

Aus der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie
Direktor (komm.): Prof. Dr. Dr. Dieter Bröring
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

GENERIERUNG INSULIN PRODUZIERENDER ZELLEN
AUS MONOZYTEN NICHT HUMANER PRIMATEN ANHAND
EINES OPTIMIERTEN VERFAHRENS ZUR HERSTELLUNG
HUMANER „NEO-INSELZELLEN“

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der
Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
OLE HARDER
aus Schleswig
Kiel 2010

1. Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. med. Schulze
Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Lutter
Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie

Tag der mündlichen Prüfung: 16.11.2010

Zum Druck genehmigt.

Meinen Eltern als Dank!

Inhalt

1	Einleitung.....	1
2	Fragestellung.....	7
3	Material und Methoden.....	8
3.1	Zellkultur.....	8
3.1.1	Herkunft der humanen Monozyten.....	8
3.1.2	Generieren von PCMO.....	8
3.1.3	Dedifferenzierung.....	9
3.2	Generieren von Neo-Inselzellen.....	9
3.2.1	Herstellung mit Grundmedium.....	9
3.2.2	Verbessertes Neo-Inselzellmedium.....	10
3.2.3	Mediumwechsel.....	10
3.2.4	Zellernte.....	11
3.2.5	Herstellung von Zytospins.....	11
3.3	Klassische Färbungen.....	11
3.3.1	Färbung nach Pappenheim.....	11
3.3.2	Dithizone-Färbung.....	12
3.3.3	Färbung der unspezifischen Alpha-Naphtylacetat-Esterase.....	13
3.4	Immunhistochemie.....	13
3.4.1	Prinzip.....	13
3.4.2	Durchführung der immunhistochemischen Färbungen.....	15
3.4.3	Durchführung APAAP-Methode.....	15
3.4.4	Durchführung Avidin-Biotin-Methode.....	19
3.4.5	Immunfluoreszenz- und Immunfluoreszenzdoppelfärbung.....	20
3.5	Durchflusszytometrie.....	21
3.5.1	Grundlagen der Durchflusszytometrie.....	21
3.5.2	Durchführung der Durchflusszytometrie an PCMO.....	21
3.6	ELISA (Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay).....	24
3.6.1	Double-Antibody-Sandwich-ELISA.....	24
3.6.2	Insulin ELISA.....	25
3.7	Tierversuch.....	26
3.7.1	Ethikantrag.....	26

3.7.2	Tierhaltung	26
3.7.3	Splenektomie beim Anubispavian (Papio anubis)	26
4	Ergebnisse	28
4.1	Charakterisierung humaner Zellen.....	28
4.1.1	Charakterisierung von PCMO	28
4.1.2	Morphologie von Neo-Inselzellen	31
4.1.3	Proteinexpression.....	31
4.1.4	Insulingehalt	36
4.2	Charakterisierung von Neo-Inselzellen nicht humaner Primaten	37
4.2.1	Proteinexpression.....	39
4.2.2	Insulingehalt der nicht humanen Primaten-Neo-Inselzellen	42
4.3	Verlaufsbeobachtung nach Splenektomie beim Anubispavian	43
5	Diskussion	44
5.1	Grundlagen zur Verbesserung des Differenzierungsmediums zur Neo-Inselzellherstellung	44
5.2	Die Rolle von Aktivin A.....	44
5.3	Generierung von PCMO aus Monozyten nicht humaner Primaten	46
5.4	Differenzierungsstufe der Neo-Inselzellen unter Beachtung der embryonalen Entwicklung des endokrinen Pankreas	47
5.5	Neo-Inselzellen aus Monozyten nicht humaner Primaten zur potenziellen autologen Verwendung	48
5.6	Vorteile bei der Verwendung von PCMO im Vergleich zu anderen differenzierbaren Zellen	50
6	Zusammenfassung	52
7	Literaturverzeichnis.....	54
8	Danksagung.....	59
9	Curriculum vitae	60
10	Anhang	61

Abkürzungsverzeichnis

APAAP-Methode	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode
APC	Allophycocyanin
BSA	bovine serum albumin
CD	cluster of differentiation
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-Dihydrochlorid
Dm	Diabetes mellitus
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay
FACS	Fluorescent-Aktivated-Cell-Sorting
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
HBSS	Hank's buffered salt solution
HGF	hepatocyte growth factor
HRP	horseradish peroxidase
Il-3	Interleukin 3
MCSF	macrophage colony stimulating factor
PBS	phosphate buffered saline
PCMO	programmierbare Zellen monozytärer Herkunft
PE	Phycoerythrin
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TBS	Tris buffered saline
TGF	transforming growth factor- β
TMB	3,3`-5,5`-tetramethylbenzidine

1 Einleitung

Mehr als 200 Millionen Menschen weltweit sind an Diabetes mellitus erkrankt (International Diabetes Federation, 2009). Er ist definiert als eine durch den Leitbefund chronische Hyperglykämie charakterisierte Regulationsstörung des Stoffwechsels. Es liegt entweder eine gestörte Insulinsekretion oder eine verminderte Insulinwirkung oder auch beides zugrunde. Die chronische Hyperglykämie führt über die diabetesspezifische Mikroangiopathie zu Folgeerkrankungen, vorwiegend an Augen, Nieren und Nervensystem, und über die diabetesassoziierte Makroangiopathie zu Folgeerkrankungen, vorwiegend an Herz, Gehirn und den peripheren Arterien (Evidenzbasierte Leitlinie der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, 2004). Dies bedeutet eine signifikant erhöhte Morbidität wie auch Mortalität. Unterschieden werden im Wesentlichen zwei verschiedene Klassen von Diabetes. Zum einen Diabetes mellitus Typ 1, der durch eine progrediente Zerstörung der Insulin produzierenden β -Zellen in den Langerhansschen Inseln des Pankreas gekennzeichnet ist. Hier sind eine immunologische sowie eine idiopathische Form bekannt. Er tritt vorwiegend im jüngeren Alter auf. Zum anderen Diabetes mellitus Typ 2, der sich von einer vorwiegenden Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis zu einem vorwiegend sekretorischen Defekt mit Insulinresistenz erstrecken kann (Evidenzbasierte Leitlinie der Deutschen Diabetes-Gesellschaft, 2004). Die immer genauere Unterteilung des Diabetes mellitus nach Ätiologie und klinischem Schweregrad ist das Ergebnis intensiver aktueller Forschung und kann daher nur in Teilen in diese Arbeit aufgenommen werden.

Die bisherige Therapie sowohl für Diabetes mellitus Typ 1 wie auch für Typ 2 beruht auf der strikten Normalisierung der Blutglucosekonzentration. Konservativ wird versucht, dieses Ziel durch eine konsequente Ernährungsumstellung, Erhöhung der körperlichen Aktivität sowie den intensiven Einsatz von Insulin zu erreichen. Als kausale Therapie des Diabetes mellitus Typ 1 steht heutzutage eine Bauchspeicheldrüsentransplantation mit guten Langzeitergebnissen zur Verfügung (Gruessner, Sutherland 2005). Auch eine Inselzelltransplantation ist möglich, allerdings mit schlechteren Resultaten (Corrêa-Giannella, Raposo do Amaral 2009). Ein häufiges Problem stellt hier der Verlust von funktionsfähiger Inselzellmasse dar, so dass mehrere Spender für eine Inselzelltransplantation benötigt werden. Unter

allen Umständen müssen beide Patientengruppen einer lebenslangen Immunsuppression unterzogen werden. Weiterhin ist zu beachten, dass das Angebot an Spenderorganen begrenzt ist. Ungeachtet dieser Probleme wurde beobachtet, dass auch bei einem guten Ansprechen auf eine intensive Insulintherapie die Komorbidität sowohl im Vergleich zu einer Inselzelltransplantation wie auch zu einer Bauchspeicheldrüsentransplantation erhöht ist (de Sá et al. 2009; Navarro et al. 1997). Da allerdings nicht jedem Typ 1-Diabetiker eine Transplantation angeboten werden kann, bleibt eine intensive Insulintherapie Therapie der Wahl. Über eine mögliche Transplantation wird in Europa nach den Leitlinien von Eurotransplant entschieden. Welches Transplantationsverfahren hierbei jeweils ausgewählt wird, hängt direkt von den Voraussetzungen (z.B. Nierenfunktion) des Patienten ab.

Betrachtet man die zurzeit zur Verfügung stehenden Behandlungsmethoden, so gehen alle mit einer signifikanten Einschränkung der Lebensqualität (tägliche Injektionen, Tabletteneinnahme, Nebenwirkungen, Komorbidität) einher. Bei der regelmäßigen Insulininjektion wird, sowohl im Hinblick auf den Zeitpunkt wie auch auf die Dosis, nie die physiologische Leistung der β -Zellen des Pankreas erreicht. Bei den Transplantationsverfahren ist auch in Zukunft ein Mangel an Spenderorganen zu erwarten, außerdem besteht immer die Gefahr einer Abstoßungsreaktion. Aufgrund der nicht zufrieden stellenden Therapiemöglichkeiten besteht Bedarf, neue Wege in der Diabetestherapie zu gehen. Dies gilt insbesondere für Patienten mit einem Dm Typ 1, wo eine lebenslange Therapie meist schon in der Jugend begonnen werden muss. Hier könnten neue Therapieformen zu einem Leben mit deutlich erhöhter Lebensqualität führen.

Seit Ende der 1990-ziger Jahre widmen sich Forscher in verstärktem Maße der Untersuchung von Stammzellen. Definitionsgemäß handelt es sich dabei um undifferenzierte Zellen, welche sich unbegrenzt selbst erneuern können und zudem die Fähigkeit besitzen, sich in unterschiedliche Zelltypen aller drei Keimblätter auszudifferenzieren (Pluripotenz). Noch vor kurzer Zeit wurde angenommen, dass sich pluripotente Zellen nur aus dem Embryo gewinnen lassen. Inzwischen konnte jedoch in vielen Untersuchungen gezeigt werden, dass adulte Stammzellen nicht nur im Knochenmark (hämatopoetische Stammzellen), sondern in nahezu allen Gewebetypen vorkommen. Für die hämatopoetischen Stammzellen konnte

inzwischen die Fähigkeit der Plastizität im Tiermodell gut belegt werden. Es konnte gezeigt werden (Krause et al. 2001), dass sich in bestrahlte Mäuse transplantierte hämatopoetische Stammzellen zu Zellen des Mesoderms (Blutzellen), aber auch zu Zellen differenzieren können, welche normalerweise endodermalen (epitheliale Zellen in Lunge und Hoden) oder ektodermalen (Hautzellen) Ursprungs sind. Weitere Studien konnten die Ausdifferenzierung adulter Stammzellen in Hepatozyten (Lagasse et al. 2000) bzw. eine Entwicklung in neuronartige Zellen (Brazelton et al. 2000) aus Knochenmarkzellen demonstrieren. Die Transplantation von Stammzellen wird als potenzielle Lösung der oben genannten Probleme der Diabetestherapie, insbesondere der Organknappheit bei Transplantationen angesehen. Allerdings ist auch der Einsatz von Stammzellen in einer neuen Therapie des Dm Typ 1 nicht unproblematisch. So stellt sich bei embryonal gewonnenen Stammzellen z.B. die Frage der ethischen Vertretbarkeit. Des Weiteren sind hier die Immunogenität sowie eine eventuell vorhandene Teratogenität kritisch zu bewerten (Przyborski 2005). Als verfahrenstechnisches Problem stellt sich die Tatsache dar, dass beim Einsatz embryonaler Stammzellen die Kultivierung einer homogenen Zellpopulation schwierig ist. Dennoch ist die Herstellung von Insulin produzierenden Zellen aus embryonalen oder adulten Stammzellen Gegenstand vieler aktueller Publikationen. In verschiedenen Arbeiten wurden diese Zellen auf ihre Fähigkeit getestet, Insulin auf einen Glucosereiz hin auszuschütten (in vitro) und Normoglykämie in diabetischen Tieren (in vivo) wieder herzustellen (z.B. Kroon et al. 2008). Die oben bereits angesprochenen Probleme des Stammzeleinsatzes sind jedoch weiterhin ungelöst.

Neben der Verwendung von Stammzellen kommen auf der Suche nach neuen, zellbasierten Therapiemöglichkeiten des Diabetes mehr und mehr auch gentechnisch veränderte Zellen zum Einsatz. Sie bieten den Vorteil, die Genexpression der veränderten Zellen effektiv und gezielt beeinflussen zu können. Jedoch sind ihre Herstellung technisch aufwendig und ihre Anwendung ähnlich wie bei embryonalen Stammzellen umstritten. Ergebnisse von Langzeituntersuchungen, die das Verhalten von gentechnisch veränderten Insulin produzierenden Zellen in vivo untersuchen, müssen abgewartet werden, um gegebenenfalls weitere Risiken aufzudecken. Parallel zu den Ergebnissen in der Stammzellforschung gibt es auch für den Einsatz Insulin produzierender Zellen aus gentechnisch manipulierten Zellen eine Reihe

aktueller Forschungsarbeiten. So beschreibt z.B. Karnieli et al. (2007) den Einsatz gentechnisch manipulierter Insulin produzierender Zellen aus mesenchymalen Knochenmarkszellen in vitro und im Mausmodell. Es konnten hier eine Glucose abhängige Insulinproduktion in vitro wie auch der Rückgang einer induzierten Hyperglykämie im Mausmodell nachgewiesen werden. Bei genauer Betrachtung der verschiedenen Ansätze zur Entwicklung einer zellbasierten Therapie des Diabetes kann jedoch festgehalten werden, dass alle Verfahren mit einer Reihe von ungelösten Problemen und teilweise ernsthaften Risiken behaftet sind, so dass über weitere Alternativen nachgedacht werden muss.

Wünschenswert für eine zellbasierte, kausale Therapie des Diabetes mellitus wäre der Einsatz nicht immunogener, autologer adulter Zellen, die nach entsprechender in vitro Behandlung die Funktion von Insulin produzierenden Zellen übernehmen könnten. Diese sollten in einem nicht-invasiven Verfahren von einem Patienten gewonnen und in kurzer Zeit in ausreichender Menge hergestellt werden können. Unserer Arbeitsgruppe ist es kürzlich gelungen, aus der Monozytenfraktion des peripheren Blutes über verschiedene Dedifferenzierungs- und Programmierungsschritte eine Zelle herzustellen, welche Stammzeleigenschaften besitzt (Ruhnke et al. 2005 b). Diese programmierbare Zelle monozytären Ursprungs (PCMO) exprimiert die Stammzellmarker CD90 und CD117 und zeigt keine erhöhte Telomeraseaktivität, was sie von Stammzellen unterscheidet und dafür spricht, dass kein kanzerogenes Potential vorhanden ist. Unter bestimmten Voraussetzungen ist diese Zelle in der Lage, sich zu unterschiedlichen somatischen Zellen zu differenzieren. Dieses konnte bislang für Hepatozyten (Ruhnke et al. 2005 a,b), neuronale Zellen, Keratinozyten, Chondrozyten (Pufe et. al. 2008) in vitro sowie für Insulin produzierende Zellen (in vivo und in vitro, Ruhnke et al. 2005 b) gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollen verschiedene Ansätze zu Generierung Insulin produzierender Zellen aus „programmierbaren Zellen monozytärer Herkunft“ (PCMO) dargestellt und verglichen werden. Hierbei werden die Expression inselzellspezifischer Antigene, die Fähigkeit Glucose abhängig Insulin auszuschütten sowie der Insulingehalt in den Zellen untersucht. Im Tiermodell an durch Streptozotocingabe diabetisch gemachten Mäusen konnten diese Zellen passager

den Blutzuckerspiegel normalisieren, zeigten jedoch in vitro noch erhebliche Defizite im Vergleich zu primären β -Zellen des Pankreas auf (Ruhnke et al. 2005 b). Um die Leistungsfähigkeit der Neo-Inselzellen zu erhöhen, wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit das etablierte Zellkulturmedium um verschiedene Zusätze ergänzt. Diese sind nach ihrem Potenzial ausgewählt, pluripotente Zellen in Insulin produzierende Zellen zu differenzieren, und spielen alle eine entscheidende Rolle im Rahmen der Pankreasembryogenese. Tabelle 1 enthält eine Übersicht über die verwendeten Mediumzusätze und ihre Funktion sowie Referenzen, die ihren Einfluss in der Entwicklung Insulin produzierender Zellen belegen.

Tab.1: Faktoren für die Förderung der β -Zellproliferation und Differenzierung zu Insulin produzierenden Zellen

Faktor	Zugehörigkeit	Effekt
Aktivin A	transforming growth factor (TGF)	Aktivin A aktiviert über die Bindung an Transmembranrezeptoren und eine anschließende Signalkaskade Transkriptionsfaktorenkomplexe, die für eine spezifische Genexpression im Verlauf der Pankreasentwicklung verantwortlich sind (Sulzbacher et al. 2009).
Betacellulin	epidermal growth factor (EGF)	Wirkt mitosefördernd auf Pankreaszellen und erhöht die Anzahl der sich entwickelnden Inselzellcluster. (Demeterco et al. 2000)
Exendin 3+4	Glucagon-like-peptide-1 Rezeptoragonist	Exendin führt zur Differenzierung von Pankreasgangzellen in Insulin positiven Zellen (Zhou et al. 2002)

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, PCMO äquivalente Zellen und Neo-Inselzellen aus Monozyten nicht humaner Primaten herzustellen und auf ihre Funktion hin zu untersuchen. Neo-Inselzellen aus Monozyten nicht humaner Primaten eröffnen aufgrund des nahen Verwandtschaftsgrades zum Menschen die Möglichkeit, wichtige Erkenntnisse für die spätere klinische Anwendung zu erlangen.

Im Rahmen der Vorbereitung von Transplantationsversuchen von Neo-Inselzellen in nicht humanen Primaten ist ein kritischer Punkt, ob die nötige Zahl Monozyten für die Durchführung einer autologen Transplantation zur Verfügung steht. Die Beantwortung dieser Frage im Fall von Anubispavianen ist ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit, wobei eine ausreichende Zellzahl mit Hilfe einer Splenektomie gewonnen werden soll.

2 Fragestellung

In der vorliegenden experimentellen Studie soll untersucht werden, ob aus PCMO durch die Behandlung mit verschiedenen Wachstumsfaktoren und deren neue Kombination in ihrer Qualität verbesserte, Insulin produzierende Zellen hergestellt werden können. Hierbei soll das optimale Verfahren herausgearbeitet werden. Verglichen werden die Zellen mit den ursprünglich aus PCMO produzierten Neo-Inselzellen, die bereits klinisch in einem Mausmodell eingesetzt wurden und zu einer kurzzeitigen Normalisierung des Blutzuckerspiegels führten.

In einem zweiten Versuchsteil sollen Neo-Inselzellen aus nicht humanen Primaten hergestellt und in ihrer in vitro Funktion dargestellt werden. Hierbei wird unter anderem die Fähigkeit der Zellen untersucht, die inselzellspezifischen Antigene Insulin, Pdx1, Glut2 und C-Peptid zu exprimieren. Außerdem wird betrachtet, wie ausgeprägt die Fähigkeit der Insulin produzierenden Zellen ist, Insulin zu speichern.

