

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Isolierung und Anreicherung der enteroendokrinen
K-Zellen aus Rattendarmmucosa**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Haushalts- und Ernährungswissenschaften
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Dipl. oec. troph. Jutta Maaß
aus Friedberg

Gießen im September 1999

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dr. A. Gardemann
2. Prof. Dr. H. Daniel

Tag der Disputation:

18.12.1999

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), Bonn finanziert.

„Wenn Kinder klein sind, gib ihnen Wurzeln,

wenn sie groß sind, gib ihnen Flügel.“

(U. Neumann)

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 PROBLEMSTELLUNG	1
1.1 Diabetes mellitus - Aktuelle Therapieansätze	1
1.2 Theorie einer neuen Behandlungsmethode.....	3
1.3 Enteroendokrine K- und L-Zellen - Lokalisation, Isolation und Anreicherung.....	6
1.4 Zusammenfassung der Aufgabenstellung	13
2 MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 Lokalisation der K- und L-Zellen im Darm der Ratte	16
2.1.1 Immunhistochemische Lokalisation der K- und L-Zellen	16
2.1.1.1 Herstellung von Gefrierschnitten	18
2.1.1.2 Einfachmarkierung durch Immunfluoreszenz	18
2.1.1.3 Gegenfärbung mit Propidiumjodid	20
2.1.1.4 Doppelmarkierung durch Immunfluoreszenz.....	20
2.1.1.5 Negativkontrollen.....	20
2.1.2 Untersuchung der Verteilung der K- und L-Zellen über die gesamte Darmlänge.....	21
2.1.2.1 Die Schabtechnik	21
2.1.2.2 Bestimmung des GIP- und GLP-1-Gehaltes der Fraktionen durch Radioimmunoassay	22
2.1.2.3 Bestimmung des Proteingehalts der Fraktionen.....	23
2.1.3 Lokalisation der K- und L-Zellen entlang der Villus-Krypt-Achse.....	23
2.1.3.1 Die Ausschütteltechnik	24
2.1.3.2 Colorimetrische Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase.	25
2.1.3.3 Bestimmung der Thymidinkinase-Aktivität mittels Radioenzymassay	26

2.2 Isolation der K- Zellen aus Duodenum	27
2.2.1 Mechanische Isolation der K-Zellen.....	27
2.2.2 Enzymatische Zellisolation	28
2.2.2.1 Isolation	28
2.2.2.2 Hämalaun-Eosin-Färbung.....	29
2.2.3 Isolation der K-Zellen in hyperosmolarem Chelatpuffer.....	30
2.3 Anreicherung der K-Zellen.....	32
2.3.1 Zellanreicherung durch Magnetic Cell Sorting (MACS)	33
2.3.2 Zellanreicherung mit Dynabeads	36
2.3.2.1 Standardversuch und Variationen	38
2.4 Nachweis der Anreicherung und der Glucose-Stimulierbarkeit der K-Zellen <i>in vitro</i>.....	41
2.5 Statistik.....	41
3 ERGEBNISSE	43
3.1 Lokalisation der K- und L-Zellen im Darm der Ratte	43
3.1.1 Immunhistochemische Lokalisation der K- und L-Zellen	43
3.1.2 Untersuchung der Verteilung der K- und L-Zellen über die gesamte Darmlänge	45
3.1.3 Lokalisation der K- und L-Zellen entlang der Villus-Krypt-Achse	48
3.2 Isolation der K-Zellen	51
3.2.1 Isolation von K-Zellen aus Duodenum.....	51
3.2.1.1 Ergebnisse der mechanischen Zellisolationsversuche	51
3.2.1.2 Ergebnisse der enzymatischen Zellisolationsversuche	52
3.2.1.3 Ergebnisse der Versuche mit hyperosmolarem Chelatpuffer	52
3.3 Anreicherung der K-Zellen.....	53
3.3.1 Zellanreicherung durch Magnetic Cell Sorting (MACS)	53
3.3.2 Zellanreicherung mit Dynabeads	54
3.3.2.1 Auswahl des primären Antikörpers	54
3.3.2.2 Optimierung der Standardbedingungen.....	57

3.4 Glucose-Stimulierbarkeit der K-Zellen <i>in vitro</i>	60
4 DISKUSSION	63
4.1 Lokalisation der K- und L-Zellen	63
4.2 Isolation der K-Zellen	66
4.3 Anreicherung der K-Zellen.....	69
4.3.1 Zellanreicherung durch Magnetic Cell Sorting (MACS)	69
4.3.2 Zellanreicherung mit Dynabeads.....	70
4.4 Glucosesensitivität der K-Zellen.....	74
4.5 Ausblick auf die Fortführung der Versuchsplanung	75
4.6 Die Signalkette zwischen K- und L-Zellen.....	79
4.6.1 Erkenntnisse aus der Literatur.....	79
4.6.2 Erkenntnisse aus den Versuchen zur Lokalisation der K- und L-Zellen	82
4.7 Schlußfolgerungen und Ausblick	85
4.7.1 Weitere, neue Fragen, die sich aus der Lokalisation der K- und L-Zellen ergeben	85
4.7.2 Neue Entwicklungen in der Therapie des Diabetes mellitus.....	85
4.7.3 Resümee	90
5 ZUSAMMENFASSUNG	91
6 LITERATUR	93

Verzeichnis der Tabellen

TABELLE 2-1: ABSORPTIONS- UND EMISSIONSMAXIMA DER FLUORESZENZ-FARBSTOFFE FITC, TRITC, CY2 UND CY3.....	17
TABELLE 2-2: ÜBERSICHT ÜBER DIE BEI DEN IMMUNHISTOCHEMISCHEN VERSUCHEN VERWENDETEN ANTIKÖRPER	19
TABELLE 2-3: ÜBERSICHT DER ZUR K-ZELL-ISOLATION VERWENDETEN COLLAGENASEN	28
TABELLE 2-4: ABFOLGE DER AUFSTIEGENDEN ALKOHOLREIHE ZUR ENTWÄSSERUNG VON BIOLOGISCHEM UNTERSUCHUNGSMATERIAL...29	
TABELLE 2-5: VARIATIONEN DER INKUBATIONSBEDINGUNGEN ZUR K-ZELL-ISOLATION.....	31
TABELLE 2-6: ÜBERSICHT ÜBER DIE ZUR ISOLATION DER K-ZELLEN GETESTETEN PRIMÄREN ANTIKÖRPER	39
TABELLE 2-7: FAKTOREN ZUM UMRECHNEN DER ZELLZAHL AUF DIE ZUR ISOLATION DER K-ZELLEN EINZUSETZENDE MENGE AN DYNABEADS...39	
TABELLE 3-1: GIP-VERTEILUNG ÜBER DIE DARMLÄNGE IM RATTENDARM.	46
TABELLE 3-2: GLP-1-VERTEILUNG ÜBER DIE DARMLÄNGE IM RATTENDARM	47
TABELLE 3-3: ANREICHERUNGSFAKTOREN FÜR K-ZELLEN BEI DER VERWENDUNG VERSCHIEDENER PRIMÄRER ANTIKÖRPER.....	56
TABELLE 3-4: ERGEBNISSE DER VERSUCHE ZUR ANREICHERUNG DER K-ZELLEN DURCH ABREICHERUNG VON EPITHELZELLEN.	56
TABELLE 4-1: DURCH ELUTRIATION ERZIELTE ANREICHERUNGEN ENDOKRINER ZELLEN.	70

Verzeichnis der Abbildungen

ABBILDUNG 1-1: VEREINFACHT DARGESTELLTER MECHANISMUS ZUR INSULINSEKRETION AUS β -ZELLEN DES PANKREAS.....	4
ABBILDUNG 1-2: SEQUENZEN VON GLUCOSE-DEPENDENT INSULINOTROPIC POLYPEPTIDE (GIP) BEI MENSCH UND RATTE	7
ABBILDUNG 1-3: PROZESSIERUNG VON PRÄPROGLUCAGON IN DEN L-ZELLEN ..	9
ABBILDUNG 1-4: SEQUENZ VON GLUCAGON-LIKE PEPTIDE 1 (1-37).....	9
ABBILDUNG 2-1: SCHEMA DER ANTIGEN-ANTIKÖRPER-BINDUNGEN BEI DER IMMUNFLUORESCENZMARKIERUNG.....	19
ABBILDUNG 2-2: NACHWEISREAKTION ZUR MESSUNG DER AKTIVITÄT VON ALKALISCHER PHOSPHATASE.....	26
ABBILDUNG 2-3: VERSUCHSAUFBAU ZUR ISOLATION VON K-ZELLEN IN HYPEROSMOLAREM CHELATPUFFER	31
ABBILDUNG 2-4: BINDUNG ZWISCHEN EINER ZELLE UND EINEM MAGNETISCHEN TEILCHEN BEI DER IMMUNOMAGNETISCHEN ZELLSEPARATION	32
ABBILDUNG 2-5: DIREKTE UND INDIREKTE TECHNIK BEI DER IMMUNOMAGNETISCHEN ZELLSEPARATION	33
ABBILDUNG 2-6: DAS VERFAHREN ZUR ZELLANREICHERUNG MIT MACS.....	34
ABBILDUNG 2-7: FUNKTIONSWEISE DER DYNABEADS	37
ABBILDUNG 3-1: A) K-ZELLE AUS DEM DUODENUM DER RATTE B) L-ZELLE AUS DEM ILEUM DER RATTE.....	44
ABBILDUNG 3-2: A) K-ZELLE AUS DEM DUODENUM DER RATTE B) L-ZELLE AUS DEM ILEUM DER RATTE	45
ABBILDUNG 3-3: GIP-VERTEILUNG ÜBER DIE DARMLÄNGE	46
ABBILDUNG 3-4: GLP-1-VERTEILUNG ÜBER DIE DARMLÄNGE	47
ABBILDUNG 3-5: VERLAUF DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄTEN AN ALKALISCHER PHOSPHATASE (AP) UND THYMIDINKINASE (TK) ENTLANG DER VILLUS-KRYPT-ACHSE A) IM KOMPLETTEN DÜNNDARM B) IM PROXIMALEN TEIL (DUODENUM UND PROXIMALES JEJUNUM) C) IM DISTALEN TEIL DES RATTENDARMS (DISTALES JEJUNUM UND ILEUM)	49

ABBILDUNG 3-6: VERLAUF DER SPEZIFISCHEN GIP- UND GLP-1-KONZENTRATIONEN ENTLANG DER VILLUS- KRYPT-ACHSE	
A) IM KOMPLETTEN DÜNNDARM	
B) IM PROXIMALEN TEIL (DUODENUM UND PROXIMALES JEJUNUM)	
C) IM DISTALEN TEIL DES RATTENDARMS (DISTALES JEJUNUM UND ILEUM)	51
ABBILDUNG 3-7: RELATIVER K-ZELLGEHALT IM VERGLEICH ZUM ANREICHERUNGSFAKTOR.....	56
ABBILDUNG 3-8: K-ZELLANREICHERUNG IN ABHÄNGIGKEIT VON DER DAUER DER INKUBATION MIT DEM PRIMÄREN ANTIKÖRPER	58
ABBILDUNG 3-9: K-ZELLANREICHERUNG IN ABHÄNGIGKEIT VON DER DAUER DER INKUBATION MIT DEM DYNABEAD-GEKOPPELTEN, SEKUNDÄREN ANTIKÖRPER.....	59
ABBILDUNG 3-10: STIMULATION DER GIP-SEKRETION AUS ANGEREICHERTEN K-ZELLEN.....	61
ABBILDUNG 4-1: NÄHRSTOFFABSORPTION IM DARM DES MENSCHEN	83

Verzeichnisse der Abkürzungen

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
AtT20	Zelllinie, aus dem Hypophysenvorderlappen von Mäusen gewonnen
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Konzentration
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCK	Cholecystokinin
CD	Cluster of Differentiation, Differenzierungscluster
cDNA	Complementary DNA oder copy-DNA
Cy2	Carbocyanin
Cy3	Indocarbocyanin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Kulturmedium)
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)-tetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EHS	Abkürzung für die Namen der Forscher Engelbreth, Holm und Swarm, eingehend in den Namen „Biomatrix EHS“
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
<i>g</i>	Normwert der Fallbeschleunigung: 9,81 m / s ²
GIP	Gastric Inhibitory Polypeptide oder Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide
GLC	Glucose
GLC - 6- P	Glucose-6-phosphat
GLP-1	Glucagon-like Polypeptide
GLP-2	Glucagon-like Peptide 2
GLUT2	Glucosetransporter 2
GRP	Gastrin Related Peptide
GRPP	Glicentin-Related Pancreatic Peptide
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution

HLA I	Human Leucocyte Antigene I
HLA II	Human Leucocyte Antigene II
IDDM	Insulin-dependent Diabetes mellitus
IGF	Insulin-like Growth Factor
IgG	Immunglobulin G
MACS	Magnetic Cell Sorting
MHC-1	Major Histocompatibility Complex 1
MHC-2	Major Histocompatibility Complex 2
MIN	Mausinsulinom-Zelllinie
N-CAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NIDDM	Non-Insulin-Dependent Diabetes mellitus
PBS	Phosphate Buffered Salt Solution
PC2	Peptid Convertase 2
PC3	Peptid Convertase 3
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
REA	Radioenzymassay
RIA	Radioimmunoassay
RIN	Ratteninsulinom-Zelllinie
SD	Standardabweichung (Standard Deviation)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (Standard Error of the Mean)
SGLT1	Sodium-Glucose-Transporter 1
TK	Thymidinkinase
TRITC	Tetramethylrhodamin-isothiocyanat
UW-Lösung	University-of-Wisconsin-Lösung
VIP	Vasoactive Intestinal Peptide
β -TC	β -Tumor-Zelllinie

Dreibuchstabencode für Aminosäuren

Ala	= Alanin	Leu	= Leucin
Arg	= Arginin	Lys	= Lysin
Asn	= Asparagin	Met	= Methionin
Asp	= Asparaginsäure	Phe	= Phenylalanin
Cys	= Cystein	Pro	= Prolin
Gln	= Glutamin	Ser	= Serin
Glu	= Glutaminsäure	Thr	= Threonin
Gly	= Glycin	Trp	= Tryptophan
His	= Histidin	Typ	= Tyrosin
Ile	= Isoleucin	Val	= Valin

1 Problemstellung

1.1 Diabetes mellitus - Aktuelle Therapieansätze

In den westlichen Industrieländern sind etwa 3 % der Bevölkerung Diabetiker; damit ist der Diabetes mellitus die am häufigsten vorkommende Stoffwechselerkrankung. Von klinischer Bedeutung sind vor allem der Typ I-Diabetes (IDDM, Insulin dependent diabetes mellitus) und der Typ II-Diabetes (NIDDM, Non-insulin-dependent diabetes mellitus). Der Typ I-Diabetes ist eine Autoimmunerkrankung mit immunogenetischem Hintergrund, bei der die Langerhansschen Inselzellen des Pankreas zerstört werden, was zu einem absoluten Insulinmangel führt. Die Ursachen des Typ II-Diabetes liegen entweder in einer verminderten Glucose-sensitivität der β -Zellen des Pankreas, woraus ein relativer Insulinmangel resultiert, oder einer peripheren Insulinresistenz [1].

Die Erkrankung ist meistens mit Begleit- und Folgekrankheiten (wie einer Makroangiopathie, Retinopathie, Neuropathie oder Nephropathie) verbunden. Diese können die Lebensqualität und die Lebenserwartung der Patienten deutlich herabsetzen. Außerdem verursacht deren Behandlung hohe Kosten. Um das Ausmaß der Begleit- und Folgekrankheiten möglichst gering zu halten, ist daher eine gute Einstellung des Blutglucosespiegels unbedingt anzustreben [2, 3].

Typ II-Diabetikern wird derzeit zunächst eine Normalisierung des Körpergewichts empfohlen sowie eine angemessene Diät, verbunden mit viel Bewegung [4]. Wenn nötig, werden orale Antidiabetika eingesetzt. Hierbei handelt es sich in erster Linie um Sulfonylharnstoffe, die die Insulinsekretion der β -Zellen stimulieren, um Biguanide oder um α -Glucosidasehemmer, die die Disaccharid-Spaltung hemmen. Wenn die β -Zellen versagen, wird eine Therapie mit Insulin nötig, wie sie auch bei Typ I-Diabetikern angewandt wird. Hierbei unterscheidet man zwischen der konventionellen und der intensivierten Insulintherapie. Mittlerweile wird in den meisten Fällen die intensivierte Therapie angewandt, bei der die zu injizierende Insulinmenge flexibel an die physiologischen Bedürfnisse (Nahrungsaufnahme, Sport) des Patienten angepaßt wird. Selbst mit der intensivierten Insulintherapie ist aber keine vollständige Wiederherstellung der

Glucose-Homöostase möglich [5]. Außerdem ist der Erfolg der Therapie stark von der Einsicht und Disziplin des Patienten abhängig.

Aus diesem Grund wird für insulinpflichtige Diabetiker (Typ I-Diabetiker sowie Typ II-Diabetiker, die nicht mehr ohne Insulin behandelt werden können, sogenannte „Therapie-Versager“) nach alternativen Behandlungsmethoden gesucht.

Ideal wäre hierfür ein geschlossenes System, in dem das Hormon an den metabolischen Bedarf angepaßt ausgeschüttet wird, so daß der Diabetiker selbst keine Parameter mehr zu kontrollieren hätte. Zu dieser Überlegung gibt es drei wissenschaftliche Ansätze [6]:

1. Es können mechanische Geräte entwickelt werden, die nach Detektion des Blutglucosespiegels automatisch eine adäquate Menge an Insulin freisetzen (Insulinpumpen). Verschiedene Probleme (u.a. die Störanfälligkeit der Systeme) haben jedoch verhindert, daß sich derartige Geräte in der Therapie des insulinabhängigen Diabetes durchgesetzt haben.
2. Neben der Transplantation des kompletten Pankreas ist die Inselzelltransplantation eine Möglichkeit, die derzeit intensiv untersucht wird. Diese Methode ist aber noch mit vielen Schwierigkeiten verbunden: Inselzellen können zwar schon isoliert und transplantiert werden; um Abstoßungsreaktionen zu vermeiden, müssen die Patienten aber lebenslang Medikamente zur Immunsuppression einnehmen. Auch die dauerhafte und ausreichende Hormonproduktion ist noch nicht gesichert. Ein großes Problem besteht darin, daß für eine Transplantation humaner Inselzellen zu wenig Spenderorgane zur Verfügung stehen. So erfolgen Transplantationen in der Regel nur bei Patienten, die bereits erhebliche Komplikationen der diabetischen Grunderkrankung entwickelt haben, und dann dadurch meist in Form einer doppelten Transplantation (z.B. Inseln und Niere). Ziel einer Therapie sollte aber bereits die *Vermeidung* von Komplikationen sein. Zur Umgehung der Immunabwehr wurden Versuche durchgeführt, bei denen die Inselzellen in Kunststoffhüllen eingebettet wurden. Auch bei dieser Methode ist eine dauerhafte Funktion der Zellen noch ungewiß [7].

3. Da die bisher entwickelten Verfahren zur Therapie des insulinpflichtigen Diabetes mellitus unzureichend sind, muß nach weiteren Methoden gesucht werden. Eine neuer Ansatz ist die Genterapie.

1.2 Theorie einer neuen Behandlungsmethode

Der Genterapieansatz

Die Idee des Genterapieansatzes liegt in der Herstellung "künstlicher β -Zellen" [8], die im folgenden als β -Ersatzzellen bezeichnet werden. Autologe Zellen sollen isoliert und angereichert werden, um dann mit Insulingenkonstrukten (mit geeignetem Promotor) transfiziert zu werden. Nach Reinfusion und Anheftung, z.B. in der Leber, sollen diese zur glucose-regulierten Insulinsynthese, -prozessierung und -sekretion fähig sein.

Um diese Anforderungen erfüllen zu können, müssen die in Frage kommenden Zellen den natürlichen β -Zellen funktionell möglichst ähnlich sein.

Mechanismus der Insulinsekretion aus den β -Zellen des Pankreas

Glucose wird über den Glucosetransporter GLUT2 in die β -Zelle aufgenommen und intrazellulär durch Hexokinase I und Glucokinase, die in jeweils gleicher Konzentration vorkommen, verstoffwechselt. Glucokinase fungiert in Kombination mit GLUT2 als „Glucose-Sensor“ der Zelle. Durch die Metabolisierung der Glucose entsteht ATP, welches eine Schließung der Kaliumionen-Kanäle bewirkt. Dadurch wird die Zellmembran depolarisiert und Calciumionen-Kanäle öffnen sich. Der Einstrom von Calciumionen in die β -Zelle führt zur Sekretion des in Granula gespeicherten Insulins (siehe Abbildung 1-1) [5].

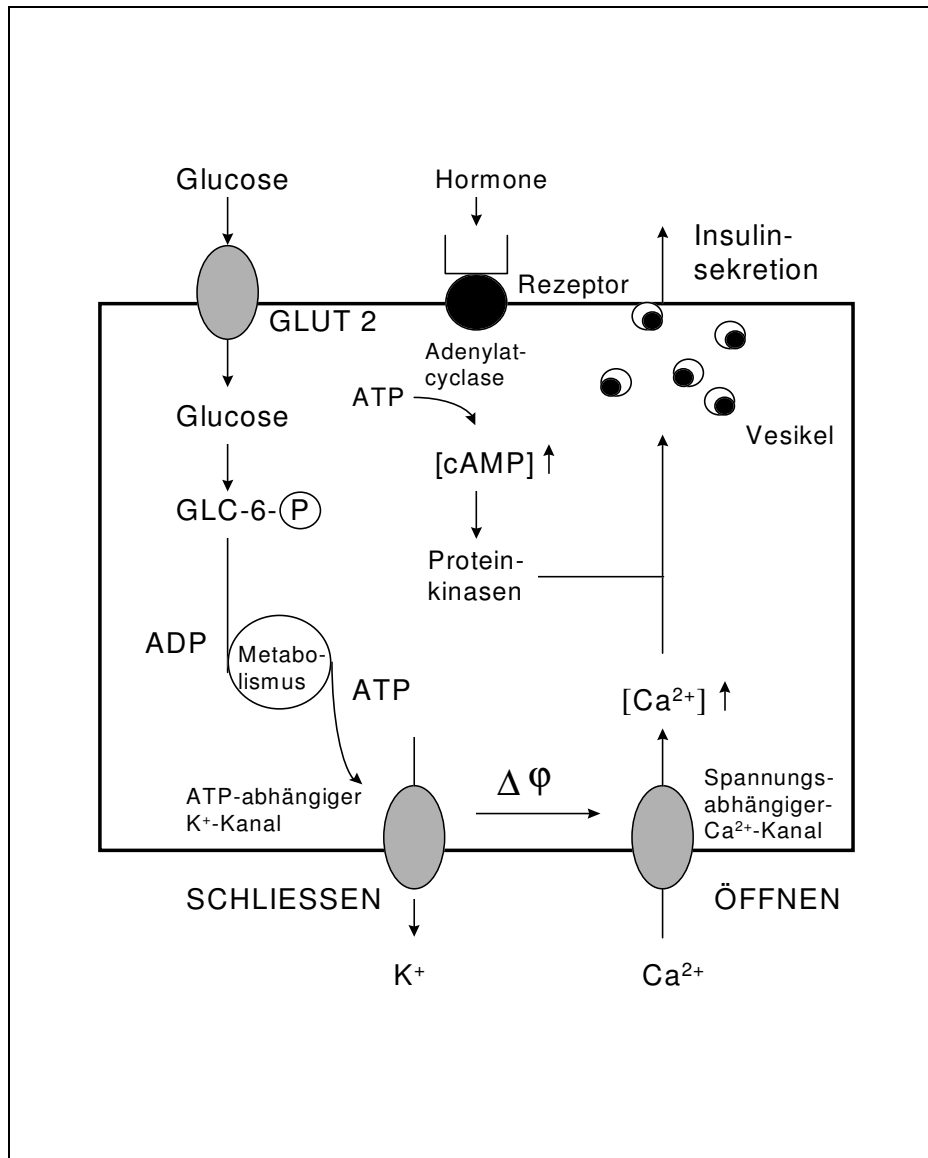


Abbildung 1-1: Vereinfacht dargestellter Mechanismus zur Insulinsekretion aus β -Zellen des Pankreas. GLUT2 = Glucosetransporter 2, GLC-6-P = Glucose-6-phosphat, ADP = Adenosindiphosphat, ATP = Adenosintriphosphat, $\Delta\phi$ = Änderung des Membranpotentials, $[X]^\uparrow$ = Zunahme der Konzentration von Substanz X.

Voraussetzungen für potentielle β -Ersatzzellen

Zellen, die als β -Ersatzzellen genutzt werden sollen, müssen mehrere Anforderungen erfüllen:

- Sie sollen den natürlichen β -Zellen funktionell möglichst ähnlich sein, um die Zahl der Transfektionen so gering wie nötig zu halten. Aus diesem Grund sollten die Zellen GLUT2-Glucosetransporter und Glucokinase exprimieren [9], sie müssen physiologisch auf einen Glucosereiz reagieren und die nötigen Enzyme zur Prozessierung des Insulins aus dem Prärohormon (Peptid

Convertasen 2 und 3: PC2 und PC3) besitzen. Zur Speicherung des Insulins sollen Granula gebildet werden können.

- b) Um Abstoßungsreaktionen oder weiteren technischen Aufwand zu vermeiden, ist es sinnvoll, autologe Zellen einzusetzen. Diese müssen in einem einfachen, risikoarmen und wiederholbaren Eingriff gewonnen werden und stabil transfizierbar sein.

Versuche zur Herstellung künstlicher β -Zellen

Zur Herstellung von β -Ersatzzellen sind bereits einige Untersuchungen durchgeführt worden. Meistens wurden *Zelllinien* eingesetzt, die aus β -Zell-Tumoren von Nagetieren gewonnen wurden (RIN, β -TC, MIN) oder aus dem Hypophysenvorderlappen von Mäusen stammen (neuroendokrine AtT20-Zellen) und sowohl PC2 als auch Glucokinase exprimieren [10,11].

Die cDNA zur Expression von humanem Proinsulin konnte mit einem viralen Promotor bereits in AtT20-Zellen transfiziert werden (AtT20ins) [12]. Durch zusätzliche Transfektion des GLUT2-Gens waren die Zellen in der Lage, Insulin auf einen Glucosereiz hin auszuschütten, allerdings erfolgte die Insulinsekretion bei subphysiologischen Glucosekonzentrationen [8], vermutlich, weil im intrazellulären Glucokinase/Hexokinase-Verhältnis die Hexokinase überwiegt [5]. Weitere Probleme bestanden darin, daß nur ein geringer Teil des gebildeten Insulins freigesetzt wurde und daß die AtT20-Zellen zwar nahezu unbegrenzt verfügbar sind, aber aus Ratten stammen und somit beim Menschen eine Immunreaktion auslösen können. Unklar ist außerdem, wie ein unreguliertes Wachstum der zu transplantierenden Zellen im Empfängerorganismus vermieden werden kann, ob die Zellen zusätzliche (unerwünschte) Proteine produzieren und ob sie auf andere Stoffwechselsignale des humanen Organismus angemessen reagieren. Auch die Funktionsdauer der Zellen im Empfängerorganismus ist noch begrenzt [5,13].

Eine sehr vielversprechende Möglichkeit zur Herstellung von β -Ersatzzellen bieten die enteroendokrinen K-Zellen, die an Ratten als Modelltieren untersucht und im Folgenden näher beschrieben werden sollen. Außerdem soll dargestellt werden, warum die ihnen funktionell ähnlichen L-Zellen und die der AtT20-Zelllinie

zugrunde liegenden Zellen aus der Adenohypophyse [14] zu diesem Zweck vermutlich weniger geeignet sind.

1.3 Enteroendokrine K- und L-Zellen - Lokalisation, Isolation und Anreicherung

Der Darmaufbau

Im Darm der Ratte beträgt die Länge des Duodenums etwa 10 cm, die des Jejunums etwa 80 cm und die des Ileums etwa 3 cm. An das Caecum schließt sich das Colon mit einer Länge von rund 10 cm an. Das Lumen hat einen von etwa 3 auf 10 mm zunehmenden Durchmesser [15]. Der menschliche Darm ist etwa 4,5 m lang, auf das Duodenum entfallen etwa 20-30 cm, auf das Jejunum etwa 1,2 m. An das Ileum (ca. 1,5 m) schließt sich direkt das Colon mit einer Länge von etwa 1,5 m an [16].

In das Darmlumen ragen zahlreiche blatt- oder fingerförmige Darmzotten (Villi), zwischen denen Einstülpungen der Epithelschicht, die Lieberkühnsche Krypten, liegen.

Alle Zellen des Darms entstehen durch Zellteilung aus gemeinsamen Stammzellen, migrieren villusaufwärts, verlieren dabei ihre Teilungsfähigkeit und werden nach 5-6 Tagen beim Menschen bzw. 2-3 Tagen bei der Ratte an der Villuspitze abgestoßen [17].

Verschiedene endokrine Zellen (Übersicht in [18]), die als Einzelzellen vorliegen, sind über die gesamte Darmlänge verteilt. Zu ihnen zählen die K- und L-Zellen.

K-Zellen

Die K-Zellen sind endokrine Zellen vom offenen Typ, sie erreichen das Darmlumen über einen schmalen Cytoplasmaausläufer und sind mit Nachbar epithelzellen verbunden. Junge Zellen, die man an der geringen Zahl der Granula erkennt, werden an der Kryptenbasis gebildet. Mit der Migration zur

Villusspitze vermehren sich die Granula und die Zellen verlieren ihre Teilungsfähigkeit [19,20].

Das primäre Produkt der K-Zellen ist das aus 42 Aminosäuren bestehende Gastric Inhibitory Polypeptide (GIP) oder neuer: Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide (siehe Abbildung 1-2) [20, 21, 22]. Es wird nach noch nicht vollständig geklärtem Mechanismus aus Präpro-GIP gebildet [23, 24], in Granula gespeichert [20] und in Abhängigkeit vom extrazellulären Glucosespiegel über cAMP- und Ca^{2+} -abhängige Mechanismen [25,26] auf Stimulation durch Nahrungsinhaltsstoffe hin durch Exocytose ausgeschüttet. Stimulierend wirken bei Mensch [27,28] und Ratte [24,29] sowohl langkettige Fettsäuren als auch Glucose.

