenanalyse einer Versichertenstichprobe der AOK Hessen/ KV Hessen.** *Dtsch Med Wochenschr* 2003; 128: 2632-2637.
- Hernández-Sánchez C, Mansilla A, de la Rosa EJ, de Pablo F. **Proinsulin in development: new roles of an ancient prohormone.** *Diabetologia* 2006; 49 (6): 1142-1150.
- Hilgert I, Stolba P, Kristofova H, Stefanova I, Bendlova B, Lebl M, Horejsi V. **A monoclonal antibody applicable for determination of C-peptide of human proinsulin by RIA.** *Hybridoma* 1991; 10: 379-386.
- Horejsi V, Hilgert I, Kristofova H, Satyalai O. **Murine hybridoma monoclonal antibodies against insulin: cross-reactivity with the insulin of three species and blocking of insulin binding to its receptor.** *Immunol Lett* 1984; 8(5): 279-283.
- Hug K. **Sources of human embryos for stem cell research: ethical problems and their possible solutions.** *Medicina (Kaunas)*. 2005; 41(12): 1002-1010.
- International Diabetes Federation. **Diabetes atlas.** International Diabetes Federation, 2005 <http://www.eatlas.idf.org/Incidence/> (aufgerufen: 30.04.2006).
- Jeffcoate W. **Drive to eliminate the burden of type 1 diabetes.** *Lancet* 2006; 367(9513): 795-797.
- Kerner W, Brückel J, Böhm BO. **Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. Aktualisierte Version auf den Webseiten der DDG** „www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de“/Evidenzbasierte Leitlinien/ Definition. Scherbaum WA, Kiess W (Hrsg.). Oktober 2004 1) (aufgerufen: 13.12.2007).

- Ko AS, Smyth DG, Markussen N, Sundby F. **The amino acid sequence of the C-peptide of human proinsulin.** *Eur J Biochem.* 1971; 20(2): 190-199.
- Kodama H, Inoue T, Watanabe R, Yasutomi D, Kawakami Y, Ogawa S, Mikoshiba K, Ikeda Y, Kuwana M. **Neurogenic potential of progenitor cells derived from human circulating CD14⁺ monocytes.** *Immunol Cell Biol* 2006; 84(2): 209-17.
- Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, Younan P, Imaeda H, Maeda M, Chan L. **NeuroD-beta cell gene therapy induces islet neogenesis in the liver and reverses diabetes in mice.** *Nat Med* 2003; 9: 596-603.
- Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. **Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets.** *Science* 2001; 292(5520): 1389-1394.
- Narayan KMV, Boyle JP, Thompson TJ, Sorensen SW, Williamson DF. **Lifetime risk for diabetes mellitus in the United States.** *JAMA* 2003; 290(14): 1884-1890.
- Otonkoski T, Cirulli V, Beattie GM, Mally MI, Soto G, Rubin JS, Hayek A. **A role for hepatocyte growth factor/scatter factor in fetal mesenchyme-induced pancreatic β -cell growth.** *Endocrinology* 1996; 137(7): 3131-3139.
- 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.
- Pixley FJ, Stanley ER. **CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action.** *Trends Cell Biol.* 2004; 14(11): 628-638.
- Przyborski SA. **Differentiation of human embryonic stem cells after transplantation in immune-deficient Mice.** *Stem Cells* 2005; 23(9): 1242-1250.
- Rajagopal J, Anderson WJ, Kume S, Martinez OI, Melton A. **Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake.** *Science* 2003; 299(5605): 363.
- Roche E, Reig JA, Campos A, Paredes B, Isaac JR, Lim S, Calne RY, Soria B. **Insulin-secreting cells derived from stem cells: clinical perspectives, hopes and hopes.** *Transpl Immunol* 2005; 15: 113-129.
- Ruhnke M, Ungefroren H, Nussler, Martin F, Brulport M, Schormann W, Hengstler JG, Klapper W, Ulrichs K, Hutchinson JA, Soria B, Parwaresch RM, Heeckt P, Kremer B, Fandrich F. **Differentiation of in vitro-modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells.** *Gastroenterology* 2005; 128(7): 1774-1786.
- Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam A, Alfadhli E, Kneteman NM, Lakey JRT, Shapiro AMJ. **Five-Year follow-up after clinical islet transplantation.** *Diabetes* 2005; 54(7): 2060-2069.
- Salokangas A, Smyth DG, Markussen J, Sundby F. **Bovine proinsulin: a amino acid sequence of the C-Peptide isolated from pancreas.** *Eur J Biochem* 1971; 20(2): 183-189.

- Scharp DW, Lacy PE, Santiago JV, McCullough CS, Weide LG, Falqui L, Marchetti P, Gingerich RL, Jaffe AS, Cryer PE *et al.* **Insulin independence after islet transplantation into type I diabetic patients.** *Diabetes* 1990; 39(4): 515-518.
- Sharma A, Zangen DH, Reitz P, Taneja M, Lissauer ME, Miller CP, Weir GC, Habener JF, Bonner-Weir S. **The homeodomain protein IDX-1 increases after an early burst of proliferation during pancreatic regeneration.** *Diabetes* 1999; 48, 507-513.
- Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. **Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen.** *N Engl J Med* 2000; 343(4): 230-238.
- Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, Secchi A, Brendel MD, Berney T, Brennan DC, Cagliero E, Alejandro R, Ryan EA, DiMercurio B, Morel P, Polonsky KS, Reems JA, Bretzel RG, Bertuzzi F, Froud T, Kandaswamy R, Sutherland DE, Eisenbarth G, Segal M, Preiksaitis J, Korbitt GS, Barton FB, Viviano L, Seyfert-Margolis V, Bluestone J, Lakey JR. **International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation.** *N Engl J Med* 2006; 355(13): 1318-1330.
- Segev H, Fishman B, Ziskind A, Shulman M, Itskovitz-Eldor J. **Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters.** *Stem Cells* 2004; 22(3): 265-274.
- Seissler J, Scherbaum WA. **Autoimmune diagnostics in diabetes mellitus.** *Clin Chem Lab Med* 2006; 44(2): 133-137.
- Soria B, Roche E, Berná G, León-Quinto T, Reig JA, Martín F. **Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice.** *Diabetes* 2000; 49: 1-6.
- Stainier D. **No Stem Cell Is an Islet (Yet).** *N Engl J Med* 2006; 354(5): 521-523.
- Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. **Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the multiple risk factor intervention trial.** *Diabetes Care* 1993; 16(2): 434-444.
- Sutherland DE, Gruessner RW, Dunn DL, Matas AJ, Humar A, Kandaswamy R, Mauer SM, Kennedy WR, Goetz FC, Robertson RP, Gruessner AC, Najarian JS. **Lessons learned from more than 1,000 pancreas transplants at a single institution.** *Ann Surg* 2001; 233(4):463-501.
- Tesfaye S, Chaturvedi N, Eaton SE, Ward JD, Manes C, Ionescu-Tirgoviste C, Witte DR, Fuller JH. **Vascular risk factors and diabetic neuropathy.** *N Engl J Med* 2005; 352(4): 341-350.
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. **Hypoglycemia in the the diabetes control and complications trial.** *Diabetes* 1997; 46: 271-286.

- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. **The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus.** *N Eng J Med* 1993; 329: 977-986.
- Thyssen S, Arany E, Hill DJ. **Ontogeny of regeneration of β -cells in the neonatal rat after treatment with streptozotocin.** *Endocrinology* 2006; 147(5): 2346-2356.
- Todd JA, Bain SC. **A practical approach to identification of susceptibility genes for IDDM.** *Diabetes* 1992; 41(9): 1029-1034.
- Umpierrez GE, Kitabchi AE. **Diabetic ketoacidosis: risk factors and management strategies.** *Treat Endocrinol* 2003; 2(2): 95-108.
- Yoon JW, Austin M, Onodera T, Notkins AL. **Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis.** *N Engl J Med* 1979; 300(21): 1173-1179.
- Yoon JW, Jun HS, Santamaria P. **Cellular and molecular mechanisms for the initiation and progression of beta cell destruction resulting from the collaboration between macrophages and T cells.** *Autoimmunity* 1998; 27(2): 109-122.
- Zuckerman SH, Ackerman SK, Douglas SD. **Long-term human peripheral blood monocyte cultures: establishment, metabolism and morphology of primary human monocyte-macrophage cell cultures.** *Immunology* 1979; 38: 401-411.
- Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Müller B, Vallejo M, Thomas MK, Habener JF. **Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes.** *Diabetes* 2001; 50(3): 521-533.