Vorbereitend für weiterführende Forschung wird der Frage nachgegangen, ob durch eine Splenektomie beim Anubispavian (*Papio anubis*) eine ausreichende Anzahl von Monozyten zur autologen Transplantation nach Dedifferenzierung und Differenzierung zu Neo-Inselzellen zur Verfügung steht.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Herkunft der humanen Monozyten

Die für diese Arbeit verwendeten Leukozytenpräparate wurden nach Information und erklärtem Einverständnis der Spender vom Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein zur Verfügung gestellt. Hierbei kamen neben Buffy-Coats auch Leukozyten zum Einsatz, die als Nebenprodukt bei der Herstellung von Thrombozytenkonzentraten gewonnen wurden.

3.1.2 Generieren von PCMO

Neben dem Einsatz von Buffy-Coats als Quelle von Monozyten zur Herstellung von PCMO humaner Herkunft muss bei Zellen nicht humaner Primaten auf Vollblut oder eine entsprechende Menge aus homogenisiertem, verdünntem Milzgewebe zurückgegriffen werden. Für 1×10^6 Zellen PCMO wird eine Menge von ca. 25 ml Vollblut oder Milzgewebe benötigt. Die Gewinnung erfolgt nach der Blutentnahme aus einem peripheren Gefäß oder nach zunächst mechanischer Zerkleinerung und Homogenisierung von Milzparenchym (Tierversuch) durch eine Dichte-Gradienten-Zentrifugation (Multifuge 3 S-R, Thermo Scientific, Dreieich) und anschließende Selektion anhand des Adhäsionsverhaltens in der Zellkultur. Hierzu wird das Blut 1:1 mit PBS (phosphate buffered saline) ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (Lonza, Walkersville, USA) verdünnt. In einem 50 ml Falcon-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) werden 20 ml Ficoll-Hypaque (Invitrogen, Karlsruhe) mit der verdünnten Lösung aufgefüllt und mit 2000 rpm 25 min bei 20°C ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend sammelt sich in der Interphase die mononukleäre Zellschicht. Diese Interphase wird abpipettiert und in zwei neue Falcon-Röhrchen überführt. Beide Röhrchen werden bis auf ein Volumen von 50 ml mit PBS aufgefüllt und anschließend bei 1600 rpm für 10 min bei 20°C zentrifugiert, der Überstand wird vorsichtig abgenommen und verworfen. Nun werden die entstandenen Zellpellets dreimal mit PBS bei 1000 rpm für 5 min

gewaschen, mit Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen (Invitrogen, Karlsruhe) mit 1×10^7 Zellen pro 10 ml Dedifferenzierungsmedium ausgesät. Bei zur Qualitätskontrolle geernteten Zellen erfolgt die Bestimmung der Zellzahl nach Zellernte mit Hilfe eines automatischen Zellzählers (ABX Micros60, Block Scientific, Nutley, USA).

3.1.3 Dedifferenzierung

Das Dedifferenzierungsmedium setzt sich aus RPMI 1640 Medium, 10% humanem AB-Serum, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin (alles von Invitrogen, Karlsruhe) zusammen. Nach 12 Stunden werden nicht adhärente Zellen entfernt. Die Kultur der adhärennten Zellen erfolgt für weitere sechs Tage bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank (Heracell Kendro, Thermo Scientific, Dreieich) in dem oben beschriebenen RPMI 1640 basiertem Medium, dem zusätzlich 140 mM β -Mercaptoethanol, 5 ng/ml M-CSF und 0,4 ng/ml humanes IL-3 (alles R&D Systems, Wiesbaden) zugesetzt wurden. Die Zellen erhalten einen Mediumwechsel an Tag zwei und vier. An Tag sechs werden die Zellen geerntet und charakterisiert oder durch Zugabe von Inselzellmedium zu Insulin produzierenden Zellen differenziert.

3.2 Generieren von Neo-Inselzellen

3.2.1 Herstellung mit Grundmedium

Aus den nach dem oben beschriebenen Protokoll gewonnenen PCMO können durch Differenzierung Insulin produzierende Zellen hergestellt werden. Hierzu werden die PCMO in einem RPMI 1640 basiertem Medium kultiviert, das 10 ng/ml EGF, 20 ng/ml HGF (beides von Calbiochem, München), 10 mM Nicotinamide (Sigma, München) und 5 mM Glucose enthält. Die Kultivierung in dem Inselzell-Grundmedium erfolgt für sieben Tage. Am letzten Tag werden die Zellkulturflaschen mit je 10 ml PBS gespült und die Zellen dann mechanisch vom Boden des Zellkulturgefäßes mit einem Zellschaber (Cell Scraper, Sarstedt, Nümbrecht) gelöst. Alle geernteten Zellen werden in 50 ml PBS in einem Falcon-Röhrchen gesammelt und bei 1600 rpm für 5 min zentrifugiert und konzentriert. Die Bestimmung der

Zellzahl nach Zellernte erfolgt wie bei den bereits zur Qualitätskontrolle der PCMO geernteten Zellen mit Hilfe eines automatischen Zellzählers.

3.2.2 Verbessertes Neo-Inselzellmedium

Um eine Optimierung der Insulinproduktion der Neo-Inselzellen zu erreichen, wird das Protokoll zur Herstellung des oben genannten Inselzellgrundmediums in vier verschiedenen Ansätzen jeweils um je eine Substanz ergänzt. Die aus nicht humanen Primaten gewonnenen PCMO werden später lediglich in dem besten der folgenden Testmedien differenziert. Diese werden zunächst an den deutlich einfacher zu gewinnenden humanen Zellen auf ihre Differenzierungsleistung untersucht. Hierzu werden die PCMO in einem RPMI 1640 basiertem Medium kultiviert, das 10 ng/ml EGF, 20 ng/ml HGF (beides von Calbiochem, München), 10 mM Nicotinamide (Sigma, München) und 5 mM Glucose (Merck, Darmstadt) enthält. Es werden folgende Substanzen in genannter Konzentration supplementiert:

Neo-Inselzellmedium A:

Aktivin A 2ng/ml (R&D Systems, Wiesbaden)

Neo-Inselzellmedium B:

Betacellulin 0,5ng/ml (Sigma Aldrich, Taufkirchen)

Neo-Inselzellmedium C:

Exendin 3 10nmol/ml (Sigma Aldrich, Taufkirchen)

Neo-Inselzellmedium D:

Exendin 4 10nmol/ml (Sigma Aldrich, Taufkirchen)

3.2.3 Mediumwechsel

Für einen Mediumwechsel der Monozyten- und Neo-Inselzellkulturen wird alle drei Tage die Hälfte des verbrauchten Mediums abpipettiert und durch frisches Medium

ersetzt. Sind im Überstand viele nicht adhärenente Zellen vorhanden, können diese durch Zentrifugation konzentriert, resuspendiert und in einer eigenen Kultur erneut ausgesät werden.

3.2.4 Zellernte

Zum Ernten der PCMO und später auch der Neo-Inselzellen wird der in den Zellkulturflaschen vorhandene Mediumüberstand vorsichtig abpipettiert. Anschließend wird zweimal mit jeweils 10 ml PBS gespült. Die Zellkulturflaschen werden nun mit je 5ml PBS befüllt und die Zellen mechanisch mit Hilfe eines Zellschabers vorsichtig gelöst, da die aus Monozyten gewonnen PCMO bzw. Neo-Inselzellen nicht durch eine enzymatische Behandlung von der Zellkulturflasche gelöst werden können (nicht veröffentlichte Beobachtung unserer Arbeitsgruppe). Die Zellsuspension wird in Falcon-Röhrchen gesammelt und auf je 10 ml Gesamtvolumen mit PBS verdünnt. Es folgt eine Zentrifugation für 10 min bei 1000 rpm, wonach der sich bildende Überstand vorsichtig abpipettiert wird. Das verbleibende Zellpellet kann nun resuspendiert werden und mit Hilfe eines automatischen Zellzählers zur Herstellung von Zytospins portioniert werden.

3.2.5 Herstellung von Zytospins

Eine Zellsuspension, deren Zellgehalt mit Hilfe eines automatischen Zellzählers und entsprechender Verdünnung mit PBS auf 1×10^6 Zellen je ml eingestellt wurde, wird auf je 30 μ l portioniert. Es folgen Zytozentrifugation (Cytospin 4, Thermo Scientific, Dreieich) und Trocknung über Nacht. Anschließend kann die Weiterverarbeitung z.B. in Form einer Färbung erfolgen.

3.3 Klassische Färbungen

3.3.1 Färbung nach Pappenheim

Reagenzien (alle von Merck, Darmstadt)

- 1) May-Grünwald-Lösung enthält eosinsaures Methylenblau in Methanol : Glycerin (2:1)
- 2) GIEMSA-Lösung (Stammlösung) enthält Azur II sowie eosinsaures Azur II in Methanol : Glycerin (1:1)
- 3) Aqua bidest.
- 4) GIEMSA-Gebrauchslösung (1/2 Std. verwendbar) enthält 1 Volumenteil GIEMSA-Stammlösung in 20 Volumenteilen Aqua bidest..

Das Objekt wird mit May-Grünwald-Lösung bedeckt und nach drei Minuten Einwirkzeit mit Aqua bidest. gründlich gespült. Nun erfolgen Färbung mit GIEMSA-Gebrauchslösung für 15 min, erneute gründliche Spülung mit Aqua bidest., anschließende Trocknung des Objekts an der Luft und Abdeckung (Rick 1977). Die Auswertung und Herstellung von Fotos wird an einem Mikroskop vom Typ Axioskop 40 und einer Digitalkamera vom Typ HBO 50 (beides Carl Zeiss, Göttingen) durchgeführt. Dies ist ebenfalls bei allen weiteren, mikroskopisch zu beurteilenden Präparaten und Färbungen der Fall und wird im weiteren Verlauf nicht mehr gesondert erwähnt.

3.3.2 Dithizone-Färbung

Aufgrund des hohen Gehaltes an Zn^{2+} in Inselzellen lassen sich diese mithilfe des Zink bindenden Chelatbildners Dithizone spezifisch anfärben. Das in den Beta-Zellen enthaltene Insulin wird hierbei indirekt nachgewiesen, da sich intrazellulär jeweils sechs Dithizonemoleküle um ein zentrales Zinkion gruppieren. Diese Eigenschaft kann zur Charakterisierung der Neo-Inselzellen genutzt werden, die sich analog mit Dithizone anfärben lassen. Im Lichtmikroskop zeigt der Dithizone-Zink-Chelatkomplex eine rotbraune Farbe. Zellen, die kein Insulin bzw. Zink enthalten, werden nicht angefärbt.

- 1) Für die Dithizone Färbung werden die in Zellkulturflaschen kultivierten Insulin produzierende Zellen monozytärer Herkunft geerntet und zu Zytospins mit einer definierten Zellzahl verarbeitet.
- 2) Die Dithizone-Arbeitslösung wird durch Lösen von 10 mg Dithizone (ICN Biomedicals, Eschwege) in 1 ml DMSO (Dimethylsulfoxid, WAK-Chemie Medical,

Steinbach) und 9 ml HBSS (Hank's Buffered Salt Solution, Lonza, Walkersville, USA) hergestellt und anschließend steril filtriert (Porengröße 0,2µm).

- 3) Die zu färbenden Zytospins werden für 5 min inkubiert und anschließend unter dem Lichtmikroskop ausgewertet.

3.3.3 Färbung der unspezifischen Alpha-Naphtylacetat-Esterase

Um die monozytäre Herkunft der untersuchten Zellen nachzuweisen, wird mit Hilfe einer Färbung das Enzym Alpha-Naphtylacetat-Esterase nachgewiesen. Hierbei wird Alpha-Naphtylacetat als Enzymsubstrat hydrolysiert. Die so entstandene Naphtholverbindung bildet zusammen mit einem Diazoniumsalz einen braunen, wasserunlöslichen Azofarbstoff. Die Färbung wird mit Hilfe eines Fertig-Kits (91A) der Firma Sigma Aldrich, Taufkirchen, nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.4 Immunhistochemie

3.4.1 Prinzip

Mit Hilfe der Immunhistochemie lassen sich zelluläre Antigene selektiv nachweisen. In dieser Arbeit kommen verschiedene indirekte Verfahren unter Verwendung von zwei bzw. drei Antikörpern zum Einsatz. Der primäre Antikörper bindet hierbei stets zuerst das für ihn spezifische zelluläre Antigen der Zielzelle. Der sekundäre Antikörper ist entweder mit Biotin konjugiert und bindet hiermit einen Avidin-Meerrettich-13-Peroxidase-Komplex oder stellt einen Brückenantikörper dar, der später einen Immunkomplex bindet, bestehend aus alkalischer Phosphatase (AP) und einem Anti-Alkalischer-Phosphatase-Antikörper. Im Fall der Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode erfolgt die Färbereaktion durch eine Diaminobenzidin-Reaktion, bei der ein brauner Farbniederschlag entsteht. Dabei setzt der entstandene Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex aus Wasserstoffperoxid Protonen frei, die das zuvor farblose Diaminobenzidin (DAB) oxidieren und damit zu einem braunen Farbniederschlag führen. Bei der Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode (APAAP) wird für die Färbung Naphthol-As-Biphosphat als

Substrat der AP hinzugegeben. Das Spaltprodukt bildet mit Neufuchsin einen roten Farbniederschlag. Neben den beiden genannten Standardverfahren der Immunhistochemie kommt in dieser Arbeit auch ein Verfahren unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten sekundären Antikörpern zum Einsatz, die nach Anregung der Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop direkt nachgewiesen werden können. Die Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung der verwendeten immunhistologischen Verfahren.

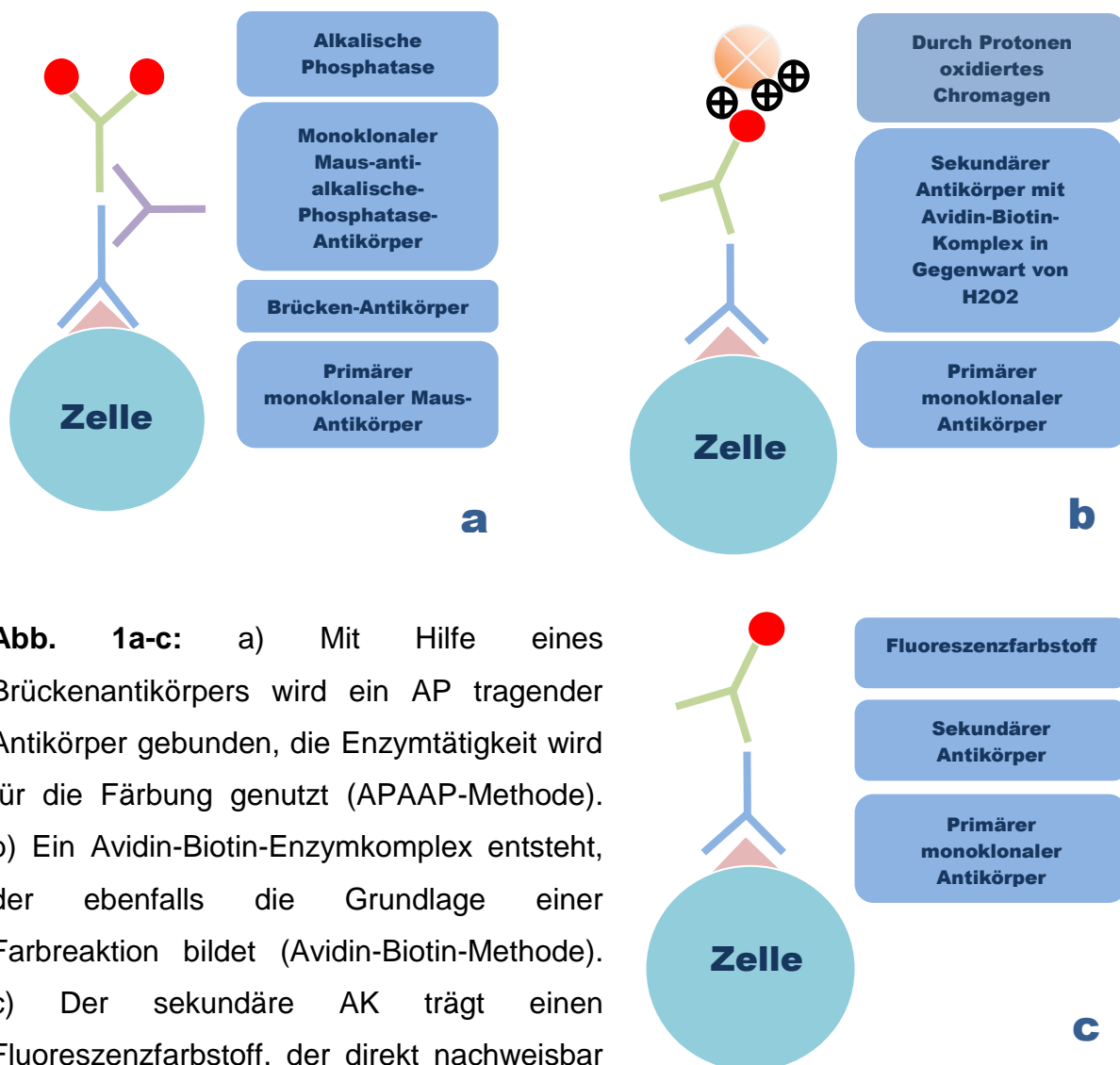


Abb. 1a-c: a) Mit Hilfe eines Brückenantikörpers wird ein AP tragender Antikörper gebunden, die Enzymtätigkeit wird für die Färbung genutzt (APAAP-Methode). b) Ein Avidin-Biotin-Enzymkomplex entsteht, der ebenfalls die Grundlage einer Farbreaktion bildet (Avidin-Biotin-Methode). c) Der sekundäre AK trägt einen Fluoreszenzfarbstoff, der direkt nachweisbar ist (Fluoreszenzmethode).

3.4.2 Durchführung der immunhistochemischen Färbungen

Im Verlauf dieser Arbeit werden Färbungen für die folgenden Beta-Zell typischen Proteine durchgeführt: Insulin, Glut-2, PDX1, C-Peptid sowie verschiedene Oberflächenantigene. Es werden die bereits vorgestellten immunhistochemischen Standardverfahren benutzt. Bei jeder Färbung wird eine Kontrollfärbung unter Weglassen des primären Antikörpers durchgeführt, um eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers auszuschließen. Die primären Antikörper (Tabelle 2) werden je nach Färbemethode mit unterschiedlichen sekundären Antikörpern kombiniert.

3.4.3 Durchführung APAAP-Methode

Hierzu werden die zu färbenden Zellen jeweils für 10 min in eiskaltem Aceton (Merck KGaA, Darmstadt) fixiert und anschließend für 20 min mit 30% humanem AB Serum (Lonza, Walkersville, USA) in Tris buffered saline (TBS) Puffer inkubiert.

Herstellung TBS Puffer:

- a. Trisbase 10x Vorratslösung (0,5 M, pH 7,6):
60,55 g Trisbase (Sigma Aldrich, Taufkirchen) mit HCL konz. auf pH 7,6 einstellen und mit Aqua dest. auf ein Volumen von einem Liter auffüllen.
- b. Saline 10x Vorratslösung (1,5 M):
87,66 g NaCl (Merck, Darmstadt) in Aqua dest. lösen und auf ein Volumen von einem Liter bringen.
- c. Arbeitslösung:
Jeweils 100 ml von a. und b. mit 800 ml Aqua dest. auffüllen (0,05 M).