GIP, human

Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met-Asp-Lys-Ile-His-Gln-Gln-Asp-Phe-Val-Asn-Trp-Leu-Leu-Ala-Gln-Lys-Gly-Lys-Lys-Asn-Asp-Trp-Lys-His-Asn-Ile-Thr-Gln

GIP, Ratte

Tyr-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile-Ala-Met-Asp-Lys-Ile-Arg-Gln-Gln-Asp-Phe-Val-Asn-Trp-Leu-Leu-Ala-Gln-Lys-Gly-Lys-Lys-Asn-Asp-Trp-Lys-His-Asn-Leu-Thr-Gln

Abbildung 1-2: Sequenzen von Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP) bei Mensch [21] und Ratte [22]. Dargestellt im Dreibuchstabencode für Aminosäuren (siehe Abkürzungsverzeichnis, Seite VII).

Die Konzentration der K-Zellen nimmt beim Menschen vom proximalen zum distalen Teil des Darms ab [30,31]. Über die Lokalisation entlang der Krypt-Villus-Achse existieren widersprüchliche Befunde [20,30,31,32]. Auch bei der Ratte nimmt die Konzentration der K-Zellen von proximalen zum distalen Teil des Darms ab [33,34,35]. Ähnlich wie für Menschen gibt es auch hier keine klaren Aussagen zur Verteilung der K-Zellen entlang der Krypt-Villus-Achse [36]. Die Angaben zum Anteil der K-Zellen an der Gesamtzellzahl liegen bei weniger als 0,6 % [19,25].

Neben vielen anderen biologischen Wirkungen (siehe Übersichtsartikel [37,38]) hemmt GIP die Magensäuresekretion beim Menschen [27] und stimuliert in physiologischen Mengen [39,40] glucose-abhängig [41,42] über Mechanismen, die von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP-) und Proteinkinase A (PKA) abhängig sind [43], die Synthese und Sekretion von Insulin aus den Langerhansschen Inselzellen des Pankreas bei Mensch und Ratte [44,45]. Außerdem stimuliert GIP die GLP-1-Synthese und -Sekretion aus L-Zellen der Ratte [46,47].

L-Zellen

Die L-Zellen sind ebenfalls endokrine Zellen vom offenen Typ [48], deren Cytoplasma über einen schmalen Ausläufer das Darmlumen erreicht [49, 50].

In den L-Zellen des Darms wird GLP-1 in zwei Schritten prozessiert. Aus Präproglucagon [51,52] entstehen Glucagon-Like Peptide 1 (1-37) (GLP-1(1-37)), Glucagon-Like Peptide 2 (GLP-2) und Glicentin, welches weiter zu Glicentin Related Pancreatic Peptide (GRPP) und Oxyntomodulin umgesetzt wird (siehe Abbildung 1-3) [48,53]. GLP-1 (1-37), das biologisch noch unwirksam ist [54], wird beim Menschen zu den gleichermaßen wirksamen GLP-1 (7-37) und GLP-1(7-36)amid umgesetzt [55]. Die Sequenzen des Peptids sind bei allen bisher untersuchten Tierspezies und Menschen gleich (siehe Abbildung 1-4) [56]. Die Peptide werden in sekretorischen Granula gespeichert [49] und in das Blut freigesetzt, wenn die Zellen durch Nahrungsinhaltsstoffe (z.B. langkettige Fettsäuren [57]), Hormone oder Neurotransmitter [58,46,47] über einen PKA- und Proteinkinase C (PKC) -abhängigen Mechanismus [59,60,61] aktiviert werden.

Die Zahl der L-Zellen nimmt bei Mensch und Ratte vom proximalen zum distalen Teil des Darms und von den Villi zu den Krypten zu [49,31,36,50,32]. Der Anteil der L-Zellen an der gesamten Zellzahl im Darm beträgt im Ileum der Ratte weniger als 1 % [62].

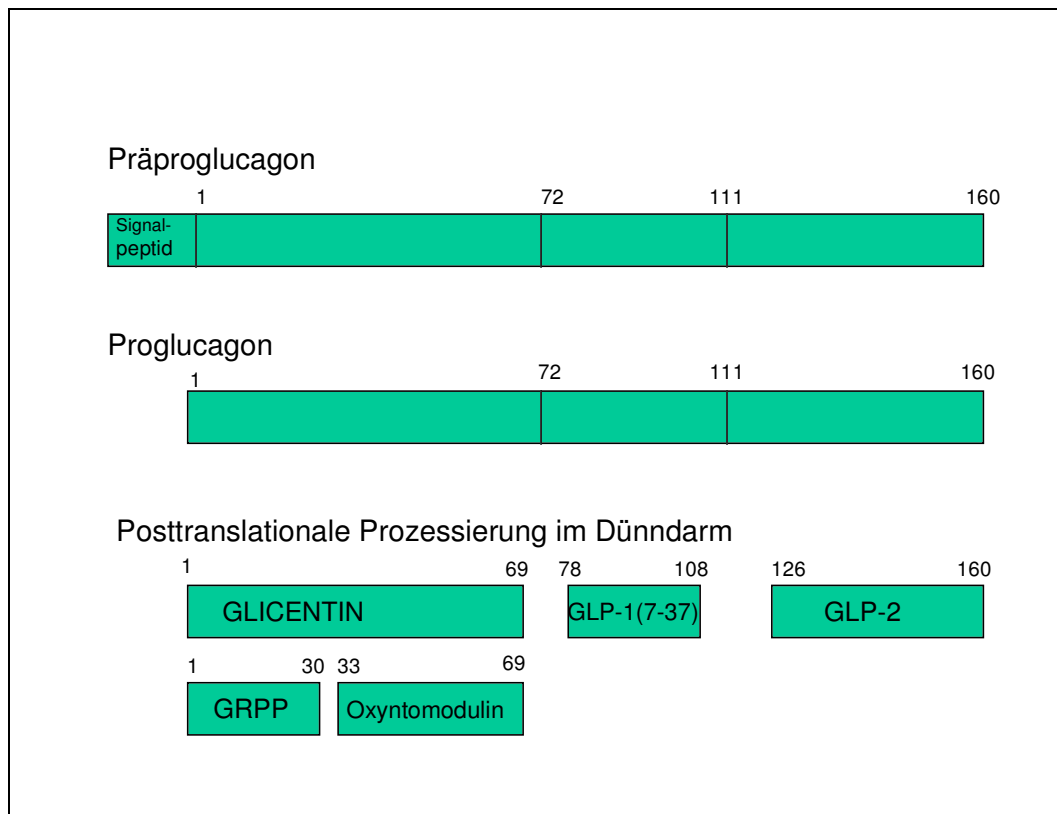


Abbildung 1-3: Prozessierung von Präproglucagon in den L-Zellen. Im Dünndarm entstehen aus dem Vorläufermolekül Präproglucagon die Peptide GLP-1, GLP-2 und Glicentin, das teilweise weiter zu GRPP und Oxyntomodulin umgesetzt wird. Auch GLP-1 (7-37) wird größtenteils noch weiter zu GLP-1(7-36)amid umgesetzt (nicht dargestellt). GLP-1 (7-37) = Glucagon-Like Peptide 1 (7-37), GLP-2 = Glucagon-Like Peptide 2, GRPP = Glicentin Related Polypeptide.

His-Asp-Glu-Phe-Glu-Arg-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly

Abbildung 1-4: Sequenz von Glucagon-like Peptide 1 (1-37). Dargestellt im Dreibuchstabencode für Aminosäuren (siehe Abkürzungsverzeichnis, Seite VII).

Neben vielen anderen biologischen Wirkungen (siehe Übersichtsartikel [63,64,65]) hemmt GLP-1 die Magensäuresekretion und Magenentleerung [66] über adrenerge Wege [67] und wirkt als Sättigungsfaktor bei Ratte und Mensch [68,69]. GLP-1 bindet an GLP-1-Rezeptoren auf den β -Zellen des Pankreas [70] und stimuliert in physiologischen Mengen [39,54,71] glucoseabhängig [72] über mindestens 2 Signaltransduktionskaskaden (PKA- und Calcium-abhängig) [73,26] die Insulinsynthese und -sekretion bei Mensch [74] und Ratte [39,54].

Die extrazelluläre Signalkette der K-, L- und β -Zellen

Man vermutet, daß zwischen proximalem und distalem Teil des Darms ein sogenannter „entero-endocriner loop“ besteht, d.h., daß *in vivo* durch Nahrung primär K-Zellen stimuliert werden und diese über GIP und andere Botenstoffe die L-Zellen zur GLP-1-Sekretion anregen. Dafür spricht, daß schon kurz nach der Nahrungsaufnahme erhöhte GLP-1-Konzentrationen im Blut meßbar sind, noch bevor die Nahrung eine größere Anzahl L-Zellen erreichen kann [57,58,75,46,47].

K- und L-Zellen als Kandidaten für β -Ersatzzellen

Glucose-Stimulierbarkeit:

K- und L-Zellen sind für den sogenannten "Inkretineffekt" verantwortlich. So bezeichnet man die Beobachtung, daß bei gleicher Plasmaglukosekonzentration nach oraler Glucosezufuhr mehr Insulin freigesetzt wird als nach intravenöser Infusion der gleichen Menge an Glucose. Die Zellen reagieren somit auf die orale Glucosezufuhr und verstärken durch Ausschüttung ihrer intestinalen Hormone (GIP und GLP-1) die insulinotrope Wirkung der Glucose.

Für eine Zellkultur, in der die K-Zellen auf einen Anteil von 10 % angereichert worden waren, konnte die Stimulierbarkeit durch Glucose *in vitro* ab einer Konzentration von etwa 10 mmol/l gezeigt werden [25]. Im perfundierten Rattenpankreas liegt die Schwelle bei etwa 5,5 mmol/l [42]. *In vivo* reagieren K-Zellen auf eine orale Glucosestimulation ebenfalls mit einer Freisetzung von GIP [27,41,76]. Das bedeutet, daß K-Zellen - genau wie β -Zellen - auf einen Glucosereiz in physiologischer Weise mit der Ausschüttung ihres Zellproduktes reagieren. Vermutlich exprimieren K-Zellen GLUT2-Transporter und Glucokinase, eine Transfektion der entsprechenden DNA wäre daher zur Herstellung von β -Ersatzzellen aus K-Zellen nicht nötig.

Im Gegensatz dazu ist die direkte Stimulierbarkeit der L-Zellen durch Glucose - die wesentliche Voraussetzung für ihre Eignung als β -Ersatzzellen - noch umstritten [57,58,59,77,78,79,80], obwohl Glucokinase in L-Zellen nachgewiesen wurde [81].

Enzymausstattung zur Insulin-Prozessierung:

Die enzymatische Ausstattung zur Prozessierung von Insulin besitzen K- und L-Zellen. Sowohl PC2 als auch PC3 kommen in endokrinen Zellen des Rattendarms vor. Höhere PC2-Konzentrationen finden sich allerdings nur im Duodenum [82]. PC3 ist das Enzym, das Proglucagon in L-Zellen zu Glicentin, Oxyntomodulin, GLP-1 und GLP-2 umsetzt [83].

Speicherung der Produkte in Granula:

Sowohl GIP als auch GLP-1 werden in Granula gespeichert [20,49].

Gewinnung der Zellen:

Im Gegensatz zu glucoseabhängig regulierten Gehirnzellen aus Hypophyse oder Hypothalamus [12,14], die sonst ebenfalls potentielle Kandidaten für β -Ersatzzellen wären, können K- und L-Zellen durch einen relativ einfachen, risikoarmen und wiederholbaren endoskopischen Eingriff gewonnen werden.

Kein Risiko einer Abstoßung oder Zerstörung der transplantierten K- und L-Zellen:

Da es sich bei den K- und L- Zellen um körpereigene Zellen handelt, ist die Abstoßungsgefahr gering. Die Zellen werden durch Diabetes mellitus nicht zerstört; sowohl GIP [84,85] als auch GLP-1 [86,87] werden bei Typ I- und Typ II-Diabetikern unverändert auf Stimulation hin freigesetzt. Transplantierte K- oder L-Zellen sollten demnach voll funktionsfähig bleiben.

Erfüllung der Voraussetzungen:

K-Zellen sind geeignete Kandidaten zur Herstellung von β -Ersatzzellen, denn sie erfüllen alle gegebenen Voraussetzungen. Die L-Zellen sind, obwohl sie alle weiteren Anforderungen erfüllen, als β -Ersatzzellen weniger geeignet. Mehrere Untersuchungen weisen darauf hin, daß L-Zellen nicht direkt durch Glucose stimuliert werden. Die glucoseabhängig regulierten Zellen aus dem Gehirn scheiden als Kandidaten für β -Ersatzzellen ebenfalls aus, da sie aufgrund ihrer Lage nicht ohne einen drastischen Eingriff gewonnen werden können.

Isolation und Anreicherung von K-Zellen

Zur Isolation der K-Zellen bestehen mehrere Möglichkeiten. Die Zellen können mechanisch durch Abschaben oder Vibration [88,62] aus dem Zellverband gelöst werden, sie können durch Enzyme wie z.B. Collagenase [25,89] oder durch Calciumionen-Chelatoren (Citrate, EDTA) in einem hyperosmolaren Puffer [90,91] herausgelöst werden. Oft werden Kombinationen aus mehreren Techniken eingesetzt [62,88,92,93]. Am zellschonendsten ist der Einsatz von Chelatoren (siehe Übersichtsartikel [94]).

Auch zur Anreicherung der K-Zellen gibt es verschiedene Möglichkeiten. Für endokrine Zellen wurde z.B. mehrfach eine von SOLL et al. [92,95] adaptierte Gegenstrom-Elutriation eingesetzt [25,93,96,97,98]. Dieses Verfahren ist allerdings relativ zeit- und kostenintensiv bei bisher unbefriedigenden Ergebnissen. Eine mehr als 10-fache Anreicherung war in der Regel nicht möglich [25,92,93]. Geht man von einem K-Zellgehalt von 0,1 bis 0,6 % [19,25] aus, so bedeutet das, daß die Suspension zu 94-99 % aus verunreinigenden Zellen bestand.

Zu Beginn der vorliegenden Studie existierte noch *keine* geeignete Methode, mit der sich die K-Zellen aus dem Darm isolieren und in für weitergehende Versuche ausreichender Konzentration anreichern ließen.

Aus diesem Grund sollten in der vorliegenden Arbeit immunomagnetische Verfahren zur Anreicherung der K-Zellen getestet werden, die für andere Zellen schon erfolgreich eingesetzt wurden. Diese versprachen eine einfache Handhabung, eine hohe Spezifität und eine zellschonende Anreicherung der gesuchten Zellen [99,100].

Mögliche Antikörper zur Markierung der K-Zellen

Zur Markierung der K-Zellen bei der immunomagnetischen Zellanreicherung kommen verschiedene Arten von Antikörpern in Frage:

a) *Antikörper gegen das K-Zellprodukt GIP*

b) *Antikörper gegen Zellmembranbestandteile endokriner Zellen:*

Syntaxin ist ein Fusionsprotein, das in den synaptischen Vesikeln neuronaler Gewebe vorkommt. Das Glycoprotein Synaptophysin wurde in neuronalen, endokrinen und neuroendokrinen Zellen nachgewiesen; in epithelialem Gewebe kommt es nicht vor [101,102]. Auch N-CAM (Neural Cell Adhesion Molecule), ein membrangebundenes Glycoprotein, läßt sich nur in endokrinem Gewebe und Nervenenden nachweisen [103].

c) *Antikörper gegen Oberflächenantigene mit immunologischer Funktion:* Human Leucocyte Antigen I (HLA I) und Human Leucocyte Antigen II (HLA II) kommen auf endokrinen Zellen des menschlichen Darms im Gegensatz zu Epithelzellen nicht vor [104,105]. Für den Rattendarm liegen noch keine entsprechenden Ergebnisse vor.

1.4 Zusammenfassung der Aufgabenstellung

K-Zellen sind geeignete Kandidaten zur Herstellung von β -Ersatzzellen, denn sie erfüllen alle hier beschriebenen Voraussetzungen. Daher sollen sie lokalisiert, isoliert und angereichert werden.

Da zur Lokalisation der K-Zellen sowohl entlang des gesamten Darms als auch entlang der Villus-Krypt-Achse noch unvollständige oder widersprüchliche Aussagen vorliegen, sollten die Zellen in dieser Arbeit immunhistochemisch und radioimmunologisch lokalisiert werden.

L-Zellen sind als β -Ersatzzellen weniger geeignet, weil ihre Glucosesensitivität nicht nachgewiesen werden konnte. Da zu ihrer Verteilung im Darm aber - wie für die K-Zellen - unvollständige oder widersprüchliche Angaben existieren und sie für den „enteroendokrinen Loop“ eine wichtige Rolle spielen, sollten sie zumindest ebenfalls immunhistochemisch und radioimmunologisch lokalisiert werden.

Zur Isolation der K-Zellen sollen dann verschiedene Methoden (z.B. der Einsatz eines Calcium-Chelators in einem hyperosmolaren Puffer) überprüft werden. Anschließend sollen immunomagnetische Verfahren zur Zellanreicherung getestet

werden, weil diese im Gegensatz zum Elutriationsverfahren neben einer einfachen Handhabung auch eine zellschonende und vor allem hochspezifische Anreicherung der gesuchten Zellen erwarten lassen.

Als Grundlage für weitere funktionelle Studien oder Kultivierungsversuche sollen möglichst reine Suspensionen von K-Zellen gewonnen und deren Glucosestimulierbarkeit *in vitro* nachgewiesen werden.

2 Material und Methoden

Ratten

Für sämtliche Versuche wurden weibliche und männliche Wistar-Ratten (150 bis 450 g) verwendet, die mit einer Standard-Diät (Altromin 1324, Altromin, Lage) ad libitum gefüttert wurden und freien Zugang zu Trinkwasser hatten. Die Ratten wurden entweder durch einen Genickschlag getötet oder durch Injektion eines Pentobarbitals (Nembutal) zunächst betäubt und durch eine Überdosis des Präparats getötet und der Darm nach Öffnung des Thorax entnommen. Mit allen Versuchen wurde zwischen 8 und 11 Uhr begonnen.

Verwendete Geräte

- * Analyseautomat Hitachi 717, Boehringer, Mannheim
- * Analysenwaage Typ BP211D, Sartorius, Göttingen
- * Biofuge 13 mit Rotor 3757, Heraeus Sepatech, Hanau
- * Dreh-Schüttelapparat Rettberg R-01, MAGV, Rabenau-Londorf
- * Einhängethermostat EM, Julabo Labortechnik, Seelbach
- * Elektronisches Thermometer Typ DT100P, Behring, Marburg
- * Gilson Pipetman-Pipetten, 20 bis 1000 µl, Abimed, Langenfeld
- * Grundschlitten-Mikrotom, Leitz, Wetzlar
- * Heizrührer IKAMAG REO und IKAMAG RCT, IKA-Labortechnik, Jahnke + Kunkel, Staufen
- * IKA-Vibrofix VF2, IKA-Labortechnik, Jahnke + Kunkel, Staufen
- * Kryostat CM 1850-01, Leica Instruments, Nussloch
- * Labsonic Model 2000 U mit Nadelschwingsonde 40 T, B. Braun, Melsungen
- * Mikroskop 471202 - 9901, Zeiss, Oberkochen
- * Mikroskop Axiovert 10 mit Fluoreszenzlampe und Filtern (450 - 490 nm und 546 nm), Zeiss, Oberkochen
- * Multi-Crystal Counter LB 2104, Berthold, Wildbad
- * Multipette 4780, Eppendorf, Hamburg

- * pH-Einstabmeßkette Typ N6280 und pH-Meter CG 840, Schott Geräte GmbH, Hofheim
- * Photometer Ultrospec III, Pharmacia Biosystems, Freiburg
- * Potter-Homogenisator Typ RM 14, Jahnke + Kunkel, Staufen
- * Reax top Reagenzglasschüttler, Heidolph, Kehlheim
- * Sartorius Basic Feinwaage Typ BA310P, Sartorius, Göttingen
- * Semi-Micro Osmometer, Knauer, Berlin
- * Spiegelreflexkamera Contax 167MT, Kyocera Europe, Neuss
- * Thermomixer Typ 5436, Eppendorf, Hamburg
- * Universal 16 R-Kühlzentrifuge (mit passenden Zytocentrifugeneinsätzen), Hettich, Tuttlingen

2.1 Lokalisation der K- und L-Zellen im Darm der Ratte

2.1.1 Immunhistochemische Lokalisation der K- und L-Zellen

Um die Lage der K- und L-Zellen zunächst optisch darzustellen, wurden aus verschiedenen Darmabschnitten der Ratte Proben entnommen, Gefrierschnitte hergestellt und diese mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern behandelt, so daß die gesuchten Zellen unter dem Mikroskop sichtbar wurden.

Dargestellt werden sollten K-Zellen im Querschnitt des Duodenums und L-Zellen im Querschnitt aus Ileum. Neben einer Einfachfärbung dieser Zellen durch GIP- bzw. GLP-1-Antikörper sollten auch Doppelfärbungen mit einem zusätzlichen Epithelzellmarker durchgeführt werden.

Bei der Auswahl aller zu testenden Antikörper wurde darauf geachtet, daß die Antikörper laut Hersteller mit dem entsprechenden *Ratten*-Antigen reagierten.

Auswahl geeigneter Objektträger

Zur Verwendung bei den immunhistochemischen Versuchen wurden verschiedene Objektträger getestet: unbeschichtete, Poly-L-Lysin-beschichtete

und „Super-Frost-Plus-Gold“- Objektträger (alle von Menzel-Gläser, Braunschweig).

Auswahl eines geeigneten Epithelzellmarkers

Als Epithelzellmarker wurden jeweils ein α - und β -Tubulin-Antikörper, sowie ein pan-Cytokeratin-Antikörper (alle von Sigma, Deisenhofen) erprobt.

Auswahl geeigneter Fluoreszenzfarbstoffe

Neben FITC (Fluorescein-isothiocyanat) und TRITC (Tetramethylrhodamin-isothiocyanat) wurden die Carbocyanin-Farbstoffe Cy2 und Cy3 (gekoppelt an IgG-Antikörper) eingesetzt, die nach Herstellerangaben [106] bei etwa gleicher Wellenlänge (siehe Tabelle 2-1) maximal angeregt werden, so daß dieselben Filter benutzt werden können, und außerdem wesentlich photostabiler und leuchtintensiver als FITC und TRITC sind.

Tabelle 2-1: Absorptions- und Emissionsmaxima der Fluoreszenzfarbstoffe FITC, TRITC, Cy2 und Cy3.

Farbstoff	Absorptionsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]
FITC	492	520
Cy2	490	508
TRITC	550	570
Cy3	553	575

Auswahl geeigneter Antikörperkonzentrationen

Um die optimalen Konzentrationen der primären und sekundären Antikörper für die immunhistochemischen Versuche zu ermitteln, wurden die Antikörper in Verdünnungen von 1:50 bis 1:800 getestet. Die Verdünnungsstufen, mit denen die deutlichsten und klarsten Bilder erzielt werden konnten, wurden für die nachfolgenden Versuche ausgewählt (siehe Tabelle 2-2).

2.1.1.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Kleine Stückchen aus dem Duodenum, Ileum und Colon der Ratte wurden durch Spülen mit HBSS von Nahrungsresten befreit. Nach Einbettung in Tissue-Tek (Gefriereinbettmedium, Miles Inc., Elkhart, USA) wurden sie in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ maximal zwei Wochen gelagert.

Mit einem Kryostat wurden bei einer Temperatur von $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ Schnitte in einer Dicke von $5\text{ }\mu\text{m}$ hergestellt und auf unbeschichtete Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden 20 min luftgetrocknet und in reinem Aceton (Merck, Darmstadt) 10 min fixiert.

2.1.1.2 Einfachmarkierung durch Immunfluoreszenz

Herstellung von 0,1 M Phosphate Buffered Saline (PBS) (10-fach konzentriert) für die Immunfluoreszenz-Versuche [107]

0,19 mol/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	(Merck, Darmstadt)
0,81 mol/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{ H}_2\text{O}$	(Merck, Darmstadt)
0,50 mol/l NaCl	(Roth, Karlsruhe)

Die Substanzen wurden in entionisiertem Wasser gelöst und der Puffer vor Gebrauch 1:10 verdünnt.

Durchführung der Immunfluoreszenz-Einfachmarkierung

Nach der Fixierung wurden die Objektträger mit 0,1 M PBS gewaschen und um die Schnitte herum getrocknet. Das Normalserum der Spezies, aus der der zweite Antikörper stammte (hier: Ziegen-Normalserum (NGS), Sigma, Deisenhofen), wurde mit PBS / 0,3 % Triton X-100 (Serva, Heidelberg) 1:10 verdünnt und die Schnitte damit 30 min blockiert. Anschließend wurde der erste Antikörper zentrifugiert, mit 0,1 mol/l PBS verdünnt (siehe Tabelle 2-2) und auf die Schnitte aufgetragen, die dann über Nacht im Kühlschrank inkubiert wurden.

Die Schnitte wurden erneut gewaschen und dann der zweite Antikörper in der ausgetesteten Konzentration (siehe Tabelle 2-2) aufpipettiert. Dieser mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte zweite Antikörper band innerhalb von zwei Stunden vor Licht geschützt bei Raumtemperatur an den primären Antikörper (siehe Abbildung 2-1). Nach einem weiteren Waschvorgang wurden die Schnitte in Glycerol (Merck, Darmstadt)/ 0,1 M PBS (9:1) eingedeckelt und unter dem Mikroskop mit einer Fluoreszenzlampe und entsprechendem Filter begutachtet.

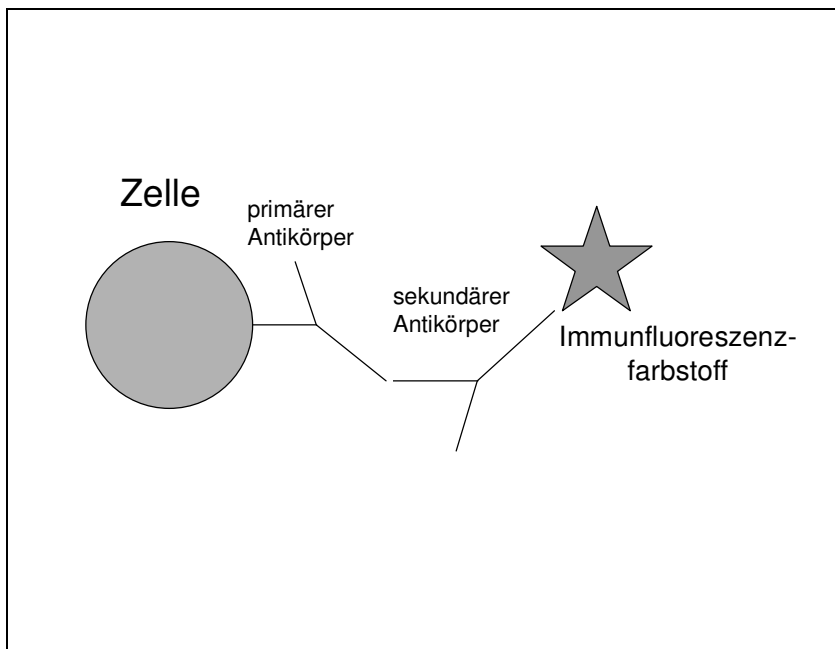


Abbildung 2-1: Schema der Antigen-Antikörper-Bindungen bei der Immunfluoreszenzmarkierung. Der Immunfluoreszenzfarbstoff bindet über zwei Antikörper indirekt an die zu markierende Zelle.

Tabelle 2-2: Übersicht über die bei den immunhistochemischen Versuchen verwendeten Antikörper

Antigen	GIP	GLP-1	Cytokeratin
Art des 1. Antikörpers	Kaninchen anti-Ratte IgG	Kaninchen anti-Mensch IgG	Maus anti-Mensch IgG
Hersteller	PepScan, Berlin	Peninsula, San Carlos	Sigma, Deisenhofen
eingesetzte Verdünnung	1:500	1:200	1:500
Art des 2. Antikörpers	Ziege anti-Kaninchen-IgG, Cy2-gekoppelt	Ziege anti-Kaninchen IgG, Cy2-gekoppelt	Ziege anti-Maus IgG, Cy3-gekoppelt
Vertreiber	Dianova, Hamburg	Dianova, Hamburg	Dianova, Hamburg
eingesetzte Verdünnung	1:100	1:100	1:200

2.1.1.3 Gegenfärbung mit Propidiumjodid

Um die Konturen der Darmstücke bei einfachmarkierten Schnitten besser erkennen zu können, wurde eine Gegenfärbung des Hintergrundes mit Propidiumjodid (Sigma, Deisenhofen) getestet. Propidiumjodid läßt das Cytoplasma von Zellen unter der Fluoreszenzlampe (TRITC-Filter) rot leuchten.

Die Schnitte wurden hierzu nach der Behandlung mit dem 2. Antikörper nicht direkt eingedeckelt, sondern nach dem Waschen mit einer Propidiumjodidlösung in PBS (Konzentration: 1 µg/ml, jeweils frisch aus einer Stammlösung angesetzt) bedeckt. Nach 15-minütiger Inkubation (lichtgeschützt) wurde die Lösung durch erneutes Waschen entfernt. Anschließend konnten die Schnitte eingedeckelt und unter dem Mikroskop begutachtet werden.

2.1.1.4 Doppelmarkierung durch Immunfluoreszenz

Die Schnitte wurden wie in Punkt 2.1.1.2 beschrieben behandelt. Einfach- und Doppelmarkierung unterschieden sich folgendermaßen:

- a) Anstelle eines Serumtyps mußte, falls die Herkunft der beiden zweiten Antikörper nicht übereinstimmte, ein Gemisch zweier Seren (2 x 5 %) zur Blockierung eingesetzt werden. Dies war aber nur beim Austesten geeigneter Antikörper im Vorfeld der Versuche nötig.
- b) Anstelle des ersten Antikörpers wurde eine Mischung aus zwei ersten Antikörpern in der jeweils nötigen Konzentration (siehe Tabelle 2-2) aufgetragen.
- c) Anstelle des sekundären Cy2- oder Cy3-gekoppelten Antikörpers wurde ein Gemisch aus einem Cy2- und einem Cy3-gekoppelten sekundären Antikörper in der benötigten Konzentration (siehe Tabelle 2-2) aufpipettiert.