11 Anhang

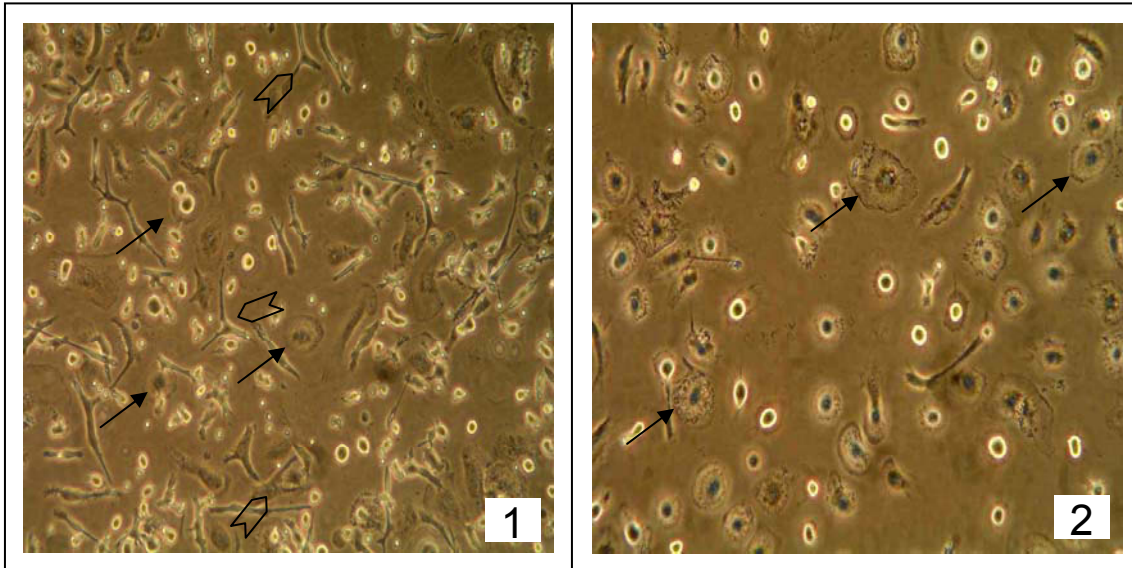


Abb. A1: Behandlung einer Monozytenkultur mit Hy QTase. Gezeigt ist eine 10 Tage alte Monozytenkultur vor (links) und nach (rechts) Behandlung mit HyQTase für 30 Minuten. Während sich die Zellen des Zelltyps 1 ($\Sigma \triangleright$) weitestgehend ablösen, widerstehen die Zellen des Zelltyps 2 (\rightarrow) dieser Behandlung und bleiben weiter adhären. Die Zellen (gezeigt ist die Aph 9.2) wurden mit dem „Kieler-Protokoll“ (Tab. 3.2) kultiviert. Vergrößerung: 400x.

Tab. A1: Aminosäuresequenz für C-Peptid von Mensch, Schwein, Rind und Ratte. Mensch und Schwein unterscheiden sich in neun Positionen, Mensch und Ratte in neun bzw. zehn Positionen und Mensch und Rind in 10 Positionen. Die Aminosäuren sind in der Drei-Buchstaben-Abkürzung angegeben. Aufgeführt sind die variablen Positionen. ¹⁾ Ko AS et al., 1971; ²⁾ Chance RE et al., 1968; ³⁾ Salokangas A et al., 1971; ⁴⁾ Bei der Ratte sind beide Allele aktiv.

Spezies	Position innerhalb des C-Peptids									
	2	4	5	7	8	9	10	13	16	17
Human ¹⁾	Ala	Asp	Leu	Val	Gly	Gln	Val	Gly	Pro	Gly
Schwein ²⁾	Ala	Asn Pro		Ala	Gly	Ala	Val	Gly	Leu	Gly
Rind ³⁾	Val Gly		Pro	Val	Gly	Ala Leu		Ala	Pro	Gly
Ratte 1 ⁴⁾	Val	Asp	Pro	Val	Pro	Gln	Leu	Gly	Pro	Glu
Ratte 2	Val	Asp	Pro	Val	Ala	Gln	Leu	Gly	Pro	Gly

Spezies	Position innerhalb des C-Peptids									Summe der Positionsunterschiede zu Human
	18	19	20	23	25	28	29	30		
Human	Ala	Gly	Ser	Pro	Ala	Gly	Ser	Leu		–
Schwein	Gly			Ala	Ala	Gly	Pro Pro			9
Rind ³⁾	Ala	Gly		Gly		Gly	Pro Pro			10
Ratte 1 ⁴⁾	Ala	Gly	Asp Thr		Ala	Val Ala		Arg		10
Ratte2	Ala	Gly	Asp Thr		Ala	Val Ala		Arg		9

Tab. A2: Aminosäuresequenz für Insulin von Mensch, Schwein, Rind und Ratte. A= α -Kette; B= β -Kette. Die Aminosäuren sind in der Drei-Buchstaben-Abkürzung angegeben. Aufgeführt sind die variablen Positionen.

Spezies	Position innerhalb des Insulin-Moleküls								Summe der Positionsunterschiede zu Human
	A #4	A #8	A #9	A #10	B #3	B #9	B #29	B #30	
Human	Glu	Thr	Ser	Ile	Asn	Ser	Lys	Thr	–
Schwein	Glu	Thr	Ser	Ile	Asn	Ser	Lys	<i>Ala</i>	1
Rind	Glu	<i>Ala Gly Val</i>			Asn	Ser	Lys	<i>Ala</i>	4
Ratte 1	<i>Asp</i>	Thr	Ser	Ile	<i>Lys Pro</i>		Lys	<i>Ser</i>	4
Ratte 2	<i>Asp</i>	Thr	Ser	Ile	<i>Lys</i>	Ser	<i>Met Ser</i>		4

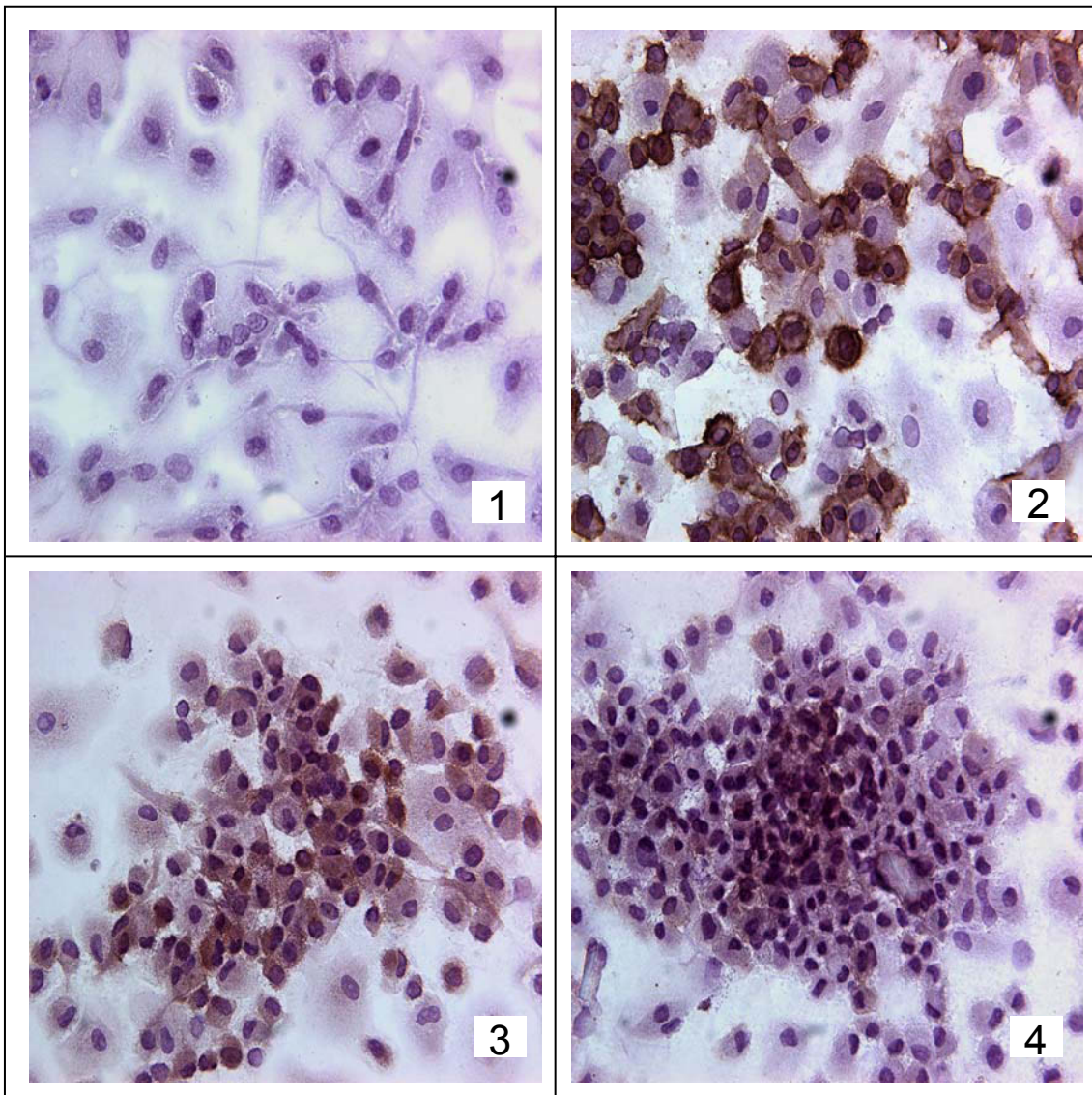


Abb. A2: Kultivierte M onozyten (Aph 10.3) vom Kulturtag 10 sind positiv für Insulin, C-Peptid und CD14. Die Monozyten wurden auf sterilen Deckgläschen

kultiviert (Kapitel 3.5). (1) Negativkontrolle; (2) CD14; (3) Insulin; (4) C-Peptid.
Vergrößerung: 600x.