Tab. 2: Übersicht über die verwendeten primären Antikörper. Diese werden je nach Methode mit unterschiedlichen sekundären Antikörpern kombiniert

Antigen	Hersteller	Verdünnung Bestellnr.	Spezifität
Insulin	Abcam, Cambridge, UK	1:20 ab6995	mouse-anti-human
Glut-2	US Biological, Swampscott, USA	1:50 G3900-15M	rabbit anti human
Pdx-1	US Biological, Swampscot, USA	1:100 P3128	rabbit-anti-human
C-Peptid	US Biological, Swampscot, USA	1:100 C7905-09E	rabbit-anti-human
CD 34	Becton Dickinson Medical, Heidelberg	1:20 555820	mouse anti-human
CD 90	Becton Dickinson Medical, Heidelberg	1:20 550402	mouse anti-human
CD 115	US Biological, Swampscott, USA	1:50 c2447-515	rat-anti-human
CD 117	US Biological, Swampscott, USA	1:50 c2448-03M	mouse anti-human
CD 123	US Biological, Swampscott, USA	1:50 c2462-01A	rabbit-anti-human
CD 135	R&D Systems, Minneapolis, USA	1:50 AF 368	rabbit-anti-human

Es folgt die Inkubation des primären Antikörpers für eine Stunde, anschließend wird dreimal mit TBS für je fünf Minuten gewaschen. Der Vorgang wird mit dem sekundären Antikörper wiederholt. Nach dem Waschen erfolgt die Inkubation mit der entsprechenden APAAP-Antikörper-Mischung für eine weitere Stunde. Die Entwicklung erfolgt durch 10 min Inkubation mit einer das Substrat der Alkalischen Phosphatase und Neufuchsin enthaltenden Entwicklerlösung. Diese enthält zur Unterdrückung endogener alkalischer Phosphataseaktivität Levamisol (Merck, Darmstadt). Abschließend wird mit Leitungswasser gespült und mit Mayer's Hämalaun (Merck, Darmstadt) gegengefärbt. Nach letztem Spülen kann das gefärbte Präparat mit Kaiser's Glyceringelantine (Merck, Darmstadt) eingedeckt werden. Die primären und sekundären Antikörper (Tabellen 2 und 3), APAAP-Reagenz (Tabelle 5) und die Entwicklerreagenz (Tabelle 4) sind wie folgt spezifiziert:

Tab. 3: Übersicht über die im Rahmen der APAAP-Methode eingesetzten sekundären Antikörper

Antigen prim. Antikörper	Hersteller	Verdünnung Bestnr.	Spezifität
Insulin, Pdx1, CD34, CD90, CD 117	Dako, Glostrup, Dänemark	1:20 Z259	rabbit anti-mouse
CD 115	Sigma, München	1:20 R9255	rabbit-anti-rat
Glut-2, CD123, CD135	Dako, Glostrup, Dänemark	1:20 M737	mouse-anti-rabbit

Tab. 4: Inhaltsstoffe der APAAP-Entwicklungsreagenz. Sie wird nach Herstellung mit HCL konz. bzw. NaOH auf pH 8,6 eingestellt

Masse / Volumen	Bezeichnung	Hersteller
130 ml	Entwicklungspuffer: 7,88g TRIS hydrochloride in 1 l Aqua dest.	Sigma Aldrich, Taufkirchen
46,5 ml	Propandiol	Merck, Darmstadt
75 mg	Levamisol	Merck, Darmstadt
37,5 mg	Sodiumnitrit	Merck, Darmstadt
94 mg	NaAs Bisphosphat	Merck, Darmstadt
1125 µl	Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
375 µl	Neufuchsin	Merck, Darmstadt

Tab. 5: Übersicht über die verwendete APAAP-Reagenz

sek. Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Spezifität
mouse-anti-rabbit	Dako, Glostrup, Dänemark	1:50 D0651	mouse-alkaline-phosphatase-antialkalin-phosphatase
rabbit-anti-mouse rabbit-anti-rat	Sigma, München	1:10 A9811	rabbit-alkaline-phosphatase-antialkalin-phosphatase

3.4.4 Durchführung Avidin-Biotin-Methode

Die zu färbenden Zellen werden jeweils für 10 min in eiskaltem Aceton (Merck, Darmstadt) fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Die Inkubation der primären Antikörper erfolgt für 60 min, anschließend werden die Zellen mit PBS gewaschen. Die Inkubation des sekundären Antikörper-Enzym-Konjugats erfolgt nach Angaben des Herstellers. Die primären und sekundären Antikörper wurden wie in Tabelle 2 bzw. 6 gewählt.

Tab. 6: Übersicht des als sekundärer Antikörper verwendeten Antikörperkits bei der Avidin-Biotin-Methode

Antigen	Hersteller	Bestellnr.	Spezifität
mouse und rabbit Antikörper	Dako, Glostrup, Dänemark	K 0492	StreptABCComplex / HRP Duet, Mouse / Rabbit

Nach Inkubation des sekundären Antikörpers werden die Zellen erneut mit PBS gewaschen. Für die Durchführung der Färbereaktion werden die Zellen nun in DAB-Färbelösung (0,25% DAB mit 0,01% H₂O₂ in PBS) überführt und bis zum Sichtbarwerden einer Färbereaktion in der DAB-Lösung belassen. Durch Spülen mit PBS wird die Färbereaktion unterbrochen. Nach dem Trocknen der Zellen erfolgt die Entwässerung durch ein 30-minütiges Bad in Xylol (Merck, Darmstadt). Kontrollen durch Weglassen des primären Antikörpers stellen sicher, dass es zu keiner unspezifischen Färbung kommt. Gegebenenfalls wird eine endogene Avidin bindende Aktivität blockiert, indem das Gewebe mit Dako Cytomation Biotin-Blockierungssystem (Dako, Glostrup, Dänemark) behandelt wird.

3.4.5 Immunfluoreszenz- und Immunfluoreszenzdoppelfärbung

Das Verfahren folgt dem Prinzip des bereits im Abschnitt „Immunhistochemische Färbung“ beschriebenen Zweischrittverfahrens. Der sekundäre Antikörper ist in diesem Fall mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Nach 10 minütiger Fixierung in eiskaltem Aceton erfolgt eine Inkubation der Zellen für 20 min mit 30% humanem AB Serum in TBS Puffer. Nun folgt die Inkubation des primären Antikörpers für 60 min, wobei bei der Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit zwei Antikörpern inkubiert wird. Nach der Inkubation der primären Antikörper wird dreimal für je fünf Minuten mit TBS Arbeitslösung gewaschen. Anschließend folgt die Inkubation der Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten sekundären Antikörper für ebenfalls 60 min. Sämtliche Antikörper werden vor Verwendung in 1% BSA (Bovin Serum Albumin, Lonza, Walkersville, USA) in TBS Puffer suspendiert und wie in Tabelle 2 bzw. 7 gewählt:

Tab. 7: Übersicht der im Rahmen der Immunfluoreszenzdarstellung verwendeten Sekundärantikörper

Fluorochrom	Hersteller	Verdünnung Bestellnr.	Spezifität
Alexa Fluor 488 grün	Invitrogen, Karlsruhe	1:100 A 11017	goat-anti-mouse IgG
Alexa Fluor 594 rot	Invitrogen , Karlsruhe	1:100 A 11072	goat-anti-rabbit IgG

Es wird erneut dreimal mit TBS für je 5 min gewaschen. An dieser Stelle kann zusätzlich eine Kerngegenfärbung mit 4',6-Diamidin-2'-phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI, Invitrogen, Karlsruhe), einem blau fluoreszierenden Farbstoff, durchgeführt werden. Hierfür werden die Zellen für 2 min mit DAPI-Arbeitslösung (1µl DAPI in 2ml TBS) inkubiert. Abschließend werden die Zellen gründlich mit Aqua dest. gespült und mit Fluorescence Mounting Medium (Dako, Glostrup, Dänemark) eingedeckt.

3.5 Durchflusszytometrie

3.5.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, engl. Fluorescent-Activated-Cell-Sorting (FACS), nutzt die Tatsache, dass jede Zellpopulation ein spezifisches Muster an Oberflächenantigenen besitzt. Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern, die gegen bestimmte Oberflächenantigene gerichtet sind, können Zellen so in spezifischer Weise markiert werden. Die hierbei genutzten Antikörper sind jeweils mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt und können so durch Anregung der Fluoreszenz mit einem Laser sichtbar gemacht werden. Bei der Durchflusszytometrie mit Hilfe von Fluoreszenzlicht werden die physikalischen Eigenschaften der zu untersuchenden Zellen gemessen. Hierbei werden die Zellen einzeln an verschiedenen Detektoren vorbeigeleitet, die das Fluoreszenzlicht und die Lichtstreuung der Zellen messen. Es kommen verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe zum Einsatz, die jeweils mit Hilfe eines Argonlasers (488nm) zur Fluoreszenz angeregt werden. Hierbei emittiert Phycoerythrin (PE) bei 560 nm rotes Licht, Fluoreszein (FITC) bei 510 nm grünes Licht. Sie sind die beiden gebräuchlichsten Fluoreszenzfarbstoffe in der Durchflusszytometrie. Mit Hilfe von Propidiumjodid können tote Zellen identifiziert werden. Bei ihnen gelangt dieser Fluoreszenzfarbstoff durch die Zellmembran und lagert sich an die DNA an. Um zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung unterscheiden zu können, erfolgt eine Isotypkontrolle. Hierbei wird überprüft, ob die Zellen einen unspezifischen Antikörper binden, und wenn ja, in welchem Ausmaß. Dies wird als Negativkontrolle bezeichnet. Eine Probe ist nur dann positiv, wenn ihre Antikörperbindung bei gleicher Konzentration die der Negativkontrolle übersteigt.

3.5.2 Durchführung der Durchflusszytometrie an PCMO

Die zu färbenden Zellen werden mit 1% BSA/PBS bei 1000 rpm für 5 min gewaschen und mit 1% BSA/PBS unter Zuhilfenahme eines automatischen Zellzählers (ABX Micros60, Block Scientific, INC., Nutley, USA) auf einen Zellgehalt von 1×10^7 Zellen/ml resuspendiert. Nun wird eine Probengröße von je 50 μ l abgemessen und für 30 min mit dem jeweiligen Antikörper auf Eis und in Dunkelheit inkubiert. Es wird

erneut mit 1% BSA/PBS gewaschen und nicht sofort verwendete Proben werden kühl und dunkel zwischengelagert. Die Messung erfolgt am Durchflusszytometer „FACScan“ (Becton Dickinson Medical, Heidelberg). Die Messwerte werden mit der Software „Cell Quest“ (Becton Dickinson Medical, Heidelberg) ausgewertet. Vor den Messungen erfolgt eine mit Simultest Control (Becton Dickinson Medical, Heidelberg) durchgeführte Isotypkontrolle (Tabelle 8). Die FACS-Antikörper wurden wie in Tabelle 9 dargestellt gewählt.

Tabelle 8: Eingesetzte Isotypkontrolle bei dem verwendeten FACS-Scan

Hersteller	Bestellnr.	Spezifität
Becton Dickinson Medical, Heidelberg	Simultest Control 340041	IgG1/IgG2a Isotype Control X39 PE mouse IgG2a, X40 FITC mouse IgG1

Tab. 9: Übersicht der verwendeten FACS-Antikörper. Abkürzungen der Fluorochrome: FITC (Fluoreszein), PE (Phycoerythrin), APC (Allophycocyanin).

Antigen	Hersteller	Bestellnr.	Fluorochrom	Beschreibung
CD 14	Becton Dickinson Medical, Heidelberg	555397	FITC	mouse IgG1, k
CD 19	Becton Dickinson Medical, Heidelberg	555412	FITC	mouse IgG1, k
CD 34	Becton Dickinson Medical, Heidelberg	555821	FITC	mouse IgG1, k
CD 45	Becton Dickinson Medical, Heidelberg	555482	FITC	mouse IgG1,k
CD 56	Becton Dickinson Medical, Heidelberg	555518	APC	mouse IgG1, k
CD 64	Becton Dickinson Medical, Heidelberg	555527	FITC	mouse IgG1, k
CD 80	Becton Dickinson Medical, Heidelberg	557227	PE	mouse IgG1,k
CD 83	Becton Dickinson Medical, Heidelberg	551073	APC	mouse IgG1, k
CD 86	Becton Dickinson Medical, Heidelberg	555660	APC	mouse IgG1,k
CD 90	Becton Dickinson Medical, Heidelberg	555596	PE	mouse IgG1, k
CD 95	Caltag Medsystems, Buckingham, UK	CD95L04	PE	mouse IgG1, k
CD 115	R&D Systems, Wiesbaden	FAB329F	FITC	mouse IgG1, k
CD 117	Becton Dickinson Medical, Heidelberg	555714	PE	mouse IgG1, k
CD 123	Becton Dickinson Medical, Heidelberg	555644	PE	mouse IgG1, k
CD 135	Becton Dickinson Medical, Heidelberg	558996	PE	mouse IgG1, k

3.6 ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay)

3.6.1 Double-Antibody-Sandwich-ELISA

Enzyme Linked Immunosorbent Assay bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren unter Verwendung teils enzymgekoppelter, spezifischer Antikörper. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Insulin ELISA handelt es sich um sogenannte Double-Antibody-Sandwich-ELISA, wobei jeweils zwei Antikörper mit unterschiedlichen Bindungsstellen zum Testantigen Verwendung finden. Die unterschiedlichen Bindungsstellen sind notwendig, damit sich die Antikörper nicht gegenseitig in ihrer Bindung behindern. In einem ersten Schritt bindet das Antigen an einen fest auf dem Grund einer Microwellplatte aufgebrachtten Antikörper. In einem zweiten Schritt bindet an diesen Antigen-Antikörperkomplex ein weiterer Antikörper, der im Fall der hier verwendeten Verfahren mit Meerrettichperoxidase (HRP, von engl. horseradish peroxidase), konjugiert ist. Nun werden Überschüsse des zweiten, enzymgekoppelten Antikörpers abgewaschen. Durch Hinzufügen eines Farbstoff bildenden Substrates der HRP wird bei Vorliegen des getesteten Antigens ein Farbumschlag beobachtet. In Verbindung mit einer Eichkurve für die Stärke der photometrisch gemessenen, optischen Absorption ist sowohl ein qualitativer wie auch quantitativer Nachweis möglich. In Abbildung 2 ist das Prinzip schematisch dargestellt.

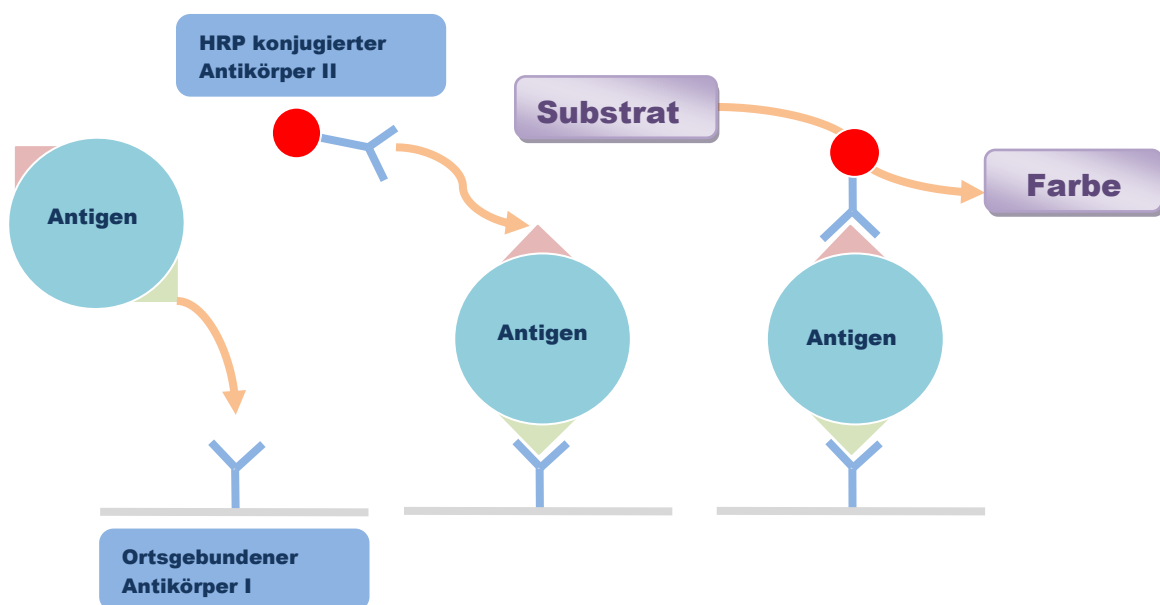


Abb. 2: Prinzip Double-Antibody-Sandwich-ELISA

3.6.2 Insulin ELISA

Der gesamte intrazelluläre Insulingehalt wird durch einen ELISA gemessen. Zu diesem Zweck werden die 1×10^6 Zellen durch Ultraschall fragmentiert und in 1 mM Essigsäure (Merck, Darmstadt) mit 0,1% BSA suspendiert. Die Insulinmessung wird mittels eines ELISA (INS-EASIA, Cat.-No.: 4012500, Biosource, Nivelles, Belgien) durchgeführt. Hierzu werden jeweils 25 μL Eichlösung (notwendig zur quantitativen Messung), Probe oder Kontrolllösung in die dem ELISA-Set beiliegenden Microwells pipettiert. Die jeweilige Position in den Microwells wird notiert. In alle Microwells werden nun jeweils 100 μL einer Lösung des ersten Antikörpers (HRP-konjugierter, monoklonaler Anti-Insulin-Antikörper) hinzugefügt. Es folgt eine 60-minütige Inkubation bei einer Inkubationstemperatur von 20°C und ständiger Bewegung der Microwells durch einen automatischen Schüttler (Modell OS-100, Wigggenhauser). Der Inkubation schließen sich drei Waschgänge mit jeweils 250 μL einer Mischung von je einem Teil Konzentrat des im ELISA-Set enthaltenen Waschpuffers sowie je 14 Teilen destilliertem Wasser an. Nach Abwaschen des überschüssigen Insulin-Antikörpers erfolgt die zweite Inkubation mit dem Substrat der HRP (3,3'-5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)). Hierzu wird mit je 100 μL Substratlösung für 10 Minuten bei 22°C inkubiert. Danach wird die Inkubation durch Hinzufügen von je 100 μL Stopp-Lösung (0,46 mol/L Schwefelsäure) gestoppt. Die Absorption wird bei zwei Wellenlängen (450 nm und 490 nm) gegen eine Referenzwellenlänge (650 nm) mit Hilfe eines Readers (Thermo Max Microplate Reader, MWG Biotech) gemessen. Mittels Computer Software (MikroWin Version 3.0, Mikrotek, Overath) werden eine Standardkurve erstellt, die Insulinkonzentration der Proben an ihr ermittelt und in $\mu\text{U/ml}$ angegeben. Der ELISA ist gegen humanes Insulin gerichtet, eine Kreuzreaktivität von 100% mit porzinem Insulin ist nachgewiesen, eine Kreuzreaktivität mit humanem oder porzinem Proinsulin ausgeschlossen.