2.1.1.5 Negativkontrollen

Um die Spezifität der Immunfluoreszenztechnik zum Nachweis der K- und L-Zellen zu überprüfen, wurden Negativkontrollen durchgeführt.

Die Objektträger, sowie die unbehandelten Schnitte wurden auf eine Eigenfluoreszenz hin kontrolliert. Außerdem wurden Schnitte begutachtet, bei denen entweder der primäre oder der sekundäre Antikörper nicht aufgetragen worden war.

2.1.2 Untersuchung der Verteilung der K- und L-Zellen über die gesamte Darmlänge

Um zu untersuchen, in welcher Weise die K- und L-Zellen über die Länge des Darms verteilt sind, wurden Rattendärme in folgender Weise verarbeitet:

2.1.2.1 Die Schabtechnik

Herstellung der Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)

9,76 g/l	HBSS	(fertige Mischung; Life Technologies, Eggenstein)
1,00 g/l	Rinderserumalbumin	(BSA; Boehringer, Mannheim)
0,35 g/l	NaHCO ₃	(Merck, Darmstadt)
77,0 mg/l	Dithiothreitol	(DTT; direkt vor Gebrauch zugegeben; Sigma, Deisenhofen)

Die Substanzen wurden in entionisiertem Wasser gelöst und der pH auf 7,3 bis 7,4 eingestellt.

Durchführung

Nach Entnahme wurden Dünndarm und Colon mit kaltem HBSS-Puffer gespült und der Dünndarm in 10 gleich lange Abschnitte unterteilt. Die Darmmucosa der einzelnen Abschnitte wurde mit zwei geschliffenen Objektträgern abgeschabt und in Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Der Inhalt der Gefäße wurde mit eiskaltem RIA-Puffer (siehe Punkt 2.1.2.2) auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt und dann mit dem Potter-Homogenisator 1 Minute auf Eis vorbehandelt. Das Probenvolumen wurde dabei auf 2 ml aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben mit Ultraschall (Frequenz: 50 kHz) 30 s auf Eis homogenisiert, etwa 1,6 ml jeder

Probe in ein Eppendorf-Gefäß abpipettiert und 3 min aufgekocht, um Proteasen unwirksam zu machen.

Die Gefäße wurden 2 min bei 13800 x *g* zentrifugiert, die klaren Überstände aliquotiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren. Neben dem GIP- und GLP-1-Gehalt (siehe Punkt 2.1.2.2) wurden die Proteinkonzentration (siehe Punkt 2.1.2.3) der Proben ermittelt, um den Hormongehalt auf den jeweiligen Proteingehalt beziehen zu können.

2.1.2.2 Bestimmung des GIP- und GLP-1-Gehaltes der Fraktionen durch Radioimmunoassay

Zwei Radioimmunoassay-Kits (RIK 7123: Glucagon-Like Peptide-1, RIK 7154: Gastric Inhibitory Peptide (Human); Peninsula Laboratories Inc., San Carlos, USA) dienten der Bestimmung des GIP- und des GLP-1-Gehaltes der Proben. Der GIP-RIA zeigte keine Kreuzreaktivität mit Gastrin, Gastrin Releasing Peptide (GRP), Insulin, GLP-1 oder GLP-2. Der GLP-1-RIA reagierte nicht mit GLP-2, GIP, Glucagon, Insulin, Secretin oder Vasoactive Intestinal Peptide (VIP). Eine minimale Kreuzreaktivität (0,1 %) bestand mit GLP-1(7-36)amid.

Prinzip:

Ein primärer Antikörper, der in begrenzter Menge zur zu untersuchenden Probe (bzw. den Standards, jeweils 100 µl) zugegeben wird, bindet an das zu bestimmende Peptid. Durch Zugabe eines konkurrierenden, radioaktiv (¹²⁵I)-markierten Antikörpers wird ein entsprechender Anteil des primären Antikörpers aus seiner Bindung verdrängt. Die Antikörperkomplexe werden durch Zentrifugation von den freien, radioaktiven Antikörpern getrennt, die dann entfernt werden. Mit einem γ -Counter wird die im Rückstand verbleibende Radioaktivität gemessen. Durch Vergleich mit der Standardkurve ergeben sich die Peptidgehalte der Proben (in pg / Probenröhrchen). Das Ergebnis wird dann auf den ursprünglichen Peptidgehalt der Proben umgerechnet.

2.1.2.3 Bestimmung des Proteingehalts der Fraktionen

Der Proteingehalt der Proben wurde mit einem Proteinassay (BIO-RAD, München) nach LOWRY [108] bestimmt.

Die Proben wurden mit RIA-Puffer (siehe unter Punkt 2.1.2.2) 1:10 verdünnt. Pro Bestimmung wurden 375 µl der verdünnten Probenlösung eingesetzt.

Prinzip der Proteinbestimmung

Die Proteine der Lösung reagieren in alkalischem Medium mit Kupfer und bilden Komplexe, die ein Folin-Reagenz reduzieren. Die Reaktionsprodukte sind charakteristisch blau gefärbt. Die Extinktion der Proben wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen und mit einer Standardgeraden aus Rinderserumalbumin- (BSA-) Lösungen verschiedener Konzentrationen (0 bis 2 mg/ml) verglichen.

Die Bestimmung ist unempfindlich gegenüber Detergenzien in niedriger Konzentration, wie sie im RIA-Puffer (siehe Punkt 2.1.2.2) enthalten sind.

2.1.3 Lokalisation der K- und L-Zellen entlang der Villus-Krypt-Achse

Zur Lokalisation der K- und L-Zellen auf der Krypt-Villus-Achse wurden Darmstückchen von den Villi zu den Krypten hin in einzelnen Fraktionen abgebaut. Die Fraktionen wurden anschließend auf die Aktivitäten der Alkalischen Phosphatase (AP) und Thymidinkinase (TK), sowie ihren Gehalt an GIP und GLP-1 untersucht und die Ergebnisse auf den ebenfalls bestimmten Gehalt an Gesamtprotein bezogen.

Die Differenzierung vom Darmzellen findet in erster Linie in den Villi statt. Mit Alkalischer Phosphatase als Differenzierungsmarker [90] lassen sich Villuszellen nachweisen. In den Krypten proliferieren Darmzellen, Thymidinkinase als Proliferationsmarker [90] wurde daher zum Nachweis von Kryptzellen genutzt.

2.1.3.1 Die Ausschütteltechnik

Die Darmstückchen wurden nach einer von WEISER [90] erarbeiteten und von FLINT et al. [91] weiterentwickelten Methode (leicht modifiziert, wie im nachfolgenden Text beschrieben) behandelt. Eine spezielle Vorbehandlung für die weiteren Bestimmungen erfolgte nicht.

Herstellung des Chelatpuffers

27 mmol/l Natriumcitrat • 2 H ₂ O	(Merck, Darmstadt)
5 mmol/l Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O	(Merck, Darmstadt)
96 mmol/l NaCl	(Roth, Karlsruhe)
8 mmol/l KH ₂ PO ₄	(Merck, Darmstadt)
15 mmol/l KCl	(Merck, Darmstadt)
55 mmol/l D-Sorbitol	(Sigma, Deisenhofen)
44 mmol/l Saccharose	(Merck, Darmstadt)
0,5 mmol/l DTT	(entspricht 77 mg/l, direkt vor Gebrauch zugeben; Sigma, Deisenhofen)

Die Chemikalien wurden in entionisiertem Wasser gelöst und der pH auf 7,3 bis 7,4 eingestellt.

Herstellung des PBS (Phosphate Buffered Salt Solution)-Puffers (10-fach konzentriert)

137,0 mmol/l NaCl	(Roth, Karlsruhe)
2,7 mmol/l KCl	(Merck, Darmstadt)
8,0 mmol/l Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O	(Merck, Darmstadt)
1,5 mmol/l KH ₂ PO ₄	(Merck, Darmstadt)

Die Inhaltsstoffe des Puffers wurden in entionisiertem Wasser gelöst und der pH der Lösung auf 7,3 bis 7,4 eingestellt.

Durchführung der Ausschüttelversuche

Je etwa 22 cm Rattendarm aus dem proximalen oder dem distalen Teil des Dünndarms, bei einigen Versuchen auch der komplette Dünndarm, wurde umgestülpt und in kleine Ringe von jeweils 3 - 4 mm Länge geschnitten. Nachdem diese 5 min in kaltem HBSS gewaschen worden waren, wurden sie in 150 ml Chelatpuffer überführt und 20 min bei 4 °C unter Rühren inkubiert. Die Zellen dieser Fraktion wurden gesammelt (V^W) und die Darmringe in 20 ml frischen, kalten Chelatpuffer in Zentrifugenröhren überführt. Die Röhren wurden per Hand 20 mal umgedreht, die Zellsuspension gesammelt und der Vorgang mit jeweils frischem Puffer noch 9 mal wiederholt. Die Inhalte von Röhren 1 bis 3 wurden als Fraktion V^1 gepoolt, die Inhalte von Röhren 4 bis 6 als V^2 und die von Röhren 7 bis 10 als V^3 . Anschließend wurden die Ringe in 100 ml Chelatpuffer unter Rühren 10 min bei 4 °C inkubiert. Diese Fraktion wurde verworfen und die Darmstückchen abschließend erneut zehnmal in je 20 ml frischem Chelatpuffer ausgeschüttelt. So ergaben sich die Fraktionen C^1 aus Röhren 1 bis 5 und C^2 aus Röhren 6 bis 10. Zusätzlich wurden die Fraktionen C^3 bis C^6 gesammelt, die ebenfalls aus dem Inhalt von je 5 Einzelröhren hervorgingen.

Alle Fraktionen wurden auf Eis bis zum Ende der Isolation aufbewahrt und die Zellen dann durch 10-minütige Zentrifugation in der Kühlzentrifuge bei 50 x g geerntet. Die Zellen wurden in je 1 ml PBS-Puffer aufgenommen, jeweils 30 s mit Ultraschall behandelt, 10 min kalt bei 2000 x g zentrifugiert und dann für die anschließenden Untersuchungen aliquotiert bei -20 °C eingefroren.

2.1.3.2 Colorimetrische Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase

Die Aktivitäten der Alkalischen Phosphatase in den Fraktionen wurden mit einem Testkit (Boehringer Mannheim) am Analyseautomaten Hitachi 717 (Boehringer Mannheim) nach der Optimierten Standardmethode der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie [109] bestimmt.

Prinzip

Die in der Probe (10 µl) enthaltene Alkalische Phosphatase setzt p-Nitrophenylphosphat (10 mmol/l) in einem magnesiumchloridhaltigen (0,5 mmol/l) Diethanolamin-Puffer bei pH 9,8 zu Dihydrogenphosphat und p-Nitrophenolat-ionen um (siehe Abbildung 2-2).

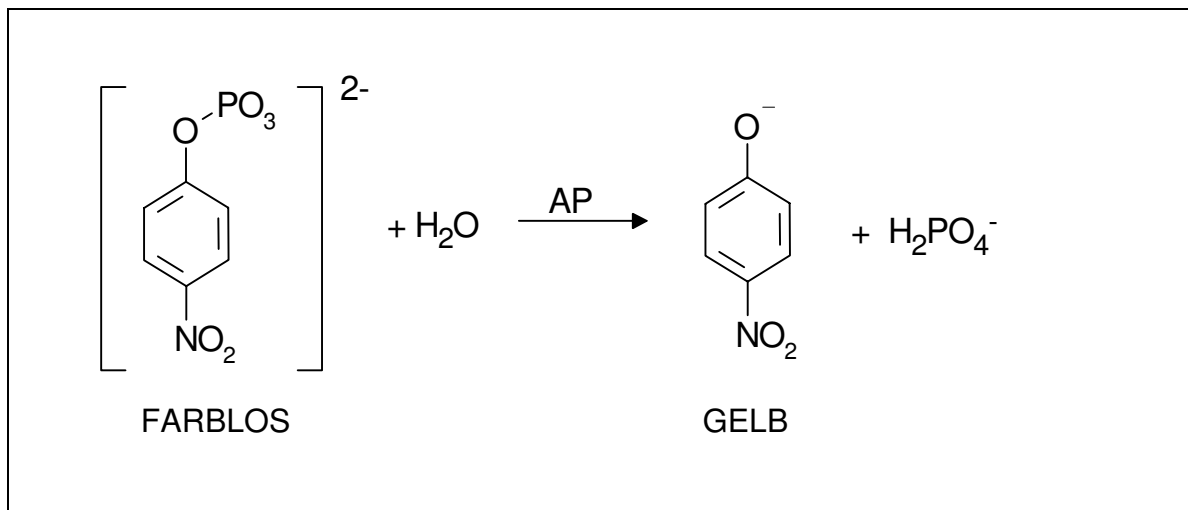


Abbildung 2-2: Nachweisreaktion zur Messung der Aktivität von Alkalischer Phosphatase. Diese setzt p-Nitrophenylphosphat in alkalischem Medium zu p-Nitrophenol (Anion) um; dabei ändert sich die Farbe der Lösung von farblos zu gelb. AP = Alkalische Phosphatase.

Die Konzentration des farbigen Produkts, dessen Gehalt proportional zur Enzymaktivität ist, wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Durch Vergleich mit einer Standardkurve wurde die Aktivität des Enzyms (in U/l) errechnet. Die Präzision der Messung wird durch geräteinterne Kontrollen (normale und pathologische Serumprobe) überprüft.

2.1.3.3 Bestimmung der Thymidinkinase-Aktivität mittels Radioenzymassay

Die Thymidinkinase-Aktivität in den Proben wurde ebenfalls mit einem Testkit (Sangtec Medical, Bromma, Schweden) bestimmt.

Prinzip

Die in der Probe (20 µl) enthaltene Thymidinkinase (TK) phosphoryliert ¹²⁵I-markiertes 5'Desoxyuridin in Gegenwart von ATP zu ¹²⁵I-Desoxyuridinmonophosphat. Nach einer festgelegten Inkubationszeit (4 Stunden bei 37 °C) wird die

Reaktion durch ein Trennmittel gestoppt. Das entstandene ^{125}I -Desoxyuridinmonophosphat bindet an das Trennmittel. Nach einem Waschschrift wird die Radioaktivität des gebundenen Produkts mit einem γ -Counter bestimmt. Da die gemessene Radioaktivität der Enzymaktivität der Proben (in U/l) proportional ist, kann diese durch Vergleich mit der Standarddeichkurve (2,5 - 40 U/l) ermittelt werden. Um die Richtigkeit und Präzision der Bestimmung zu überprüfen, werden zwei Kontrollen (6 U/l und 20 U/l) in jedem Ansatz mitbestimmt.

2.2 Isolation der K- Zellen aus Duodenum

Zur Isolation der K-Zellen aus dem Duodenum der Ratte wurden verschiedene Methoden getestet, die im Folgenden beschrieben werden.

Herstellung der Erythrosinlösung (0,1 %)

100 mg Erythrosin B (Aldrich-Chemie, Steinheim) wurden in 100 ml PBS gelöst und der pH auf 7,3 bis 7,4 eingestellt.

2.2.1 Mechanische Isolation der K-Zellen (modifiziert nach [62])

Der obere Dünndarm einer Ratte wurde entnommen und in eiskalten HBSS-Puffer gelegt. Dann wurde proximal ein Stück von 25 cm abgemessen und dieses zuerst mit 0,9 %iger Kochsalzlösung, dann mit HBSS gespült. Nach einer 15-minütigen Präinkubation in HBSS-Puffer bei 37 °C wurde das Darmstück über einem Glasstab (Durchmesser 4 mm) umgestülpt und dort mit Zwirn befestigt. Der Glasstab wurde in ein mit HBSS-Puffer gefülltes, großes Reagenzglas eingeführt und dieses mit einem Reagenzglasschüttler bei nahezu maximaler Intensität (ca. 2200 U/min, Amplitude 5 mm) 5 bis 10 min geschüttelt. 10 μl der entstandenen Zellsuspension wurden mit 10 μl der Erythrosin B-Lösung gemischt und in eine Neubauerkammer (MAGV, Rabenau-Londorf) pipettiert. Anschließend wurden Morphologie und Intaktheit der gewonnenen Einzelzellen unter dem Mikroskop untersucht.

2.2.2 Enzymatische Zellisolation

Herstellung der EDTA / PBS-Lösung

100 mmol/l EDTA (Merck, Darmstadt) wurden in 1-fach PBS gelöst und der pH dieser Stammlösung auf 7,3 bis 7,4 eingestellt. Vor Gebrauch wurde die Lösung 1:10 mit 1-fach PBS verdünnt.

Tabelle 2-3: Übersicht der zur K-Zell-Isolation verwendeten Collagenasen

Enzym	Hersteller	Spezielle Eignung
Collagenase D	Boehringer, Mannheim	Isolation von Einzelzellen aus einem Gewebeverband mit Erhalt der Zelloberflächenproteine
Collagenase Typ I	Sigma, Deisenhofen	Zellschonende Isolation von Einzelzellen aus einem Gewebeverband

2.2.2.1 Isolation

Erneut wurde der obere Dünndarm einer Ratte entnommen und in eiskalten HBSS-Puffer gelegt. Proximal wurde ein Stück von 25 cm abgemessen, dieses über einem runden Edelstahlstab (Durchmesser 4 mm) umgestülpt und der Darm anschließend mit einem Skalpell in 1 bis 2 mm dicke Ringe geschnitten. Diese wurden in 35 ml Collagenaselösung (in HBSS-Puffer) (siehe Tabelle 2-3) in Konzentrationen von 0,002 bis 0,25 % [110] überführt und unter Carbogenbegasung (5 % CO₂ / 95 % O₂, Messer Griesheim, Krefeld) 5 bis 60 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die entstehende Zellsuspension wurde auf Eis durch ein grobmaschiges Sieb und zwei Nylonfilter (Neolab, Heidelberg) von 250 und 60 µm Porengröße filtriert. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C 5 min bei 79 xg zentrifugiert und das entstehende Zellpellet ad 1 ml in PBS/EDTA resuspendiert. 10 µl der Lösung wurden mit der Erythrosinlösung angefärbt, in eine Neubauerkammer (MAGV, Rabenau-Londorf) pipettiert und unter dem Mikroskop auf die Zellzahl und die Intaktheit der Zellen hin untersucht.

2.2.2.2 Hämalaun-Eosin-Färbung

Zur Unterscheidung von Zellen und Zellfragmenten wurde die entstandene Zellsuspension durch Zytozentrifugation (2 min bei 79 x g) auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgebracht, 45 min in einer 4 %igen Formalinlösung fixiert und mit einer Hämalaun-Eosin-Färbung angefärbt.

Durch diese Übersichtsfärbung sind Zellkerne, die durch Hämalaun blau gefärbt werden, von kompletten Zellen, bei denen zusätzlich das Cytoplasma durch Eosin rötlich gefärbt wird, zu unterscheiden.

Herstellung der Eosinlösung

1 g Eosin wurde in 100 ml 70 %igem Ethanol gelöst und mit 2 Tropfen Eisessig angesäuert.

Durchführung:

Die Objektträger wurden nach Fixierung der Zellen 15 min in Leitungswasser und 1 min in entionisiertem Wasser gewaschen, 10 min in einer Standkuvette in MAYERs saurem Hämalaun (Sigma, Deisenhofen) inkubiert und danach 10 min mit Leitungswasser gebläut. Anschließend wurden sie 2 min in Eosinlösung gefärbt, kurz mit entionisiertem Wasser gespült und dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe (siehe Tabelle 2-4) entwässert. Nach dem Eindeckeln in Entellan (Merck, Darmstadt) konnten die Zellen unter dem Mikroskop begutachtet werden.

Tabelle 2-4: Abfolge der aufsteigenden Alkoholreihe zur Entwässerung von biologischem Untersuchungsmaterial

Komponente	Einwirkzeit [min]
30 % Ethanol	je 5
70 % Ethanol	
96 % Ethanol	
100 % Ethanol	
100 % Xylol	

2.2.3 Isolation der K-Zellen in hyperosmolarem Chelatpuffer

Überprüfung der Osmolalität des Chelatpuffers

Um sicherzustellen, daß die Osmolalität des Chelatpuffers mit dem in der Literatur vorgegebenen Wert [91] übereinstimmte, wurde sie mit einem Osmometer kontrolliert, das die Osmolalität einer Salzlösung anhand der von ihr herbeigeführten Gefrierpunktniedrigung mißt. Als Eichlösung diente eine Natriumchloridlösung der Osmolalität 400 mosm/kg (Knauer, Berlin).

Isolation der Zellen

Der obere Dünndarm einer Ratte wurde entnommen und in eiskalten HBSS-Puffer gelegt. Dann wurde proximal ein Stück von 25 cm abgemessen, dieses über einem runden Edelstahlstab (Durchmesser 4 mm) umgestülpt und der Darm anschließend mit einem Skalpell in 1 bis 2 mm dicke Ringe geschnitten. Diese wurden in 35 ml Chelatpuffer überführt und unter Carbogenbegasung (5 % CO₂ / 95 % O₂, Messer Griesheim, Krefeld) 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert (siehe Abbildung 2-3). Die entstehende Zellsuspension wurde auf Eis durch ein grobmaschiges Sieb und zwei Nylonfilter (Neolab, Heidelberg) von 250 und 60 µm Porengröße filtriert. Danach wurden kleine Aliquots entnommen, um später die ursprüngliche GIP-Konzentration der Zellsuspension bestimmen zu können. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C 5 min bei 79 xg zentrifugiert und das entstehende Zellpellet ad 1 ml in PBS/EDTA resuspendiert. 10 µl der Lösung wurden mit der Erythrosinlösung angefärbt, in eine Neubauerkammer (MAGV, Rabenau-Londorf) pipettiert und unter dem Mikroskop auf Zellzahl und Intaktheit der Zellen hin untersucht.

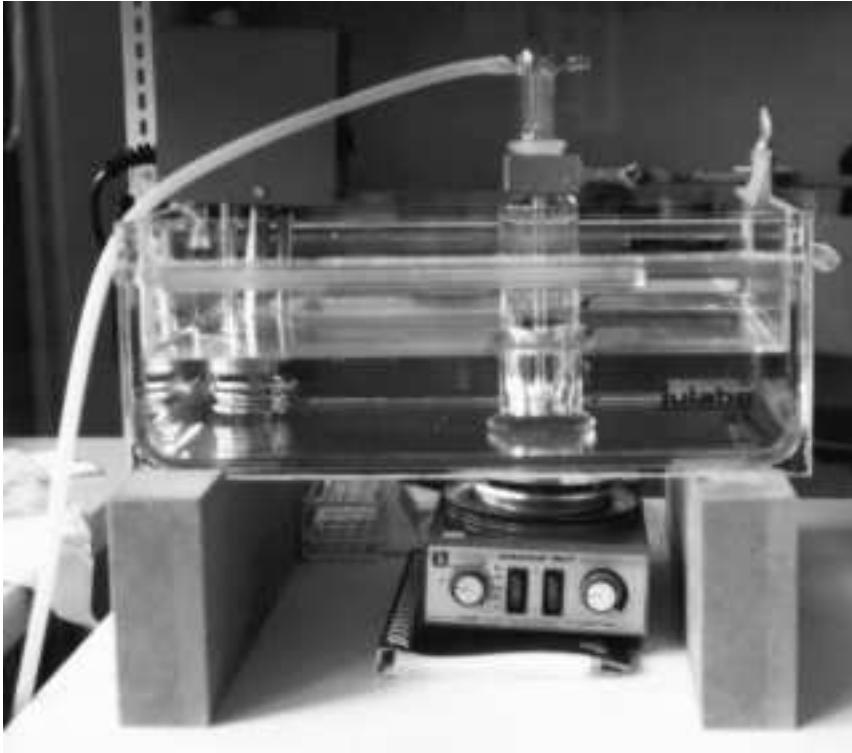


Abbildung 2-3: Versuchsaufbau zur Isolation von K-Zellen in hyperosmolarem Chelatpuffer. Die kleingeschnittenen Darmstückchen in Chelatpuffer werden in eine Gaswaschflasche mit Begasungseinsatz überführt. Die Lösung wird mit einem Magnetrührer durchmischt und durch ein Wasserbad auf einer Temperatur von 37 °C gehalten.

Variationen

Die Technik wurde variiert, indem Zeit oder Temperatur der ersten Inkubation verändert wurden, die Begasung weggelassen, ein Schutzstoff zugesetzt oder ein Chelatpuffer mit nahezu physiologischer Osmolarität (290 mosm/l) verwendet wurde (siehe Tabelle 2-5).

Tabelle 2-5: Variationen der Inkubationsbedingungen zur K-Zell-Isolation

Variable	Variation
Zeit	10 min bis 60 min
Temperatur	0 °C, 37 °C
Zusatz eines Schutzstoffes	Glutamin (1 - 5 mmol/l)
Begasung	ohne - mit
Osmolarität des Chelatpuffers	290 mosm/l - 385 mosm/l

2.3 Anreicherung der K-Zellen

Zur Anreicherung der isolierten Zellen sollten immunomagnetische Verfahren getestet werden.

Allgemeines Prinzip:

Magnetische Partikel, an die Antikörper gekoppelt sind, binden entweder direkt oder über einen weiteren Antikörper an die gewünschten Zellen (siehe Abbildung 2-4). In einem Magnetfeld lassen sich anschließend die markierten von den nicht-markierten Zellen trennen.

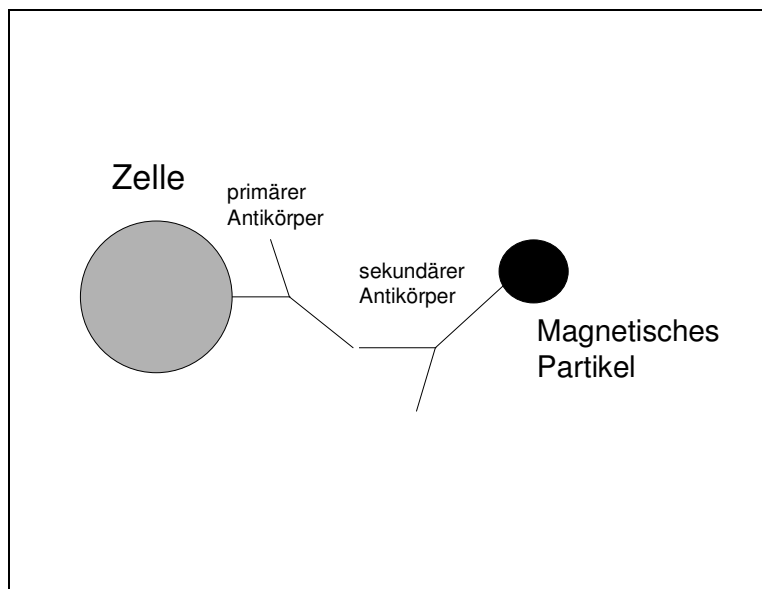


Abbildung 2-4: Bindung zwischen einer Zelle und einem magnetischen Teilchen bei der immunomagnetischen Zellseparation. Das Partikel bindet bei der indirekten Technik über zwei Antikörper an die zu markierende Zelle.

Neben einer Anreicherung der gesuchten Zellen ist auch eine Depletion der unerwünschten Zellen möglich. Hierbei werden alle störenden Zellen mit den magnetischen Partikeln markiert.

Die Markierung der Zellen mit den magnetischen Teilchen kann mittels einer direkten oder einer indirekten Technik erfolgen (siehe Abbildung 2-5). Bei der direkten Technik werden zuerst die magnetischen Partikel mit einer Lösung geeigneter primärer Antikörper inkubiert. Die markierten Antikörper werden dann einer Zellsuspension zugesetzt und binden dort an die gesuchten Zellen. Diese

Reihenfolge wird bei der indirekten Technik umgekehrt. Hier wird eine Zellsuspension mit der ausgewählten Antikörper-Lösung versetzt. Nachdem die Antikörper an die gesuchten Zellen gebunden haben, werden die magnetischen Teilchen zugesetzt, die ihrerseits an die Antikörper binden und dadurch die gesuchten Zellen markieren.

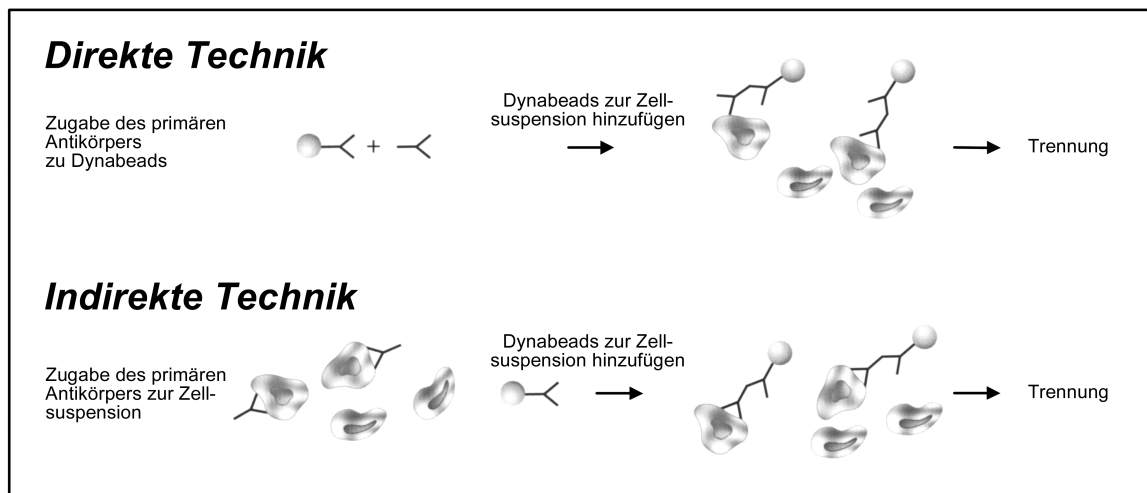


Abbildung 2-5: Direkte und indirekte Technik bei der immunomagnetischen Zellseparation. Bei der direkten Technik wird der primäre Antikörper mit den magnetischen Partikeln präinkubiert und anschließend zu den zu markierenden Zellen gegeben; bei der indirekten Technik werden die Zellen mit dem primären Antikörper inkubiert und anschließend die magnetischen Partikel hinzupipettiert (modifiziert nach [111])

Zur immunomagnetischen Anreicherung der K-Zellen sollten zwei verschiedene Systeme getestet werden.