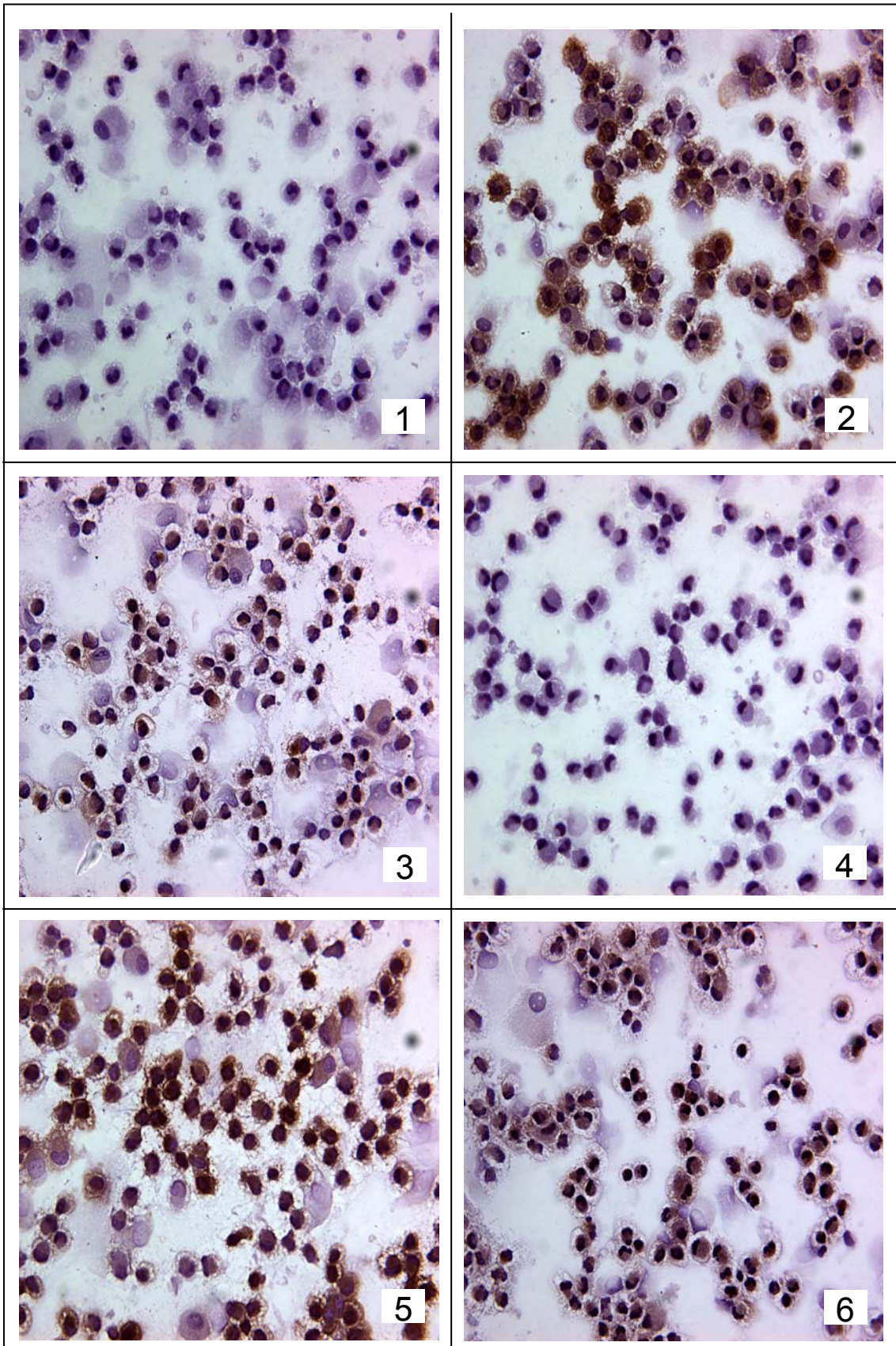


Abb. A3 (Seite 71): *Testung verschiedener Fixierungsmittel.* Insulin-positive Monozyten vom Kulturtag 6 wurden mit Formaldehyd bzw. Aceton fixiert. Es wurden keine Unterschiede bei den immunohistochemischen Ergebnissen gefunden (siehe auch Abb. 4.6). Gezeigt sind Monozyten der Apherese 10.1 und 10.2. Teilabbildungen 1-3: Acetonfixierung. (1) Negativkontrolle; (2) CD14; (3) Insulin. Teilabbildungen 4-6: Formaldehydfixierung mit 1% Tween. (4) Negativkontrolle; (5) CD14; (6) Insulin. Vergrößerung: 600x.

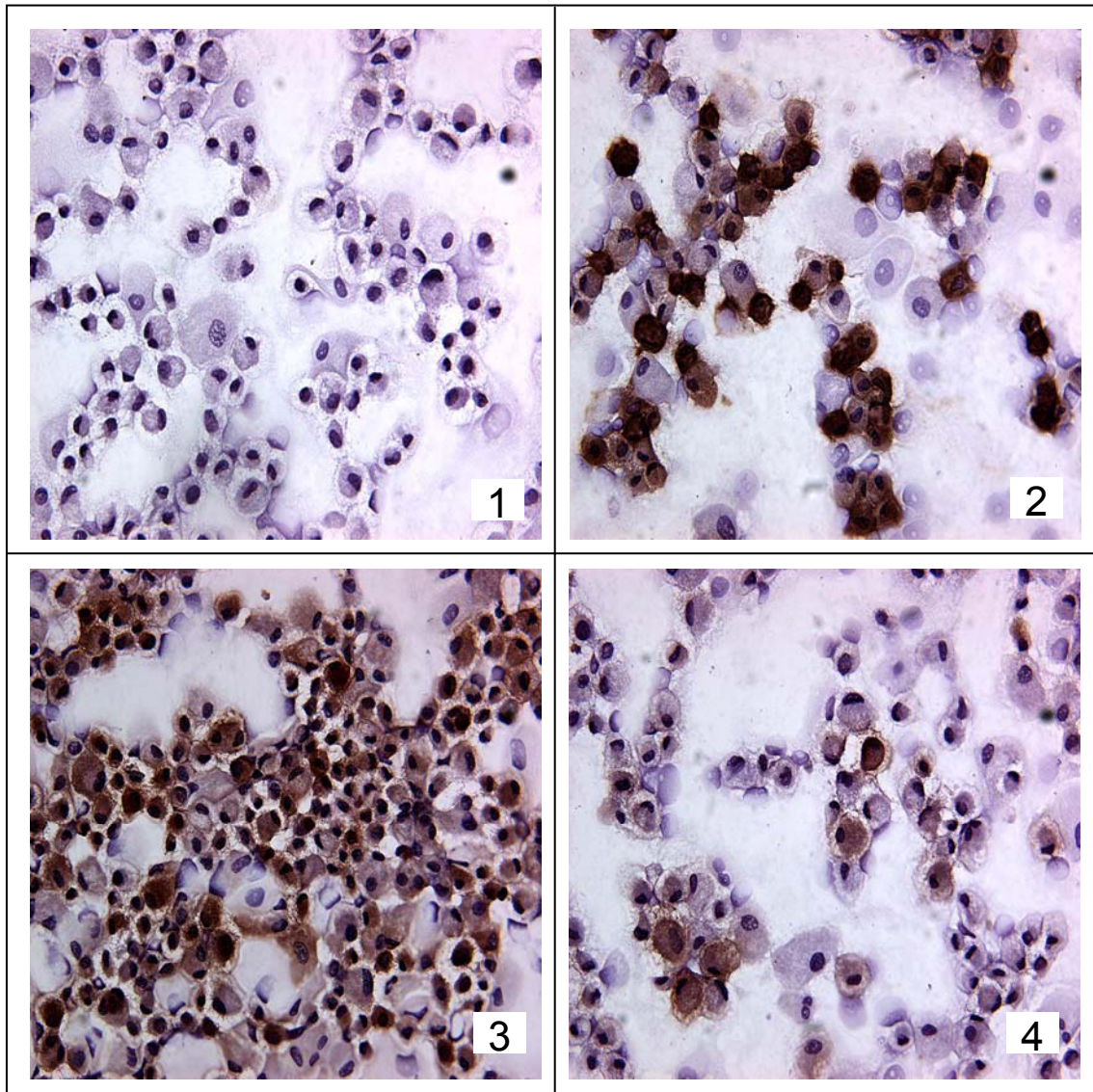


Abb. A4: *Insulin-positive Monozyten sind über den Kulturtag 10 hinaus positiv für Insulin.* Gezeigt sind Zellen der Apherese 11.1 vom Kulturtag 18. (1) Negativkontrolle; (2) CD14; (3) Insulin; (4) C-Peptid. Vergrößerung: 600x.