3.7 Tierversuch

3.7.1 Ethikantrag

Für die Durchführung einer Splenektomie zum Gewinnen von Pavianmonozyten aus Milzgewebe wurde, nach Antrag, die Zustimmung durch das zuständige Animal Research Ethics Committee der Health Sciences Faculty an der University of Cape Town erteilt. Die entsprechenden Versuche wurden von uns in Kapstadt, Südafrika, durchgeführt.

3.7.2 Tierhaltung

Die Tierhaltung erfolgte artgerecht unter Einhaltung eines regelmäßigen Hell-Dunkel-Zyklus in Einzelkäfigen mit Sichtkontakt zu Artgenossen. Eine regelmäßige veterinärmedizinische Beratung war ebenso gewährleistet wie durchgehende Betreuung durch qualifizierte Tierpfleger mit spezieller Erfahrung in Umgang und Pflege von nicht humanen Primaten.

3.7.3 Splenektomie beim Anubispavian (*Papio anubis*)

Mit Hilfe einer Ketaminsedierung 100mg = 1,5 ml Anaket (Centaur Lab, Mumbai, India) erfolgte der Transport des zur Splenektomie vorgesehenen weiblichen Anubispavians (*Papio anubis*), Gewicht 19kg, mit dem Projektrufnamen „Heidi“ und der Registernummer 726 von seinem Käfig in den OP. Unter Allgemeinanästhesie mittels Isoflurane (Baxter, Deerfield, USA) und Analgesie durch Morphin 2 x 5mg iv. (Centaur Lab Mumbai, India) konnte die geplante Splenektomie unter veterinärmedizinischer Beratung ohne Komplikationen durchgeführt werden. Nach medianer Laparotomie erfolgten retrograde Präparation der Milz aus dem Retroperitoneum und Lösen der ligamentären Strukturen durch Diathermie sowie Durchtrennung des Ligamentum Gastrosplenicum mittels Overholt und Ligaturen. Dann sorgfältiges Darstellen der Arteria und Vena lienalis am Pancreasschwanz. Diese wurde gesondert nach Ligatur durchtrennt, um die Ausbildung einer postoperativen arteriovenösen Fistel zu verhindern. Es erfolgten eine gründliche

Blutstillung und der Wundverschluss nach Faziennaht mittels Klammernahtgerät (3M, Neuss) (Vorgehen nach: Berchtold Chirurgie 2006). Als anschließende analgetische Therapie wurde Temgesic 0,3mg (Centaur Lab, Mumbai, India) verabreicht. Siehe auch Anhang (OP-Bericht + Anästhesieprotokoll).

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung humaner Zellen

4.1.1 Charakterisierung von PCMO

Monozyten, die in Gegenwart von MCSF und IL-3 für 6 Tage kultiviert wurden, nahmen eine charakteristische Morphologie an (Abb. 3a) und konnten durch die Pappenheim-Färbung sowie die Expression von unspezifischer Esterase klar als monozytäre Zellen identifiziert werden (Abb. 3b,c). Zwischen Tag fünf und sechs bildete sich ein konfluenten Zellrasen durch Zunahme von Zellzahl und Zellgröße (4-5fach), verbunden mit einer erhöhten DNA Synthese (Ruhnke et al. 2005b).

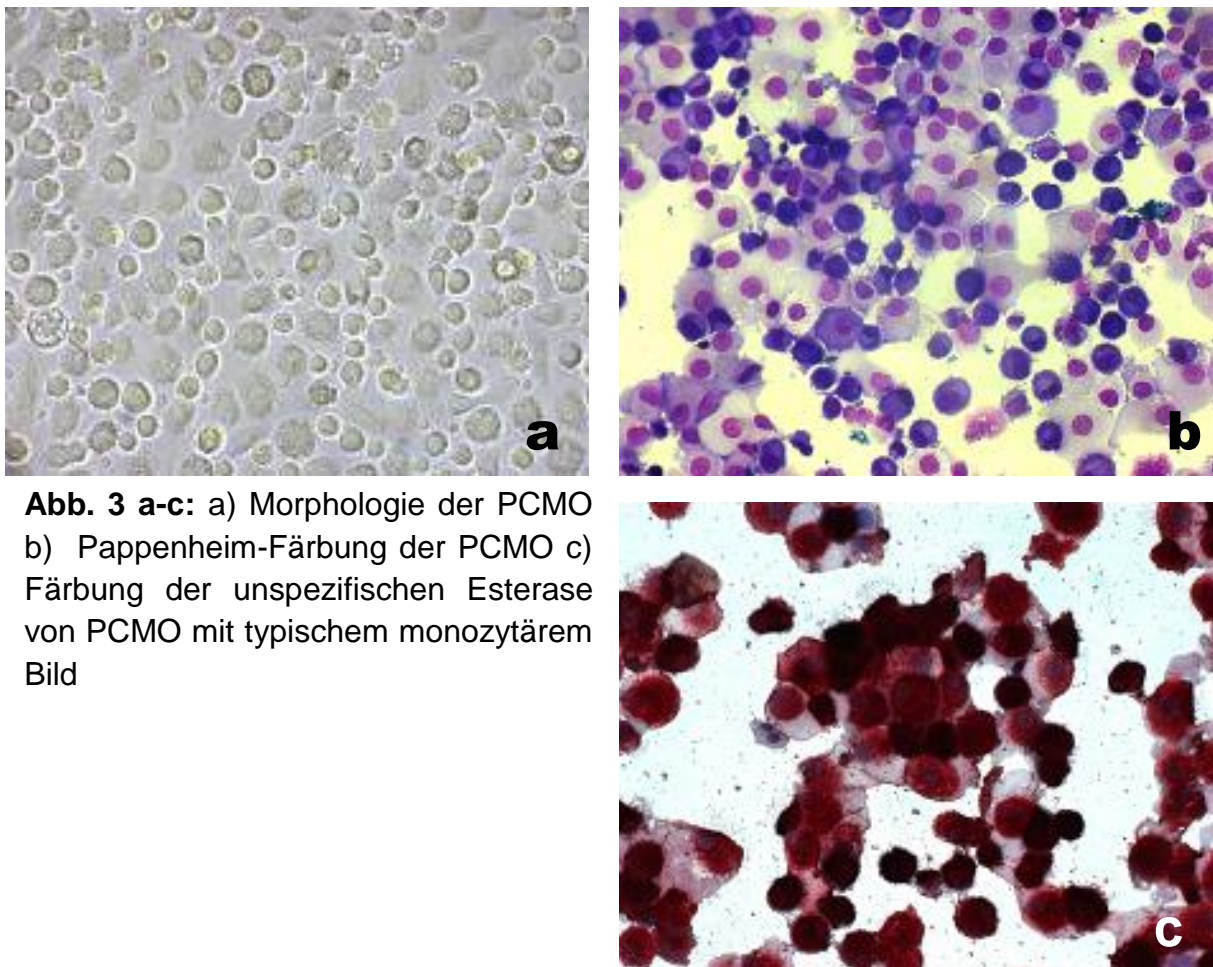


Abb. 3 a-c: a) Morphologie der PCMO
b) Pappenheim-Färbung der PCMO
c) Färbung der unspezifischen Esterase von PCMO mit typischem monozytärem Bild

Die Immunhistochemie an Tag sechs zeigte eine Hochregulation von CD90 und CD123 und CD135 (Abb. 4 a,b,c). Auch der MCSF Rezeptor CD115 wurde bis an Tag sechs zum Teil jedoch nur schwach exprimiert (Abb. 4d). Andere Stammzellmarker (CD34 und CD117) blieben während der gesamten Kulturdauer niedrig in ihrer Expression (Abb. 4 e,f).

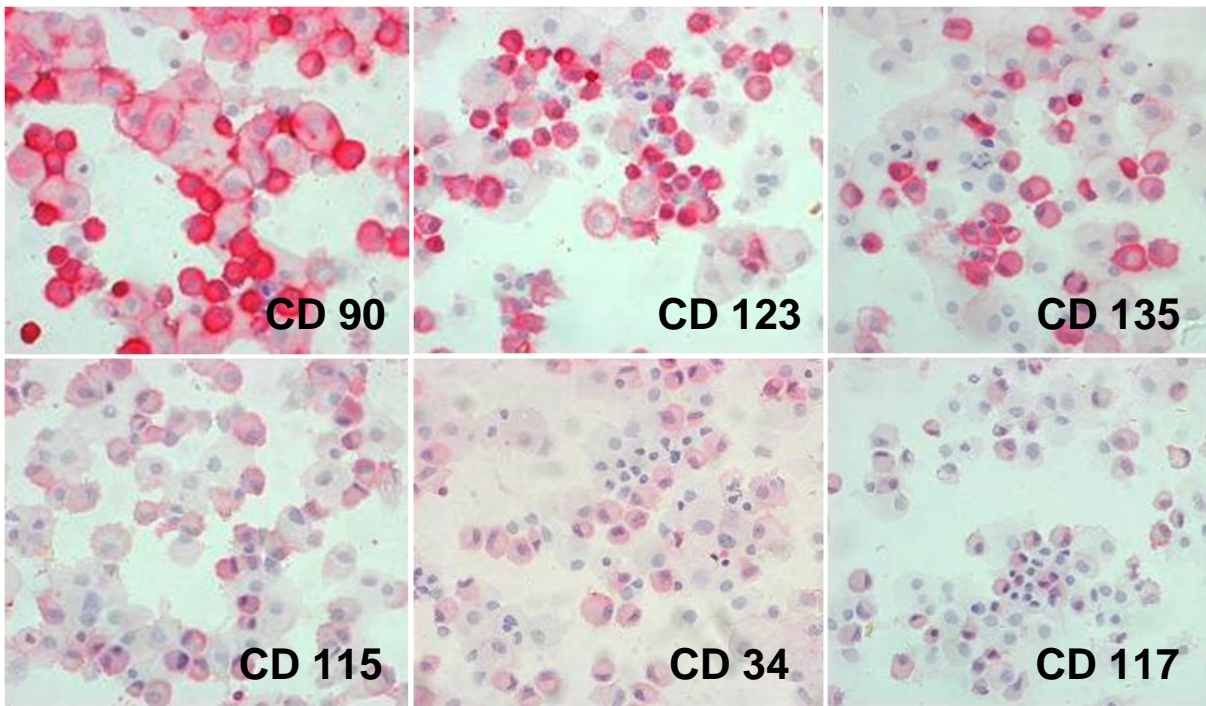


Abb. 4a-f: Immunhistochemische APAAP Färbung der jeweiligen Oberflächenantigene. a) CD 90 b) CD 123 c) CD 135 d) CD 115 e) CD 34 f) CD 117

PCMO exprimieren einige koregulatorische Moleküle wie CD80 (schwach) und CD86 sowie CD14. Tabelle 10 zeigt das unterschiedliche Expressionsmuster der Stammzellmarker (CD34, CD117, CD90, CD34) und der Leukozytensubpopulationen (CD45, CD19, CD56, CD14) und Fas (CD95) an Tag null (zweite Spalte) und nach sechs Tagen Kultur von PCMO mit und ohne Zugabe von MCSF und IL-3 (zweite und dritte Spalte). Gezeigt sind hier Mittelwerte von insgesamt sechs Präparationen. Monozyten, die ohne MCSF und IL-3 MCSF kultiviert wurden, bildeten keine Kolonien und proliferierten nicht (Abb. 5a). Zellen, die länger als 20 Tage im Dedifferenzierungsmedium kultiviert wurden, differenzierten zu Makrophagen oder starben ab (Abb. 5b).

Tab. 10: Expression verschiedener zellulärer Oberflächenantigene bei Blutmonozyten (Spalte 1), nach Herstellung von PCMO (Spalte 2), nach Zellkultur in Dedifferenzierungsmedium ohne MCSF und IL 3

Antikörper	Tag 0	Tag 6 PCMO	Tag 6 ohne MCSF + IL3
CD 14	30%	70%	25%
CD 90	5%	70%	5%
CD117	3%	20%	2%
CD 80	40%	5%	2%
CD 56	8%	0%	0%
CD 95	3%	74%	2%
CD 19	15%	2,1%	0%
CD 86	30%	83%	20%
CD135	3%	5%	0%
CD 45	60%	80%	50%
CD 34	2%	8,5%	0%
CD123	4%	20%	2%

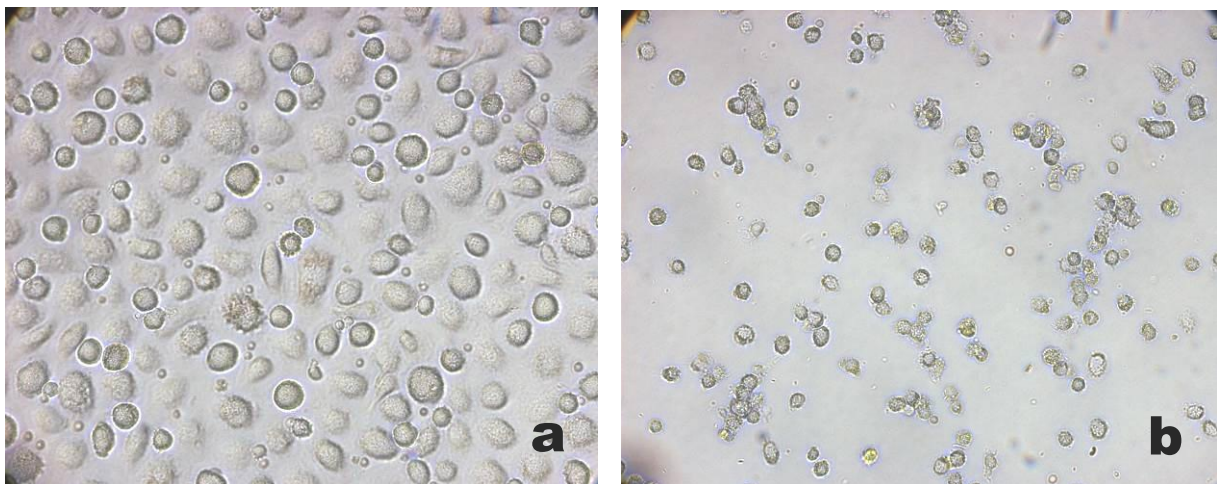


Abb. 5a,b: a) Fehlende Koloniebildung der Zellkulturen bei Anzucht ohne Zusatz von IL-3 und MCSF. b) Bei Kulturdauer von mehr als 20 Tagen: Absterben der Zellen oder Differenzierung zu Makrophagen

4.1.2 Morphologie von Neo-Inselzellen

Nach 4-7-tägiger Behandlung mit EGF, HGF und Nicotinamid bildeten sich charakteristische Zellcluster aus, die morphologisch isolierten primären Inselzellclustern entsprachen (Abb. 6a). Die Zellen ließen sich ebenfalls gut mit Dithizone anfärben. Dithizone zeigt eine klassische Anreicherung in intrazellulären Vesikeln, suggestiv für die Insulinspeicherung (Abb. 6b)

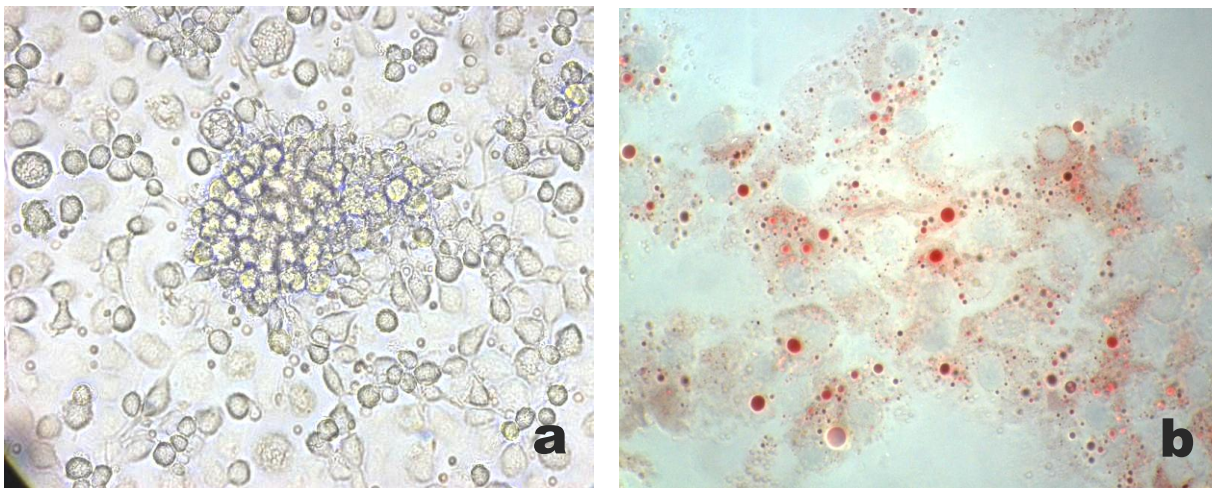


Abb. 6a,b: a) Inselzelltypische Clusterbildung der humanen Neo-Inselzellen.
b) Humane Neo-Inselzellen mit vesikulärer Dithizoneanreicherung

4.1.3 Proteinexpression

Von den in Grundmedium hergestellten Neo-Inselzellen zeigten unterschiedlich große in den gezeigten Zellclustern enthaltene Subpopulationen eine Expression von Insulin, Glut-2, Pdx-1 und C-Peptid. Dies ist in den Abbildungen 7a-d anhand von Färbungen dargestellt. PCMO exprimierten diese inselzellspezifischen Gene nicht. Die Zugabe von Aktivin A bzw. Betacellulin bewirkte gegenüber dem Grundmedium eine kräftigere Expression von Insulin (Abb. 8a,c). Die Zugabe von Exendin 3 und 4 bewirkte keine bessere Insulinexpression (Abb. 8e, 9a). Pdx-1 wurde stärker exprimiert unter Zugabe von Aktivin A (Abb. 8b), Betacellulin (Abb. 8d) und Exendin 3 (Abb. 8f). Unter Exendin 4 Zugabe ließ sich keine Verbesserung der Pdx-1 Expression beobachten (Abb. 9b). Die beste Expression von Insulin und Pdx-1 war in der mit Aktivin A behandelten Kultur zu erkennen (Abb. 8a,b).

Die in Grundmedium kultivierten Zellen zeigten eine schwächere Expression von Insulin und Pdx-1 (Abb. 9 c). Die Insulinfärbung zeigte eine intrazytoplasmatische Lokalisation, wobei Pdx-1 entsprechend einem Transkriptionsfaktor intranukleär lokalisiert war (Abb. 8). Die Kerngegenfärbung mit DAPI hob besonders die Expression von Pdx-1 im Kern der Zelle hervor (Abb. 8b,d,f).