2.3.1 Zellanreicherung durch Magnetic Cell Sorting (MACS)

Prinzip

Extrem kleine, superparamagnetische Kügelchen (MACS Microbeads) binden über eine Brücke aus einem primären und einem sekundären Antikörper an die zu isolierenden Zellen in einer Zellsuspension. Die Suspension wird auf eine Trennsäule aufgetragen, die aus kunststoffumhüllten, magnetischen Fasern besteht. Um die Säule herum erzeugt ein Separator (VarioMacs) ein starkes Magnetfeld. Während die markierten Zellen an der Säulenmatrix haften, werden die nicht markierten Zellen eluiert. Nachdem die Trennsäule aus dem Separator

entnommen worden ist, können auch die markierten Zellen eluiert werden (siehe Abbildung 2-6).

Zugabe von antikörpermarkierten MACS Microbeads zur Zellsuspension

Auftragen auf eine Trennsäule

Herauswaschen der nicht-markierten Zellen

Entnahme der Trennsäule aus dem Magnetfeld und Elutrierung der markierten Zellen

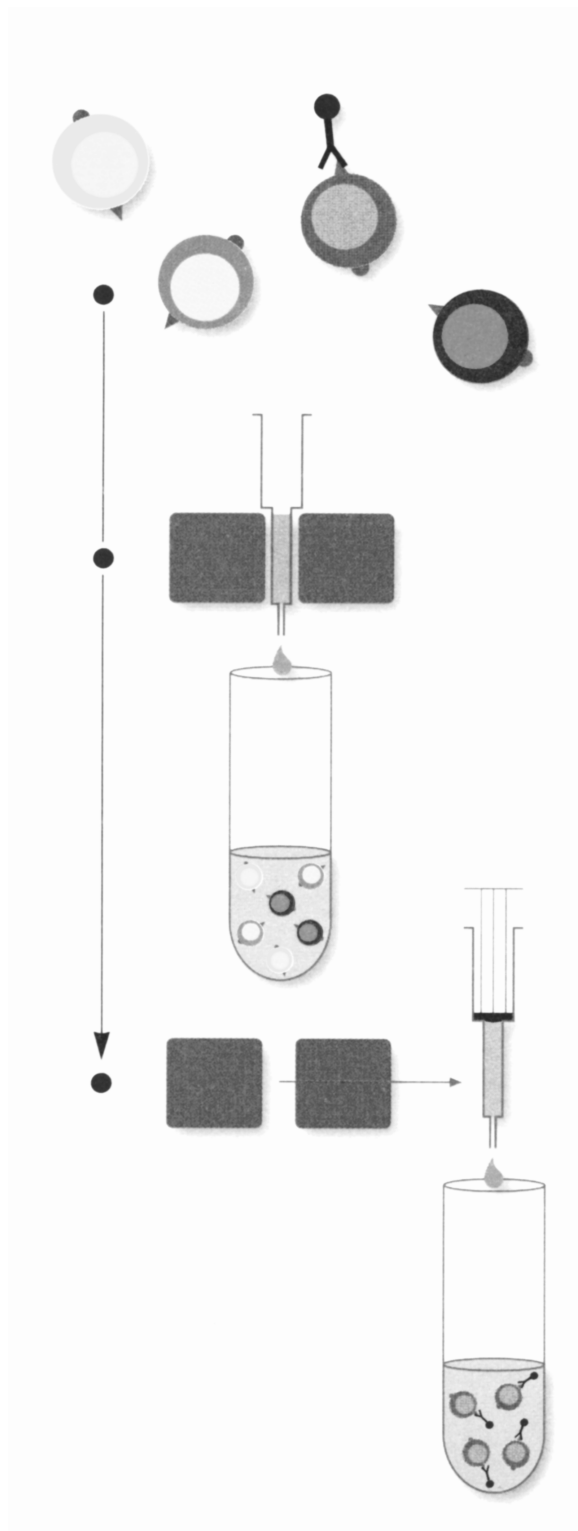


Abbildung 2-6: Das Verfahren zur Zellanreicherung mit MACS (modifiziert nach [99]). Dargestellt ist hier die Trennung mittels einer direkten Methode.

Eingesetzte Materialien (alle von Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

- * MACS Microbeads: superparamagnetische Microbeads aus Eisenoxid und einem Polysaccharid, an die ein Ratte-anti-Maus-IgG₁ Antikörper gekoppelt ist, Durchmesser 50 nm
- * Separator: VarioMACS
- * Magnetische Trennsäulen: Typ AS (für bis zu 3×10^7 markierte Zellen) oder RS (speziell für die Isolation seltener Zellen), jeweils mit einer Säulenmatrix aus ferromagnetischen Fasern mit Kunststoffumhüllung

Ansetzen des Säulentrennpuffers

5 mmol/l EDTA wurden in PBS gelöst und 0,5 % BSA zugesetzt.

Durchführung

Die Zellsuspension (wie unter Punkt 3.3.4 beschrieben) wurde mit 25 µl eines ersten Antikörpers (siehe Tabelle 2-6) 15 bis 120 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden MACS Microbeads (20 µl auf 10^7 Zellen) zu der Zellsuspension zugegeben und die komplette Suspension weitere 15 bis 45 min inkubiert.

Die verwendeten Trennsäulen wurden einmal mit 70 % Ethanol und mehrfach mit dem Säulentrennpuffer gewaschen, gekühlt, mit entgastem Puffer gefüllt und in den Separator eingespannt, anschließend mit der Pufferlösung durchspült und mit der gut gemischten Zellsuspension beladen. Nach mehrfachem Spülen mit dem Säulentrennpuffer (Negativ-Fraktion) wurde die Säule aus dem Separator genommen und die Positivfraktion mit dem Puffer eluiert.

Bei den meisten Versuchen mußte nach dem Auftragen der Zellsuspension auf die Trennsäule mit einer Einmalspritze ein Stempeldruck auf die Flüssigkeitssäule im Überstand ausgeübt werden, damit der Überstand in die Säule eintreten konnte.

Alle gewonnenen Fraktionen wurden 5 min bei 79 x *g* in der Kühlzentrifuge zentrifugiert, ad 1 ml mit entionisiertem Wasser aufgefüllt, mit Ultraschall behandelt, 10 min bei 2000 x *g* in der Kühlzentrifuge zentrifugiert und der Überstand aliquotiert bei -20 °C eingefroren.

Kontrollversuch

Herstellung des Percoll-Gradienten (Dichte: 1,088 g/ml)

1,5 ml	Percoll (Sigma, Deisenhofen) wurden mit
9,5 ml	10-fach konzentriertem HBSS-Puffer und
4,0 ml	entionisiertem Wasser gemischt.

Aus humanem Vollblut wurden Granulocyten durch einen Percoll-Gradienten, wie unter [112] beschrieben, vorangereichert. Mit Hilfe der Trennsäule Typ AS und Microbeads, an die direkt ein Antikörper gegen das Oberflächenmolekül CD 16 gekoppelt war, wurden im VarioMACS-Separator durch Depletion neutrophiler Granulocyten die eosinophilen Granulozyten isoliert.

2.3.2 Zellanreicherung mit Dynabeads

Prinzip

Die ausgewählten Zellen werden über Antikörperbrücken mit superparamagnetischen Kügelchen (Dynabeads) markiert. Anschließend wird das Röhrchen, in dem sich die Zellsuspension befindet, direkt in eine Magnethalterung eingesetzt. Die markierten Zellen haften an der Gefäßwand, während die nicht markierten Zellen in Lösung bleiben und mit einer Pipette entnommen werden können (siehe Abbildung 2-7).

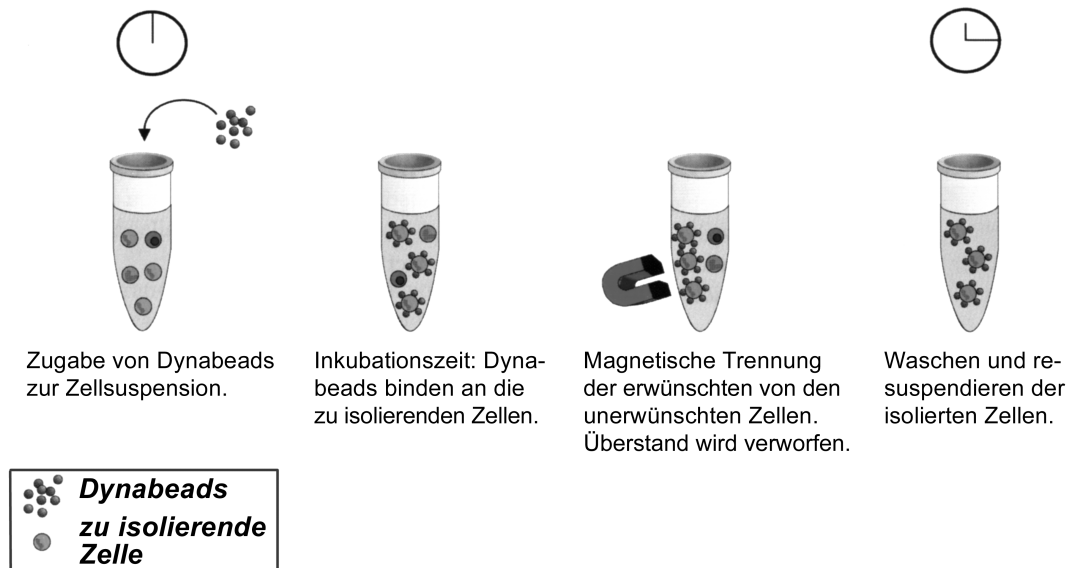


Abbildung 2-7: Funktionsweise der Dynabeads (modifiziert nach [113]).

Hinweise des Herstellers [100]

Für Zellen mit geringer Antigendichte empfiehlt Dynal, die indirekte Technik einzusetzen, da freie Antikörper, weil sie kleiner und somit beweglicher sind, leichter an Zelloberflächenantigene binden können als mit Dynabeads gekoppelte Antikörper. Die Inkubationszeit des primären Antikörpers sollte hierbei länger als 30 Minuten gewählt werden.

Dynal rät, $1-2 \times 10^7$ Dynabeads / ml Zellsuspension und 3 bis 5 μg des primären Antikörpers pro 10^7 Dynabeads (für eine maximale Bindung bis zu 8-10 μg Antikörper / 10^7 Dynabeads) und mindestens 4 Dynabeads pro gesuchter Zelle einzusetzen.

Eingesetzte Materialien (alle von Deutsche Dynal, Hamburg)

- * Dynabeads: Typ M-450 Ratte anti-Maus IgG₁, Typ M-280 Schaf anti-Kaninchen IgG, Typ HLA CLASS I und HLA CLASS II; superparamagnetische, antikörpergekoppelte Polymerkügelchen mit einem Eisenoxidkern, Durchmesser 4,5 bzw. 2,8 μm
- * Magnethalterung: Typ MPC E-1

2.3.2.1 Standardversuch und Variationen

Herstellung der kaliumreichen, chloridarmen Ringerlösung [114]

100 mmol/l	Kaliumgluconat	(Sigma, Deisenhofen)
30 mmol/l	KCl	(Merck, Darmstadt)
10 mmol/l	HEPES	(Roth, Karlsruhe)
20 mmol/l	NaCl	(Roth, Karlsruhe)
1 mmol/l	MgCl ₂ • 6 H ₂ O	(Merck, Darmstadt)
1,25 mmol/l	CaCl ₂ • 2 H ₂ O	(Merck, Darmstadt)

Alle Substanzen wurden in entionisiertem Wasser gelöst und der pH mit Kalilauge auf 7,3 bis 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde nicht länger als drei Tage im Kühlschrank aufbewahrt.

Durchführung des Standardversuchs

Zu der Zellsuspension (wie unter Punkt 2.2.3 beschrieben) wurde eine auf die Zellzahl abgestimmte Menge eines primären Antikörpers (siehe Tabelle 2-6) pipettiert. Die Röhrchen wurden in einen Drehschüttler eingespannt und bei 4 °C 60 min bei einer Drehfrequenz von 22 Umdrehungen / min inkubiert. Nach einer Zentrifugation in der Kühlzentrifuge bei 150 x g für 5 min wurden erneut Zellzahl und Intaktheit überprüft. Abgestimmt auf die errechnete Zellzahl wurden der Zellsuspension antikörpergekoppelte, magnetische Dynabeads zugesetzt (siehe Tabelle 2-7), die vorher mit EDTA/PBS-Puffer gewaschen worden waren. Die Mischung wurde 15 min auf Eis unter ständigem Drehen der Röhrchen inkubiert und die Gefäße danach in eine Magnethalterung eingesetzt. Dadurch wanderten die mit Dynabeads markierten Zellen in Richtung des Magneten an die Gefäßwand, während alle nicht markierten Zellen in Lösung blieben und anschließend entfernt werden konnten. Die markierten Zellen wurden zweimal mit EDTA/PBS-Puffer gewaschen, die Überstände mit dem ersten Überstand gepoolt und die so entstandenen Positiv- und Negativfraktionen auf ihre Zellzahl und Intaktheit wie vorher beschrieben kontrolliert. Die Positivfraktion wurde nach dem letzten Waschschrift in PBS-Puffer aufgenommen, die Negativfraktion nochmals bei 150 x g 5 min zentrifugiert und in entionisiertem Wasser aufgenommen. Die Proben wurden mit Ultraschall behandelt (siehe unter Punkt 2.1.2.1), bei 2000 x g

10 min zentrifugiert und aliquotiert bei -20 °C eingefroren. Der GIP-Gehalt aller Proben wurde durch ein RIA (siehe Punkt 2.1.2.2) bestimmt.

Der spezifische GIP-Gehalt wurde definiert als Quotient aus gemessener GIP-Konzentration der Probe und der vorher ermittelten Zellzahl. Der Anreicherungsfaktor für das Hormon ergab sich, indem der spezifische Hormongehalt der Positivfraktion durch den spezifischen Hormongehalt der Ausgangsfraktion (nach Filtration) geteilt wurde.

Die tatsächliche Zahl der Dynabeads in Lösung wurde vorher unter dem Mikroskop ausgezählt.

Tabelle 2-6: Übersicht über die zur Isolation der K-Zellen getesteten primären Antikörper
N-CAM = Neural Cell Adhesion Molecule, MHC-1 = Major Histocompatibility Complex 1
MHC-2 = Major Histocompatibility Complex 2

Antikörper	Typ	Hersteller	Biologische Funktion	Eingesetzte Konzentration [µg/ml]
Syntaxin	monoklonaler Maus anti-Ratte IgG ₁	Sigma, Deisenhofen	interzelluläre Signaltransduktion	152,5
Synaptophysin	monoklonaler Maus anti-Ratte IgG ₁	Sigma, Deisenhofen	interzelluläre Signaltransduktion	127,5
N - CAM	monoklonaler Maus anti-Ratte IgG ₁	Sigma, Deisenhofen	Zelladhäsion	97,5
GIP	polyklonaler Kaninchen anti-Mensch IgG	Peninsula, San Carlos	Insulinotropes Hormon	10
MHC-1	monoklonaler Maus anti-Ratte IgG ₁	Cedarlane, Hornby	Immunität	10
MHC-2	monoklonaler Maus anti-Ratte IgG ₁	Harlan Sera-Lab Ltd., Crawley Down	Immunität	10

Tabelle 2-7: Faktoren zum Umrechnen der Zellzahl auf die zur Isolation der K-Zellen einzusetzende Menge an Dynabeads.

Typ Dynabeads	Zuzugebendes Volumen [in µl]	Dynabeads / 10 ⁶ Zellen
M-450	Zellzahl [in 10 ⁶ /ml] * 50	12
M-280	Zellzahl [in 10 ⁶ /ml] * 37,5	12

Für die *Anreicherungsversuche* wurden primäre Antikörper gegen die Zellmembranproteine Syntaxin, Synaptophysin und N-CAM, sowie gegen das K-Zellprodukt GIP getestet (siehe Tabelle 2-6).

Analog wurden zur *Abreicherung* von Epithelzellen dem HLA I und HLA II bei Menschen entsprechende, rattenspezifische MHC-1- und MHC-2-Antikörper eingesetzt (siehe Tabelle 2-6).

Bei den humanspezifischen Dynabeads Typ HLA CLASS I+II (nicht in Tabelle 2-6 aufgeführt) waren die Antikörper, die an die Zelloberflächen binden, direkt mit den Dynabeads gekoppelt. Daher war bei diesen Versuchen eine direkte Technik zur *Abreicherung* von Epithelzellen anzuwenden.

Variationen der Standardtechnik

Bevor die oben beschriebene Durchführung feststand, wurden zusätzlich zu den Tests mit unterschiedlichen Antikörpern verschiedene andere Parameter des Versuchs variiert:

- a) Anstelle der indirekten Technik wurde bei Versuchen mit dem GIP-Antikörper die direkte Technik getestet.
- b) Der primäre Antikörper wurde zwischen 15 und 120 min bei 4 °C mit den Zellen inkubiert.
- c) Nach Zugabe der Dynabeads wurden die Röhrchen mit den Zellen zwischen 1 und 30 min auf Eis gedreht.
- d) Alle Arbeitsschritte wurden anstelle auf Eis bei Raumtemperatur (etwa 22 °C) durchgeführt.
- e) Um die Intaktheit der gewonnenen Zellen weiter zu erhöhen [115], wurden anstelle des EDTA/PBS-Puffers verschiedene Transplantationsmedien (VIASPAN (UW-Lösung), DuPont, Bad Homburg oder Euro-Collins-Lösung, nach Daten von Fresenius, Oberursel [116] selbst hergestellt), das Kulturmedium DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium Nr. 41965; Life Technologies, Eggenstein) oder eine kaliumreiche, chloridarme Ringerlösung eingesetzt.

2.4 Nachweis der Anreicherung und der Glucose-Stimulierbarkeit der K-Zellen *in vitro*

Nach Anreicherung der K-Zellen in der Positivfraktion (wie unter Punkt 2.3.2.1 beschrieben) sollte nachgewiesen werden, daß die Zellen auf einen Glucosereiz (20 mmol/l) mit der Ausschüttung von GIP reagieren.

Herstellung einer Glucoselösung der Konzentration 60 mmol/l

11,9 mg D-Glucose-Monohydrat wurden in 1 ml PBS (siehe unter Punkt 2.1.3.1) gelöst und der pH der Lösung auf 7,3 eingestellt.

Durchführung

Jeweils 200 µl der Positivfraktion (zweifach konzentriert, da aus doppeltem Ansatz) wurden für einen Stimulations- und einen parallelen Blindversuch eingesetzt. Nach Zugabe von 100 µl der Glucoselösung bzw. 100 µl PBS-Puffer wurden die Proben in Eppendorf-Gefäßen 20 min bei 4 °C unter ständigem Drehen inkubiert. Anschließend wurde der Überstand von den Zellen getrennt, indem die Eppendorf-Gefäße in eine Magnethalterung (siehe Punkt 2.3.2) eingesetzt und der Überstand anschließend nochmals 5 min bei 79 x g zentrifugiert wurde. Sowohl die Zell- als auch die Überstandsfraktionen wurden mit entionisiertem Wasser auf 200 µl aufgefüllt, alle Proben mit Ultraschall behandelt (siehe Punkt 2.1.2.1), 10 min bei 2000 x g in der Kühlzentrifuge zentrifugiert und aliquotiert bei -20 °C eingefroren. Der GIP-Gehalt der Proben wurde in einem RIA (wie unter Punkt 2.1.2.2 beschrieben) ermittelt.

2.5 Statistik

Zur statistischen Auswertung der Versuche wurde zum Vergleich zweier Werte jeweils der Students t-Test für ungepaarte Proben angewandt. Zwei Größen wurden mit einem Signifikanzniveau $p < 0,05$ als signifikant unterschiedlich betrachtet. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Lokalisation der K- und L-Zellen im Darm der Ratte

3.1.1 Immunhistochemische Lokalisation der K- und L-Zellen

Auswahl der Objektträger

Da unbeschichtete Objektträger im Vergleich zu den Poly-L-Lysin-beschichteten und den Super-Frost-Plus-Gold Objektträgern unter dem Mikroskop die klarsten Bilder ermöglichten, wurden sie für die folgenden Färbungen ausgewählt.

Auswahl des Epithelzellmarkers

Weil Tests mit dem Cytokeratin-Antikörper (Sigma, Deisenhofen) im Vergleich zu den Versuchen mit Antikörpern gegen α - und β -Tubulin die optisch schönsten Ergebnisse, d.h. die leuchtendsten und klarsten Bilder, erbrachten, wurde dieser für alle weiteren Versuche zur Epithelzellmarkierung eingesetzt.

Auswahl geeigneter Fluoreszenzfarbstoffe

Die Fluoreszenzfarbstoffe Carbocyanin (Cy2) und Indocarbocyanin (Cy3) erzeugten Färbungen, die strahlender als vergleichbare FITC- oder TRITC-Färbungen waren und bei denen Details besser zu erkennen waren. Auch die Haltbarkeit der Schnitte war um mehrere Tage verlängert, somit konnten sie besser untereinander verglichen werden. Aus diesem Grund wurden für weitere Färbungen ausschließlich Antikörper verwendet, an die die Farbstoffe Cy2 bzw. Cy3 gekoppelt waren.

Negativkontrollen

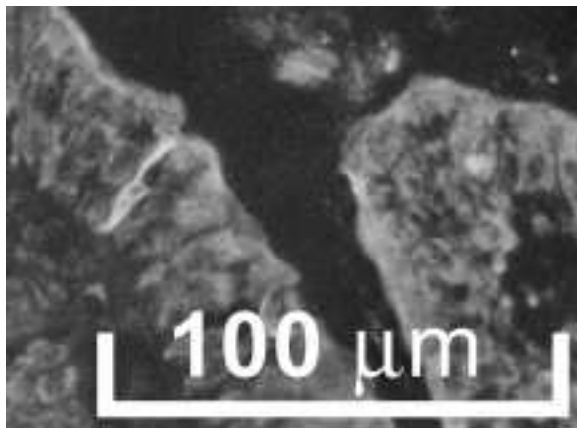
Alle Negativkontrollen verliefen ordnungsgemäß: ein Weglassen des primären Antikörpers resultierte in minimaler, diffuser Immunfluoreszenzfärbung. Ohne den sekundären, farbstoffgekoppelten Antikörper blieb die Färbung ganz aus. Weder

die ausgewählten Objektträger noch die unbehandelten Gefrierschnitte zeigten eine Eigenfluoreszenz.

Aussehen der K- und L-Zellen

Auf Abbildung 3-1 erkennt man die mit Cy2 angefärbten, endokrinen Zellen, die zwischen Epithelzellen eingelagert sind und mit einem Cytoplasmaausläufer das Darmlumen erreichen. Sowohl K- als auch L-Zellen sind endokrine Zellen vom offenen Typ.

a)



b)

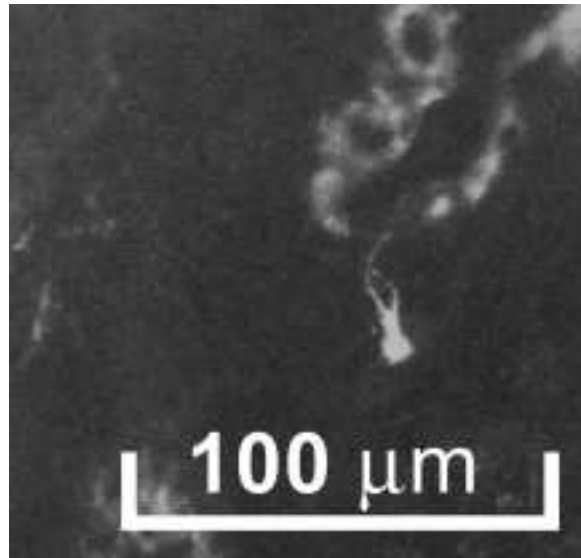


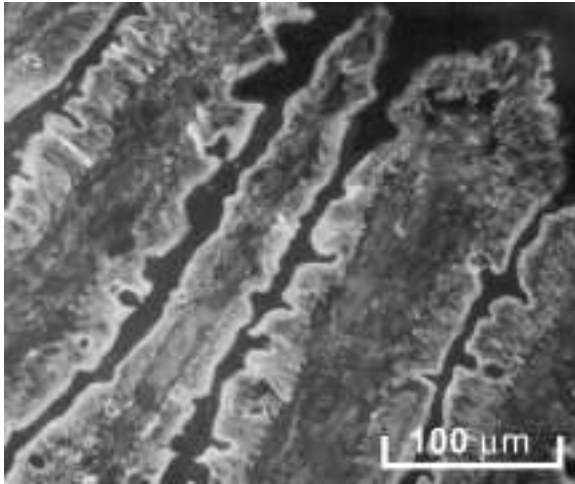
Abbildung 3-1: a) K-Zelle aus dem Duodenum der Ratte, mit einem GIP- Antikörper (1:500) markiert und mit Cy2 angefärbt. Vergrößerung 1:320.
b) L-Zelle aus dem Ileum der Ratte, mit einem GLP-1-Antikörper (1:200) markiert und mit Cy2 angefärbt. Vergrößerung 1:320.

Nachweis der K-Zellen im Duodenum und der L-Zellen im Ileum

Mit der Immunfluoreszenztechnik konnten die K-Zellen im Duodenum der Ratte vor allem im oberen und mittleren Teil der Villusspitzen lokalisiert werden (siehe Abbildung 3-2). Vereinzelt kamen Färbungen im unteren Villusbereich vor. Im Ileum konnten keine K-Zellen nachgewiesen werden.

Die L-Zellen der Ratte befanden sich im Ileum vor allem in der unteren Hälfte der Krypten (siehe Abbildung 3-2). In Duodenumschnitten blieb eine Färbung aus.

a)



b)

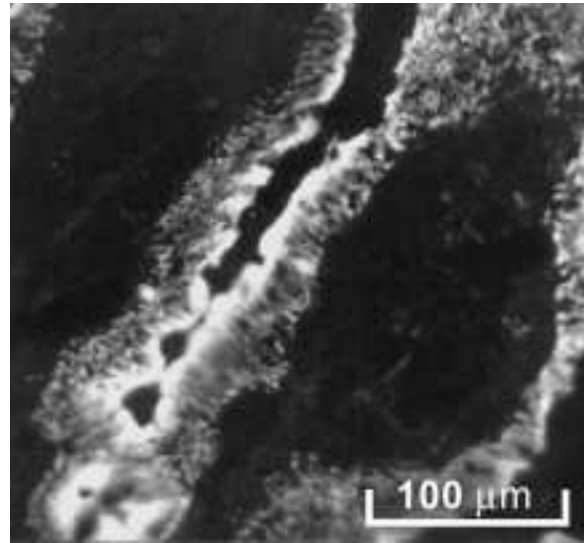


Abbildung 3-2: a) K-Zelle aus dem Duodenum der Ratte (Doppelimmunfluoreszenz), mit einem GIP-Antikörper markiert und mit Cy2 angefärbt, Gegenfärbung der Epithelzellen mit pan-Cytokeratin und Cy3 (mit FITC-Filter). Vergrößerung 1:320.
b) L-Zelle aus dem Ileum der Ratte, mit einem GLP-1-Antikörper markiert und mit Cy2 angefärbt, Gegenfärbung der Epithelzellen mit pan-Cytokeratin und Cy3 (mit FITC-Filter). Vergrößerung 1: 320.

3.1.2 Untersuchung der Verteilung der K- und L-Zellen über die gesamte Darmlänge

Die Untersuchung des Rattendarms, der in 10 gleich lange Dünndarmabschnitte eingeteilt worden war, ergab folgenden Verlauf für die Konzentrationen an GIP und GLP-1:

GIP

Bezieht man den GIP-Gehalt der Darmmucosa auf den entsprechenden Proteingehalt, so ergaben sich für das Duodenum und das proximale Jejunum Werte um 0,7 ng GIP/ mg Protein. Die insgesamt höchste GIP-Konzentration war im 2. (proximales Jejunum) von 10 untersuchten Abschnitten zu finden. Die GIP-Konzentrationen fielen im distalen Jejunum und Ileum auf signifikant niedrigere Werte von etwa 0,15 ng GIP/mg Protein ab (siehe Tabelle 3-1 und Abbildung 3-3).