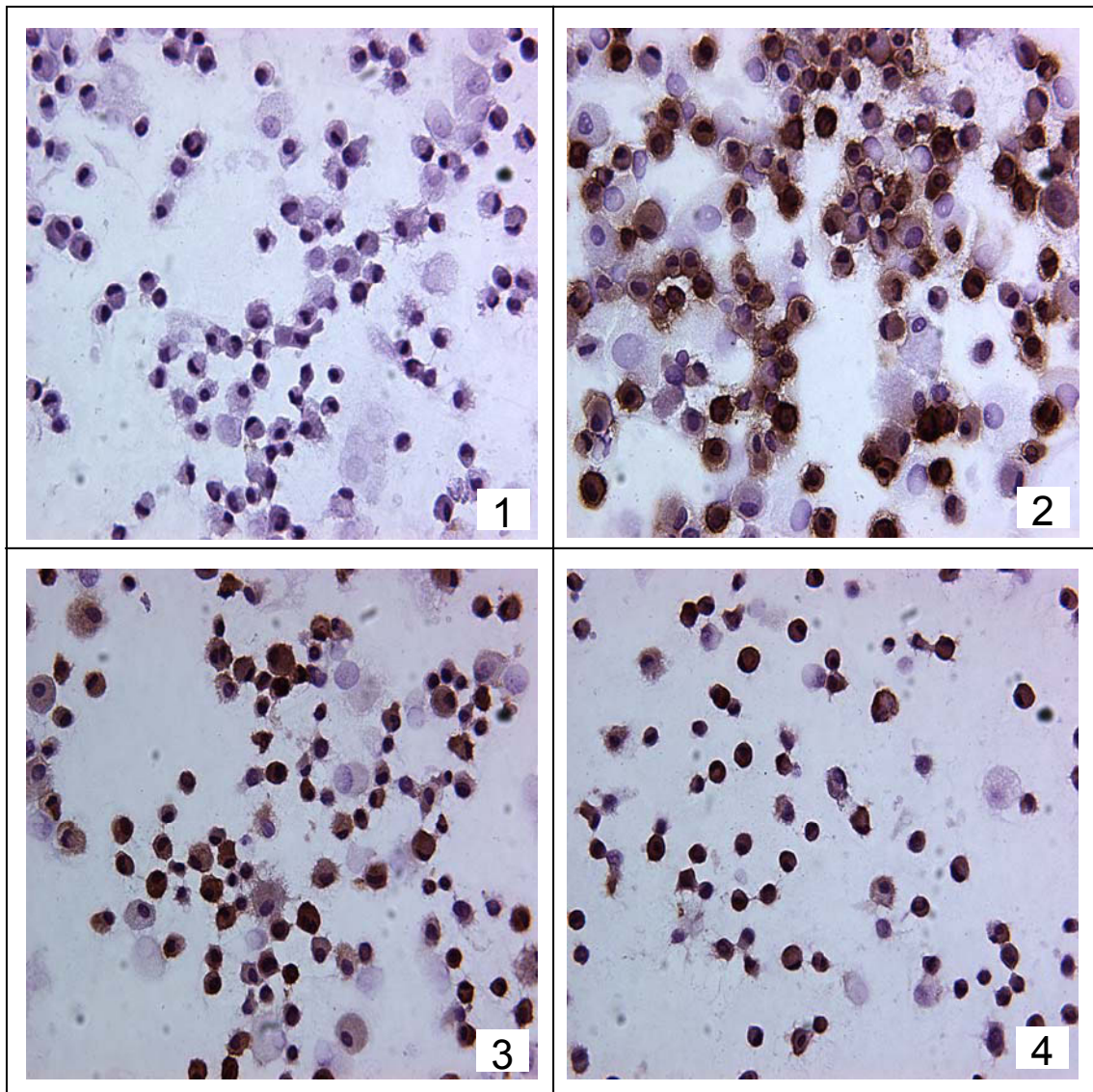


Abb. A5: Kultivierung humaner Blutmonozyten (Aph 10.1) in 10 Prozent Human-Serum. (1) Negativkontrolle; (2) CD14; (3) Insulin; (4) C-Peptid. Vergrößerung: 600x. Siehe auch Abb. 4.6.

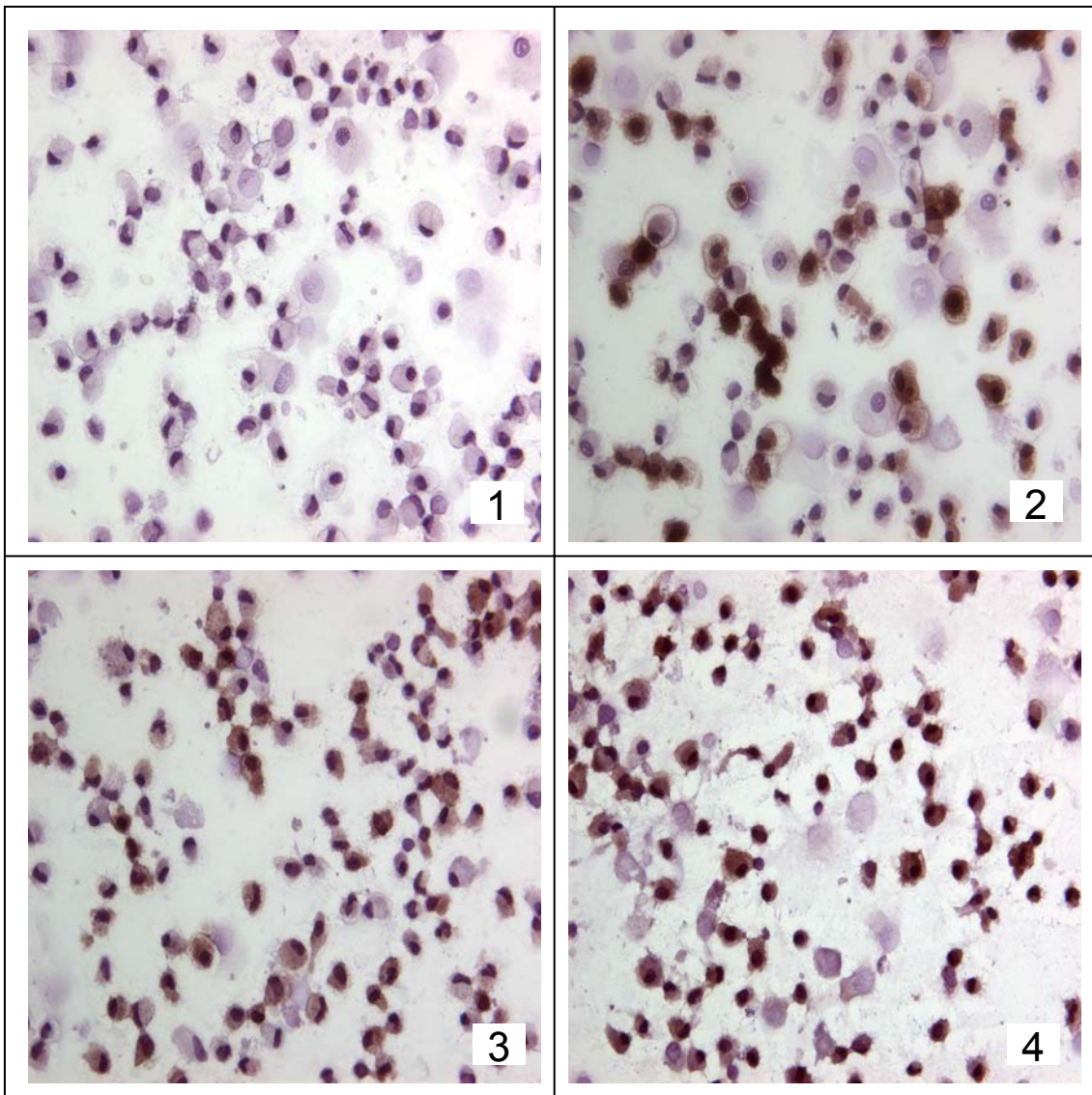
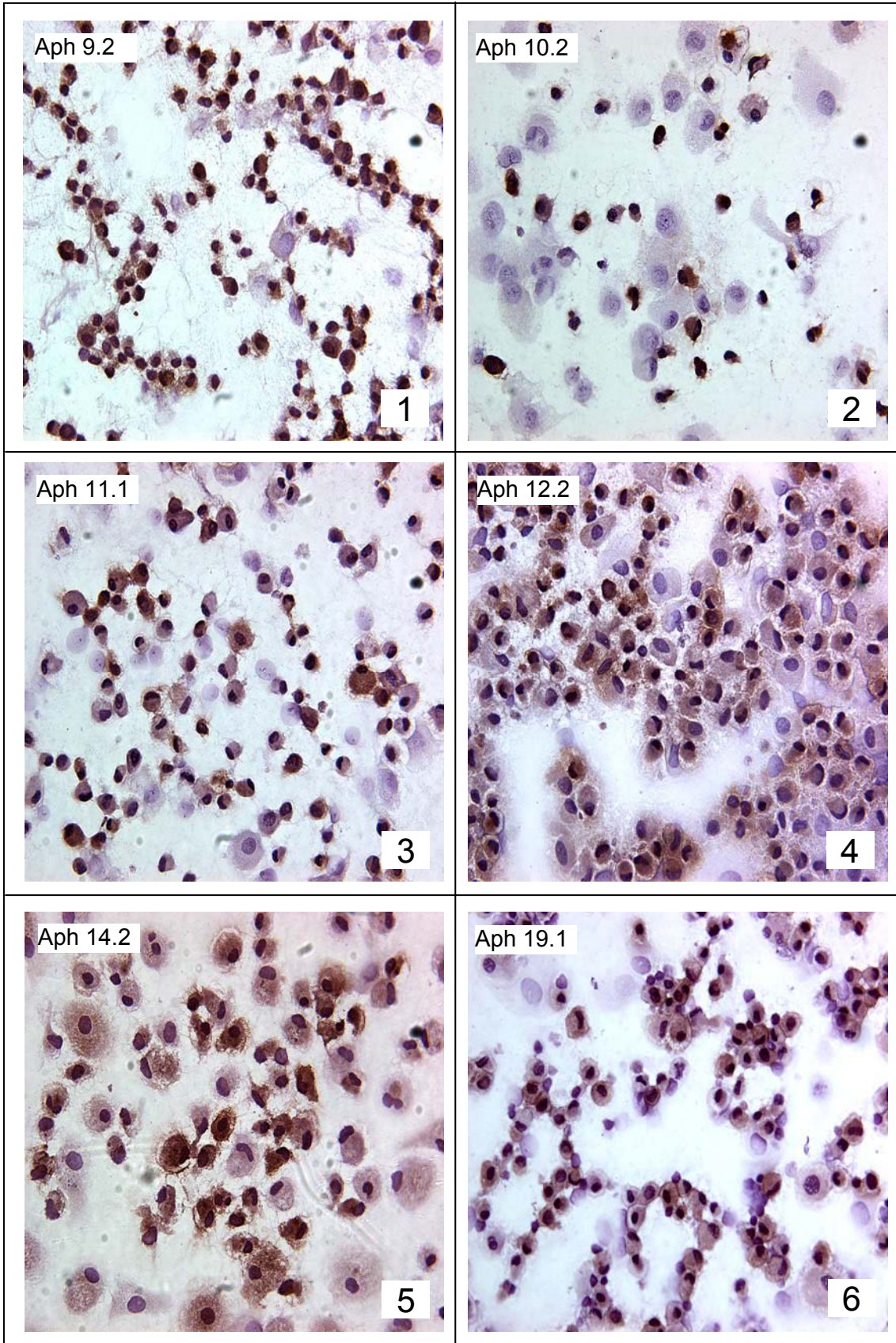