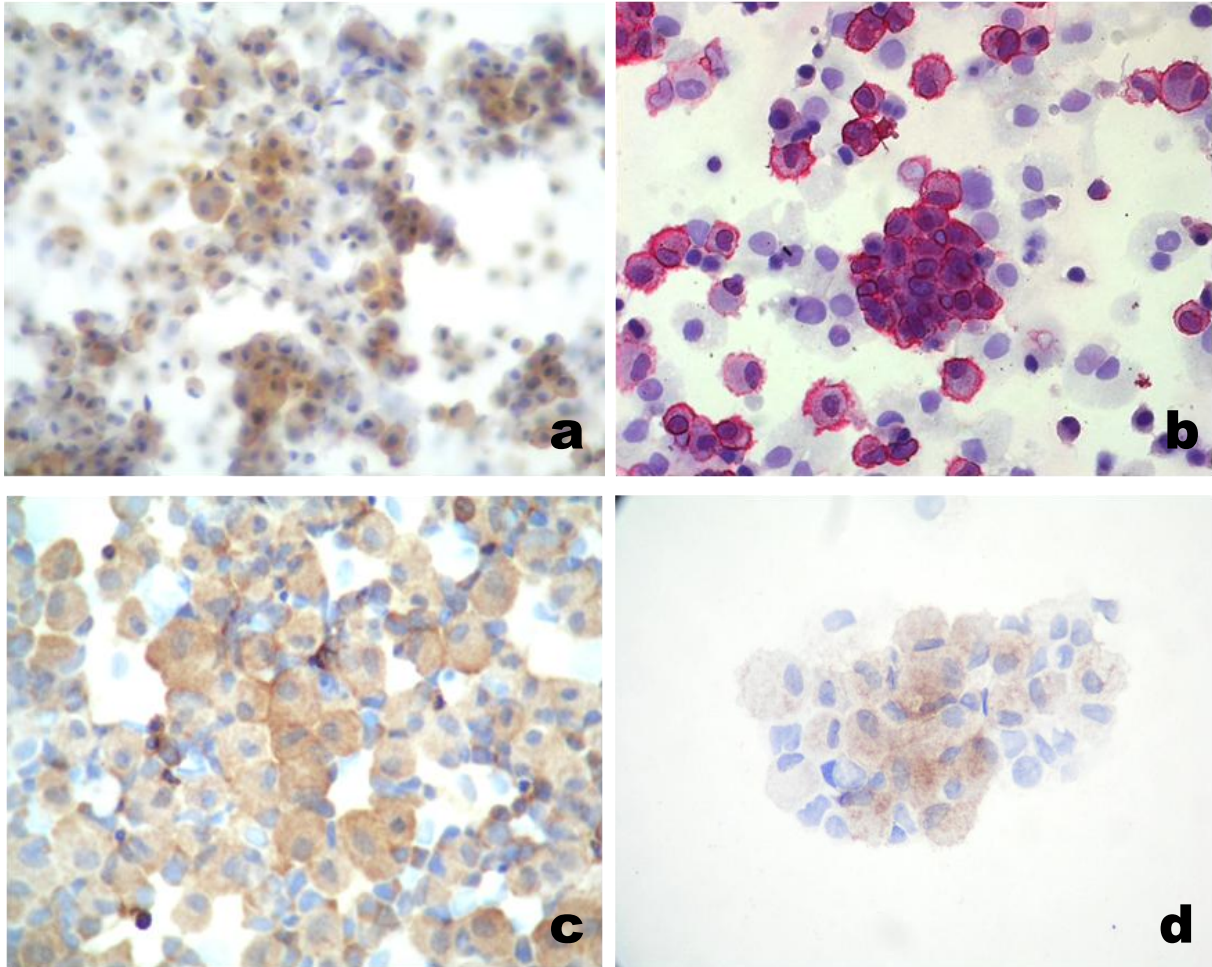


Abb. 7a-d: Immunhistochemische Färbungen von humanen Neo-Inselzellen: a) Färbung gegen Insulin mit intrazellulärer Färbung b) Färbung gegen Glut-2 mit membranständiger Färbung c) Färbung gegen Pdx-1 mit intrazellulärer Färbung d) Färbung gegen C-Peptid ebenfalls mit intrazellulärer Färbung

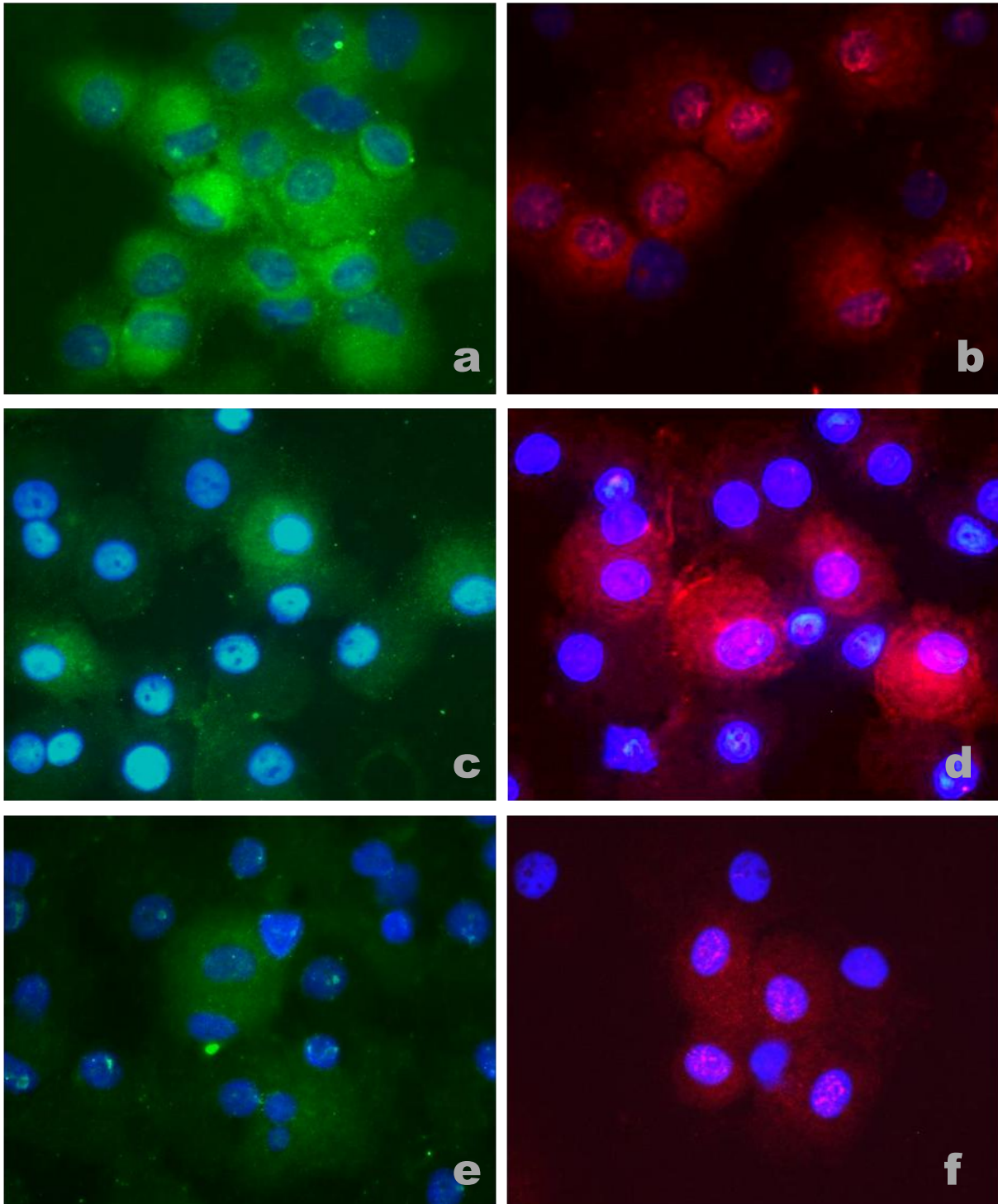


Abb. 8a-f: Immunfluoreszenzfärbung von Neo-Inselzellen für Insulin und Pdx-1 mit DAPI-Kerngegenfärbung. Im Folgenden ist jeweils der Zusatz zum Grundmedium sowie das Zielantigen angegeben: a) Aktivin A Insulin b) Aktivin A Pdx-1 c) Betacellulin Insulin d) Betacellulin Pdx-1 e) Exendin 3 Insulin f) Exendin 3 Pdx-1

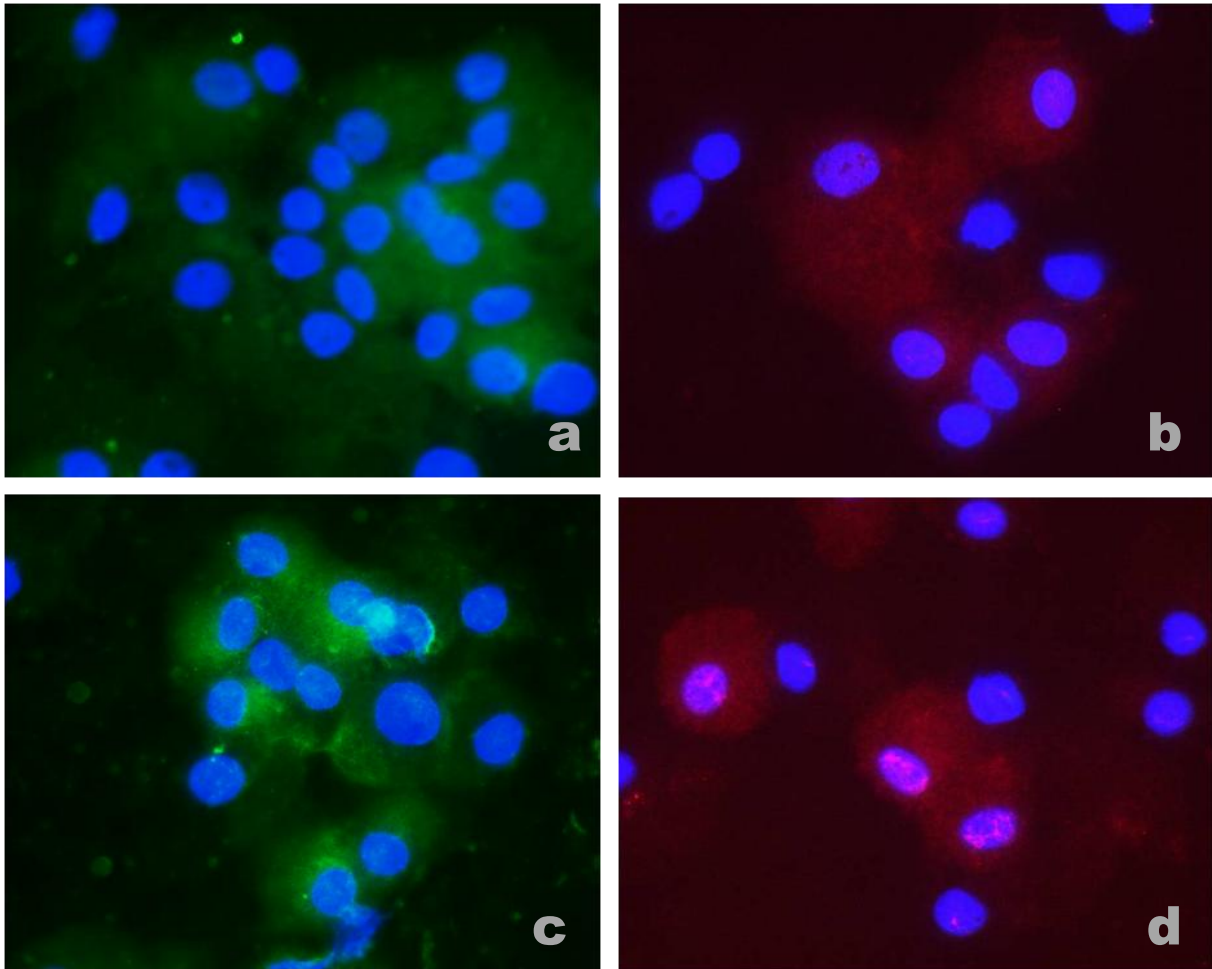


Abb. 9a-d: Immunfluoreszenzfärbung von Neo-Inselzellen für Insulin bzw. PDX-1 mit DAPI-Kerngegenfärbung. Im Folgenden ist jeweils der Zusatz zum Grundmedium sowie das Zielantigen angegeben: a) Exendin 4 Insulin b) Exendin 4 PDX-1 c) Grundmedium Insulin d) Grundmedium PDX-1

In einer Immunfluoreszenz-Doppelfärbung zeigte sich, dass Neo-Inselzellen Pdx-1 und Insulin simultan exprimierten. Außerdem konnte die Expression von intranukleärem Pdx-1 bestätigt werden. Dies ist in den vorliegenden Färbungen ohne Kerngegenfärbung mit DAPI sehr gut zu erkennen (Abb. 10).

Wiederum ist auch in dieser Doppelimmunfluoreszenzfärbung die stärkere Expression der beiden Antigene in den mit Aktivin A Zusatz behandelten Zellen zu erkennen (Abb. 10b). Die Zusätze Betacellulin (Abb. 10c), Exendin 3 (Abb. 10d) und Exendin 4 (Abb. 10e) induzierten hier eine mit dem Grundmedium vergleichbare Expression von Insulin und Pdx-1. In Abbildung 10f ist eine Negativkontrolle ohne Zugabe von Primärantikörper abgebildet, um eine Eigenfluoreszenz auszuschließen, die bei Zellen monozytären Ursprungs häufig ist.

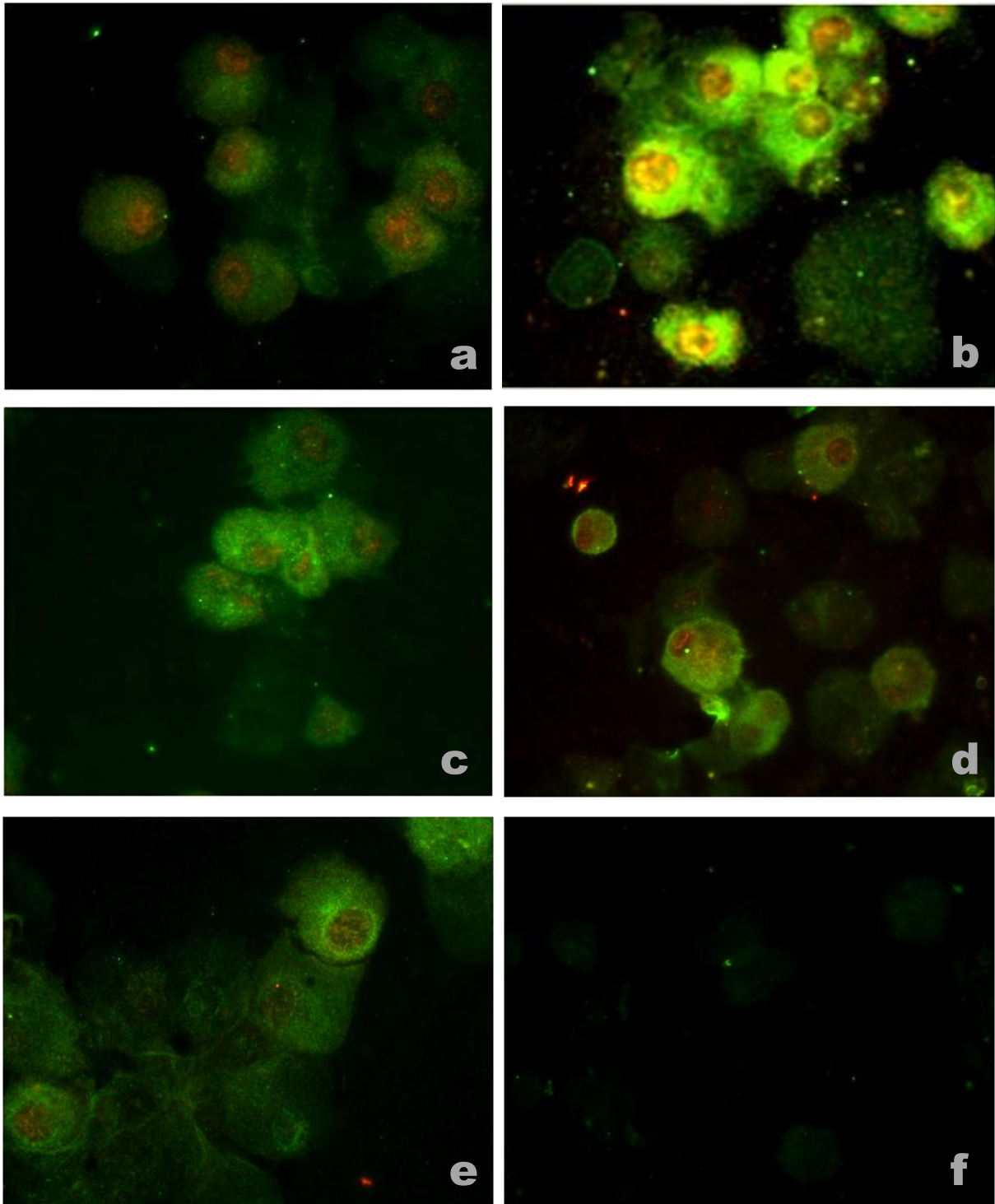


Abb. 10 a-f: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von Neo-Inselzellen für Insulin und PDX-1. Im Folgenden ist jeweils der verwendete Zusatz zum Grundmedium angegeben. a) Grundmedium b) Aktivin A c) Betacellulin d) Exendin 3 e) Exendin 4 f) Negativkontrolle ohne Antikörper

4.1.4 Insulingehalt

Nach Kultivierung der Zellen in „Hungermedium“ mit einem Glucosegehalt von 5mmol über Nacht wurde die Insulinausschüttung ins Medium reduziert und am folgenden Tag der gesamte Insulingehalt der Zellen bestimmt. Dazu wurden jeweils 1×10^6 Zellen durch Ultraschall homogenisiert und der Insulingehalt im Zellhomogenisat mittels ELISA bestimmt. Am wenigsten Insulin speicherten in diesem Ansatz die PCMO Zellen mit im Mittel 3.287 $\mu\text{U}/1\text{Million}$ Zellen. Neo-Inselzellen in Grundmedium enthielten im Mittel 6.470 μU Insulin/ 1Million Zellen. Unter Zusatz von Aktivin A enthielten 1 Million Neo-Inselzellen im Mittel 13.808 $\mu\text{U}/1\text{Million}$ Insulin, unter Zusatz von Betacellulin 12.872 $\mu\text{U}/1\text{Million}$, unter Zusatz von Exendin 3 13.753 $\mu\text{U}/1\text{Million}$ Insulin und unter Zusatz von Exendin 4 nur 8.120 μU Insulin/ 1Million Zellen (Tabelle 11, Diagramm 1).