Tabelle 3-1: GIP-Verteilung über die Darmlänge im Rattendarm. Angegeben sind die ermittelten GIP-Gehalte bezogen auf die entsprechenden Proteingehalte. n = Anzahl der untersuchten Därme, SD = Standardabweichung, SEM = Standardfehler des Mittelwerts, p = Signifikanzniveau, VGL = Vergleichswert

Abschnitt	n	Mittelwerte	SD	SEM	T-Test
		[ng GIP/mg Prot.]	[ng GIP/mg Prot.]	[ng GIP/mg Prot.]	p
1	5	0,71	0,16	0,07	0,5271
2	4	0,78	0,08	0,04	VGL
3	4	0,71	0,22	0,11	0,6224
4	5	0,67	0,21	0,10	0,4043
5	5	0,69	0,21	0,09	0,4814
6	5	0,73	0,16	0,07	0,6108
7	5	0,65	0,10	0,04	0,1076
8	5	0,16	0,02	0,01	0,0000
9	5	0,17	0,03	0,01	0,0000
10	5	0,15	0,03	0,01	0,0000

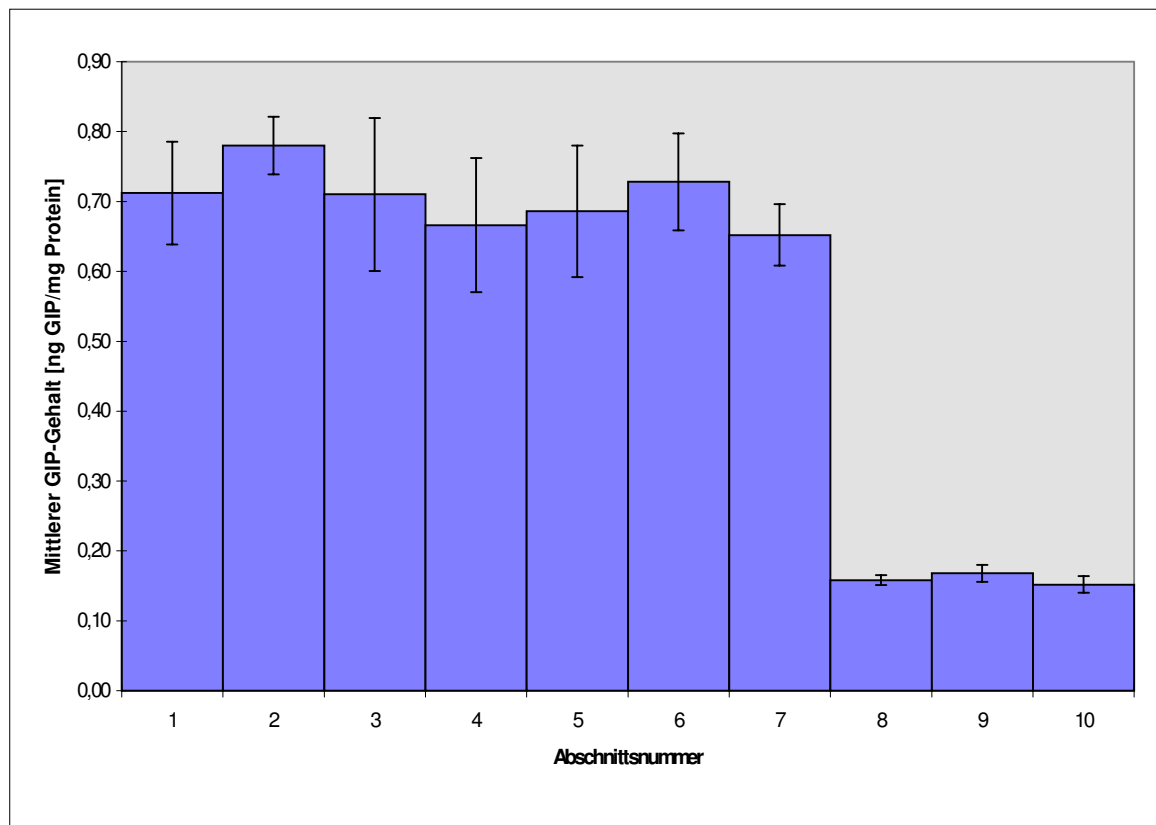


Abbildung 3-3: GIP-Verteilung über die Darmlänge. Dargestellt ist der Verlauf des mittleren GIP-Gehalts bezogen auf den Proteingehalt (in ng GIP/mg Protein) in der Dünndarmmucosa der Ratte (n = 5) über die gesamte Darmlänge (Abschnitte 1-10). Die zusätzlichen Linien markieren den Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

GLP-1

Ein ausgeprägter Gradient wurde bei den Untersuchungen zum Verlauf der GLP-1-Konzentration über die Darmlänge gefunden. Vom Duodenum bis zum proximalen Jejunum waren nur minimale GLP-1-Konzentrationen nachweisbar

Tabelle 3-2: GLP-1-Verteilung über die Darmlänge im Rattendarm. Angegeben sind die ermittelten GLP-1-Gehalte bezogen auf die entsprechenden Proteingehalte. n = Anzahl der untersuchten Därme, SD = Standardabweichung, SEM = Standardfehler des Mittelwerts, p = Signifikanzniveau, VGL = Vergleichswert

Abschnitt	n	Mittelwerte	SD	SEM	T-Test
		[ng GLP-1/mg Prot.]	[ng GIP/mg Protein]	[ng GIP/ mg Protein]	p
1	5	0,03	0,01	0,01	0,004
2	4	0,06	0,01	0,01	0,010
3	4	0,11	0,03	0,01	0,011
4	5	0,19	0,18	0,08	0,006
5	5	0,19	0,11	0,05	0,006
6	5	0,13	0,09	0,04	0,005
7	5	0,26	0,21	0,09	0,007
8	5	0,61	0,52	0,23	0,017
9	5	1,40	0,96	0,43	0,127
10	5	2,86	1,41	0,63	VGL

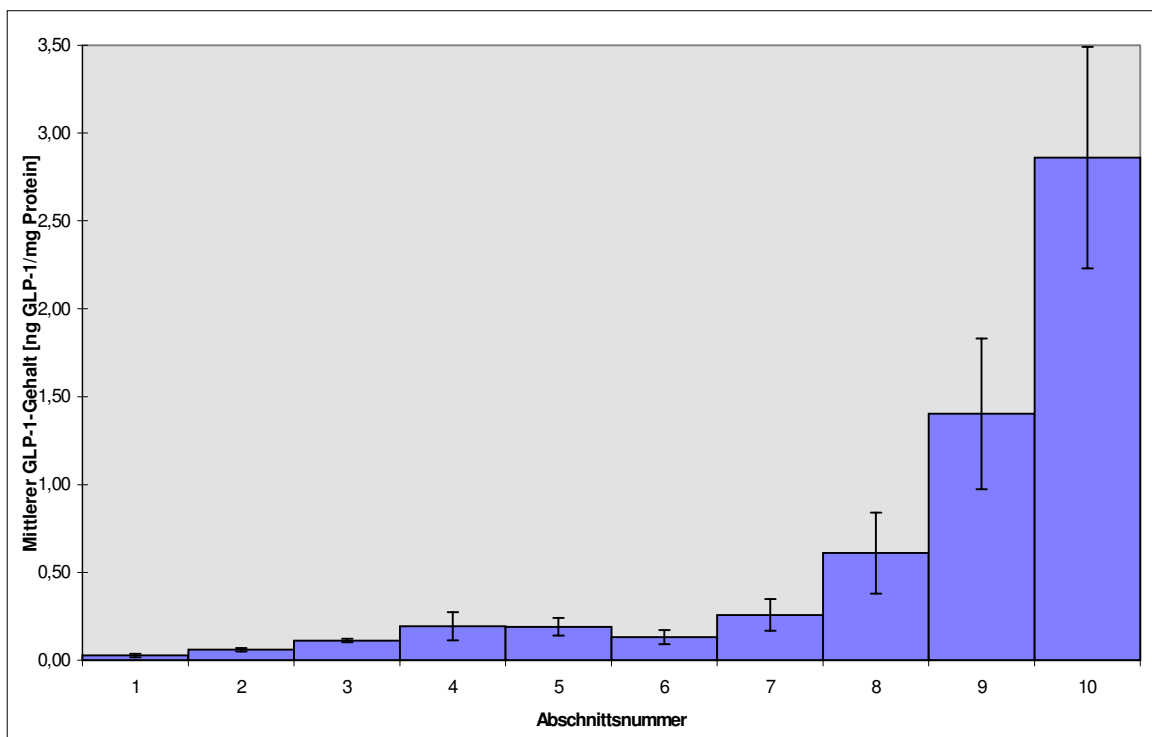


Abbildung 3-4: GLP-1-Verteilung über die Darmlänge. Dargestellt ist der Verlauf des mittleren GLP-1-Gehalts bezogen auf den Proteingehalt (in ng GIP / mg Protein) in der Dünndarmmucosa der Ratte (n = 5) über die gesamte Darmlänge (Abschnitte 1-10). Die zusätzlichen Linien markieren den Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

(um 0,1 ng GLP-1/mg Protein). Im distalen Jejunum stieg der Wert signifikant an und erreichte im Ileum mit einer Konzentration von 2,9 ng GLP-1/mg Protein ein Maximum (siehe Tabelle 3-2 und Abbildung 3-4).

3.1.3 Lokalisation der K- und L-Zellen entlang der Villus-Krypt-Achse

Fraktionsweises Abtragen der Zellen

Die Zellen aus der Mucosa des Rattendarms wurden schichtweise abgetragen. Zu Beginn der Schüttelversuche lagen noch intakte Villusspitzen vor, diese wurden Schritt für Schritt abgetragen, bis schließlich auch Kryptzellen aus dem Zellverband gelöst werden konnten (nicht dargestellt). Die Zellen in den gesammelten Fraktionen lagen meist nicht als Einzelzellen, sondern als kleine Zellverbände in Form von Villuszellagen oder Kryptorganoiden vor.

Lokalisation der spezifischen Aktivitäten von Alkalischer Phosphatase und Thymidinkinase im kompletten Dünndarm

Die Methode erlaubte eine gute Trennung der Zellen aus den Villi von den Zellen aus den Krypten. Die spezifische Aktivität an Alkalischer Phosphatase sank im Verlauf der Fraktionen bis auf nahezu 0 U/mg Protein in der letzten Fraktion. Im Gegensatz dazu war die spezifische Aktivität der Thymidinkinase in den ersten Fraktionen kaum meßbar und stieg in den weiteren Fraktionen stark an. Die höchsten spezifischen Aktivitäten an Alkalischer Phosphatase befanden sich in den ersten Fraktionen (bis zu 960 U/mg Protein), die höchsten spezifischen Aktivitäten an Thymidinkinase (bis zu 75 U/mg Protein) jeweils in den letzten Fraktionen (siehe Abbildung 3-5).

Lokalisation der spezifischen Aktivitäten von Alkalischer Phosphatase und Thymidinkinase im proximalen und im distalen Dünndarm

Eine nahezu gleiche relative Verteilung ergab sich für die spezifischen Aktivitäten an Alkalischer Phosphatase und Thymidinkinase, wenn nur der proximale oder der distale Teil des Dünndarms untersucht wurden: die spezifische Aktivität an

Alkalischer Phosphatase nahm im Verlauf der Fraktionen signifikant ab, während die der Thymidinkinase signifikant zunahm (siehe Abbildung 3-5).

Durch den Nachweis der Markerenzyme Alkalische Phosphatase und Thymidinkinase konnte somit gezeigt werden, daß in den zuerst gesammelten Fraktionen, die aus dem Abbau der Villusspitzen resultierten, vor allem differenzierte Zellen aus dem Zellverband gewonnen wurden. Die undifferenzierten, proliferierenden Zellen aus dem Kryptbereich befanden sich in den letzten Fraktionen.

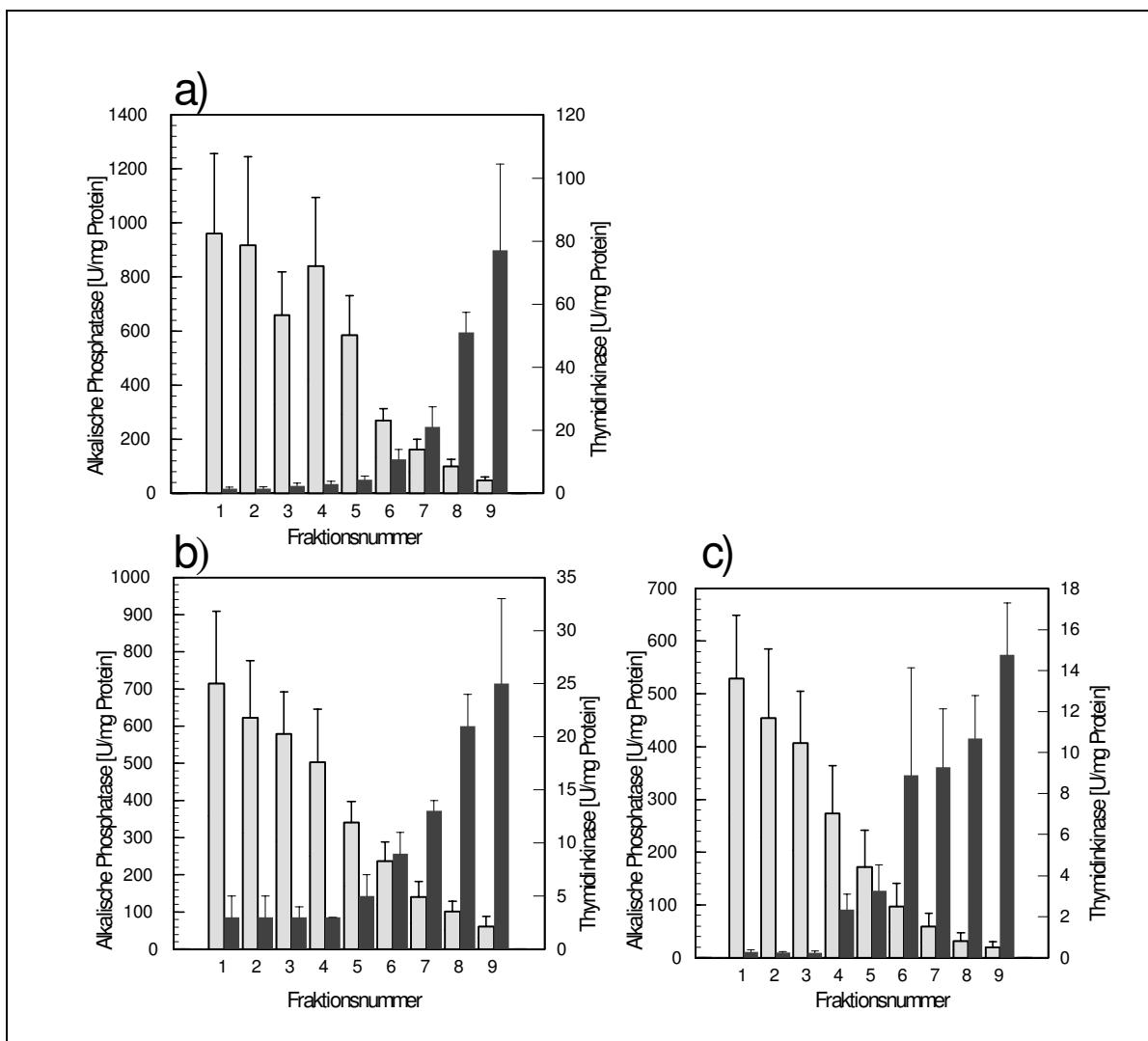


Abbildung 3-5: Verlauf der spezifischen Aktivitäten an Alkalischer Phosphatase (AP) und Thymidinkinase (TK) entlang der Villus-Krypt-Achse a) im kompletten Dünndarm (n = 8), b) im proximalen Teil (Duodenum und proximales Jejunum) (n = 4) und c) im distalen Teil des Rattendarms (distales Jejunum und Ileum) (n = 4) (Angaben jeweils in U/mg Protein). In hellen Säulen dargestellt ist der Verlauf der spezifischen AP-Aktivitäten, in den dunklen Säulen der der spezifischen TK-Aktivitäten; die zusätzlichen Linien beziehen sich auf die Standardfehler der Mittelwerte (SEM).

Lokalisation von GIP entlang der Villus-Krypt-Achse

Ein ähnlicher Gradient wie für die spezifische Aktivität der Alkalischen Phosphatase ergab sich für den spezifischen GIP-Gehalt. Im kompletten Rattendünndarm konnten in den ersten Fraktionen Konzentrationen bis zu $0,98 \pm 0,14$ ng GIP/mg Protein gemessen werden. Die GIP-Konzentration sank ab der dritten Fraktion auf signifikant geringere Werte ($0,23 \pm 0,04$ ng GIP/mg Protein in C³). Ähnliche Gradienten ergaben sich, wenn anstelle des gesamten Dünndarms die proximalen oder distalen Abschnitte isoliert untersucht wurden (siehe Abbildung 3-6). Bemerkenswert ist die relativ hohe spezifische GIP-Konzentration ($0,91 \pm 0,21$ ng GIP/mg Protein) in den ersten Fraktionen aus dem distalen Dünndarmabschnitt.

Die GIP-produzierenden K-Zellen konnten also im gesamten Dünndarm der Ratte auf den Villusspitzen und in villusnahen Regionen nachgewiesen werden.

Lokalisation von GLP-1 entlang der Krypt-Villus-Achse

Bei der Untersuchung des kompletten Dünndarms trat die mit Abstand höchste spezifische GLP-1-Konzentration ($0,62 \pm 0,08$ ng GLP-1/mg Protein) in der zuletzt gesammelten Fraktion (Kryptregion) auf. Auch wenn der proximale oder distale Abschnitt des Dünndarms alleine untersucht wurde, ergab sich die höchste GLP-1-Konzentration für die jeweils zuletzt gesammelte Fraktion. In allen Versuchen stieg die Konzentration des Peptids an, je weiter die Zellen in Richtung der Krypten abgetragen wurden. Die insgesamt höchste GLP-1-Konzentration trat in der letzten Fraktion des distalen Dünndarms auf ($0,75 \pm 0,19$ ng GLP-1/mg Protein) (siehe Abbildung 3-6).

Im gesamten Dünndarm wurde demnach die höchste Dichte an GLP-1-produzierenden L-Zellen in den Krypten und kryptennahen Regionen gefunden.

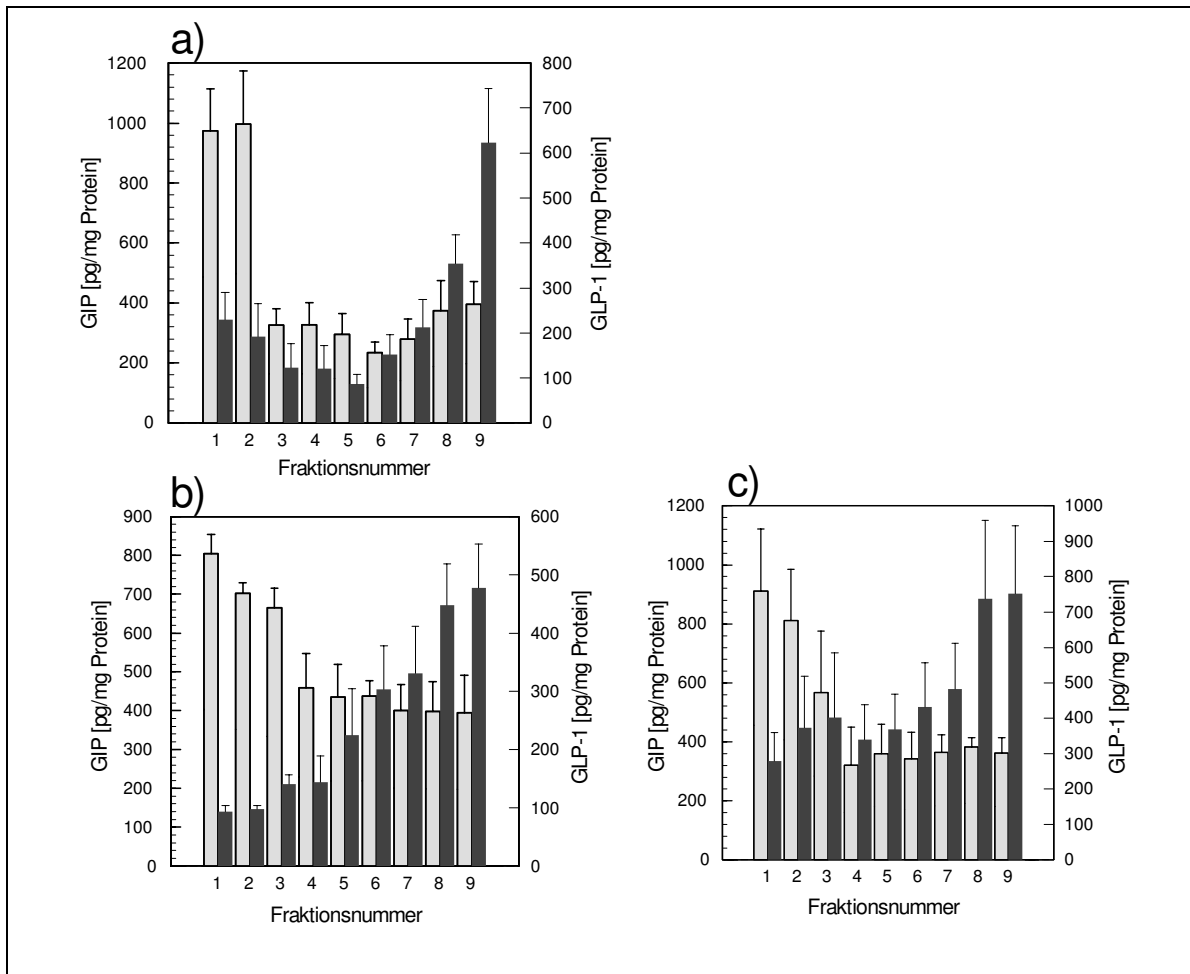


Abbildung 3-6: Verlauf der spezifischen GIP- und GLP-1-Konzentrationen entlang der Villus-Krypt-Achse a) im kompletten Dünndarm ($n = 8$), b) im proximalen Teil (Duodenum und proximales Jejunum) ($n = 4$) und c) im distalen Teil des Rattendarms (distales Jejunum und Ileum) ($n = 4$) (Angaben jeweils in pg Hormon / mg Protein). In hellen Säulen dargestellt ist der Verlauf der GIP-Gehalte, in den dunklen Säulen der der GLP-1-Gehalte; die zusätzlichen Linien beziehen sich auf die Standardfehler der Mittelwerte (SEM). GIP = Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide, GLP-1 = Glucagon-like Peptide 1

3.2 Isolation der K-Zellen

3.2.1 Isolation von K-Zellen aus Duodenum

3.2.1.1 Ergebnisse der mechanischen Zellisoliationsversuche

Eine mechanische Isolation der Zellen (angelehnt an die Methode von SAIFIA et al. [62]) erbrachte viele Zelltrümmer und wenige Zellen, deren Intaktheit zudem niedrig war. Auf die in der Anleitung angegebenen weiteren Schritte wurde daraufhin verzichtet und die Methode verworfen. Allerdings war es auch nicht

möglich, die Methode technisch identisch nachzuarbeiten, da kein vergleichbarer Schüttelapparat eingesetzt werden konnte, weil die Herstellerfirma nicht mehr existierte.

3.2.1.2 Ergebnisse der enzymatischen Zellisolationsversuche

Die enzymatische Isolation der Zellen erbrachte mit beiden getesteten Collagenase-Typen und unabhängig von der eingesetzten Enzymkonzentration und den Inkubationszeiten eine geringe Zellausbeute. Die Intaktheit der isolierten Zellen betrug in der Regel weniger als 20 %. Die Fraktionen enthielten sehr viele Trümmer und außerdem viele mittelgroße zellartige Gebilde. Durch Kontrolle mittels einer Hämalaun-Eosin-Färbung konnte ausgeschlossen werden, daß es sich hierbei um Zellen handelte. Zur weiteren Verarbeitung waren die mit dieser Methode gewonnenen Suspensionen nicht geeignet.

3.2.1.3 Ergebnisse der Versuche mit hyperosmolarem Chelatpuffer

Aussehen der isolierten Zellen

Unter dem Mikroskop waren längliche und runde Zellen sichtbar, die meist als Einzelzellen, zum Teil jedoch auch in Form von kleinen Zellverbänden vorkamen (diese wurden nicht in die Zellzahlberechnung eingeschlossen). In der Regel waren wenige Zelltrümmer, aber einige isolierte Zellkerne oder Bakterien zu beobachten.

Zellzahlen und Intaktheiten

Mit der hier beschriebenen Methode wurden durchschnittlich $3,1 \pm 0,3 \times 10^6$ Zellen isoliert. Die mittlere Intaktheit betrug $81 \pm 1 \%$.

Variationen

- a) Wurde die Inkubationszeit von 30 auf 60 min heraufgesetzt, so sank die Intaktheit der Zellen auf rund 60 %. Eine geringere Inkubationszeit resultierte in deutlich geringeren Zellausbeuten (kleiner 1×10^6).
- b) Den gleichen Effekt hatte das Absenken der Inkubationstemperatur auf 0 °C. Die mittlere Zellausbeute sank auf $0,7 \pm 0,3 \times 10^6$ Zellen und die durchschnittliche Intaktheit auf 28 ± 9 %.
- c) Ein Glutaminzusatz erbrachte in Bezug auf die Intaktheit der isolierten Zellen keinen positiven Effekt.
- d) Wurde die Begasung weggelassen, so sanken die Intaktheiten der isolierten Zellen.
- e) Auch ein Absenken der Osmolarität von etwa 380 mosm/l auf einen physiologischen Wert von etwa 290 mosm/l erbrachte keinen Vorteil bezüglich der Intaktheit der Zellen bei geringerer Zellausbeute (Ergebnisse nicht dargestellt).

Unter den getesteten Methoden ist die unter Punkt 0 beschriebene Methode am besten zur Isolation der K-Zellen geeignet. Diese Methode ergab eine ausreichend hohe Anzahl morphologisch intakter Zellen.

3.3 Anreicherung der K-Zellen

Zur Anreicherung der K-Zellen aus der gewonnenen Zellsuspension wurden das Magnetic Cell Sorting (MACS) und die immunomagnetische Trennung durch Dynabeads getestet. Die zu isolierenden Zellen wurden mit verschiedenen Antikörpern (siehe Tabelle 2-6) markiert und ihr Anreicherungsfaktor nach der immunomagnetischen Separation kontrolliert.

3.3.1 Zellanreicherung durch Magnetic Cell Sorting (MACS)

Weder mit der Trennsäule Typ AS (für bis zu 3×10^7 markierte Zellen) noch mit der Säule Typ RS (speziell für die Isolation seltener Zellen) konnte eine ausreichende Trennung der K-Zellen aus der Zellsuspension erreicht werden. Die Proben

flossen schlecht durch beide getesteten Säulentypen, bei Anwendung von Druck verschlechterte sich die Trenngenaugkeit. Zudem sank die mittlere Intaktheit der eluierten Zellen auf Werte unter 20 %.

Da vermutet wurde, daß die schlechten Fließeigenschaften durch eine zu hohe Viskosität (verursacht durch einen relativ hohen Schleimgehalt) der Proben entstand, wurden die Einzelzellsuspensionen enzymatisch mit Hyaluronidase vorbehandelt. Eine derartige Vorbehandlung blieb jedoch ohne den gewünschten Erfolg. Zudem sank die Intaktheit der Zellen durch diese Behandlung noch weiter.

Im Gegensatz zu Darmzellsuspensionen, die nach dem Auflösen des Zellverbandes nicht komplett aus Einzelzellen bestehen, funktionierte das "MACS"-Verfahren für Einzelzellgemische gut. Eine Anreicherung eosinophiler Granulozyten (1-3 % der Leukocyten) aus Vollblut gelang mit CD 16-gekoppelten Microbeads durch die Depletion neutrophiler Granulozyten nahezu vollständig.

Da mit dem „Magnetic Cell Sorting“ keine nennenswerte Anreicherung der K-Zellen (Anreicherungsfaktor <2) erreicht werden konnte und somit kein Fortschritt gegenüber der bereits existierenden Elutriationsmethode erzielt werden konnte, wurde sie verworfen.

3.3.2 Zellanreicherung mit Dynabeads

Die Trennung mittels Dynabeads erfolgt nicht in einer Säulenmatrix und wurde daher anschließend getestet. Die zu isolierenden K-Zellen sollten mit magnetischen Dynabeads markiert und in einem Magnetfeld von den restlichen Zellen getrennt werden.

3.3.2.1 Auswahl des primären Antikörpers

Unter standardisierten Bedingungen (siehe Versuchsdurchführung unter Punkt 2.3.2.1) wurde zunächst getestet, welcher der zur Verfügung stehenden Antikörper am besten zur Markierung der K-Zellen geeignet war.

Die Versuchsreihen zeigten, daß die Auswahl des verwendeten, primären Antikörpers großen Einfluß auf die Anreicherung der K-Zellen hatte. Antikörper gegen die Oberflächenantigene Syntaxin, Synaptophysin und N-CAM (siehe Tabelle 2-6) führten zu einer nur geringfügigen Anreicherung der K-Zellen (siehe Tabelle 3-3). Im Vergleich zu den Zahlen, die mittels der Elutriationstechnik erzielt werden konnten, konnte mit den Antikörpern gegen Syntaxin und gegen N-CAM keine deutliche Verbesserung der Anreicherung von K-Zellen erzielt werden. Die Anreicherung gelingt mit dem Syntaptophysin-Antikörper (Anreicherungsfaktor 22 ± 8) besser als mit der Elutriationstechnik, mit der für K-Zellen ein maximaler Anreicherungsfaktor von rund 3 erzielt wurde [25].

Die Antikörper gegen humanspezifisches HLA I und HLA II, sowie gegen rattenspezifisches MHC-1 und MHC-2 führten zu keiner effizienten Abreicherung von Epithelzellen. Der Anteil der Zellen in der Fraktion mit den K-Zellen betrug immer noch zwischen 23 und 60 % aller zu Beginn isolierten Zellen. Formal ließ sich nur eine marginale Anreicherung der K-Zellen errechnen (siehe Tabelle 3-4).

Sehr viel effektiver konnten die K-Zellen mit dem Kaninchen anti-Mensch GIP-Antikörper (siehe Tabelle 2-6) markiert werden (siehe Tabelle 3-3). Hierfür ergab sich ein durchschnittlicher relativer K-Zellgehalt von 0,3 % und ein spezifischer Anreicherungsfaktor von 209 ± 32 .

In den Versuchen ergab sich ein umgekehrt proportionales Verhältnis zwischen dem durchschnittlichen relativen K-Zellgehalt und dem entsprechenden spezifischen Anreicherungsfaktor (siehe Abbildung 3-7).