Abb. A6: Der Nachweis Insulin-positiver Monozyten ist unabhängig vom verwendeten Serum. Gezeigt sind Insulin-positive Zellen der Apherese 19.1, die nach dem „Kieler-Protokoll“ (Tab. 3.2) kultiviert wurden. Hierzu wurde das Medium mit fetalem Kälberserum (FCS) anstelle von Humanserum versetzt. Die Zellen sind positiv für Insulin und C-Peptid. (1) Negativkontrolle; (2) CD14; (3) Insulin; (4) C-Peptid. Vergrößerung: 600x.

Die in Abb. A6 präsentierten Daten sind sehr interessant, da sie die Annahme unterstützen, dass kultivierte Monozyten tatsächlich in der Lage sind, Insulin zu synthetisieren. Für die Argumentation ist von Bedeutung, dass der anti-C-Peptid Antikörper C-Pep-01 (Tab. 3.3) sehr Spezies-spezifisch ist, nicht aber IN-05 (Abb. 4.4). C-Pep-01 reagiert nicht mit dem C-Peptid der Spezies Ratte und Schwein (Abb. 4.4). Werden Monozyten mit Medium kultiviert, dem fetales Kälberserum zugesetzt wurde, dann sollten sie unter der Annahme, dass sie Insulin aus der Umgebung aufnehmen, mit dem anti-Insulin Antikörper IN-05 eine Reaktion zeigen, nicht aber mit C-Pep-01. Da jedoch auch C-Pep-01 eine positive Reaktion zeigte, könnte es tatsächlich sein, dass *in vitro* kultivierte Monozyten humanes Insulin produzieren.



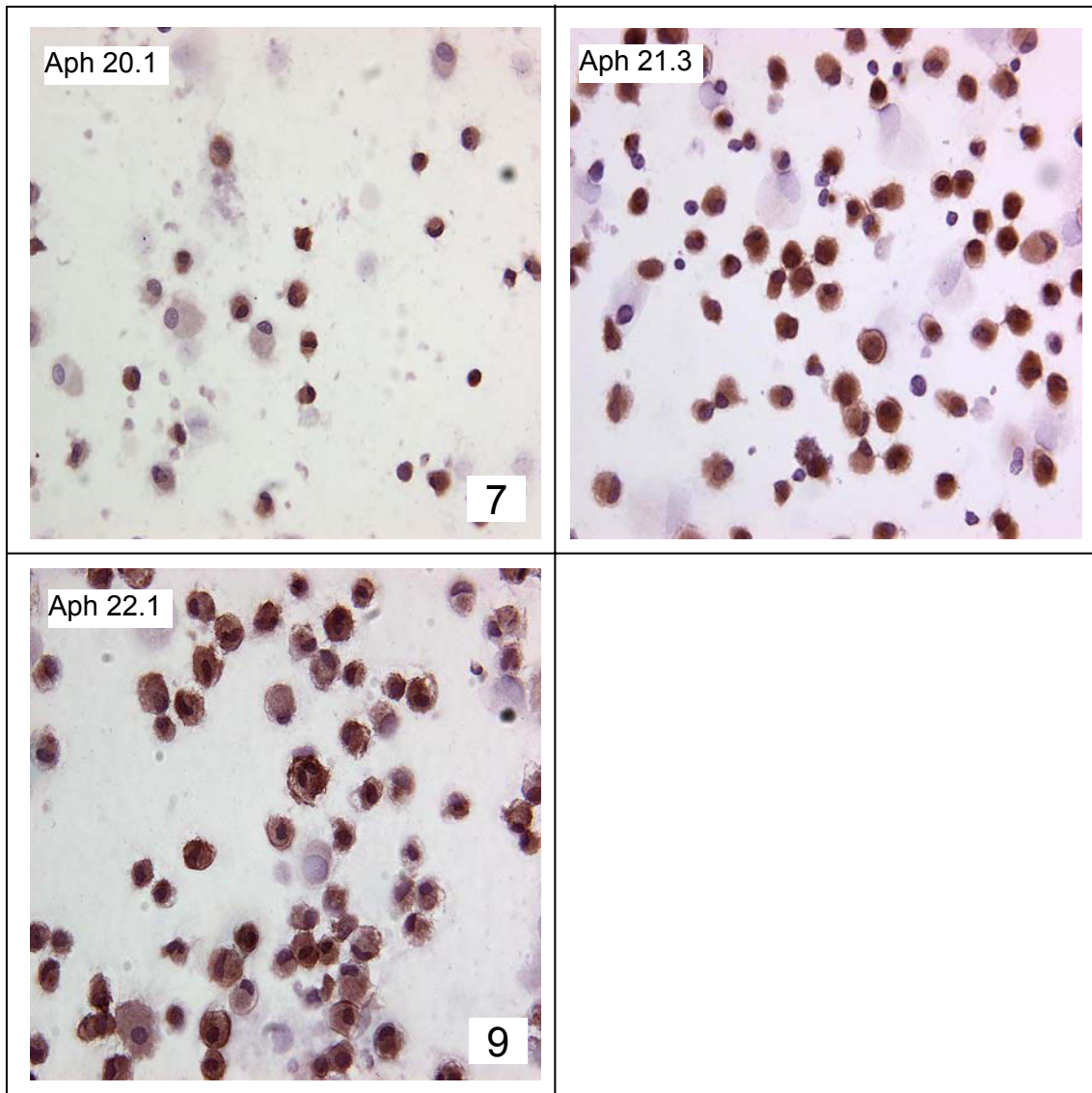
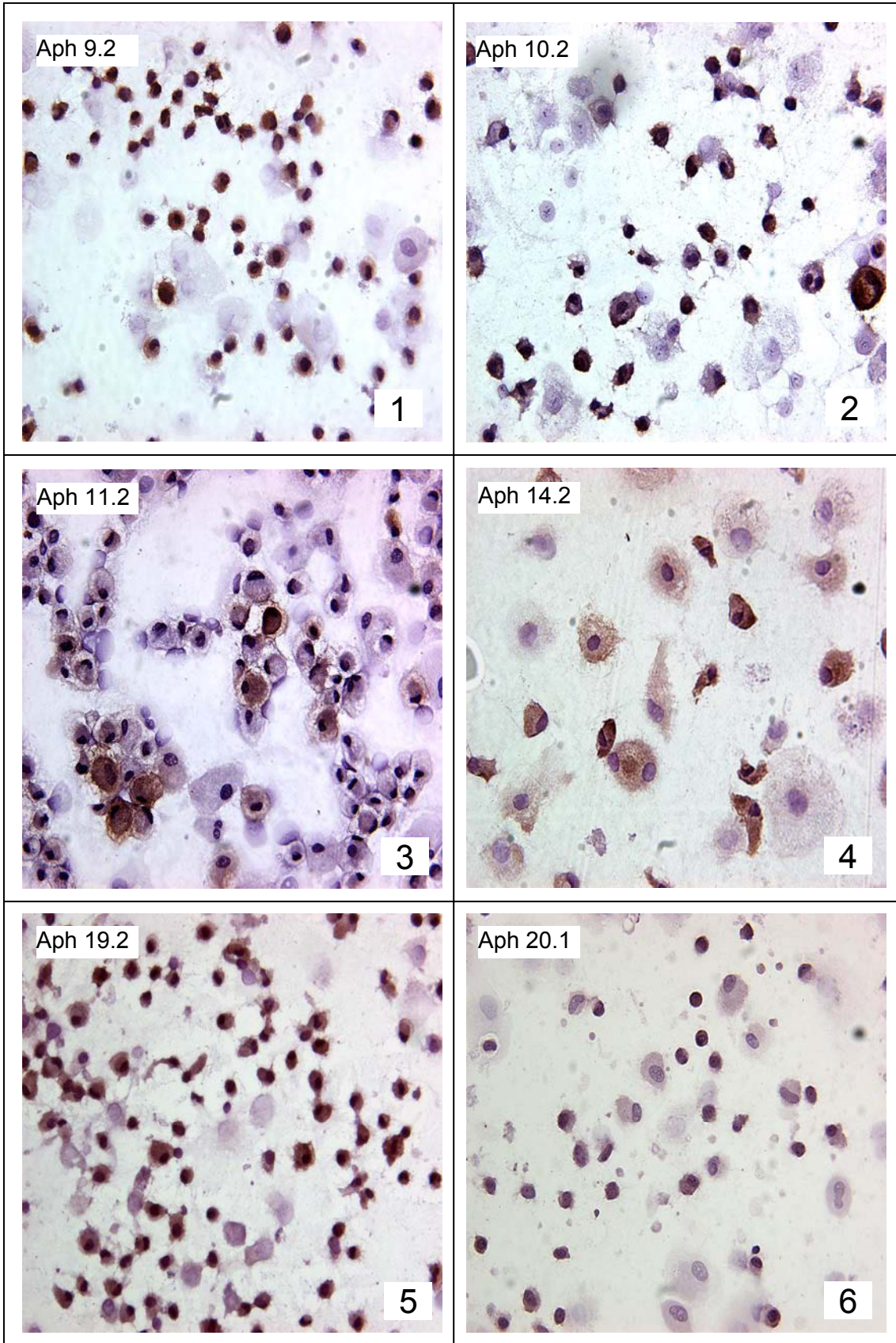