Tab. 11: Übersicht über den Insulingehalt in μU je 1 Million Zellen (entspricht einem ml Homogenisat), aufgeführt sind PCMO bzw. der jeweilige Mediumzusatz mit dem entsprechenden Insulingehalt und der Standardabweichung bei insgesamt sechs ausgewerteten Präparationen

Zell-Homogenisat	Insulingehalt $\mu\text{U}/1\text{Million}$	Standardabweichung (sechs Präparationen)
PCMO	3.416	0,24465895
Neo-Inselzellen Grundmedium	6.362	0,15273506
Neo-Inselzellen Aktivin A	12.969	1,18581807
Neo-Inselzellen Betacellulin	12.217	0,92560278
Neo-Inselzellen Exendin 3	12,675	1,52381511
Neo-Inselzellen Exendin 4	8.782	0,93620938

■ Insulingehalt $\mu\text{U}/1\text{Million Zellen}$

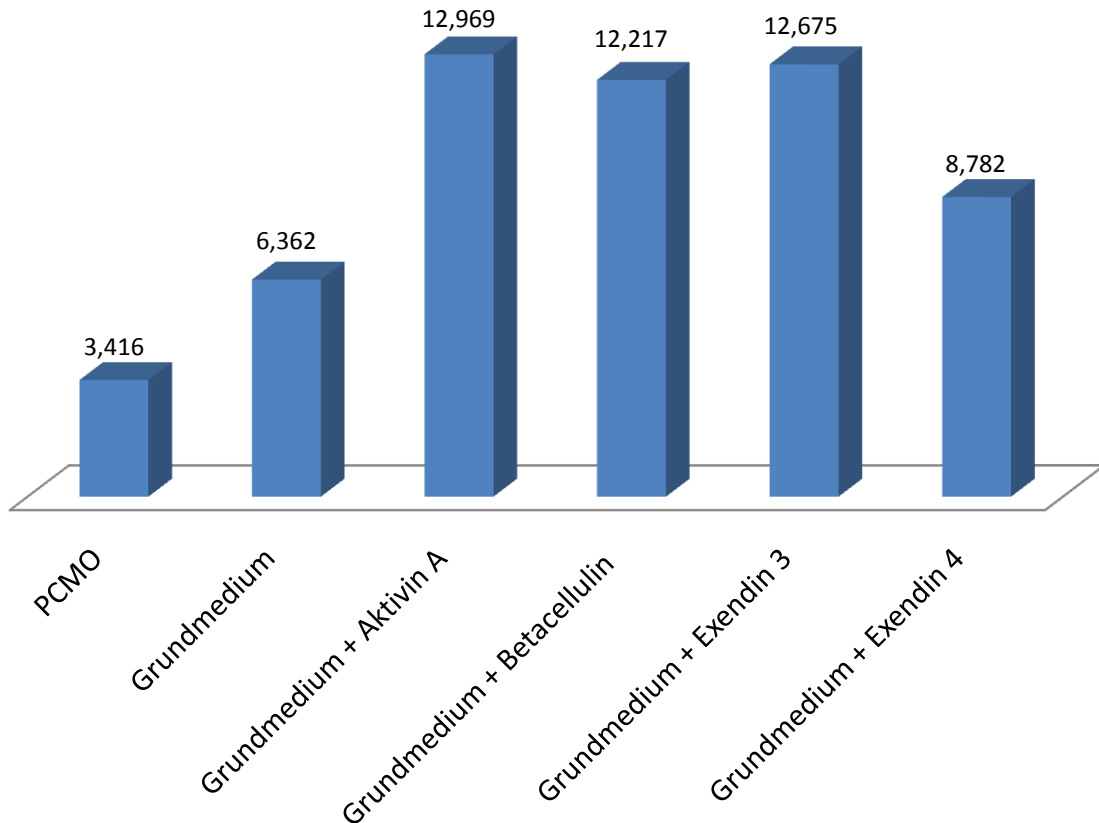


Diagramm 1: Balkendiagramm der in Tabelle 11 enthaltenen Daten zum Insulingehalt der Neo-Inselzellen bei Berücksichtigung von insgesamt sechs Präparationen. Die entsprechenden Standardabweichungen sind Tabelle 11 zu entnehmen.

4.2 Charakterisierung von Neo-Inselzellen nicht humaner Primaten

Es gelang uns, nicht humane Primaten-Monozyten aus einer Affenmilz und Affenblut zu isolieren. Diese wurden dann unter Ermangelung von speziesspezifischen Wachstumsfaktoren mit humanen Wachstumsfaktoren zunächst zu PCMO dedifferenziert und anschließend weiter zu Neo-Inselzellen differenziert. Zellen, die sechs Tage mit humanem MCSF und IL-3 kultiviert wurden, ähnelten den humanen PCMO in ihrer Morphologie (Abb. 11a) und ihrer Anfärbarkeit unter Verwendung der Pappenheim-Färbung (Abb. 11b). Eine durchflusszytometrische Charakterisierung war nicht möglich, da es keine für nicht humane Primaten spezifischen FACs

Antikörper gibt. Dem Neo-Inselzellmedium wurde von Anfang an Aktivin A hinzugefügt, da in den humanen Neo-Inselzellpräparaten der Insulingehalt mit Aktivin A im Vergleich zum Grundmedium am höchsten war.

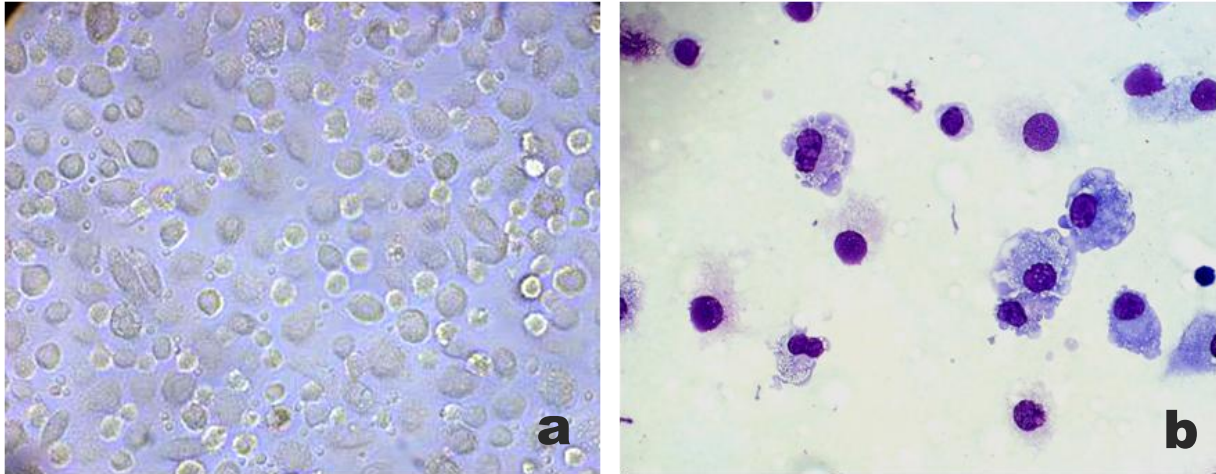


Abb. 11a,b: a) Morphologie von Neo-Inselzellen nicht humaner Primaten
b) Pappenheim-Färbung von PCMO nicht humaner Primaten

Morphologisch zeigten Neo-Inselzellen aus Monozyten nicht humaner Primaten ebenfalls die charakteristische Clusterbildung (Abb. 12a) und neuronenähnliche Fortsätze auf, die aus den Clustern herausragten (Abb. 12b). Des Weiteren zeigten diese Zellen in der Dithizone-Färbung ein vergleichbares Bild wie die aus humanen Monozyten entstandenen Neo-Inselzellen (Abb. 13c,d) und suggerierten somit eine Insulinspeicherung.

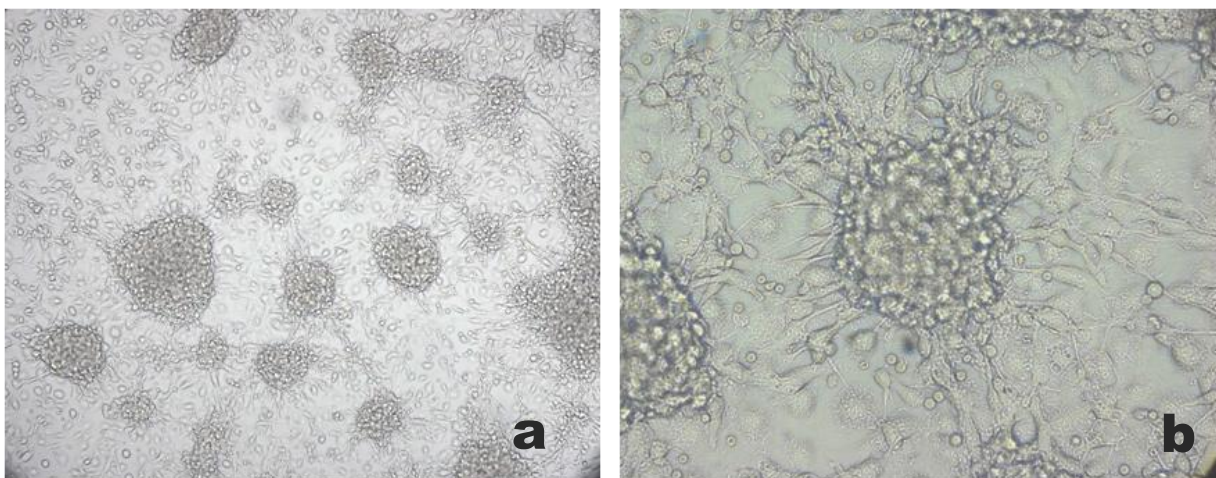


Abb. 12 a,b: a) Morphologie von Neo-Inselzellen nicht humaner Primaten mit charakteristischer Clusterbildung
b) Morphologie von Neo-Inselzellen nicht humaner Primaten mit charakteristischen neuronenähnlichen Fortsätzen

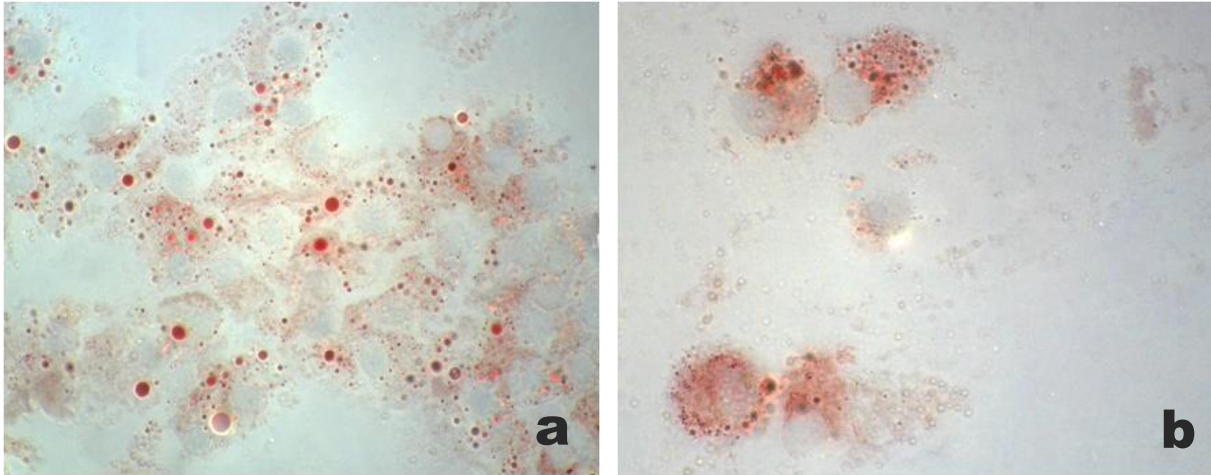


Abb. 13a,b: a) Dithizone-Färbung von nicht humanen Neo-Inselzellen mit für Insulinspeicherung typischem Verteilungsmuster b) Dithizone-Färbung in starker Vergrößerung mit vesikulärer Färbung

4.2.1 Proteinexpression

Die mit Neo-Inselzellmedium A unter Zusatz von Aktivin A behandelten, aus Monozyten nicht humaner Primaten differenzierten PCMO mit charakteristischer Clusterbildung exprimierten vergleichbar mit den Zellen humanen Ursprungs inselzellspezifische Antigene.

In den Clustern exprimierte eine Subpopulation Insulin, ebenfalls in typischer perinukleärer Anordnung der Insulin speichernden Granula (Abb. 15a) auch C-Peptid das bei der de novo-Synthese von Insulin entsteht konnte durch eine Immunfluoreszenzfärbung (Abb. 15b) nachgewiesen werden. Eine Kontrollfärbung ohne Primärantikörper zeigte, dass es sich hierbei nicht um eine Autofluoreszenz der Zellen handelte (Abb. 15 c). Die Färbung gegen Glut-2, einen Glucose Rezeptor, zeigte eine membranständige Färbung (Abb. 15d). Auch Pdx-1, ein Transkriptionsfaktor, wurde einer Subpopulation der Zellen in den Clustern exprimiert (Abb. 15e). Einige Zellen in den Clustern blieben bei allen immunhistochemischen Färbungen ungefärbt.

Eine ebenfalls durchgeführte Doppelimmunfluoreszenzfärbung zeigte auch bei den aus nicht humanen Primaten-Monozyten generierten Neo-Inselzellen eine simultane Expression von Insulin im Zytoplasma und Pdx-1 intranukleär (Abb. 14 a). Wiederum zeigte die Kontrollfärbung ohne Primärantikörper, dass es sich hierbei nicht um eine Autofluoreszenz der Zellen handelte (Abb. 14 b).

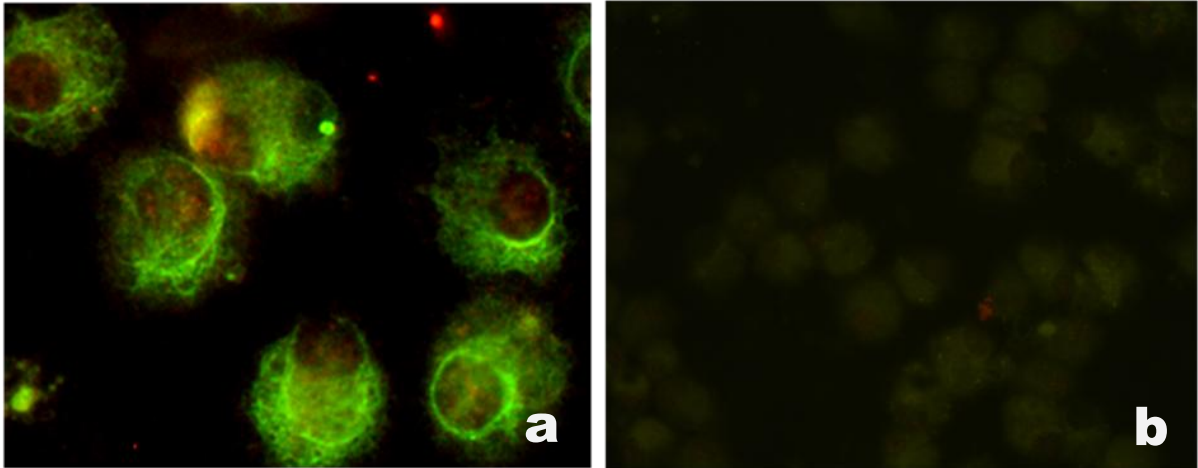
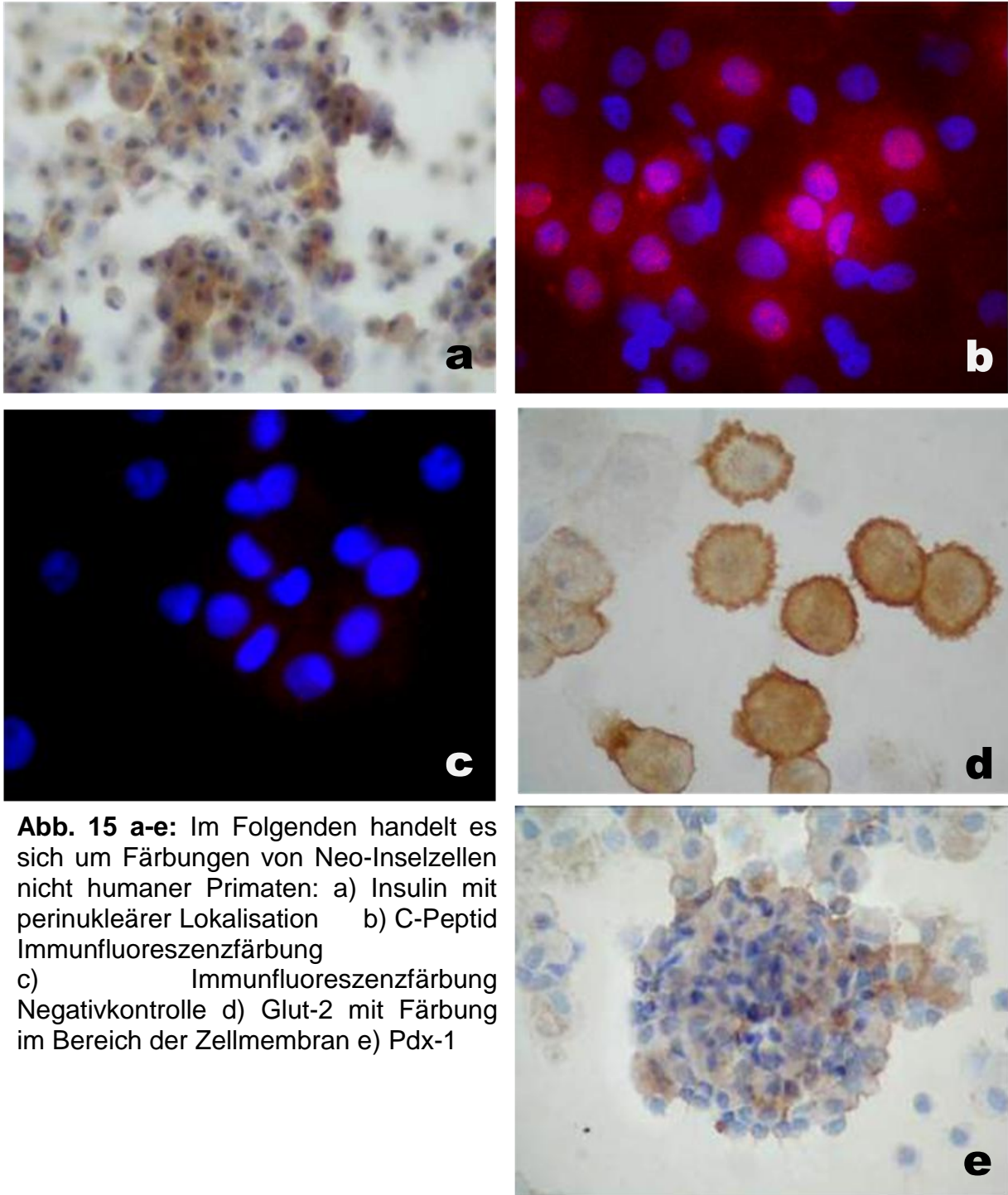


Abb. 14 a,b: a) Doppelimmunfluoreszenzfärbung für Insulin und PDX-1 c) Negativkontrolle ohne Primärantikörper um eine Autofluoreszenz auszuschließen.



4.2.2 Insulingehalt der nicht humanen Primaten-Neo-Inselzellen

Auch in den aus nicht humanen Primaten-Monozyten gewonnenen Neo-Inselzellen ließ sich ein Insulingehalt messen. In diesem Versuchsansatz wurde der Gesamtinsulingehalt von 1 Million Zellen nach 12-stündiger Inkubation in einem 5mmol Glucose haltigen Medium und nach Zellhomogenisierung mittels Ultraschall gemessen. Die Werte waren 16,213 $\mu\text{U}/1$ Million Zellen Standardabweichung: $\pm 0,76895$ (Diagramm 2).