Tabelle 3-3: Anreicherungsfaktoren für K-Zellen bei der Verwendung verschiedener primärer Antikörper. N-CAM = Neural Cell Adhesion Molecule

Antikörper	Typ	Anzahl der Versuche	Verhältnis der Zellzahlen Positivfraktion/ Zellzahl vor Anreicherung	Spezifischer Anreicherungsfaktor
Syntaxin	monoklonaler Maus anti-Ratte IgG ₁	7	3,8 ± 0,8	6 ± 3
Synaptophysin	monoklonaler Maus anti-Ratte IgG ₁	10	3,1 ± 0,6	22 ± 8
N - CAM	monoklonaler Maus anti-Ratte IgG ₁	8	3,4 ± 1,2	12 ± 5
GIP	polyklonaler Kaninchen anti-Mensch IgG	7	0,29 ± 0,04	209 ± 32

Tabelle 3-4: Ergebnisse der Versuche zur Anreicherung der K-Zellen durch Abreicherung von Epithelzellen. MHC-1 = Major Histocompatibility Complex I, MHC-2 = Major Histocompatibility Complex II, HLA I = Human Leucocyte Antigen I, HLA II = Human Leucocyte Antigen II

Antikörper	Typ	Anzahl der Versuche	Verhältnis der Zellzahlen Positivfraktion/ Zellzahl vor Anreicherung	Spezifischer Anreicherungsfaktor
MHC-1	monoklonaler Maus anti-Ratte IgG ₁	3	23 ± 6	1,8 ± 0,4
MHC-2	monoklonaler Maus anti-Ratte IgG ₁	6	27 ± 4	1,5 ± 0,2
HLA I	Dynabead-gekoppelter anti-Mensch IgG ₁	7	31 ± 8	2,2 ± 0,3
HLA II	Dynabead-gekoppelter anti-Mensch IgG ₁	11	60 ± 7	1,5 ± 0,2

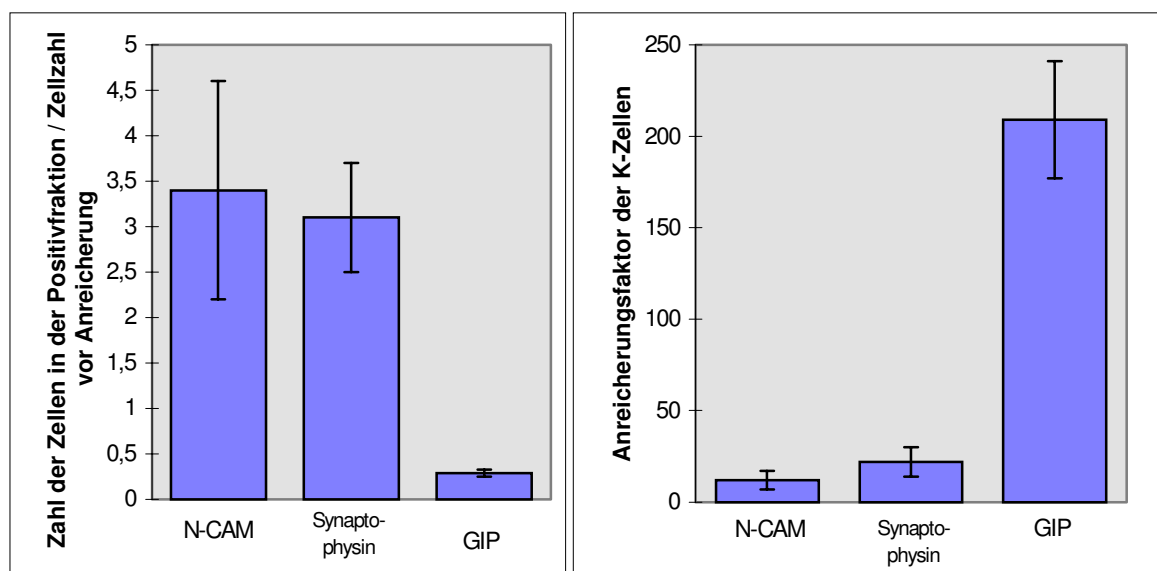


Abbildung 3-7: Relativer K-Zellgehalt im Vergleich zum Anreicherungsfaktor. Dargestellt ist links der relative Gehalt an K-Zellen in der Ausgangsfraktion, der sich nach Anreicherung mit den drei verschiedenen Antikörpern ergibt; rechts der mit den entsprechenden Antikörpern erzielte Anreicherungsfaktor. N-CAM = Neural Cell Adhesion Molecule, GIP = Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide. Die zusätzlichen Linien stellen den Standardfehler der Mittelwerte (SEM) dar.

Da mit dem oben genannten GIP-Antikörper die mit Abstand höchsten Anreicherungsfaktoren erzielt wurden, wurde er für alle weiteren Anreicherungsversuche als primärer Antikörper benutzt.

3.3.2.2 Optimierung der Standardbedingungen

Auswahl zwischen direktem und indirektem Trennverfahren

Bei Tests mit den HLA I und II Antikörpern, die vom Hersteller aus direkt an die Dynabeads gekoppelt waren, konnte nur die direkte Technik eingesetzt werden.

Für alle anderen Antikörper zeigte sich, daß der Einsatz der indirekten Technik im Vergleich zur direkten Technik (siehe Punkt 2.3.2) effektiver war; die spezifischen Anreicherungsfaktoren betragen bei Einsatz der direkten Technik nahe null im Vergleich zur indirekten Technik mit 209 ± 32 .

Dauer der Inkubation mit dem primären Antikörper

Eine 15 bis 30-minütige Inkubationszeit reichte zur Markierung der K-Zellen mit dem primären Antikörper nicht aus. Der spezifische Anreicherungsfaktor lag hierbei unter 2. Hohe Anreicherungsfaktoren (209 ± 32) konnten dagegen bei einer Inkubationszeit von 60 min erzielt werden (siehe Abbildung 3-8). Eine weitere Steigerung der Zeitspanne auf 120 min erbrachte keinen Vorteil; daher wurde die Inkubationszeit bei 60 min belassen.

Verhältnis der eingesetzten Antikörpermenge zur Zellzahl

Im Verlauf der Untersuchungen zeigte sich in Übereinstimmung zu den Empfehlungen des Herstellers (siehe Punkt 2.3.2), daß eine Antikörpermenge von etwa $10 \mu\text{g}$ pro 10^6 Zellen für eine optimale Markierung der K-Zellen sorgte.

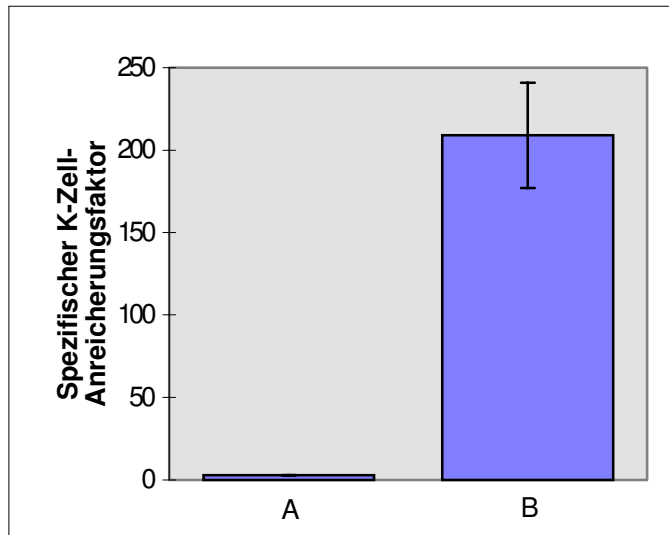


Abbildung 3-8: K-Zellanreicherung in Abhängigkeit von der Dauer der Inkubation mit dem primären Antikörper. Eine Inkubationszeit von 60 min mit dem primären GIP-Antikörper erlaubt im Vergleich zu einer Inkubationszeit von 15 min eine signifikant höhere K-Zellanreicherung. Säule A: Inkubation mit dem primären GIP-Antikörper für 15 min, Säule B: Inkubation mit dem primären GIP-Antikörper für 60 min (sonst identische Bedingungen).

Dauer der Inkubation des sekundären Antikörpers

Bei einer Inkubationszeit des Dynabead-gekoppelten, sekundären Antikörpers von 1 min konnten zwar schon befriedigende Anreicherungen der K-Zellen erzielt werden, d.h. es konnte eine rund 60 %ige Trennung der markierten von den nicht-markierten Zellen erzielt werden und der spezifische Anreicherungsfaktor betrug durchschnittlich 138 ± 82 , die Anreicherungsfaktoren erhöhten sich jedoch ab einer Inkubationszeit von 2 min nochmals. Die besten Ergebnisse brachten 15-minütige Inkubationen. Hierbei konnte ein durchschnittlicher spezifischer Anreicherungsfaktor von 209 ± 32 erzielt werden (siehe auch Abbildung 3-9). Bei allen weiteren Versuchen wurde die Zellsuspension daher 15 min mit den Dynabeads inkubiert.

Als unverzichtbar zur Erzielung hoher Anreicherungsfaktoren erwiesen sich die zwei Waschschrte der Positivfraktion nach der Inkubation. Dadurch konnten nicht-markierte Zellen entfernt werden, die zunächst durch unspezifische Bindungen an markierten Zellen oder Dynabeads angehaftet hatten und dadurch mit den K-Zellen an den Magneten gezogen worden waren.

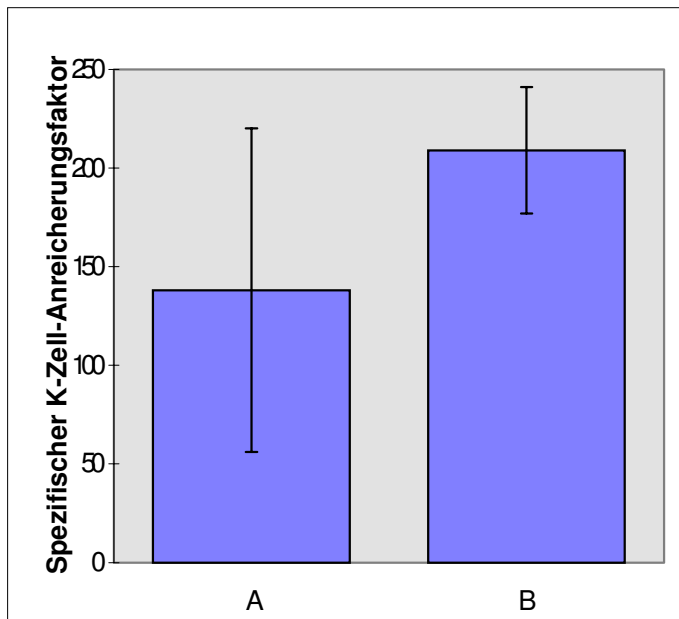


Abbildung 3-9: K-Zellanreicherung in Abhängigkeit von der Dauer der Inkubation mit dem Dynabead-gekoppelten, sekundären Antikörper. Eine Inkubationszeit von 15 min mit dem Dynabead-gekoppelten, sekundären Antikörper bewirkt im Vergleich zu einer Inkubationszeit von 1 min eine (nicht signifikant) höhere K-Zellanreicherung. Säule A: Inkubation mit dem sekundären Antikörper 1 min, Säule B: Inkubation mit dem sekundären Antikörper 15 min (sonst identische Bedingungen).

Verhältnis der Zahl der eingesetzten Dynabeads zur Zellzahl

Für eine ausreichende Markierung der K-Zellen mit den Dynabeads war, wie vom Hersteller angegeben [100], ein Verhältnis von 12:1 optimal.

Durchführung des Verfahrens bei Raumtemperatur

Zur Vermeidung unspezifischer Wechselwirkungen zwischen den Antikörpern und den zu markierenden Antigenen sowie zur Verlangsamung des Zellmetabolismus wurde normalerweise eine Arbeitstemperatur von 4 °C gewählt. Wurden die Anreicherungsversuche bei Raumtemperatur (etwa 22 °C) durchgeführt, so lagen die Intaktheiten der K-Zell-angereicherten Fraktionen etwas niedriger als vorher, der spezifische Anreicherungsfaktor sank auf nahe 0. Daher wurden weiterhin alle Versuche auf Eis ausgeführt.

Vergleich der getesteten Puffersysteme

Um die Intaktheiten der K-Zell-angereicherten Fraktionen weiter zu verbessern, wurden einige Versuche durchgeführt, bei denen der bisher verwendete PBS/EDTA-Puffer durch andere, protektive Lösungen ersetzt wurde. Getestet wurden zwei Lösungen, die für den Einsatz bei Organtransplantationen entwickelt worden waren. Da sich die Zellen aber sowohl in der UW-Lösung als auch in der Euro-Collins-Lösung zu Zellaggregaten zusammenlagerten, wurde die Trennung der Zellen stark beeinträchtigt. Die Lösungen kamen somit für weitere Versuche nicht in Frage. Auch der Einsatz des Kulturmediums DMEM erbrachte keine Erhöhung der Intaktheiten bei gleichem K-Zell-Anreicherungsfaktor.

Zusätzlich zu den oben genannten Lösungen wurde eine kaliumreiche Krebs-Ringer-Lösung getestet. Diese sollte die Zellen bei niedrigen Temperaturen durch eine Blockierung des Natrium- und Kaliumionentransports schützen, bot jedoch keine weitere Verbesserung der Intaktheiten bis zur Beendigung des jeweiligen Versuchs (Ergebnisse nicht dargestellt).

Für alle weiteren Versuche wurde daher der beschriebene EDTA/PBS-Puffer eingesetzt.

Optischer Nachweis der Anreicherung durch Immunfluoreszenz

Die Anreicherung der K-Zellen in den Positivfraktionen sollte auch immuncytochemisch nachgewiesen werden, dies scheiterte jedoch daran, daß der primäre Antikörper aus nur einer Spezies zur Verfügung stand. Dieser bildete Brücken zwischen dem fluoreszierenden, zweiten Antikörper und dem mit Dynabeads gekoppelten Antikörper, so daß alle Dynabeads leuchteten und eine sinnvolle Auswertung der Versuche nicht möglich war.

3.4 Glucose-Stimulierbarkeit der K-Zellen *in vitro*

Durch Stimulationsversuche konnte gezeigt werden, daß die Zellsuspensionen, in denen die K-Zellen stark angereichert worden waren (siehe Punkt 3.3.2), auf einen Glucosereiz (20 mmol/l) mit der Ausschüttung von GIP reagierten, während

bei einer Kontrollfraktion mit gleicher Zellzahl kein GIP im Überstand der Zellen gemessen werden konnte (siehe Abbildung 3-10).

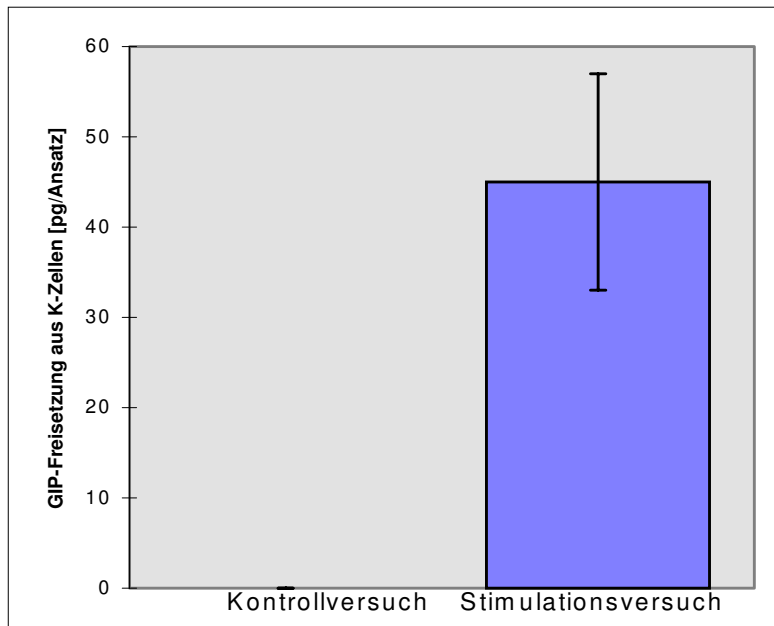


Abbildung 3-10: Stimulation der GIP-Sekretion aus angereicherten K-Zellen. Dargestellt sind die GIP-Gehalte [in pg / Ansatz] der Überstandsfraktion aus den Stimulationsversuchen (stimuliert mit 20 mmol/l Glucose) im Vergleich zu den Gehalten der Überstandsfraktion aus dem Kontroll (Blind-)versuch (mit Pufferzusatz). Die zusätzliche Linie markiert den Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

4 Diskussion

4.1 Lokalisation der K- und L-Zellen

Optik der K- und L-Zellen

Anhand der fluoreszenzgefärbten Darmschnitte konnte gezeigt werden, daß sowohl K- als auch L-Zellen endokrine Zellen vom offenen Typ sind. Diese Ergebnisse bestätigen die Angaben aus der Literatur zum Aussehen der K- und L-Zellen [20,48,49].

Verteilung der K-Zellen über die gesamte Darmlänge

Mit der Immunfluoreszenztechnik (siehe Punkt 2.1.1.2) konnten K-Zellen im Duodenum der Ratte nachgewiesen werden. Die weiteren radioimmunologischen Untersuchungen (siehe Punkt 2.1.2.2) ergaben, daß die Konzentration der K-Zellen vom Duodenum zum proximalen Jejunum ansteigt, dort ein Maximum erreicht und bis zum Ileum wieder abfällt. GIP war über die gesamte Dünndarmlänge nachzuweisen.

Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Beobachtungen überein [24,33,34,117]. Ein anderer Autor fand im Duodenum der Ratte die höchsten GIP-Gehalte, konnte aber ebenfalls K-Zellen über den über den kompletten Darm verteilt nachweisen [35].

Die in den Untersuchungen gefundenen Konzentrationen von $0,98 \pm 0,14$ ng GIP/mg Protein entsprechen in etwa den Werten einer anderen Studie [24], in der die Konzentration von GIP im Dünndarm mit $2,22 \pm 0,26$ ng/mg Protein angegeben wurde.

Die Verteilung der K-Zellen im menschlichen Darm unterscheidet sich leicht von der Verteilung im Rattendarm. Auch beim Menschen wurden im Duodenum [30,31] die höchsten K-Zell-Konzentrationen ermittelt, im Ileum konnten jedoch fast keine K-Zellen mehr nachgewiesen werden.

Verteilung der L-Zellen über die gesamte Darmlänge

Durch Immunfluoreszenzfärbungen auf Darmschnitten konnte GLP-1 im Ileum der Ratte nachgewiesen werden. Im Duodenum waren keine L-Zellen sichtbar.

Die radioimmunologischen Untersuchungen ergaben einen deutlichen Gradienten in der GLP-1-Verteilung entlang des Darms. Die GLP-1-Konzentrationen stiegen vom Duodenum zum Ileum an; nennenswerte Mengen an GLP-1 waren erst im distalen Jejunum meßbar.

Diese Ergebnisse stimmen mit den Angaben aus der Literatur überein [49,74]. Auch EISSELE et al. [50] fanden bei der Ratte vereinzelt L-Zellen im Duodenum ($0,16 \pm 0,09$ Zellen/mm³) und erst ab dem distalen Jejunum erwähnenswerte Mengen an GLP-1 ($10,30 \pm 1,25$ Zellen/mm³); die höchsten L-Zelldichten fanden sie bei der Ratte im Colon transversum ($15,49 \pm 4,64$ Zellen/mm³).

Im Gegensatz zu einer früheren Arbeit [74] wurden insgesamt um etwa Faktor 200 höhere GLP-1-Konzentrationen in allen Darmabschnitten gemessen.

Beim Menschen wurden übereinstimmend die höchsten GLP-1-Konzentrationen im distalen Dünndarm und Colon gefunden. Während SJÖLUND et al. [31] und NAUCK et al. [65] die höchste L-Zellkonzentration beim Menschen im Ileum nachgewiesen haben, zeigten EISSELE et al. [50] eine Verteilung der L-Zellen mit zwei Maxima auf: eines im distalen Jejunum und eines im Rectum. Über das Vorkommen von L-Zellen im menschlichen Duodenum existieren gegensätzliche Aussagen [36,50].

Lokalisation der K-Zellen entlang der Krypt-Villus-Achse

Mittels radioimmunologischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß sich die GIP-produzierenden K-Zellen bei der Ratte vor allem in der oberen Villushälfte befanden. Ein Vergleich mit Daten aus der Literatur ist schwierig, da bisher kaum Untersuchungen an Ratten vorliegen. SMITH [36] fand, daß GIP bevorzugt in Krypten, aber auch in Villi lokalisiert war, PEDERSON et al. [117] beobachteten eine gleichmäßige Verteilung der K-Zellen über Krypten und Villi. Im Gegensatz

dazu stellten ROTH et al. [118] bei Mäusen fest, daß sich die K-Zellen zu 75 % auf den Villi befanden.

Auch beim Menschen gibt es widersprüchliche Befunde. Eine bevorzugte Lokalisation der K-Zellen in den Krypten fanden SJÖLUND et al. [31] und RÖNNBLOM et al. [32]. POLAK et al. [30] wiesen die K-Zellen vor allem im mittleren Teil der Krypten, im Duodenum aber auch auf Villi nach und BUCHAN et al. [20] beobachteten die GIP-Zellen primär in den oberen Krypten und Villi.

Lokalisation der L-Zellen entlang der Krypt-Villus-Achse

Auch zur Lokalisation der L-Zellen entlang der Krypt-Villus-Achse liegen bisher wenige Untersuchungen vor. Diese stimmen allerdings mit den hier gefundenen Ergebnissen überein. Sowohl bei der Ratte [31,36] als auch beim Menschen [31,32] befinden sich die L-Zellen bevorzugt in den Krypten des Darms.

Zuverlässigkeit der vorliegenden Ergebnisse

Die Verteilung der K- und L-Zellen entlang des gesamten Darms und entlang der Krypt-Villus-Achse wurde in dieser Arbeit im Gegensatz zu anderen Arbeiten nicht nur durch ein Auszählen immunfluoreszenzmarkierter Zellen untersucht. Die Zellen wurden hier mit der Ausschütteltechnik, die eine durch die Markerenzyme nachgewiesene Trennung von Villus- und Kryptzellen erlaubt, lokalisiert und die Zellprodukte durch einen Radioimmunoassay quantifiziert.

Ein Auszählen angefärbter Zellen alleine ist unzuverlässig und kann nie repräsentativ sein, da auf diese Weise nur ein winziger Teil des zu untersuchenden Probenmaterials erfaßt werden kann. Gezielte Methoden, bei denen die gesamte Probe erfaßt wird und deren quantitative Ergebnisse durch den Einsatz eines Radioimmunoassays abgesichert wurden - wie in dieser Studie - sind zuverlässiger.

Nahrungseinflüsse

Sowohl die Zahl und Verteilung der enteroendokrinen Zellen im Darm der Ratte, als auch die Freisetzung ihrer Zellprodukte wird durch die Art der Nahrung, die Darmflora und deren Wechselwirkungen beeinflusst [29,35,119,120]. Da die in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Ratten gesund waren, freien Zugang zu Nahrung hatten, mit einer standardisierten Nahrung gefüttert und unter identischen Bedingungen gehalten wurden, sind Einflüsse innerhalb der Studie auszuschließen.

Unterschiede in der Verteilung der K- und L-Zellen bei Ratte und Mensch

Prinzipiell weisen Ratte und Mensch in der Verteilung ihrer K- und L-Zellen ähnliche Gradienten auf, doch kleine Unterschiede existieren: Die K- und L-Zellen kommen bei der Ratte im Gegensatz zum Menschen im gesamten Darm vor, sind also weiträumiger verteilt und die maximale Konzentration an K-Zellen befindet sich im Rattendarm distaler als im humanen Darm. Darauf soll später (siehe Punkt 4.6.2) noch eingegangen werden.

4.2 Isolation der K-Zellen

Vergleich der getesteten Methoden mit Ergebnissen aus der Literatur

Intaktheiten wie bei SAIFIA et al. [62] (über 90 %) konnten mit der getesteten mechanischen Isolationsmethode nicht erreicht werden. Das könnte daran liegen, daß es nicht möglich war, technisch identische Versuchsbedingungen zu erzeugen. Wahrscheinlicher ist aber, daß die Zellen aus den Villusspitzen empfindlicher auf mechanische Reize reagieren als die zunächst noch eine Weile im Zellverband vorliegenden Kryptzellen, die SAIFIA et al. isoliert hatten. Auch andere Autoren haben für Epithelzellen, die mit mechanischen Verfahren isoliert wurden, schlechte Intaktheiten (< 10 %) beschrieben [94].

Im Gegensatz dazu erzielten PERRET et al. [88] bei der Isolation von Colon-Epithelzellen mit einer mechanischen Methode gute Ergebnisse (Ausbeute $4,0 \times 10^6$ Zellen mit einer Intaktheit von über 90 %). Auch aufgrund eigener Tests

kann vermutet werden, daß Colonzellen auf mechanischen Streß weniger empfindlich reagieren als Zellen aus dem Duodenum und Jejunum der Ratte.

Bei Versuchen zur Isolation von Epithelzellen aus dem proximalen Dünndarm der Ratte mit enzymatischen Methoden wurden - im Gegensatz zu den eigenen Versuchen - bereits gute Ergebnisse erzielt [89,121]; die durch Collagenase-Verdau gewonnenen Zellsuspensionen zeichneten sich sowohl durch hohe Zellgehalte (größer $1,5 \times 10^7$ Zellen pro 20 cm Darm) als auch durch hohe Intaktheiten (mehr als 90 %) aus. Allerdings bestanden die Suspensionen nicht nur aus Einzelzellen, sondern auch aus vielen Zellverbänden. Außerdem bringt ein Collagenase-Verdau unvorhersehbare Risiken bezüglich der Intaktheit der Antigene auf den Zelloberflächen mit sich. Für die Anreicherung endokriner Zellen durch immunomagnetische Methoden würde die enzymatische Zellisolation somit keine gute Grundlage bilden.

In Übereinstimmung mit den vergleichenden Untersuchungen von EADE et al. [94] konnten auch in dieser Arbeit die besten Ergebnisse durch Inkubation der Därme in hyperosmolarem Chelatpuffer erzielt werden. Aus dem Duodenum und proximalen Jejunum der Ratte konnten durchschnittlich $3,1 \pm 0,3 \times 10^6$ Zellen mit einer Intaktheit von 81 ± 1 % gewonnen werden. Durch das relativ schonende Verfahren wurden vor allem Zellen aus den Villi gelöst (Ergebnisse nicht dargestellt); die Zahl der isolierten Zellen war dadurch im Vergleich zu anderen Arbeiten eher gering [91]. Dies war für den weiteren Versuchsablauf allerdings auch wünschenswert, weil sich die zu isolierenden K-Zellen in der oberen Hälfte der Villi befinden und somit gleichzeitig weniger verunreinigende Zellen aus dem Zellverband gelöst wurden. Berücksichtigt man, daß Rattendarm als Untersuchungsmaterial besonders autolyseempfindlich ist [122], so ist die erzielte Intaktheit sehr positiv zu beurteilen. Sie ist in jedem Fall ausreichend für die sich anschließenden Anreicherungsversuche.

Der Zeitrahmen zur Inkubation des Darms scheint klar begrenzt zu sein. Bei einer Inkubationszeit deutlich unter 30 min wurden zu wenige Zellen aus dem Zellverband gelöst, mit einer über 30 min zunehmend längeren Inkubationszeit sank die Intaktheit der gewonnenen Zellen stetig.

Einige Gründe scheinen für eine Inkubation der Rattendarms bei 4 °C zur Zellisolation zu sprechen [91], z.B. der Erhalt instabiler mRNA-Transkripte und daraus entstehender Proteine, der bessere Erhalt der strukturellen Integrität der Einzelzelle und die Verhinderung der Internalisierung von Oberflächenrezeptoren. Dennoch wurden in dieser Arbeit mit einer Inkubation bei 37 °C bezüglich der Zellzahlen und der Intaktheit der Zellen bessere Ergebnisse erzielt als bei der Durchführung bei 0 °C. Für die weitere Versuchsdurchführung wurde in Übereinstimmung mit EADE et al. [94] und FLINT [91] eine Temperatur von etwa 4 °C gewählt.

Die Begasung der Zellsuspension stellte offenbar keinen zusätzlichen mechanischen Streß für die Zellen dar; im Gegenteil: die Zellen *benötigten* die Begasung bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C vermutlich sogar, um die Zellatmung in ausreichendem Maße aufrecht zu erhalten.

Ein Glutaminzusatz, der sich insbesondere protektiv auf Zellen aus dem Darm auswirken kann, da Glutamin in der Lage ist, in hohem Maße zu deren Energieversorgung beizutragen (siehe Übersichtsartikel [123,124]), hat hier offenbar kurzfristig keinen positiven Einfluß auf die Intaktheit der Zellen.

Besondere Vorteile der gewählten Methode

Die Zellisolation durch Einsatz des hyperosmolaren Chelatpuffers bietet für die weitere Versuchsdurchführung eine Reihe von Vorteilen:

1. Die Methode ist im Vergleich zu den anderen dargestellten Verfahren zellschonend.
2. Insbesondere im Vergleich zur enzymatischen Zellisolation werden die Proteine auf der Zelloberfläche, die für eine spätere immunologische Markierung benötigt werden, kaum geschädigt.
3. Die resultierende Zellsuspension besteht - im Gegensatz zu einer durch enzymatischen Gewebeverdau gewonnenen Suspension - weitgehend aus intakten Einzelzellen (wozu auch DTT im Inkubationspuffer [125] und EDTA im

Auffangpuffer beitragen). Dies macht eine immunomagnetische Zellanreicherung als nächsten Schritt erst möglich.

4. Im Vergleich zu anderen Chelatoren wie EDTA oder EGTA (Ergebnisse nicht dargestellt; siehe auch [94]) greift Natriumcitrat die Zelloberflächen weniger an, was sich in vergleichsweise höheren Intaktheiten ausdrückte.

Grenzen der Methode

1. Wie auch andere Verfahren bedeutet die Einwirkung des Chelatpuffers Streß für die Zellen. Durch die zur Isolation benötigte, unphysiologisch hohe Osmolalität der Lösung (siehe Punkt 2.2.3) ist eine gewisse Zellschädigung nicht auszuschließen, die sich nach Anreicherung der Zellen noch negativ auswirken könnte.
2. Eine relativ geringe Ausbeute an Zellen ist zwangsläufig gegeben, wenn seltene Zellen in hoher Reinheit angereichert werden und ist nicht negativ zu bewerten (siehe oben). Zur Steigerung der Zellausbeute kann im Bedarfsfall eine höhere Anzahl an Därmen eingesetzt werden.

4.3 Anreicherung der K-Zellen

4.3.1 Zellanreicherung durch Magnetic Cell Sorting (MACS)

Vor- und Nachteile der Zellanreicherung durch „MACS“

Die „MACS“-Beads sind extrem klein und verursachen bei Zellen daher kaum mechanischen Streß. Bei Einzelzellgemischen sind Trennungen mit hoher Reinheit und Intaktheit der zu isolierenden Zellen möglich, wie auch durch die Anreicherung eosinophiler Granulozyten aus Vollblut gezeigt werden konnte (siehe Punkt 3.3.1). Zudem könnten Zellen mit auch mit anhaftenden MACS-Microbeads, zunächst im Tierversuch, transplantiert werden, da ein Embolierisiko aufgrund der geringen Größe der Partikel sehr unwahrscheinlich ist.