Abb. A7 (1. Teil der Abb. auf S. 75): ***Monozyten unterschiedlicher Spender (s. auch Tab. 3.1) sind positiv für Insulin nach zehn Tagen Kultur in X- Medium und Y-Medium (Tab. 3.2).*** Angefärbt wurden die Zellen mit dem monoklonalen Antikörper IN-05 (Tab. 3.3). Zur statistischen Auswertung wurden die Präparate der Apheresen 9.2, 12.2, 19.1 und 22.1 auf Insulin-positive Zellen ausgezählt. Das Ergebnis war, dass sich $69 \pm 8\%$ der Zellen positiv für Insulin färbten. Vergrößerung: 600x.



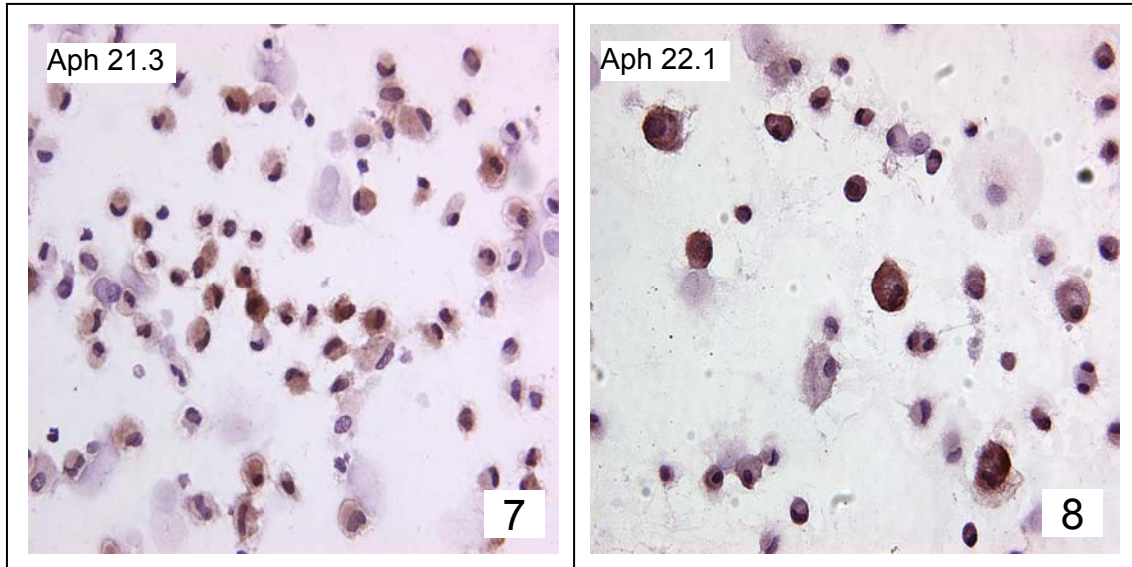
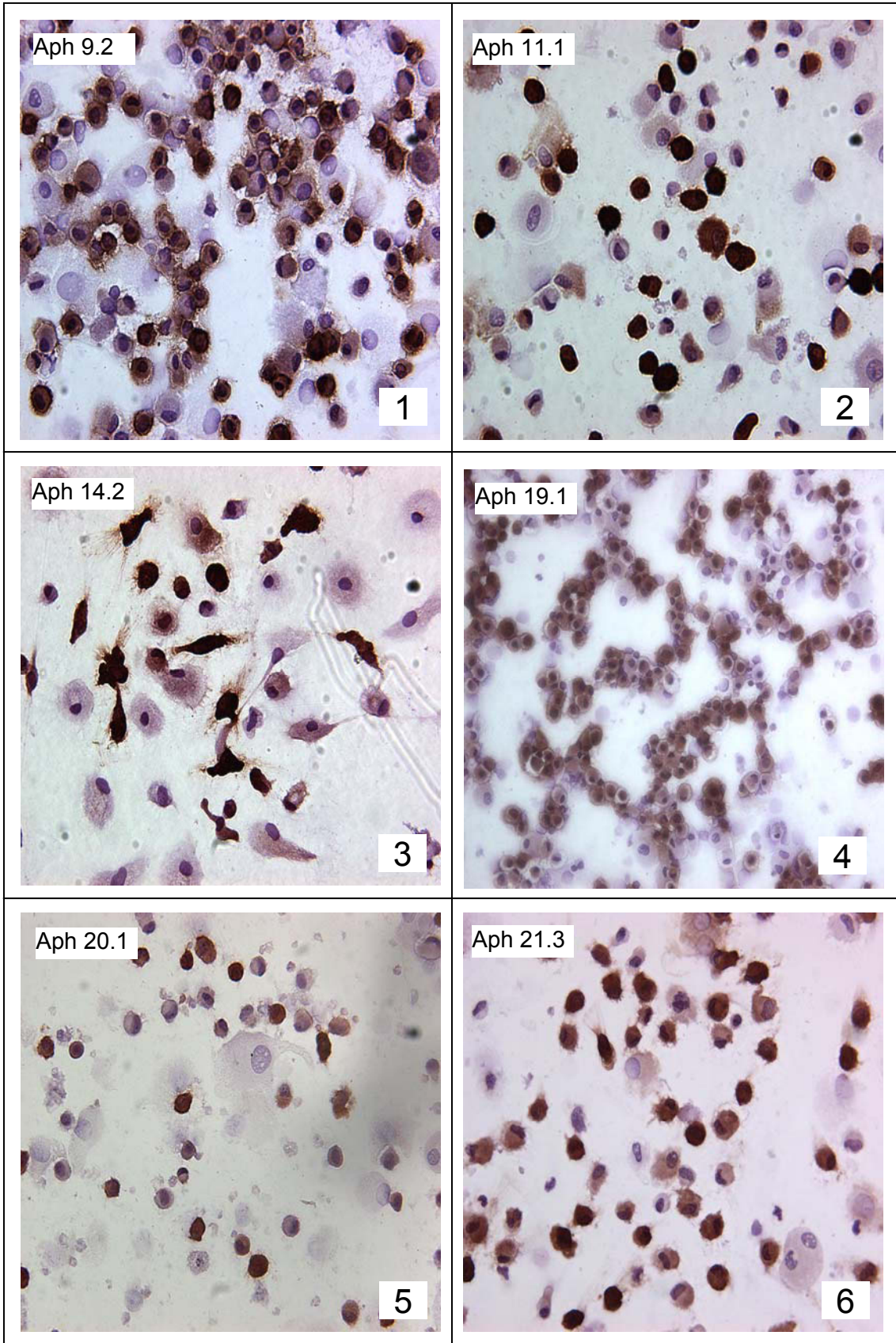


Abb. A8 (1. Teil der Abb. auf S. 77): ***Monozyten unterschiedlicher Spender (s. auch Tab. 3.1) sind positiv für C-Peptid nach zehn Tagen Kultur in X-Medium und Y-Medium (Tab. 3.2).*** Angefärbt wurden die Zellen mit dem monoklonalen Antikörper C-Pep 01. Zur statistischen Auswertung wurden die Präparate der Apherese 9.2, 14.2, 21.3 und 22.1 auf C-Peptid-positive Zellen ausgezählt. Das Ergebnis war, dass sich $49 \pm 30\%$ der Zellen positiv für C-Peptid färbten. Vergrößerung: 600x. Der Nachweis von C-Peptid gelang nicht immer eindeutig (siehe hierzu Aph 20.1).