■ Insulingehalt $\mu\text{U}/1$ Million Zellen

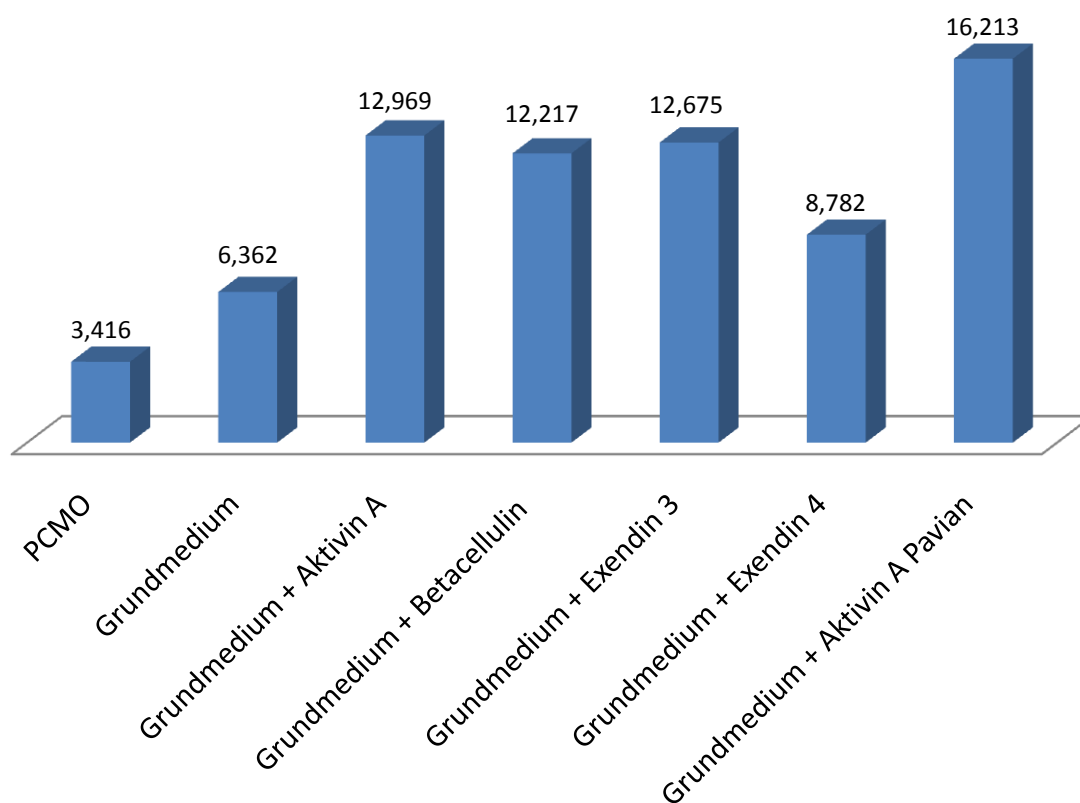


Diagramm 2: Aufgetragen sind Mittelwerte des Insulingehaltes in $\mu\text{U}/1$ Million Zellen von insgesamt vier Präparationen aus dem Blut nicht humaner Primaten. Diese wurden in Aktivin A enthaltendem Medium hergestellt. Außerdem ist der Insulingehalt der verschiedenen Proben humaner Neo-Inselzellen mit dargestellt (vergl. Diagramm 1, Tab. 11).

4.3 Verlaufsbeobachtung nach Splenektomie beim Anubispavian (Papio anubis)

Zwecks Vorbereitung einer Autotransplantation von aus PCMO gewonnenen Neo-Inselzellen im Tiermodell mit nicht humanen Primaten wurde im Rahmen dieser Forschungsarbeit ein Pavianweibchen der Gattung *Papio anubis* splenektomiert. Aus der homogenisierten Milz konnte eine zur Autotransplantation potenziell ausreichende Anzahl Monozyten von ca. $3,8 \times 10^8$ Zellen zur Dedifferenzierung und Differenzierung in PCMO bzw. Neo-Inselzellen isoliert werden. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass der zur Verfügung stehende Zeitraum während der in vitro Anzucht der Neo-Inselzellen zu einer guten Rekonstitution des Versuchstiers (Abb. 16) ausreicht.



Abb. 16: Pavian (Rufname „Heidi“) der Gattung (*Papio anubis*) 10 Tage nach erfolgreicher Splenektomie zur Gewinnung von Monozyten in guter körperlicher Verfassung

5 Diskussion

5.1 Grundlagen zur Verbesserung des Differenzierungsmediums zur Neo-Inselzellherstellung

Der Embryonalentwicklung der Beta-Zellen des Pankreas liegt die sequentielle Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren zugrunde. Die komplexen molekularbiologischen Abläufe der Pankreasembryogenese zu verstehen, ist Gegenstand aktueller Forschung und in vielen Publikationen, auch mit Blick auf ihre exogene Beeinflussbarkeit im in vitro Versuch, beschrieben (Soria 2001). Auf der Grundlage von Forschungsergebnissen, die den Einfluss von Aktivin A (Sulzbacher et al. 2009), Betacellulin (Mashima et al. 1996) und Exendin 3+4 (Xu et al. 1999; Zhou et al. 1999, 2002) in der Entwicklung Insulin produzierender Zellen zeigen (Tabelle 1), konnte mit dieser Arbeit ein verbessertes Protokoll zur Herstellung von Neo-Inselzellen aus PCMO etabliert werden.

Von den verschiedenen genannten Testmedien zeigte das Aktivin A enthaltende die besten Ergebnisse im Hinblick auf den Insulingehalt und die Expression von Insulin und Pdx-1. Unter Verwendung des Aktivin A enthaltenden Kulturmediums konnte der Insulingehalt der Neo-Inselzellen auf über 213% gegenüber in unverändertem Differenzierungsmedium hergestellten Neo-Inselzellen angehoben werden. Diese Erkenntnis bildete die Grundlage für die sich anschließenden Versuche an Monozyten nicht humaner Primaten. Hierbei konnten PCMO analoge Zellen erstmals aus Monozyten nicht humaner Primaten hergestellt werden und in der Folge weiter zu Insulin produzierenden Zellen differenziert werden.

5.2 Die Rolle von Aktivin A

Studien an Xenopus Spezies konnten zeigen, dass Aktivin A die Bildung des Endoderms inklusive der pankreatischen Zellen induziert (Smith et al. 1990; Gurdon et al. 1994). Aktivin A, welches zu der TGF- β Familie gehört, interagiert mit zwei transmembranösen Rezeptoren, welche eine Serin/Threonin-Kinase-Aktivität in Ihren

intrazellulären Domänen besitzen. Aktivin A bindet an den Typ-II-Rezeptor und initiiert den Start einer Signalkaskade. Hierbei wird der Typ-I-Aktivin-Rezeptor phosphoryliert und aktiviert. Es folgt eine Phosphorylierung von SMADs2/3, wobei SMAD3 in den Zellkern transloziert, hier wiederum SMAD4 phosphoryliert und somit zur Aktivierung von Transskriptionsfaktorkomplexen führt, die für die Genexpression verantwortlich sind (Chen, et al. 2006).

D'Amour et al. (2006) konnten zeigen, dass Aktivin A in humanen embryonalen Stammzellen einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung Hormon exprimierender endokriner Zellen hat. Diese entwickeln sich unter Einfluss von Aktivin A aus definitivem Endoderm.

In zahlreichen Publikationen zur Differenzierung von embryonalen Stammzellen zu Insulin produzierenden Zellen zeigte sich eine gleichzeitige Expression mehrerer Hormone (Insulin, Glucagon etc.). Diese Tatsache wie auch die fehlende Stimulierbarkeit zur Insulinsekretion durch Glucosestimulation wurde von vielen Autoren dahingehend interpretiert, dass die untersuchten Zellen möglicherweise noch Vorläuferstufen der Insulin produzierenden Zellen sind (D'Amour et al. 2006). Spätere Versuche bestätigten diese Annahme und konnten zeigen, dass aus unreifen embryonalen Zellen unter dem Einfluss von Aktivin A funktionstüchtige Insulin produzierende Zellen wurden. Diese konnten in diabetische Mäuse implantiert werden, wo sie unter den diabetischen in vivo Bedingungen ausdifferenzierten und den Glucosespiegel normalisierten (Kroon et al. 2008).

In einer Vorarbeit unserer Forschungsgruppe (Ruhnke et al. 2005 b) konnten wir zeigen, dass die von uns aus monozytären Zellen gewonnenen Neo-Inselzellen in geringem Maße Glucose abhängig Insulin ausschütten und ebenfalls nach Transplantation in diabetische Mäuse eine passagere Blutzuckernormalisierung induzieren. Wir interpretieren unsere Ergebnisse im Hinblick auf die nur geringe Insulinausschüttung ähnlich wie die oben genannten Forschungsgruppen und gehen davon aus, dass unsere Zellen sich noch auf einer sehr frühen Differenzierungsstufe befinden. Offensichtlich können der Einfluss von Aktivin A und die Transplantation der Zellen in ein diabetisches Milieu die Weiterdifferenzierung verbessern.

Bewusst wurde in dieser Arbeit auf eine erneute in vivo Funktionsanalyse im Mausmodell verzichtet, da unser zukünftiges Ziel nun darin besteht, die Generierung dieser Insulin produzierenden Zellen auf ein Primatenmodell zu übertragen. So bietet sich die Möglichkeit an, einer im Bezug auf Körpergewicht, Blutvolumen und nicht zuletzt Verwandtschaftsgrad mit dem Menschen vergleichbareren Spezies weitere offene Fragen zu beantworten.

5.3 Generierung von PCMO aus Monozyten nicht humaner Primaten

Es gelang uns, Primaten-Monozyten aus Blut und Milz zu isolieren und sie zu PCMO zu dedifferenzieren. Obwohl diese nicht humanen Monozyten mit den humanen rekombinanten Wachstumsfaktoren MCSF und IL-3 behandelt wurden, konnten wir die für PCMO charakteristischen Veränderungen der Zellmorphologie beobachten. Es erfolgte die Charakterisierung aufgrund der Morphologie sowie der Zuhilfenahme konventioneller Färbungen. Eine Durchflusszytologie entfiel, da zum Versuchszeitpunkt keine speziesspezifischen Antikörper gegen Cluster of Differentiation auf dem Markt erhältlich waren. Die Differenzierung von Zellen und Stammzellen nicht humaner Primaten stellt auch für andere Arbeitsgruppen ein Problem dar und ist Gegenstand aktueller Forschung.

So beispielsweise bei der Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten für die Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen, wo erforscht wurde, ob embryonale Stammzellen von Rhesus Makaken in Neuronen und Gliazellen differenziert werden können (Kuai et al. 2009). Oder bei Lester et al. (2004), deren Arbeitsgruppe die Differenzierung von embryonalen Stammzellen aus Rhesusaffen in pankreastypische Zellen untersuchte.

Versuche an Großtieren und insbesondere an Primaten sind ethisch sehr umstritten. In Deutschland gibt es nur wenige Einrichtungen, an denen Primatenversuche durchgeführt werden (z.B. das Deutsche Primatenzentrum in Göttingen).

Der Vorteil, unsere ersten Primatenversuche an der University of Cape Town in Südafrika durchzuführen, bestand darin, dass wir in freier Wildbahn geborene und

aufgewachsene Paviane als Versuchstiere einsetzen konnten. Sie wären anderenfalls als Problemtiere eingeschläfert worden. Diese sind im Gegensatz zu den in Deutschland verwendeten Primaten widerstandsfähiger. Durch ihre kräftige Statur gleichen sie hinsichtlich Körpergröße und Gewicht eher einem Menschen.

Aus hygienischer Sicht ist es jedoch schwieriger, eine sterile Zellkultur aus Wildtieren zu gewinnen. Dies ist uns bei Zellen aus peripheren Blutentnahmen zu 80%, bei den per Splenektomie gewonnenen Zellen jedoch gänzlich gelungen.

Somit konnten wir in dieser Arbeit erfolgreich demonstrieren, dass es möglich ist, PCMO analoge Zellen aus Monozyten nicht humaner Primaten herzustellen. Die positiven Ergebnisse im Hinblick auf Morphologie und Färbeverhalten erlauben es, die Affen-PCMO für die Differenzierung in Neo-Inselzellen zu verwenden, auch wenn eine Charakterisierung nur anhand von Morphologie und klassischem Färbeverhalten, nicht jedoch durch Oberflächenanalyse mittels Durchflusszytometrie erfolgte.

5.4 Differenzierungsstufe der Neo-Inselzellen unter Beachtung der embryonalen Entwicklung des endokrinen Pankreas

Bei der Entwicklung von Insulin produzierenden Zellen aus Stammzellen wie auch bei den in dieser Arbeit betrachteten PCMO stellt die erreichte Differenzierungsstufe ein zentrales Qualitätsmerkmal dar. Nur Zellen, die eine umfassende Differenzierung durchlaufen und sich möglichst wenig von adulten Beta-Zellen unterscheiden, sind in der Lage, Insulin in ausreichendem Maße und Glucose abhängig zu exprimieren.

Im Vergleich mit dem Ablauf der Genexpression während der in vivo Differenzierung von Beta-Zellen (Soria 2001) wird aufgrund des spezifischen Musters der Genexpression vermutet, dass sich die aus PCMO hervorgegangenen Neo-Inselzellen noch in einem frühen Stadium der Differenzierung befinden (Ruhnke et al. 2005 b).

Ein wie in der vorliegenden Arbeit veröffentlichtes, weiter entwickeltes Differenzierungsprotokoll bietet die Möglichkeit, dem Ziel einer vollständigen

Differenzierung näher zu kommen. Eine im Vergleich zur adulten β -Zelle wirklich vollwertige Ausdifferenzierung scheint jedoch weiterhin *in vitro* nicht möglich. So bleibt z.B. der Insulingehalt auch im Rahmen unserer Versuche stets hinter dem von natürlichen Beta-Zellen zurück.

Die Mehrzahl bekannter Differenzierungsprotokolle pluripotenter Zellen hin zu Neo-Inselzellen beruht auf der möglichst umfassenden Imitation der physiologischen Abläufe in der Embryonalentwicklung des Pankreas. Hier scheinen noch immer nicht alle beeinflussenden Faktoren in Funktion und Bedeutung vollständig erforscht zu sein. So verdichten sich mehr und mehr die Hinweise, dass z.B. das spezielle Zellmilieu, welches sich durch die dreidimensionale Organstruktur *in vivo* ergibt, entscheidenden Einfluss auf die Differenzierung von pluripotenten Zellen zu adulten Zellen hat.

Wir gehen weiterhin davon aus, dass aus PCMO gewonnene Neo-Inselzellen ihr volles Differenzierungspotenzial erst nach Transplantation in ein diabetisches „Mikroenvironment“ erreichen und dass eine Weiterdifferenzierung *in vivo* besser erfolgen kann als *in vitro*. So konnten Ruhnke et al. (unpublished observation) an aus PCMO generierten Neo-Hepatozyten zeigen, dass diese *in vitro* eine geringere Differenzierung aufweisen als drei Wochen nach Transplantation in das Leberparenchym einer Maus.

5.5 Neo-Inselzellen aus Monozyten nicht humaner Primaten zur potenziellen autologen Verwendung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Herstellung von PCMO und die anschließende Differenzierung in Insulin produzierende Zellen aus Monozyten nicht humaner Primaten möglich ist. Dieses neue Wissen bildet die Grundlage, über weiterführende Versuche zur autologen Verwendung von Neo-Inselzellen nachzudenken. Es bietet sich nun z.B. die Möglichkeit, Monozyten eines Individuums nicht humaner Primaten zu gewinnen, Diabetes zu induzieren und nach Dedifferenzierung und anschließender Differenzierung der Monozyten *in vitro* analog einer Inselzelltransplantation intraportal zu injizieren. Dies stellt viele entscheidende

Verbesserungen im Vergleich zu bisher durchgeführten Versuchen dar. Zum einen kann durch Verwendung autologer Zellen eine Abstoßung, anders als bei vorangegangenen Xenotransplantationen im Mausmodell (Ruhnke et al. 2005), verhindert werden und damit eine Langzeitbeobachtung der transplantierten Zellen in vivo erfolgen. Zum anderen konnten wir im Primatenmodell bereits zeigen, dass aus einer Affenmilz eine entsprechende Zellzahl an Neo-Inselzellen zu isolieren ist, die höchstwahrscheinlich für eine autologe Zelltherapie ausreichen würde.

Die im Edmonton Protokoll angegebene Menge der zu transplantierten Inselzellen, die zur erfolgreichen Therapie eines Diabetes mellitus notwendig ist, besteht aus 10 000 Inseln pro kg Körpergewicht (Schernthaner et al. 2001). Eine Langerhans-Insel enthält bis zu 5000 Zellen. Die Insulin produzierenden Beta-Zellen machen dabei 60-80 % am Inselzellvolumen aus. Somit müssten wir auf eine Gesamtzellzahl von 4×10^6 Zellen pro kg Körpergewicht kommen. Die in unseren Versuchen eingesetzten Paviane haben ein durchschnittliches Körpergewicht von 30 kg. Hochgerechnet auf ein Körpergewicht von 30 kg betrüge die notwendige Zellmenge $1,2 \times 10^8$ Zellen. In unserem mittels Splenektomie gewonnenen Zellpräparat hatten wir eine zur Transplantation verfügbare Zellmenge von $3,8 \times 10^8$ Zellen, also eine mehr als ausreichende Zellpopulation. Allerdings ist weiterhin zu bedenken, dass die aus Monozyten gewonnenen Insulin produzierenden Zellen, zumindest in vitro, deutlich weniger Insulin sezernieren als Beta-Zellen.

Im Gegensatz zu der zur Zeit praktizierten Inselzelltransplantation aus Pankreata verstorbener Individuen, bei der meist ein Präparat von mehreren Spendern hergestellt werden muss, würde in unserem Ansatz ein einziges autologes Präparat genügen. Im Tiermodell stellt der nahe Verwandtschaftsgrad zum Menschen einen weiteren Vorteil und damit einen wichtigen Schritt in Richtung zur humanen Anwendung dar.

Erste Versuche an aus PCMO vom Anubispavian (*Papio anubis*) hergestellten Neo-Inselzellen konnten zeigen, dass das oben genannte Verfahren insbesondere im Hinblick auf ausreichende Gewinnung von autologen Monozyten sowie die Durchführung der in vitro Versuche praktikabel ist. Eine hinreichend große Zellmasse an Monozyten konnte im Anschluss an eine vollständige Splenektomie bei guter Verträglichkeit gewonnen werden. Dies war von tierärztlicher Seite nicht sicher

vorherzusagen. Das Tier trug keinerlei Komplikationen der Splenektomie davon. Die Separation der Monozyten aus der homogenisierten Affenmilz gelang problemlos.