Für visköse Proben ist die „MACS“-Technik offenbar nicht geeignet. Die Zellsuspension durchlief die Trennsäule nicht wie gewünscht. Eine Anwendung

von Druck auf die Säule ist vom Hersteller nicht vorgesehen und für den Trennungsvorgang nicht förderlich, da zum einen markierte und in der Matrix haftende Zellen direkt wieder aus der Säule herausgedrückt werden und zum zweiten die Intaktheit der Zellen durch die mechanische Belastung sinkt. Da das Verfahren somit für die untersuchte Anwendung ungeeignet ist, wurde auf eine weitere Erprobung der immunomagnetischen Zellseparation mit dieser Technik verzichtet.

4.3.2 Zellanreicherung mit Dynabeads

Bisherige Anreicherungsversuche endokriner Zellen

Bisher wurde zur Anreicherung endokriner Zellen aus Dünndarm meist das Elutriationsverfahren genutzt [62,96,25,93,98,97]. Die mit dieser Technik erzielten Anreicherungsfaktoren waren jedoch durchgängig niedrig (siehe Tabelle 4-1) und lagen im Bereich einer 2 bis 13fachen Anreicherung der gewünschten Zellen.

Tabelle 4-1: Durch Elutriation erzielte Anreicherungen endokriner Zellen. CCK = Cholecystokinin, GIP= Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide, GLP-1 = Glucagon-Like Peptide-1

Autor	Untersuchte Spezies	Untersuchter Darmabschnitt	Angereicherte Zellart	Anreicherungsfaktor
SAIFIA et al.[62]	Ratte	Ileum	L-Zellen (GLP-1)	6 bis 7
BUCHAN et al. [96]	Hund	Ileum	L-Zellen (GLP-1)	4 bis 5
KIEFFER et al. [25]	Hund	Duodenum/Jejunum	K-Zellen (GIP)	3
POITRAS et al. [93]	Hund	Duodenum/Jejunum	K-Zellen (GIP)	6,6
XUE et al. [98]	Hund	Duodenum	S-Zellen (Sekretin)	13
KOOP et al. [97]	Hund	Jejunum	I-Zellen (CCK)	2,4

Durch gezielte anschließende Kultivierung konnten KIEFFER et al. [25] K-Zellen aus Hundeduodenum und -jejunum bis zu 100fach anreichern. Etwa 10 % der Zellen in Kultur waren nach Auswertung durch ein immunoenzymatisches Färbeverfahren (PAP-Färbung) K-Zellen.

Anteil der K-Zellen an der Gesamtzellzahl

SJÖLUND et al. [31] gaben die Anzahl endokriner Zellen im menschlichen Darm mit 3×10^9 Zellen an. POITRAS et al. [93] fanden heraus, daß der Anteil aller endokriner Zellen im Hundeduodenum und -jejunum nach rund fünffacher Anreicherung 4,4 % aller Zellen ausmacht. Somit läge der Anteil endokriner Zellen im Darm bei etwa 0,9 %. Bezogen auf die Angaben von SJÖLUND et al. [31] hieße das, daß die gesamte Zellzahl im menschlichen Darm bei etwa $3,3 \times 10^{11}$ Zellen liegt. Die Anteile der K-Zellen an der Zahl endokriner Zellen betragen nach einer Auszählung immunhistochemisch angefärbter Gewebeschnitte im menschlichen Duodenum rund 19 % und im Jejunum rund 15 % [31]. Somit läge der Anteil der K-Zellen im menschlichen Duodenum und Jejunum bei 0,1 bis 0,2 %.

Diese Rechnung soll als grober Richtwert für die weiteren Überlegungen dienen, zumal diese Zahlen in guter Übereinstimmung mit den Angaben von KIEFFER et al. [25] stehen, die für K-Zellen im Hundejejunum einen Anteil von kleiner 0,1 % angegeben haben.

Anreicherung der K-Zellen mit Dynabeads

Die Antikörper gegen Zellmembranbestandteile anti-Syntaxin und anti-N-CAM erbrachten gegenüber der Elutriationstechnik keine deutliche Verbesserung in der Anreicherung von K-Zellen. Eine neuere Studie [126] hat aufgezeigt, daß Synaptophysin weniger mit GIP, sondern eher mit Serotonin colokalisiert ist. Demnach ist Synaptophysin, wie vermutlich auch Syntaxin und N-CAM, eher ein allgemeiner endokriner Zellmarker. Unter diesem Aspekt ist der mit dem anti-Synaptophysin-Antikörper erzielte Anreicherungsfaktor von 22 ± 8 sogar besonders positiv zu bewerten. Diese Zahl liegt noch deutlich über den mit der Elutriation erzielten Ergebnissen. Der Antikörper muß demnach die endokrinen Zellen besonders effektiv markiert haben.

Mittels HLA I- oder HLA II-Antikörpern konnte keine gezielte Abreicherung der Epithelzellen erreicht werden. Das ist nicht allzu überraschend, da bei dieser Art der Antigene spezieabhängige Unterschiede bestehen, so daß die Markierung der Epithelzellen vermutlich zu unspezifisch erfolgte.

Allerdings war die Abreicherung der Epithelzellen auch mit den Maus anti-Ratte MHC-1- oder MHC-2-Antikörpern nicht möglich. Hierbei könnte eine Rolle spielen, daß die Zahl der K-Zellen im Vergleich zu den sie in Suspension umgebenden Epithelzellen zu gering war, so daß die Trennung nicht in ausreichendem Maße erfolgen konnte. Wahrscheinlicher ist jedoch, daß der zu Beginn der Studie angestellte Analogieschluß, daß die endokrinen Zellen der Ratte - im Gegensatz zu den Dünndarmepithelzellen - wenig oder gar nicht MHC-1 und MHC-2 exprimieren, nicht zutreffend war.

Sehr erfolgreich verlief die Anreicherung der K-Zellen mit dem Kaninchen anti-Mensch GIP-Antikörper. Der mit diesem Antikörper erzielte Anreicherungsfaktor liegt mit 209 ± 32 weit über den mit der Elutriationstechnik erzielten Faktoren.

Geht man davon aus, daß der Anteil isolierter K-Zellen in der Zellsuspension rund 0,2 % beträgt, was aufgrund der vorher angestellten Rechnung und der Tatsache, daß bei der hier verwendeten Isolationsmethode vor allem Villuszellen isoliert werden, wahrscheinlich ist, so bedeutet ein 209-facher Anreicherungsfaktor, wie er mit dem Kaninchen anti-human GIP-Antikörper erzielt wurde, eine ungefähr 42 %ige K-Zellsuspension. Der Anteil der Zellen in der Positivfraktion an der Gesamtzellzahl lag bei den Versuchen bei durchschnittlich 0,3 %. Es ist davon auszugehen, daß nahezu alle K-Zellen aus dem Zellverband in den Villusspitzen gelöst werden konnten und rund 0,1 % Epithelzellen die K-Zellsuspension verunreinigten.

Diese Rechnung kann ebenfalls nur einen groben Richtwert für die Reinheit der erzielten K-Zellsuspension darstellen, weil Vergleichswerte für die Ratte in der Literatur bisher nicht publiziert sind und eine Überprüfung dieses Ergebnisses durch ein Anfärben der K-Zellen mittels Immunfluoreszenzfarbstoffen technisch nicht möglich war (siehe 3.3.2.2).

Eine Erklärung, warum ausgerechnet ein Antikörper gegen das Zellprodukt GIP im Inneren der K-Zelle die besten Anreicherungsfaktoren ermöglichte, liefert möglicherweise die Studie von WYNICK und BLOOM [127]. Zur Markierung Prolactin-produzierender Adenohypophysenzellen erzielten sie spezifische

Markierungen mit einem Prolactin-Antikörper und vermuteten daraufhin, daß die Granula der Zellen unter den gegebenen Bedingungen (4 °C) teilweise in der Zellmembran verankert blieben und so ihre Produkte an den Zelloberflächen präsentiert wurden. Der gleiche Mechanismus wäre auch für die K-Zellen denkbar.

Daß auch ein humanspezifischer GIP-Antikörper in der Lage ist, die Antigene der Ratte zu markieren, ist nicht weiter verwunderlich, da sich, wie in der Einleitung beschrieben (siehe Abbildung 1-2), die Peptidsequenzen des GIP bei Ratte und Mensch nur in zwei Aminosäuren mit jeweils konservativem Austausch unterscheiden.

Vorteile einer Zellanreicherung mit Dynabeads

Im Gegensatz zur „MACS“-Technik sind die Dynabeads säulenunabhängig anzuwenden. Die Zellen sind in Lösung freier beweglich und dadurch besser trennbar; einen Zellverlust durch in der Säule haftende Zellen gibt es nicht. Im Vergleich zur Elutriationstechnik ist die neue Methode sehr viel spezifischer. Beiden Methoden gegenüber ist die Zellanreicherung mit Dynabeads deutlich einfacher durchzuführen.

Grenzen der Methode

1. Die Trennung mittels Dynabeads bedeutet in jedem Fall einen mechanischen Streß für die Zellen [128].
2. Der Zellgehalt in der Positivfraktion ist durch den geringen K-Zell-Anteil bei Verwendung eines Rattendarms extrem gering. Damit wird auch die Auszählung der Zellen schwierig und ungenau. Der Variationskoeffizient betrug 15 %.
3. Die geringe Zellzahl wird auch bei weiterführenden Versuchen zu Problemen führen. Daher sollte trotz gegebenenfalls geringerer Aussage für weiterführende Versuche mehr als ein Rattendarm pro Versuch verwendet werden.
4. Trotz der Waschschrte gelingt keine 100 %ige Abtrennung der K-Zellen von Epithelzellen. Aus diesem Grund ist auch die Intaktheit speziell der endokrinen

Zellen in der Suspension nicht isoliert zu beschreiben, da die K-Zellen unter dem Lichtmikroskop von den Epithelzellen nicht zu unterscheiden sind.

5. Für die Anreicherung menschlicher K-Zellen müßten die für Rattenzellen optimierten Bedingungen überprüft und gegebenenfalls modifiziert werden.

Zusammenfassung

Im Vergleich mit den bisher mittels Elutriation durchgeführten Anreicherungsversuchen zeichnet sich das immunomagnetische Verfahren mit Dynabeads bei Verwendung eines optimalen ersten Antikörpers durch bisher noch nicht erzielte spezifische Anreicherungsfaktoren und Reinheitsgrade der K-Zellsuspension aus. Die Anwendung dieses Trennverfahrens verlief für die K-Zellen so erfolgreich, daß nun auch denkbar ist, es für die Isolation anderer endokriner Zellen einzusetzen.

4.4 Glucosesensitivität der K-Zellen

Nach oraler Glucosezufuhr (Größenordnung 25 bis 75 g) steigt der GIP-Plasmaspiegel bei Menschen signifikant an [27,80,129]. Gleiches gilt für die Ratte [29]. Auch eine K-Zell-angereicherte Zellsuspension in Kultur ließ sich mit Glucose stimulieren: ab einer Glucosekonzentration von 15 mmol/l konnte eine signifikante Freisetzung von GIP in das Kulturmedium gemessen werden. Möglicherweise hemmte hierbei das nicht aus dem Medium entfernte Produkt GIP eine intensivere Ausschüttung bei niedrigeren Glucosekonzentrationen, wie sie physiologisch gewesen wären (kleiner 20 mmol/l) [25].

Diese Ergebnisse bestätigen die Befunde dieser Arbeit, bei denen eine Stimulation der GIP-Ausschüttung aus K-Zellen durch Glucose in einer Konzentration von 20 mmol/l gezeigt werden konnte. Damit wurde auch nachgewiesen, daß die mit dieser Methode angereicherten Zellen nicht nur morphologisch intakt, sondern auch funktionell aktiv waren. Es sollen nun weitere Studien durchgeführt werden, in denen die Glucose-Sensitivität der K-Zellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* genauer charakterisiert werden soll.

4.5 Ausblick auf die Fortführung der Versuchsplanung

Nach Anreicherung der K-Zellen gibt es zur weiteren Planung mehrere Ansätze:

1. Betrachtet man die Isolation und Anreicherung der K-Zellen in erster Linie als Grundlagenforschung, so wäre der nächste wichtige Schritt die Kultivierung der K-Zellen, um schließlich eine möglichst reine K-Zellkultur funktionell charakterisieren zu können. Untersucht werden sollten die Hauptstimulatoren der Sekretion *in vitro*, die Sättigungskinetiken und ob es andere Modulatoren der Stimulation gibt. Ebenso sollte die intrazelluläre Signalkette der GIP-Sekretion näher untersucht werden. Mit Hilfe reiner Kulturen könnten erstmals definitive Aussagen zum Metabolismus der K-Zellen getroffen werden. Parallel sollten die Zellen wie geplant mit dem Proinsulingen transfiziert werden.
2. Wichtig wäre außerdem auszutesten, wie sich die isolierten und angereicherten K-Zellen verhalten, wenn man sie in einen lebenden Organismus implantiert. Zu klären wäre der optimale Ort zur Infusion der Zellen. Die Zellen müßten dort anhaften und ihre Funktion aufrecht erhalten können.
3. Als Alternative zu einer Kultivierung der Zellen mit anschließender Transfektion des Insulingens ist auch eine direkte Transfektion der Zellen in Suspension mit anschließender Transplantation denkbar.
4. In jedem Fall sollten die Dynabeads zunächst von den Zellen gelöst werden, da sie sonst sowohl in Kultur als auch bei einer Transplantation Schwierigkeiten bereiten könnten.

Ablösen der Dynabeads von den K-Zellen

An K-Zellen anhaftende Dynabeads sollten entfernt werden, da sie bei einer Transplantation zu Mikroembolien führen, bzw. in Kultur die Durchführung der weiteren Untersuchungen behindern könnten.

Nach Angabe des Herstellers [100] lösen sich die Dynabeads über Nacht von den isolierten Zellen. Für eine Kultivierung sollten demnach keine Schwierigkeiten zu erwarten sein. Für eine direkte Transfektion mit anschließender Transplantation müßte eine „Wartezeit“ eingehalten werden.

Direkte Transfektion des Proinsulingens in Zellen in Suspension

Eine direkte Transfektion des Insulingens in K-Zellen in Suspension verbunden mit einer anschließenden Transplantation der Zellen in Ratten ermöglicht zumindest rasche erste Aussagen über das Verhalten der transfizierten Zellen *in vivo*. Eine ähnliche Herangehensweise ist für Humanstudien selbstverständlich ausgeschlossen, da sie hierfür mit einem viel zu hohen Risiko verbunden ist.

Kultur von K- Zellen

Abgesehen von dem geplanten Projekt ist eine Kultivierung von K-Zellen für die Grundlagenforschung von Interesse. Die Kultivierung von K-Zellen scheint allerdings mit vielen Problemen verbunden zu sein:

Bei einem bisherigen Versuch zur Kultivierung von K-Zellen aus Hundedünndarm überlebten die ausgesäten Zellen (10% K-Zellen) in Kultur zwei Tage [25]. Leider sind die Aussagen der Versuche bezogen auf das aktuelle Projekt begrenzt, da die verwendete Suspension zu 90 % aus Nicht-K-Zellen bestand und die Ergebnisse nicht ohne weiteres auf Versuche mit Rattendarm übertragbar sind, weil Rattendarmzellen noch wesentlich empfindlicher als Zellen aus Hundedarm auf äußere Einflüsse reagieren [122].

Weitere Versuche zur Kultivierung von Darmzellen der Ratte beschäftigten sich in der Regel mit Epithelzellen, die auf Dauer in Kultur zu halten bisher auch noch nicht gelungen ist. Die Intaktheit ausgesäter Einzelzellen sank innerhalb von Stunden rapide ab und auch als kleine Zellverbände in Kultur genommene Zellen überlebten nur wenige Tage aufgrund der mangelnden Versorgung der im Inneren gelegenen Zellen. Auch der Einsatz von fetalem oder neonatalem Dünndarm und Gewebekulturversuche waren bisher wenig erfolgreich (Übersichtsartikel [130]).

Ein ganz entscheidender Grund für das Scheitern bisheriger Versuche könnte darin liegen, daß die Zellen auf gewisse Faktoren aus der Basalmembran und aus anderen Zellen angewiesen sind.

BENYA et al. [131] stellten fest, daß bei Colonocyten aus Kaninchendarm Kontakte innerhalb der Darmepithelzellen wichtig für deren Intaktheit (und damit die Kultivierbarkeit) waren. BOUDREAU et al. [132] kamen wenig später zu dem Schluß, daß die extrazelluläre Matrix der Basalmembran integrinabhängig die Apoptose in Epithelzellen in Kultur und *in vivo* hemmt. 1997 beobachteten HAGUE et al. [133], daß humane Colonepithelzellen von Zellkontakten und verschiedenen Wachstumsfaktoren (wie IGF I+II, EGF, Insulin und Hydrocortison), die die Apoptose verhindern können, abhängig sind.

Daß der Zellkontakt und der Kontakt der Zellen zur Basalmembran offenbar so extrem wichtig sind, könnte für die geplante Kultivierung zu Problemen führen, da Einzelzellsuspensionen für die Isolation und Anreicherung der K-Zellen nach der erfolgreich getesteten Methode nötig sind.

Ein Lösungsansatz hierfür könnte in der Verwendung von Biomatrix EHS liegen. Diese Substanz simuliert quasi die natürliche Basalmembran in Kultur und unterstützt die Anheftung und das Zellwachstum auf dem Substrat [134]. Die optimale Formulierung des Kulturmediums wäre neu zu erarbeiten.

Ein weiteres Problem für die Kultivierung der K-Zellen könnte darin bestehen, daß die Zellen in Kälte isoliert und angereichert wurden. Diese Art der Aufarbeitung ist unumgänglich, bedeutet aber vermutlich großen Streß für die Zellen, der sich bei der anschließenden Kultivierung negativ auf die Intaktheit der Zellen auswirken könnte. Viele Autoren beschreiben Zellschädigungen bis hin zur kälteinduzierten Apoptose bei der Reperfusion von Geweben nach kalter Aufbewahrung bei Transplantationsversuchen oder nach Kälteexposition von Einzelzellen in Kultur [135,136,137,138,139].

Auch die geringen Arbeitsvolumina der Anreicherungsversuche könnten bei Kultivierungsversuchen Probleme bereiten. In kleinen Volumina wirken sich Konzentrationsveränderungen durch die Verdunstung von Kulturmedium stärker aus. Hierbei könnte allerdings die gleichzeitige Präparation mehrerer Rattendärme zur Gewinnung einer größeren Zellzahl an K-Zellen Abhilfe schaffen.

Weitere Voraussetzungen für die Transplantation der K-Zellen

Ganz entscheidend für die Fortführung der Versuche wird es sein, genaue Informationen über die Überlebenszeit der K-Zellen *in vitro* und *in vivo* zu gewinnen. Im lebenden Organismus wandern Darmepithelzellen von den Krypten bis zu den Villi und werden dort bei der Ratte nach 2 bis 3 Tagen abgestoßen [17]. Zu klären ist nun, wie lange Darmepithelzellen generell unter optimierten Bedingungen überleben können und ob die gleichen Daten auch für K-Zellen zutreffen. Zu klären ist auch, inwieweit sich die Transfektion auf die Überlebenszeit der K-Zellen auswirkt.

Wenn die Überlebenszeit der K-Zellen auf wenige Tage begrenzt bleibt, ist es sinnlos, die gentechnisch veränderten Zellen zu transplantieren, da sie ihre Funktion dann nicht lange genug erfüllen könnten. Für den erfolgreichen Einsatz der K-Zellen als β -Ersatzzellen muß außerdem sichergestellt werden, daß die Zellen ihre Funktion dauerhaft aufrechterhalten. Außerdem sollten Komplikationen im Organismus vor einer Transplantation ausgeschlossen werden können, da es praktisch nahezu unmöglich ist, die Zellen nach der Transplantation zu lokalisieren und zu entfernen.

Ein weiteres Problem könnte in der Isolation einer ausreichenden Menge an K-Zellen zur Transplantation bestehen. Bei einer Biopsie können aufgrund des geringen Vorkommens der K-Zellen nur wenige Zellen gewonnen werden. Diese sind dann aber ausdifferenziert und somit nicht mehr teilungsfähig.

Dieses Problem könnte dadurch gelöst werden, daß man sich nicht um die Isolation der differenzierten K-Zellen bemüht, sondern darum, ihre noch undifferenzierten Vorläuferzellen zu gewinnen. Diese machen zwar auch nur weniger als 0,1 % der Zellen im Darm aus [130], sind aber teilbar [19] und mit hoher Effizienz zu transfizieren [140]. Man könnte sie isolieren, anreichern und *in vitro* vermehren, um sie dann zu transfizieren. Vorab müßte allerdings sichergestellt werden, aus welchen der Stammzellen die K-Zellen hervorgehen.

4.6 Die Signalkette zwischen K- und L-Zellen

4.6.1 Erkenntnisse aus der Literatur

Der „enteroendokrine Loop“

ROBERGE und BRUBAKER [57] fanden 1991 heraus, daß eine Fettinfusion in das Duodenum der Ratte eine qualitativ und quantitativ gleichartige Erhöhung des Plasmaspiegels an GLP-1 hervorruft wie eine direkte Infusion in das Ileum. Sie stellten die Vermutung an, daß ein humoraler oder neuraler Faktor diese Wirkung vermitteln könnte und nannten als Kandidaten dafür bereits GIP.

Ein „*enteroendokriner Loop*“ könnte auch die Tatsache erklären, daß die Plasmakonzentrationen an GLP-1 schon wenige Minuten nach einer Nahrungszufuhr ansteigen, lange bevor die Nährstoffe eine ausreichende Menge an L-Zellen erreichen können [47].

An fetalen Ratten-Darmzellkulturen konnte BRUBAKER [58] einen dosisabhängigen, stark stimulierenden Effekt von GIP auf L-Zellen ab einer Konzentration von 10^{-10} mol/l nachweisen. Weder Cholecystokinin, Neurotensin noch Peptide YY zeigten ähnliche Eigenschaften, doch das neurokrine Gastrin-Releasing Peptide (GRP) stimulierte die GLP-1-Sekretion ebenfalls ab einer Konzentration von 10^{-12} mol/l signifikant.

1992 postulierten ENSINCK und D'ALESSIO [75] eine Schleife zwischen Duodenum und Ileum beim Menschen zur GLP-1-Freisetzung. Zur gleichen Folgerung kamen ROBERGE und BRUBAKER 1993 [46] nach ihren *in vivo* Studien an Ratten. Sie konnten zeigen, daß eine nahrungsinduzierte GIP-Freisetzung zur einer Stimulation der GLP-1 Sekretion führt und formulierten das Konzept des „*enteroendokrinen Loops*“. Dabei kamen sie bereits zu dem Schluß, daß hinsichtlich der Peptide, die in diese Schleife involviert sind, Speziesunterschiede bei Hund, Mensch und Ratte bestehen könnten.

PLAISANCIE et al. [47] konnten am isolierten, perfundierten Rattencolon zeigen, daß verschiedene Neuropeptide und Neurotransmitter (Bombesin, Isoproterenol, Calcitonin gene-related Peptide (zum Vergleich [58])) potente Stimulatoren der GLP-1-Freisetzung sind und bestätigten Unterschiede in deren Wirksamkeit zwischen Ratten und anderen Spezies.

Daß eine nahrungsinduzierte GLP-1-Freisetzung nicht zwingend mit einer Erhöhung des GIP-Plasmaspiegels einhergehen muß, konnten HERRMANN et al. [80] durch Humanstudien zeigen, bei denen sie niedrigkonzentrierte Glucoselösungen in das menschliche Duodenum infundierten. Demnach mußte es mindestens einen weiteren Faktor außer GIP geben, der für die Regulation der GLP-1-Sekretion verantwortlich ist. HERRMANN-RINKE et al. [141] vermuteten, daß GRP für die Stimulation der GLP-1-Sekretion beim Menschen wichtig sein könnte.

Daß die Sensitivität der L-Zellen gegenüber Neurotransmittern und endokrinen Hormonen auch von ihrer Lage im Darm abhängig sein kann, vermuteten DUMOULIN et al. [142]. Bei ihrer Studie am perfundierten Rattenileum zeigten sie, daß L-Zellen aus dem Ileum weniger empfindlich gegenüber GIP als L-Zellen aus dem Colon sind. Eine Begründung dafür könnte in der jeweiligen Zahl der GIP-Rezeptoren auf den L-Zellen liegen. Außerdem postulierten DUMOULIN et al. eine rasche neurale Stimulation der L-Zellen nach der Nahrungsaufnahme.

1996 wiesen ROBERGE et al. [143] nach, daß eine Infusion des Neuropeptids Gastrin Releasing Peptide (GRP), das in Neuronen entlang des gesamten Darms vorkommt [144], die GLP-1-Sekretion aus den L-Zellen der Ratte stimuliert. Die Wirkung von GRP war dabei unabhängig von einer GIP-Sekretion. Der Einsatz des GRP-Antagonisten BW10 führte zu einer vollständigen Hemmung der GRP-abhängigen Stimulation der L-Zellen. ROBERGE et al. kamen zu dem Schluß, daß die Effekte von GIP *in vivo* bei der Ratte indirekt durch einen GRP-vermittelten Mechanismus zustande kommen könnten. Allerdings stimulierten physiologische Mengen an GRP die GIP-Freisetzung in ihrem Modell - im Gegensatz zu vorangegangenen Experimenten - nicht. Eine Erklärung hierfür könnte sein, daß eine Infusion von GRP nicht mit der physiologischen Freisetzung

des Transmitters zu vergleichen ist, da *in vivo* mehrere Transmitter gleichzeitig ausgeschüttet werden, die synergistisch wirken.

Nach den Ergebnissen von HERRMANN et al. [80] und nachdem NAUCK et al. [145] bereits festgestellt hatten, daß eine intravenöse GIP-Injektion in physiologischen Mengen ($1 \text{ pg/kg} \times \text{min}^{-1}$) beim Menschen keine GLP-1-Sekretion hervorruft, vermuteten ROBERGE et al. [143], daß beim Menschen GRP eine entscheidende Rolle im *enteroendokrinen Loop* spielt. Erstmals war nun von einem „*neuroendokrinen Loop*“ die Rede.

Das aktuellste Modell des „*neuroendokrinen Loops*“ stellten ROCCA und BRUBAKER [146] nach *in vivo* Tests am Rattenmodell vor: nach ihrem Verständnis umfaßt der „*neuroendokrine Loop*“ eine humorale Komponente (GRP, GIP) und eine neurale Komponente, den Vagusnerv, der die wichtigste parasympatische Innervation im proximalen Darm ist. Nahrungsinhaltsstoffe (Glucose und Fett) werden im Darm von K-Zellen, die quasi als „Fühler“ fungieren, registriert. Diese reagieren mit der Sekretion von GIP, welches wiederum konzentrationsabhängig zwei Wirkungen hat: in niedrigen Konzentrationen aktiviert es den Vagusnerv, der über eine GRP-Freisetzung L-Zellen stimuliert, daneben kann es in höheren Konzentrationen auch direkt stimulierend auf L-Zellen wirken. Zusätzlich ist vermutlich eine Komponente des Darmnervensystems in den Darmwänden für eine direkte, frühe Stimulation der L-Zellen im Ileum verantwortlich.

Dieses Konzept stellt sicher ein sehr gutes Modell für die Zusammenhänge im Organismus der Ratte dar. Beim Menschen spielt GIP allerdings offenbar eine geringere oder sogar keine Rolle bei der Aktivierung der L-Zellen, wie mehrere Autoren übereinstimmend festgestellt haben [80,145,147].

4.6.2 Erkenntnisse aus den Versuchen zur Lokalisation der K- und L-Zellen

Lokalisation der K- und L-Zellen entlang der Krypt-Villus-Achse

Bei den Versuchen zur immunhistochemischen Lokalisation der K- und L-Zellen konnte gezeigt werden, daß sich die K-Zellen vor allem auf den Villusspitzen im Duodenum befinden und die L-Zellen vor allem in den Krypten des distalen Jejunums und Ileums.

Dieser Befund paßt in das von ROCCA und BRUBAKER [146] entworfene Modell. Mit ihrer exponierten Lage auf den Villusspitzen sind die K-Zellen in der Lage, als Sensor für den im Duodenum ankommenden Speisebrei zu fungieren. Durch Glucose und Fett werden die K-Zellen der Ratte stimuliert und schütten GIP in die Blutbahn aus.

Wenn die Stimulation durch die Nahrung für L-Zellen eine geringe Rolle spielt, was noch zu diskutieren ist, wäre ausschließlich eine möglichst schnelle Erreichbarkeit der L-Zellen über Blut- und Nervenbahnen wichtig. Damit wäre auch die Lage der L-Zellen in den Krypten für deren Funktion vorteilhaft.

Lokalisation der Nahrungsabsorption im Darm

Eine noch offene Frage ist, inwieweit Nahrungsinhaltsstoffe überhaupt in Kontakt mit den L-Zellen gelangen können. Abgesehen von ihrer „versteckten“ Lage in den Krypten, durch die fraglich ist, ob der Chymus überhaupt mit ihnen in Berührung kommt, ist zu klären, welche Nährstoffe bei ihrem Weg durch den Darm noch das distale Jejunum und Ileum erreichen, d.h. vorher nicht schon absorbiert werden. Abbildung 4-1 soll hierüber Aufschluß geben.