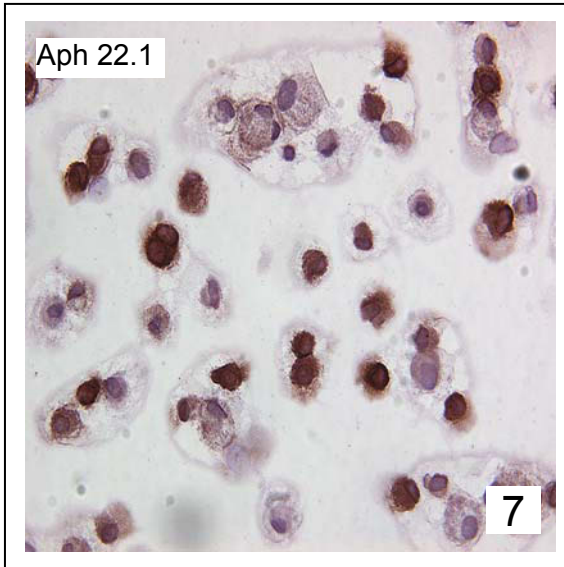


Abb. A9 (1. Teil der Abb. auf Seite 79): ***Monozyten unterschiedlicher Spender (s. auch Tab. 3.1) sind positiv für CD14 nach zehn Tagen Kultur in X- Medium und Y-Medium (Tab. 3.2).*** Verwendet wurde der anti-CD14 Antikörper B365.1 (Tab. 3.3). Zur statistischen Auswertung wurden die Präparate der Apheresen 9.2, 11.1, 19.1 und 22.1 auf CD14-positive Zellen ausgezählt. Das Ergebnis war, dass sich 60 ± 4 Prozent der Zellen positiv für CD14 färbten. Vergrößerung: 600x.

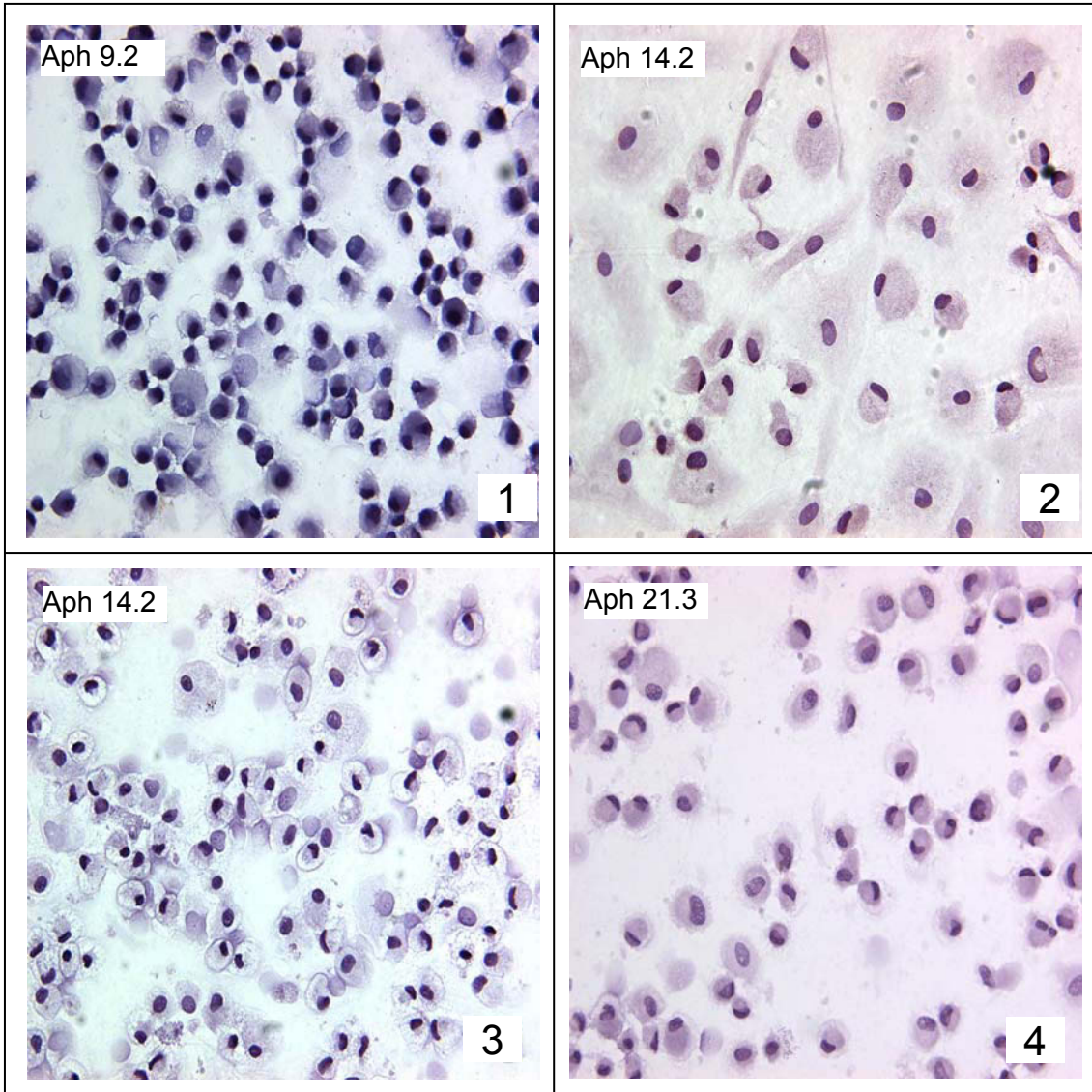


Abb. A10: Unterschiedliche Negativkontrollen von Insulin-positiven Zellen vom Kulturtag 10 oder älter. In keinem dieser Präparate zeigte der verwendete Sekundärantikörper (Tab. 3.3) eine Kreuzreaktion. Vergrößerung: 600x.

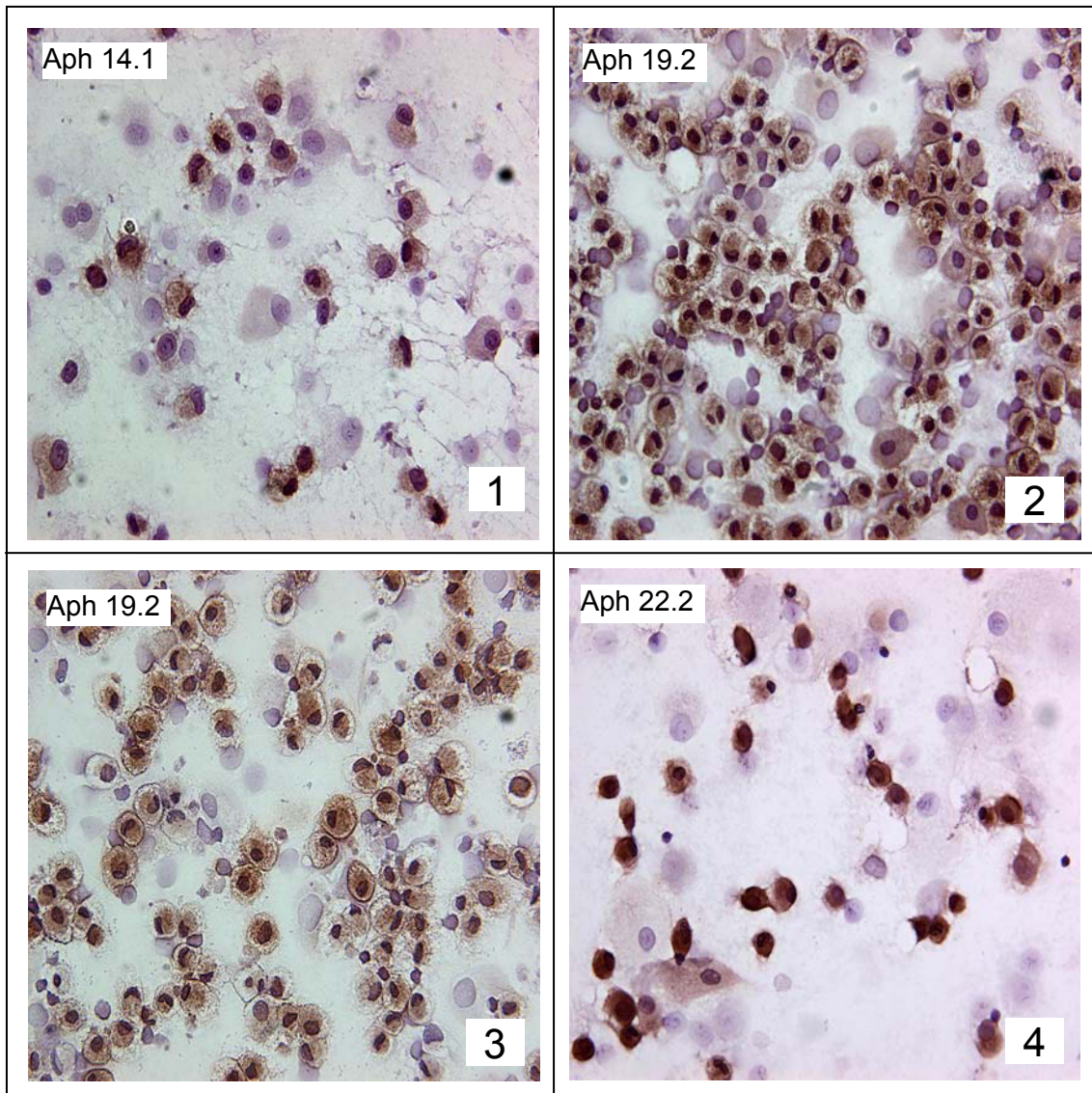


Abb. A11: Humane Monozyten, die für 10 Tage in X-Medium kultiviert wurden, sind Insulin-positiv (Tab. 3.2). Auch ohne die Cytokine HGF und EGF (Y-Medium; Tab. 3.2) sind Insulin-positive Monozyten nachweisbar (s. auch Abb. A12). Zur statistischen Auswertung wurden die Zellen der drei Aphereseen ausgezählt. Das Ergebnis war, dass sich 54 ± 6 Prozent der Zellen positiv für Insulin färbten. Vergrößerung: 600x.