5.6 Vorteile bei der Verwendung von PCMO im Vergleich zu anderen differenzierbaren Zellen

Wie bereits dargelegt, befindet sich die Diabetestherapie aktuell in einer Phase, in der neben einer konservativen oder Transplantat gestützten Therapie zunehmend ein Forschungsschwerpunkt auf die Entwicklung nicht immunogener Zellersatzverfahren gelegt wird. Ziel dieser Bemühungen ist es, die endokrine Pankreasfunktion wieder herzustellen. Insbesondere der potenzielle Einsatz von embryonalen oder adulten Stammzellen wird in einer großen Anzahl von Arbeiten propagiert (Kroon et al. 2008, D'Amour et al. 2006, Segev et al. 2004, Soria 2001). Der Einsatz von Stammzellen in Forschung und klinischer Routine ist jedoch aufgrund von ungeklärten Entartungsrisiken, und im Fall von embryonalen Stammzellen auch aus ethischen Gesichtspunkten, immer wieder Gegenstand kontroverser Diskussion (Hug 2005). Hauptkritikpunkt ist hierbei die Zellentnahme im Blastozystenstadium, bei der die Frucht unweigerlich abstirbt.

Andere erfolgreich in vitro generierte Insulin produzierende Zellen wurden mittels Gentransfer aus mesenchymalen oder Knochenmarkstammzellen generiert (Karnieli et al. 2007, Kim et al. 2007). Diese gentechnisch veränderten Zellen sezernieren zwar erfolgreich Insulin, die Überführung in ein klinisches Protokoll ist jedoch nicht ohne Weiteres möglich. Die Zulassung von gentechnischen Zelltherapeutika ist bis heute stark umstritten. Umfangreiche Langzeit- und Großtierversuche werden ihre Unbedenklichkeit beweisen müssen und so lange zu einer Abseitsposition gentechnischer Zelltherapie in der klinischen Routine führen.

Dieses Problem stellt sich bei PCMO nicht. Auch ist die Verfügbarkeit beispielsweise durch Leukapherese (Herbst 2008) besser als bei adulten Stammzellen. Des Weiteren zeigen PCMO keine erhöhte Telomeraseaktivität (Ruhnke 2005 b), was sie insbesondere von embryonalen Stammzellen unterscheidet, die zur malignen Entartung oder Teratombildung (Przyborski 2005) neigen.

Nach allen vorliegenden Erkenntnissen stellen PCMO eine vielversprechende Basis für zukünftige zellbasierte Therapien dar. Ihre Pluripotenz und Differenzierbarkeit in verschiedene Zelllinien ist gut belegt und mit weniger Vorbehalten und Risiken verbunden als bei embryonalen Stammzellen. Wie auch in dieser Arbeit gezeigt, ist jedoch noch weitere Grundlagenforschung notwendig, um die Differenzierung von PCMO in die jeweilige Zielzelle zu verbessern.

6 Zusammenfassung

Weltweit sind mehr als 200 Millionen Menschen an Diabetes erkrankt (International Diabetes Federation 2009), denen eine große Auswahl an Therapien zur Verfügung steht. Diese sind jedoch überwiegend mit einer lebenslangen Medikamenteneinnahme und daher mit einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität verbunden. Ein häufiger Grund für einen Diabetes ist eine Fehlfunktion der Insulin produzierenden Zellen der Bauchspeicheldrüse. Eine solche Fehlfunktion kann schon heute im Rahmen einer Inselzelltransplantation oder einer kompletten Bauchspeicheldrüsentransplantation kurativ behandelt werden. Die Empfänger sind jedoch zum Schutz vor einer Abstoßungsreaktion stets auf eine lebenslange immunsuppressive Therapie angewiesen.

Ziel aktueller Forschung ist es daher, nicht immunogene Zellen herzustellen, welche die Insulinproduktion im Körper übernehmen könnten. Dieser Idee folgend ist es Gegenstand dieser Arbeit, ein bereits etabliertes Protokoll zur Herstellung solcher Insulin produzierender Zellen zu verbessern, um eine möglichst hohe Insulinexpression zu erreichen. Des Weiteren wurde untersucht, ob im Großtiermodell am Pavian genügend Monozyten für die Verwendung zur autologen Transplantation derartiger Zellen gewonnen werden können, was einen wichtigen Schritt auf dem Weg zur humanen Anwendung darstellt.

In der vorliegenden Arbeit wird die Generierung von programmierbaren Zellen monozytärer Herkunft (PCMO) und Neo-Inselzellen nach dem von unserer Forschungsgruppe bereits 2005 vorgestellten Protokoll (Ruhnke et al. 2005 b) durchgeführt. Die Differenzierung von PCMO zu Insulin produzierenden Zellen erfolgt jedoch unter Verwendung verschiedener neuartiger Mediumzusätze mit dem Ziel, die Insulinexpression der Zellen zu erhöhen. Zur Beurteilung der Zellen kommen verschiedene klassische und immunhistochemische Färbemethoden sowie ein Insulin-ELISA zur Quantifizierung der Insulinproduktion zum Einsatz. Außerdem erfolgt die Charakterisierung von PCMO mit Hilfe einer Durchflusszytometrie.

Im Tierversuch werden Monozyten zur Herstellung von PCMO bzw. Neo-Inselzellen aus dem Milzparenchym nach einer Splenektomie am Pavian gewonnen und die Rekonstitution des Versuchstiers sowie die Anzüchtbarkeit von PCMO bzw. Neo-Inselzellen aus Affenmonozyten untersucht. Hierzu diente ein sechsmonatiger Forschungsaufenthalt in Kapstadt, Südafrika.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Insulinproduktion von Neo-Inselzellen humaner sowie nicht humaner Primaten unter Verwendung eines Differenzierungsmediums, das Aktivin A enthält, gegenüber dem Grundmedium deutlich erhöht ist. Diese Erkenntnis bildet die Basis für die Herstellung und den Einsatz von Neo-Inselzellen aus Monozyten von nicht humanen Primaten zur potentiellen autologen Verwendung bei experimentell induziertem Diabetes.

Die in dieser Dissertation vorgestellten Erkenntnisse zeigen, dass es gelungen ist, leistungsfähigere Neo-Inselzellen herzustellen als bisher möglich. Sie bieten gegenüber dem Einsatz von Stammzellen entscheidende Vorteile, insbesondere im Hinblick auf Teratogenität sowie aus ethischen Gesichtspunkten. Durch ihren Einsatz im Rahmen einer autologen Transplantation könnte es gelingen, Diabetes zukünftig kurativ zu behandeln.

7 Literaturverzeichnis

Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM (2000) From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290: 1775 – 1779

Bruch HP (Hrsg.), Trentz O (Hrsg.) (2006) *Berchtold Chirurgie. Fünfte Auflage.* München: Elsevier GmbH

Chen WB, Lenschow W, Tiede K, Fischer JW, Kalthoff H, Ungefroren H (2002) Smad4/DPC4-dependant regulation of biglycan gene expression by transforming growth factor-beta in pancreatic tumor cells. *J Biol Chem.* 277: 36118-36128

Chen YG, Wang Q, Lin SL, Chang CD, Chuang J, Ying SY (2006) Activin signaling and its role in regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Exp Biol Med.* 231: 534-44

Corrêa-Giannella ML, Raposo do Amaral AS (2009) Pancreatic islet transplantation. *Diabetol Metab Syndr.* 1: 9

D'Amour KA, Bang AG, Eliazer S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG, Moorman MA, Kroon E, Carpenter MK, Baetge EE (2006) Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 24:1392-1401

de Sá JR, Monteagudo PT, Rangel EB, Melaragno CS, Gonzalez AM, Linhares MM, Salzedas A, Neves MD, Stela C, Medina-Pestana JO (2009) The evolution of diabetic chronic complications after pancreas transplantation. *Diabetol Metab Syndr.* 1: 11

Demeterco C, Beattie GM, Dib SA, Lopez AD, Hayek A (2000) A role for activin A and betacellulin in human fetal pancreatic cell differentiation and growth. *J Clin Endocrinol Metab.* 85: 3892-3897

Gruessner AC, Sutherland DE (2005) Pancreas transplant outcomes for United States (US) and non-US cases as reported to the United Network for Organ Sharing

(UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR) as of June 2004. Clin Transplant. 19: 433-55

Gurdon JB, Harger P, Mitchell A, Lemaire P (1994) Activin signalling and response to a morphogen gradient. Nature. 371: 487-92

Herbst AS (2008) Untersuchungen zu in vitro modifizierten humanen Blutmonozyten: Immunhistochemisch-morphologische Charakterisierung und funktioneller Nachweis von Insulin. Med. Diss. Bayerische Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

Hug K (2005) Sources of human embryos for stem cell research: ethical problems and their possible solutions. Medicina 41: 1002-10

Jonasson O, Jones CW, Bauman A, John E, Manaligod J, Tso MO (1985) The pathophysiology of experimental insulin-deficient diabetes in the monkey. Implications for pancreatic transplantation. Ann Surg. 201: 27-39

Karnieli O, Izhar-Prato Y, Bulvik S, Efrat S. (2007) Generation of insulin-producing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells by genetic manipulation. Stem Cells. 25:2837-44

Kim JH, Park SN, Suh H (2007) Generation of insulin-producing human mesenchymal stem cells using recombinant adeno-associated virus. Yonsei Med J. 48:109-19

Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ (2001) Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. Cell. 105: 369-77

Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazar S, Young H, Richardson M, Smart NG, Cunningham J, Agulnick AD, D`Amour KA, Carpenter MK, Baetge EE (2008) Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. Nat Biotechnol. 26: 443-452

Kuai XL, Gagliardi C, Flaas M, Bunnell BA (2009) Differentiation of nonhuman primate embryonic stem cells along neural lineages. *Differentiation* 77: 229-38

Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M (2000) Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med.* 6: 1229-34

Lester LB, Kuo HC, Andrews L, Nauert B, Wolf DP (2004) Directed differentiation of rhesus monkey ES cells into pancreatic cell phenotypes. *Reprod Biol Endocrinol.* 2: 42

Mashima H, Ohnishi H, Wakabayashi K, Mine T, Miyagawa J, Hanafusa T, Seno M, Yamada H, Kojima I (1996) Betacellulin and activin A coordinately convert amylase-secreting pancreatic AR42J cells into insulin-secreting cells. *J Clin Invest.* 97: 1647-1654

Przyborski SA (2005) Differentiation of human embryonic stem cells after transplantation in immune-deficient mice. *Stem Cells.* 23:1242-50

Pufe T, Petersen W, Fändrich F, Varoga D, Wruck CJ, Mentlein R, Helfenstein A, Hoseas D, Dressel S, Tillmann B, Ruhnke M (2008) Programmable cells of monocytic origin (PCMO): a source of peripheral blood stem cells that generate collagen type II-producing chondrocytes. *J Orthop Res.* 26: 304-13

Rick W (Hrsg.) (1977) *Klinische Chemie und Mikroskopie.* Fünfte Auflage. Berlin-Heidelberg-New York: Springer

Ruhnke M, Nussler AK, Ungefroren H, Hengstler JG, Kremer B, Hoeckh W, Gottwald T, Heeckt P, Fändrich F (2005) Human monocyte-derived neohepatocytes: a promising alternative to primary human hepatocytes for autologous cell therapy. *Transplantation.* 79: 1097-103, a

Ruhnke M, Ungefroren H, Nussler A, Martin F, Brulport M, Schormann W, Hengstler JG, Klapper W, Ulrichs K, Hutchinson JA, Soria B, Parwaresch RM, Heeckt P, Kremer B, Fändrich F (2005) Differentiation of in vitro-modified human peripheral

blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells. *Gastroenterology*. 128: 1774-1786, b

Scherbaum W, Kiess W (Hrsg.) (2004) Evidenzbasierte Leitlinie der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG). http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/leitlinien/EBL_Klassifikation_Update_2004.pdf

Schernthaner G (2001) Fortschritte in der Pankreas- und Inselzelltransplantation. *Acta Chir. Austriaca*. 33:127-131

Segev H, Fishman B, Ziskind A, Shulman M, Itskovitz-Eldor J (2004) Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters. *Stem Cells*. 22: 265-74

Smith JC, Price BM, Van Nimmen K, Huylebroeck D (1990) Identification of a potent *Xenopus* mesoderm-inducing factor as a homologue of activin A. *Nature*. 345: 729-31

Soria B (2001) In-vitro differentiation of pancreatic beta-cells. *Differentiation*. 68: 205-219

Sulzbacher S, Schroeder IS, Truong TT, Wobus AM (2009) Activin A-induced differentiation of embryonic stem cells into endoderm and pancreatic progenitors the influence of differentiation factors and culture conditions. *Stem Cell Rev*. 5: 159-173

Theriault BR, Thistlethwaite JR Jr, Levisetti MG, Wardrip CL, Szot G, Bruce DS, Rilo H, Li X, Gray GS, Bluestone JA, Padrid PA (1999) Induction, maintenance, and reversal of streptozotocin-induced insulin-dependent diabetes mellitus in the juvenile cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Transplantation*. 68: 331-337

Unwin N, Whiting D, Gan D, Jacqmain O, Ghyoot G (Hrsg.) (2009) IDF Diabetes Atlas. Vierte Ausgabe. International Diabetes Federation

Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S (1999) Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes*. 48:2270-6

Zhou J, Pineyro MA, Wang X, Doyle ME, Egan JM (2002) Exendin-4 differentiation of a human pancreatic duct cell line into endocrine cells: involvement of PDX-1 and HNF3beta transcription factors. *J Cell Physiol*. 192: 304-314

Zhou J, Wang X, Pineyro MA, Egan JM (1999) Glucagon like peptide 1 and exendin-4 convert pancreatic AR42J cells into glucagon- and insulin-producing cells. *Diabetes* 48: 2358-2366

8 Danksagung

Mein Dank gilt allen Personen, die mich mit Rat und Tat bei der Erstellung meiner Dissertation unterstützt haben.

Ganz besonders danke ich meiner Doktormutter und mittlerweile guten Freundin, Frau PD Dr. Maren Schulze, für die Überlassung des Themas, stets vorbildliche Betreuung und für ein „Abenteuer Afrika“.

Frau Ingrid Berg habe ich für ihre wesentliche Unterstützung bei der Durchführung der praktischen Versuche zu danken.

Meinem Vater, Realschulrektor a.D. Fritz Harder, danke ich auch im Namen aller Leser für sein gewissenhaftes Lektorat.

Von ganzem Herzen danke ich Frau cand. med. Eva Susanne Müller, die in ihrer liebenswerten, selbstlosen Art stets fest an meiner Seite steht.

9 Curriculum vitae

Name	Ole Harder
Geburtsdatum	01.11.1981
Geburtsort	Schleswig
Staatsbürgerschaft	deutsch

Schulen:

1987-92	Wilhelminenschule Schleswig (Grundschule)
1992-01	Lornenschule Schleswig (Gymnasium)
2001	Abitur

Wehr- / Zivildienst

2001-02	Zivildienst beim Rettungsdienst Schleswig-Flensburg mit Ausbildung zum Rettungssanitäter
---------	--

Universitäten:

2002	Studium der Pharmazie
2003	Wechsel zum Studium der Humanmedizin (beides an der Christian-Albrechts-Universität Kiel)
2005	Erfolgreich bestandener erster Teil der Ärztlichen Prüfung
2006	Aufnahme der Arbeiten zur Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
2006-07	Sechsmonatiger Forschungsaufenthalt an der University of Cape Town (Südafrika) für die Durchführung experimenteller Teile im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit
2009	Zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung / Approbation als Arzt

Tätigkeiten:

- | | |
|---------|--|
| 2001-09 | Regelmäßige Arbeit beim Rettungsdienst Schleswig-Flensburg mit ca. 4000 Notfalleinsätzen |
| 2010 | Firmengründung im Bereich Personalvermittlung Medizin, Assistenzarzt Westküstenklinikum Heide, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie |

10 Anhang



**ANIMAL RESEARCH ETHICS COMMITTEE
HEALTH SCIENCES FACULTY
UNIVERSITY OF CAPE TOWN**

**APPLICATION FOR MINOR AMENDMENT(S) TO A PREVIOUSLY
APPROVED STUDY**

Please note that major amendments to previously approved studies should rather be submitted as new applications on the correct form, with a covering letter and termination report for the previously approved study.

This application must be typed and submitted to:

For office use only

The Administrative Officer
Research Ethics Office
Faculty of Health Sciences
E53-44.1 Old Main Building
Groote Schuur Hospital

Date received:

Date approved:

Signed:

Phone: 406 6492. Email: lemjedi@curie.uct.ac.za

NAME OF PRINCIPAL INVESTIGATOR : *Dr. Schulze*

DEPARTMENT : *Surgery*

APPROVED STUDY REFERENCE NUMBER : *006/023*

STUDY TITLE : *Baboon diabetic*

NUMBER AND SPECIES ORIGINALLY APPROVED : *1*

TOTAL NUMBER OF ANIMALS USED TO DATE : *1*

SPECIFIC AMENDMENT REQUESTED :

Use of different drugs than named in protocol

Morphine instead of Buprenorphine

Cefotaxim instead of Duplocillin

MOTIVATION FOR THE AMENDMENT :

- Other medication not available*
- same profile*

Date : *22/01/07*

Signature (Principal Researcher) :

[Handwritten Signature]

INSTRUCTIONS AND OUTSTANDING WORK-UP

Complete by hand when label not available

Baboon I Heidi
726 ♂

ANAESTHETIC OPINION/PLAN

ASA STATUS

DIAGNOSIS Diabetic baboon study

Consent

PROPOSED OPERATION Splenectomy

Surgeon Schulze

RELEVANT HISTORY

Last oral intake?
Smoker?

Previous Anaesthetics

ALLERGY?

Medication

Problems

EXAMINATION

Wt 19kg Ht/BSA

INVESTIGATIONS

General

ECG

Airway:

Teeth

Chest X-RAY

Cardiovascular

BP HR

Pulmonary Function Test
Pre Post Predicted

Respiratory

FEV₁
FVC
Ratio

BLOOD INVESTIGATIONS

OTHER INVESTIGATIONS

Hb Na+ pH
Platelets K+ pO₂
INR Urea pCO₂
Creat BE
Glucose SB
FlO₂

PRE-ANAESTHETIC MEDICATION

Given by Time Checked by Time Date

Drug	Dose	Route	Time
1. Ketamine	100 mg / 15 ml	at	
2. Cefotaxime	1000 mg diluted	at	
3.	to 3ml cell	at	
4.		at	

Name & Signature

Name & Signature

Ordered by: Signature:

Print Name

GROOTE SCHUUR HOSPITAL		Complete by hand when label not available	
OPERATION SHEET		NAME <u>Baboon 1</u> <u>726</u>	AGE _____
WARD _____	DATE (operation) <u>22/01/07</u>	FOLDER No. <u>HEIDE</u>	BIRTH _____ RACE _____ SEX <u>♀</u>
SURGEON <u>Dr Schulze / Ole Harder</u>		ADM <u>19 Kilo</u>	DEPT _____ WARD _____
PATHOLOGY	<u>Diabetic Baboon study</u>		
OPERATION	<u>Splenectomy</u>		
APPROACH	<u>Laparotomy</u>		
PROCEDURE	<ul style="list-style-type: none"> - Midline incision - localization of spleen - dividing of gastrosplenic ligament mobilizing spleen - tied of splenic artery + vein silk 2/0 - visualized pancreas head not injured, oversewn 2/0 vicryl - closure 		
CLOSURE	<ul style="list-style-type: none"> - vicryl 2/0 sheath - Nylon 2/0 skin 		
DRAINAGE			
DIFFICULTY	<u>SM</u>		
MEDICAL OFFICER			