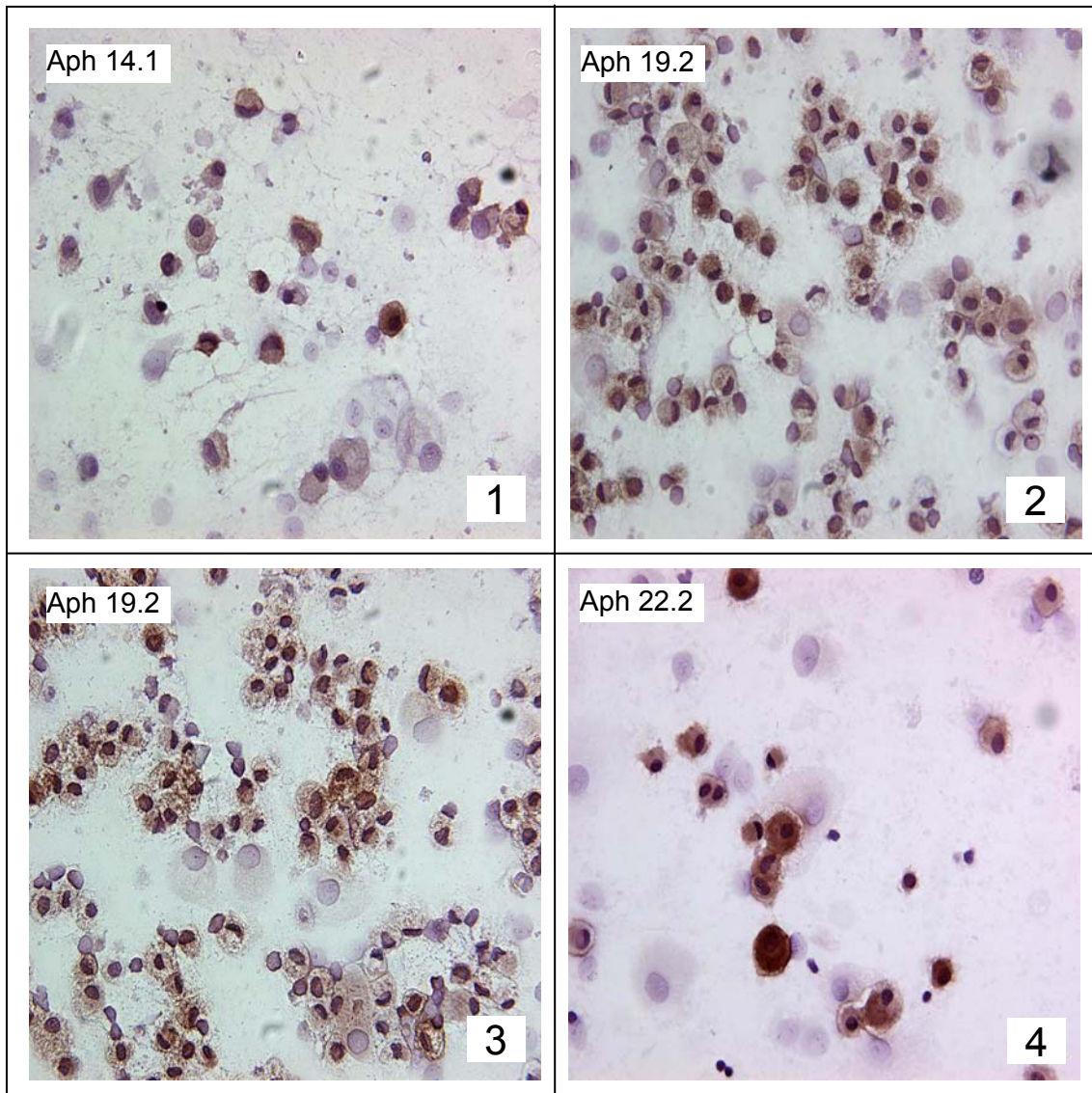


Abb. A12: Humane Monozyten, die für 10 Tage in X-M edium kultiviert wurden, sind positiv für C-Peptid (Tab. 3.2). Auch ohne die Cytokine HGF und EGF lässt sich C-Peptid in den Zellen nachweisen (s. auch Abb. A11). Zur statistischen Auswertung wurden die Zellen der drei Apheresen ausgezählt. Das Ergebnis war, dass sich 48 ± 7 Prozent der Zellen positiv für C-Peptid färbten. Vergrößerung: 600x.

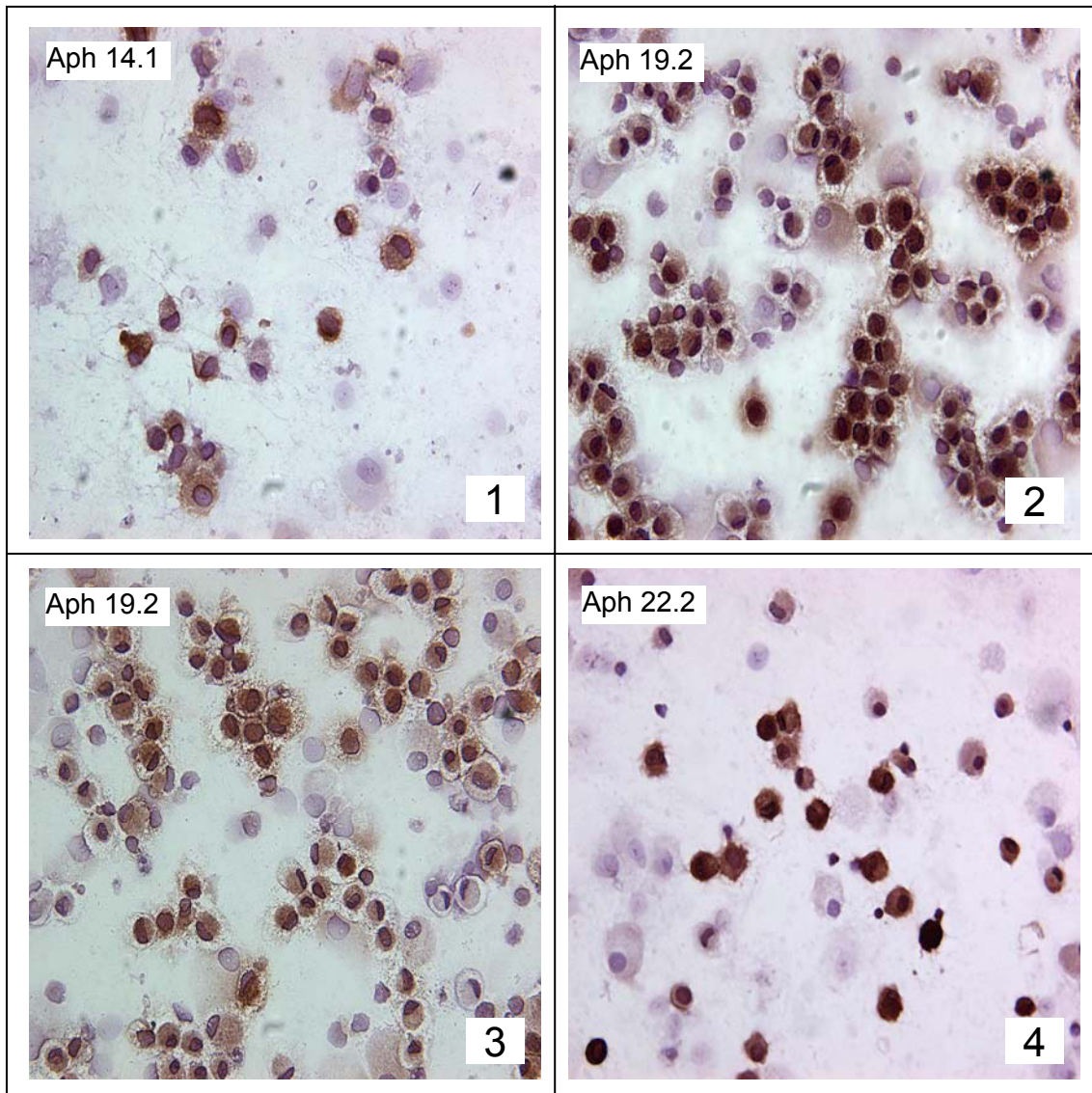


Abb. A13: Humane Monozyten, die für 10 Tage in X-Medium kultiviert wurden, sind positiv für CD14 (Tab. 3.2). Die Anzahl an CD14-positiven Zellen ($59\% \pm 11\%$) unterschied sich nicht von einer Kultur in Standardmedium. Vergrößerung: 600x.

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, und Herrn Professor Dr. med. Professor h.c. A. Thiede, Emeritus 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 sehr für die Bereitstellung des interessanten Themas und die vielfältigen Unterstützungen während der 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.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Frau Daniela Schmidt und meiner Familie danken, die mich besonders mit aufmunternden Worten während dieser Zeit unterstützt haben.