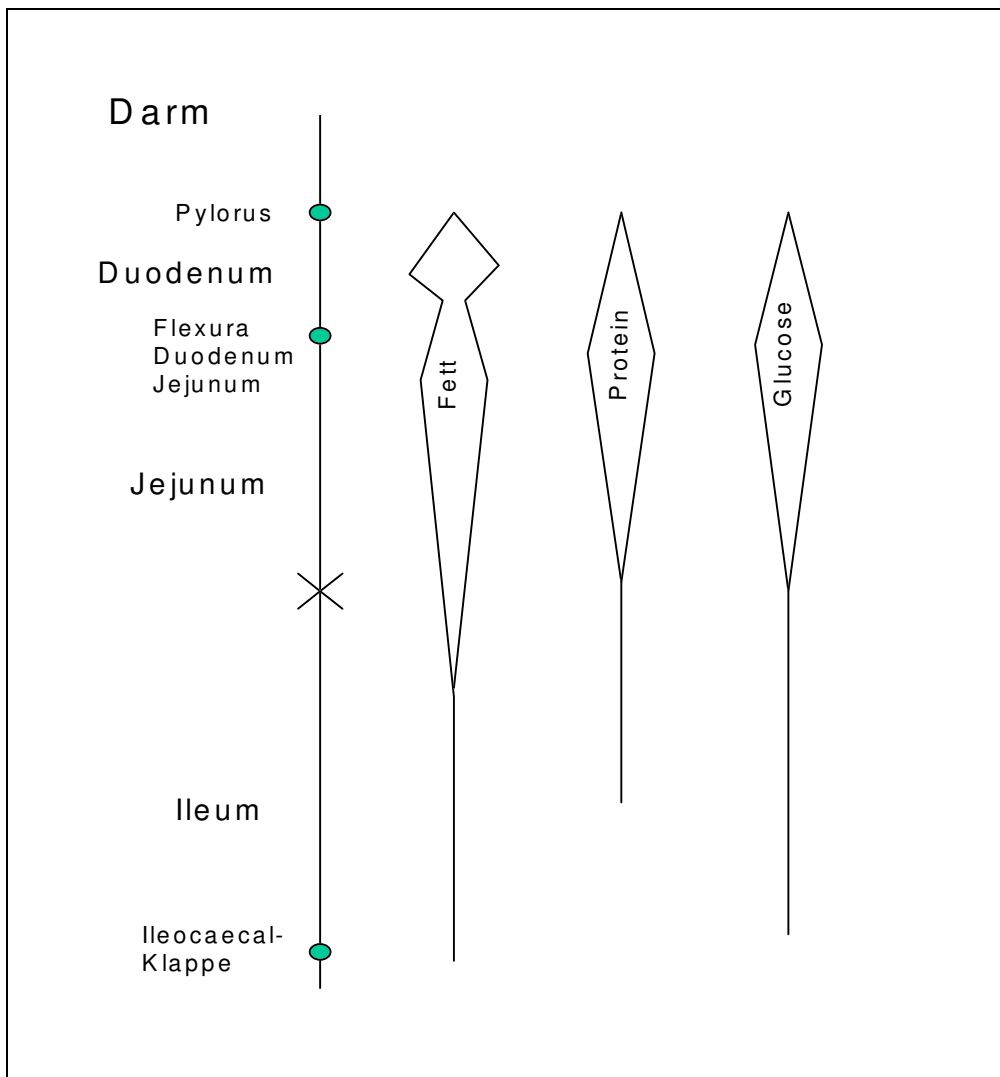


Abbildung 4-1: Nährstoffabsorption im Darm des Menschen. Die Abbildung zeigt, an welchen Stellen des Darms die verschiedenen Nährstoffe in welcher Menge absorbiert werden (modifiziert nach [148,149]).

Nach Angaben aktueller Physiologielehrbücher [148,149] werden Glucose und Proteine fast vollständig absorbiert, bevor der Nahrungsbrei das Ileum erreicht, minimale Mengen werden auch im Ileum noch aufgenommen. Fett (oder genauer: Fettsäuren) wird dagegen auch noch im Ileum absorbiert. Zusammengenommen bedeutet das, daß eine Stimulation der L-Zellen *in vivo* durch Nahrungsinhaltsstoffe zwar prinzipiell möglich, aber eher unwahrscheinlich ist. Am ehesten könnte Fett eine Ausschüttung von GLP-1 verursachen, da es noch in nennenswerten Mengen eine größere Zahl an L-Zellen erreicht. Diese Ansicht vertreten auch DUMOULIN et al. [150]. Bei der Ratte, deren Nahrung deutlich weniger Fett als die des Menschen enthält [29], entfallen Einflüsse der Nahrung auf die GLP-1-

Stimulation nahezu. Vielleicht spielt aus diesem Grund GIP als stimulierender Faktor für L-Zellen noch eine größere Rolle als beim Menschen.

Lokalisation der K- und L-Zellen entlang der gesamten Darmlänge

Insgesamt gesehen ist verwunderlich, warum die L-Zellen gerade im distalen Teil des Darms lokalisiert sind. Möglicherweise ist ihre physiologisch bedeutendste Funktion nicht die Stimulation der Insulinsekretion durch GLP-1, sondern der „Ileal-Brake“-Effekt: GLP-1 hemmt die Magenentleerung und verlangsamt Verdauungsfunktionen. Ein solches Signal aus dem distalen Darm könnte eine wertvolle, regulatorische Funktion ausüben und wäre somit eine gute Erklärung für die Lokalisation der L-Zellen [151,152].

Wie unter 4.1 beschrieben, gibt es in der Verteilung der K- und L-Zellen entlang des Darms Speziesunterschiede. K- und L-Zellen finden sich in ihren inversen Konzentrationsgradienten bei der Ratte im Gegensatz zum Menschen über die gesamte Dünndarmlänge verteilt. Zusätzlich befindet sich die höchste Konzentration an K-Zellen bei der Ratte etwas distaler gelegen als beim Menschen. Auch das bedarf einer Erklärung.

Möglicherweise gibt es bei der Ratte eine Verbindung von GIP und GLP-1 nicht nur entlang des Darmes, sondern auch innerhalb der Villus-Krypt-Achse für eine Art von Signalfunktion zur GLP-1-Freisetzung.

Denkbar wäre auch, daß das System des „*neuroendocrinen Loops*“ bei einer höheren Kohlenhydratzufuhr, wie sie bei der Ratte normalerweise besteht, sensibler reagieren kann, wenn die sensitiven K-Zellen durch ihre etwas distalere Lage einer nicht mehr ganz so hohen Glucosekonzentration ausgesetzt sind.

4.7 Schlußfolgerungen und Ausblick

4.7.1 Weitere, neue Fragen, die sich aus der Lokalisation der K- und L-Zellen ergeben

RAWDON und ANDREW haben in ihrem Übersichtsartikel [153] beschrieben, daß alle endokrinen Darmzellen und Epithelzellen des Darms aus gemeinsamen Stammzellen hervorgehen. Nach ihrer Hypothese sind endokrine Zellen als solche prädeterminiert und reifen nach Ausbildung bestimmter Rezeptoren durch den Einfluß auf sie wirkender Faktoren aus dem Mesenchym.

Das wirft die Frage auf, warum die K-Zellen in den Villi und die L-Zellen in den Krypten zu finden sind. Warum sind sie außerdem trotz starker Zellmigration der sie umgebenden Epithelzellen scheinbar stationär lokalisiert? Die Epithelzellen wandern sicher nicht um sie herum. Sind möglicherweise die Reifezeiten der K- und L-Zellen genetisch exakt abgestimmt, so daß sie erst in einem bestimmten „Wanderungsstadium“ ihre Funktion erhalten und geht die endokrine Funktion der L-Zellen vor der Abschilferung verloren? Diese Fragen müssen durch zukünftige Untersuchungen beantwortet werden.

4.7.2 Neue Entwicklungen in der Therapie des Diabetes mellitus

Zur Therapie des Diabetes mellitus werden neben dem in dieser Arbeit verfolgten Ansatz viele weitere Wege getestet, von denen einige die im Folgenden kurz beschrieben werden sollen.

Die Gewinnung von β -Ersatzzellen aus Tumorzelllinien

Mittlerweile ist es gelungen, durch Expression der Insulin-, GLUT2- und Glucokinasegene eine AtT20-Zelllinie zu konstruieren, die auf physiologische Mengen an Glucose mit der Ausschüttung von Insulin reagiert. Auch auf andere Stimulatoren reagieren diese Zellen qualitativ wie natürliche β -Zellen. Die charakteristische Ausschüttungsform als biphasische Sekretion konnte jedoch

nicht erreicht werden, auch Versuche an Tieren wurden mit diesen Zellen noch nicht durchgeführt [9].

DAVIES et al. [13] konnten zeigen, daß AtTinsGLUT2.36-Zellen glucoseabhängig Insulin ausschütten, allerdings auch schon bei subphysiologischen Konzentrationen (ab 50 $\mu\text{mol/l}$).

Durch die Elektrofusion der NEDH-Zellen (normale β -Zellen aus der Ratte) mit den immortalen RINm5F-Zellen konnten McCLENAGHAN und FLATT [154] die glucosesensitiven, insulinbildenden BRIN-Zelllinien generieren. Auch mit diesen Zellen wurden noch keine Tierversuche durchgeführt.

Tumorzelllinien erscheinen trotz der mittlerweile erzeugbaren glucose-abhängigen Insulinsekretion weniger geeignet zur Konstruktion von β -Ersatzzellen, da sie einige entscheidende Nachteile haben:

1. Sie besitzen ähnliche, aber niemals identische Eigenschaften wie natürliche β -Zellen. Damit sind sie zwar nützlich, um qualitativ Mechanismen zu erforschen, können quantitativ aber schon in Vorversuchen keine absolut zuverlässigen Aussagen liefern.
2. Wenn Zellen wie die aus der Adenohypophyse stammenden AtT20-Zellen eingesetzt werden, so kann die Sekretion von Nebenprodukten, d.h. der ursprünglich produzierten Produkte, nicht komplett verhindert werden.
3. Tumorzelllinien sind in ihrem Wachstum unbegrenzt. Man könnte sie zur Transplantation in einen lebenden Organismus in eine semipermeable Membran einbetten, um ihre Ausbreitung einzugrenzen. Hierbei wäre aber noch zu zeigen, daß die Zellen dann ihre Insulinsekretion unverändert aufrecht erhalten [5]. Generell bleibt die Transplantation von Tumorzellen mit einem hohen Risiko verbunden. Ihre Anwendung sollte daher auf *in vitro*- und Tierversuche begrenzt bleiben.

Natürliche, humane Adenohypophysenzellen kommen als Grundlage für die Transfektion nicht in Frage, weil sie aus lebenden Menschen nicht isoliert werden können.

Die Inselzelltransplantation

Bei der Transplantation von Inselzellen wurden in den letzten Jahren große Fortschritte erzielt.

Bei Versuchen an Ratten und Mäusen wurden Inselzellen isoliert und in Kapseln aus Alginaten und Poly-L-Lysin eingebettet. Diese waren permeabel für Nährstoffe, Insulin und Glucose, aber impermeabel für Faktoren des Immunsystems, die eine Immunreaktion verursacht hätten. Auf diese Weise wurde auch die artfremde Transplantation von Inselzellen ohne immunsuppressive Medikation ermöglicht. Es kam zu keinen Entzündungsreaktionen.

Schwierigkeiten bestehen noch darin, einen geeigneten Ort zur Infusion der eingekapselten Inselzellen zu finden, nachdem Versuche mit der Injektion in das Peritoneum nicht erfolgreich waren. Nun werden neue Formen der Einkapselung gesucht, die das Volumen der verpackten Zellen herabsetzen.

Das größte Problem besteht momentan darin, daß die Funktion der eingekapselten, transplantierten Inselzellen bei Versuchen an Mäusen und Ratten zeitlich auf etwa 6 bis 20 Wochen begrenzt ist. Die Gründe hierfür sind noch unklar. Vermutet wird eine ungenügende Nährstoffversorgung der Zellen, die daraufhin zugrunde gehen, oder eine aus ungeklärten Gründen mangelnde Biokompatibilität der Verpackung [155]. So lange die Funktion der Inselzellen noch auf eine derart kurze Zeitspanne begrenzt ist, scheidet sie für eine breite Anwendung beim Menschen aus.

Bei Versuchen zur Inselzelltransplantation bei Mäusen beobachteten OGAWA et al. [156] nach einigen Wochen ebenfalls den Verlust der glucoseinduzierten Insulinsekretion.

Auch die Lokalisierbarkeit und die Entfernbarekeit der transplantierten β -Zellen ist noch nicht ausreichend untersucht worden.

GLP-1 als Medikament

Die GLP-1 Sekretion ist bei Typ II-Diabetikern normal und auch die insulinotrope Wirkung des Hormons besteht weiterhin [87]. Da der insulinotrope Effekt von GLP-1 glucoseabhängig ist, dachte man, daß Hypoglycämien - im Gegensatz zu den bisher genutzten Medikamenten wie den Sulfonylharnstoffen - bei der Verwendung von GLP-1 als Therapeutikum ausgeschlossen wären. So kam man auf die Idee, das Hormon zur Behandlung des Typ II-Diabetes mellitus einzusetzen [157].

Die Verwendung von GLP-1 als Therapeutikum für den Typ I-Diabetiker ist noch umstritten. Während CREUTZFELDT et al. [158] feststellten, daß intravenös verabreichtes GLP-1 auch beim Typ I-Diabetiker blutzuckersenkend wirkt, konnten FREYSE et al. [159] bei ihren Studien an Hunden keinen relevanten insulinähnlichen Effekt beim Diabetes mellitus Typ I beobachten und sind daher der Ansicht, daß das Hormon hierfür als Therapeutikum nicht in Frage kommt.

Mehrere Autoren berichten, daß sich GLP-1 beim Typ II-Diabetes mellitus sowohl am Rattenmodell als auch beim Menschen positiv auf die Glucosesensitivität von β -Zellen auswirkt [160,161,162,163].

Derzeit wird noch untersucht, in welcher Form GLP-1 am effektivsten verabreicht werden kann. Neben der intravenösen Zufuhr, deren Wirkung zeitlich sehr begrenzt ist [157], werden die Gabe als Tablette [164] oder die subkutane Injektion [165] erprobt. Keine der bisher getesteten Arten der Zufuhr ist jedoch aufgrund der kurzen Halbwertszeit von GLP-1 im Blut, die bei intravenöser Gabe etwa 4 min und subkutan injiziert etwa 30 bis 60 min beträgt [74], wirksam genug. Die optimale Art der Verabreichung, sowie die zeitliche und mengenmäßige Dosierung sind nach wie vor offen.

Neuere Studien haben außerdem gezeigt, daß GLP-1 beim gesunden Menschen sehr wohl reaktive Hypoglycämien auslösen kann [147,166]. Zudem beobachteten EDWARDS et al. [166] einen kurzfristigen Anstieg des Blutdrucks bei subkutaner GLP-1-Injektion. Die Nebenwirkung der Therapie sind bisher nicht ausreichend untersucht.

Weitere Probleme beim Einsatz von GLP-1 als Medikament bestehen darin, daß noch keine Langzeiterfahrungen über die Wirkung vorliegen und daß die Herstellung von GLP-1 noch vergleichsweise teuer ist.

Um die Effektivität des GLP-1 als Therapeutikum zu steigern, wurden alternative Wege gesucht.

Die Verwendung von Dipeptidyl-Peptidase-Inhibitoren

Das Enzym, das für den Abbau von GLP-1 im Blut des Menschen verantwortlich ist, ist die Dipeptidyl-Peptidase IV [167]. Wenn man das Enzym hemmt und damit dem Abbau von GLP-1 im Blut entgegenwirkt, müßte seine Wirkung länger andauern. Diese Vermutung konnten PEDERSON et al. [168] durch Studien an diabetischen Ratten bestätigen. Das Enzym hat allerdings auch Funktionen im Immunsystem. Als CD26 kommt es auf aktivierten B- und T-Zellen, sowie Makrophagen vor. Ob und welche Auswirkungen eine Hemmung des Enzyms auf das Immunsystem hat, ist noch unsicher [169].

Der Einsatz von GLP-1-Analoga

Ebenfalls denkbar ist der Einsatz von GLP-1-Analoga, die resistenter als GLP-1 selbst gegen den Abbau durch die Dipeptidyl-Peptidase IV sind. GREIG et al. [170] konnten zeigen, daß Exendin-4, das aus der Speicheldrüse von Echsen stammt und an die GLP-1-Rezeptoren der Ratte bindet, wirksamer als GLP-1 den Blutglucosespiegel reguliert.

Bei ihren Studien an Mäusen bewiesen BURCELIN et al. [171], daß ein an zweiter Position Glycin-substituiertes GLP-1 deutlich resistenter gegen Dipeptidyl-Peptidase IV ist und eine stark verlängerte Wirkungszeit gegenüber der natürlichen Form hat.

4.7.3 Resümee

Es existieren viele verschiedene Ansätze zur Therapie des Diabetes mellitus, eine einzige, optimale Methode gibt es jedoch noch nicht.

Wie unter Punkt 4.5 beschrieben, sind für den hier vorgestellten Ansatz noch viele Fragen zu klären. Wenn alle Voraussetzungen zur Herstellung von β -Ersatzzellen aus den endokrinen K-Zellen des Darms erfüllbar sind, dann wäre diese Methode eine sehr elegante und erstrebenswerte Möglichkeit zur Therapie des Typ I Diabetes mellitus und sollte daher unbedingt weiter verfolgt werden.

5 Zusammenfassung

Die enteroendokrinen K-Zellen sind geeignete Kandidaten zur Herstellung von β -Ersatzzellen zur Therapie des Typ I Diabetes mellitus. Aus diesem Grund wurden sie am Modell der Ratte zunächst mittels immunhistochemischer Methoden lokalisiert. Sowohl über die gesamte Darmlänge als auch innerhalb der Villus-Krypt-Achse existiert ein Verteilungsgradient: die Anzahl der K-Zellen nimmt vom proximalen Jejunum zum Ileum und von den Villi zu den Krypten hin ab.

Nach Lokalisation der K-Zellen wurden Methoden zur Isolation und Anreicherung der Zellen entwickelt. Zur Isolation wurde der Darm kleingeschnitten und in einem hyperosmolaren, natriumcitrat-haltigen Puffer inkubiert, mit dem Darmzellen schonend aus dem Zellverband gelöst werden konnten. Zur anschließenden Anreicherung der K-Zellen wurden Dynabeads (Dyna, Hamburg) genutzt, ein immunomagnetisches Verfahren, das eine zellschonende und hochspezifische Anreicherung der K-Zellen ermöglichte. Hierbei wurde ein humanspezifischer Kaninchen IgG₁-Antikörper als primärer Antikörper und ein an diesen bindender Dynabead-gekoppelter zweiter Antikörper verwendet.

Es konnte gezeigt werden, daß die durch Anreicherungsversuche gewonnenen K-Zell-Suspensionen auf eine Glucose-Stimulation (20 mmol/l) mit der Ausschüttung ihres Zellproduktes Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP) reagieren.

Für zukünftige Versuche zur Transfektion der K-Zellen mit dem Proinsulingen und anschließender Kultur oder auch der Transfektion direkt in Suspension steht nun eine K-Zellsuspension zur Verfügung, die in dieser Reinheit bisher noch nicht gewonnen werden konnte. Damit ist die Grundlage zur Herstellung von β -Ersatzzellen aus den enteroendokrinen K-Zellen gelegt.

6 Literatur

- [1] KASPER H
Ernährungsmedizin und Diätetik. 8. Auflage. Urban & Schwarzenberg, München, 1996: 248-252
- [2] THE DCCT RESEARCH GROUP
The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) - Design and Methodologic Considerations for the Feasibility Phase.
Diabetes 1986; 35: 530-545
- [3] THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP
Lifetime Benefits and Costs of Intensive Therapy as Practiced in the Diabetes Control and Complications Trial.
JAMA 1996; 276: 1409-1415
- [4] DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG
DGE-Beratungsstandards V/2. Diabetes mellitus. 2. Auflage. Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Frankfurt, 1998
- [5] SCHNEDL WJ, HOHMEIER HE, NEWGARD CB
Insulinsezernierende Zellen zur Therapie des Diabetes mellitus.
Naturwissenschaften 1996; 83: 1-5
- [6] NEWGARD CB, CLARK S, BELTRANDELRIO H, HOHMEIER HE, QUADE C, NORMINGTON K
Engineered cell lines for insulin replacement in diabetes: current status and future prospects.
Diabetologia 1997; 40: S42-S47
- [7] LACY PE
Inselzell-Verpflanzung bei Diabetes.
Spektrum der Wissenschaft 1995; Heft 9: 72-78
- [8] HUGHES SD, JOHNSON JH, QUADE C, NEWGARD CB
Engineering of glucose-stimulated insulin secretion and biosynthesis in non-islet cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992; 89: 688-692
- [9] MOTOYOSHI S, SHIROTANI T, ARAKI E, SAKAI K, MOTOSHIMA H, YOSHIZATO A, SHIRAKAMI A, KISHIKAWA H, SHICHIRI M
Cellular characterization of pituitary adenoma cell line (AtT20 cell) transfected with insulin, glucose transporter type 2 (GLUT2) and glucokinase genes: Insulin secretion in response to physiological concentrations of glucose.
Diabetologia 1998; 41:1492-1501

-
- [10] HAKES DJ, BIRCH NP, MEZEY A, DIXON JE
Isolation of Two Complementary Deoxyribonucleic Acid Clones from a Rat Insulinoma Cell Line Based on Similarities to Kex2 and Furin Sequences and the Specific Localization of Each Transcript to Endocrine and Neuroendocrine Tissues in Rats.
Endocrinology 1991; 129:3053-3063
- [11] HUGHES SD, QUADE C, MILBURN JL, CASSIDY L, NEWGARD CB
Expression of Normal and Novel Glucokinase mRNAs in Anterior Pituitary and Islet Cells.
J. Biol. Chem. 1991; 266: 4521-4530
- [12] MOORE HPH, WALKER MD, LEE F, KELLY RB
Expressing a Human Proinsulin cDNA in a Mouse ACTH-secreting Cell. Intracellular Storage, Proteolytic Processing and Secretion on Stimulation.
Cell 1983; 35:531-538
- [13] DAVIES EL, SHENNAN KIJ, DOCHERTY K, BAILEY CJ
Expression of GLUT2 in insulin-secreting AtT20 pituitary cells.
J. Mol. Endocrinol. 1998; 20: 75-82
- [14] OOMURA Y, SASAKI K, SUZUKI, K, MUTO, T, LI A, OGITA ZI, HANAI K, TOOYAMA I, KIMURA H, YANAIHARA N
A new brain glucosensor and its physiological significance.
Am. J. Clin. Nutr. 1992; 55: 278S-282S
- [15] HEBEL R, STROMBERG M
Anatomy and Embryology of the Laboratory Rat. Biomed-Verlag, Wörthsee, 1986:51
- [16] THEWS G, MUTSCHLER E, VAUPEL P
Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. 4. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1991: 283-285
- [17] WEISS L
Cell and Tissue Biology - A Textbook of Histology. 6. Auflage. Urban & Schwarzenberg, München, 1988: 652-683
- [18] LEONHARDT H
Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. 8. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1990: 394-395
- [19] CHENG H, LEBLOND CP
Origin, Differentiation and Renewal of the Four Main Epithelial Cell Types in the Mouse Small Intestine - III Entero-endocrine Cells.
Am. J. Anat. 1974; 141: 503-520

-
- [20] BUCHAN AMJ, POLAK JM, CAPELLA C, SOLCIA E, PEARSE AGE
Electroimmunocytochemical Evidence for the K Cell Localization of Gastric Inhibitory Polypeptide (GIP) in Man.
Histochemistry 1978; 56: 37-44
- [21] MOODY AJ, THIM L, VALVERDE I
The isolation and sequencing of human gastric inhibitory peptide (GIP).
FEBS Lett. 1984; 172: 142-148
- [22] HIGASHIMOTO Y, SIMCHOCK J, LIDDLE RA,
Molecular cloning of rat glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP).
Biochim. Biophys. Acta 1992; 1132: 72-74
- [23] TAKEDA J, SEINO Y, TANAKA KI, FUKUMOTO H, KAYANO T,
TAKAHASHI H, MITANI T, KURONO M, SUZUKI T, TOBE T, IMURA H
Sequence of an intestinal cDNA encoding human gastric inhibitory polypeptide precursor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987; 84: 7005-7008
- [24] TSENG CC, JARBOE LA, LANDAU SB, WILLIAMS EK, WOLFE MM
Glucose-dependent insulinotropic peptide: Structure of the precursor and tissue-specific expression in rat.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90: 1992-1996
- [25] KIEFFER TJ, BUCHAN AMJ, BARKER H, BROWN JC, PEDERSON RA
Release of gastric inhibitory polypeptide from cultured canine endocrine cells.
Am. J. Physiol. 1994; 267: E489-E496
- [26] GROMADA J, BOKVIST K, DING WG, HOLST JJ, NIELSEN JH, RORSMAN P
Glucagon-Like Peptide 1 (7-36) Amide Stimulates Exocytosis in Human Pancreatic β -Cells by Both Proximal and Distal Regulatory Steps in Stimulus-Secretion Coupling.
Diabetes 1998; 47: 57-65
- [27] CATALAND S, CROCKETT SE, BROWN JC, MAZZAFERRI EL
Gastric Inhibitory Polypeptide (GIP) Stimulation by Oral Glucose in Man.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1974; 39: 223-228
- [28] CLEATOR IGM, GORLAY RH
Release of Immunoreactive Gastric Inhibitory Polypeptide (IR-GIP) by Oral Ingestion of Food Substances.
Am. J. Surg. 1975; 130: 128-135
- [29] HIGASHIMOTO Y, OPARA EC, LIDDLE RA
Dietary regulation of glucose-induced insulinotropic peptide (GIP) gene expression in rat small intestine.
Comp. Biochem. Physiol. 1995; 110C: 207-214

-
- [30] POLAK JM, BLOOM SR, KUZIO M, BROWN JC, PEARSE AGE
Cellular localization of gastric inhibitory polypeptide in the duodenum and jejunum. *Gut* 1973; 14: 284-288
- [31] SJÖLUND K, SANDÉN G, HÅKANSON R, SUNDLER F
Endocrine Cells in Human Intestine: An Immunocytochemical Study
Gastroenterology 1983; 85: 1120-1130
- [32] RÖNNBLUM A, DANIELSSON Å, EL-SALHY M
Intestinal endocrine cells in myotonic dystrophy: an immunocytochemical and computed image analytical study.
J. Int. Med. 1999; 245: 91-97
- [33] GESPACH C, BATAILLE D, JARROUSSE C, ROSSELIN G
Ontogeny and distribution of immunoreactive gastric inhibitory polypeptide (IR-GIP) in rat small intestine
Acta Endocrinol. 1979; 90: 307-316
- [34] BUCHAN AMJ, INGMAN-BAKER J, LEVY J, BROWN JC
A Comparison of the Ability of Serum and Monoclonal Antibodies to Gastric Inhibitory Polypeptide to Detect Immunoreactive Cells in the Gastroenteropancreatic System of Mammals and Reptiles.
Histochemistry 1982; 76: 341-349
- [35] SHULKES A, CAUSSIGNAC Y, LAMERS CB, SOLOMON TE, YAMADA T, WALSH JH
Starvation in the rat: effect on peptides of the gut and brain.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 1983; 61: 581-587
- [36] SMITH PH
Immunocytochemical Localization of Glucagonlike and Gastric Inhibitory Polypeptidelike Peptides in the Pancreatic Islets and Gastrointestinal Tract.
Am. J. Anat. 1983; 168: 109-118
- [37] PEDERSON RA
Gastric Inhibitory Peptide. In WALSH JH, DOCKRAY GJ: *Gut Peptides-Biochemistry and Physiology*. Raven Press, New York, 1994 : 217-259
- [38] MORGAN LM
The metabolic role of GIP: physiology and pathology.
Biochem. Soc. Transactions 1996; 24:585-591
- [39] SCHMIDT WE, SIEGEL EG, CREUTZFELDT W
Glucagon-like peptide-1 but not glucagon-like peptide-2 stimulates insulin release from isolated rat pancreatic islets.
Diabetologia 1985; 28: 704-707

-
- [40] SIEGEL EG, CREUTZFELDT W
Stimulation of insulin release in isolated rat islets by GIP in physiological concentrations and its relation to islet cyclic AMP content.
Diabetologia 1985; 28: 857-861
- [41] ELAHI D, ANDERSEN DK, BROWN, JC, DEBAS HAT, HERSHCOPF RJ, RAIZES GS, TOBIN JD, ANDRES R
Pancreatic α - and β -cell responses to GIP infusion in normal man.
Am. J. Physiol. 1979; 237: E185-E191
- [42] PEDERSON RA, BROWN JC
The Insulinotropic Action of Gastric Inhibitory Polypeptide in the Perfused Isolated Rat Pancreas.
Endocrinology 1976; 99: 780-785
- [43] DING WG, GROMADA J
Protein Kinase A-Dependent Stimulation of Exocytosis in Mouse Pancreatic β -Cells by Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide.
Diabetes 1997; 46: 615-621
- [44] DUPRÉ J, ROSS SA, WATSON D, BROWN, JC
Stimulation of Insulin Secretion by Gastric Inhibitory Polypeptide in man.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1973; 37: 826-828
- [45] SCHÄFER R, SCHATZ H
Stimulation of (pro-)insulin biosynthesis and release by gastric inhibitory polypeptide in isolated islets of rat pancreas.
Acta Endocrinol. 1979; 91: 493-500
- [46] ROBERGE JN, BRUBAKER PL
Regulation of Intestinal Proglucagon-Derived Peptide Secretion by Glucose-Dependent Insulinotropic Peptide in a Novel Enteroendocrine Loop.
Endocrinology 1993; 133: 233-240
- [47] PLAISANCIE P, BERNARD C, CHAYVIALLE JA, CUBER JC
Regulation of Glucagon-Like Peptide-1-(7-36) Amide Secretion by Intestinal Neurotransmitters and Hormones in the Isolated Vascularly Perfused Rat Colon.
Endocrinology 1994; 135: 2398-2403
- [48] ØRSKOV C, HOLST JJ, POULSEN SS, KIRKEGAARD P
Pancreatic and intestinal processing of proglucagon in man.
Diabetologia 1987; 30: 874-881
- [49] GRIMELIUS L, CAPELLA C, BUFFA R, POLAK JM, PEARSE AGE, SOLCIA E
Cytochemical and Ultrastructural Differentiation of Enteroglucagon and Pancreatic-Type Glucagon Cells of the Gastrointestinal Tract.
Virchows Arch. B Cell Path. 1976; 20: 217-228

-
- [50] EISSELE R, GÖKE R, WILLEMER S, HARTHUS HP, VERMEER H, ARNOLD R, GÖKE B
Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man.
Eur. J. Clin. Invest. 1992; 22: 283-291
- [51] BELL GI, SANCHEZ-PESCADOR R, LAYBOURN PJ, NAJARIAN RC
Exon duplication and divergence in the human preglucagon gene.
Nature 1983; 304: 368-371
- [52] HEINRICH G, GROS P, HABENER JF
Glucagon Gene Sequence.
J. Biol. Chem. 1984; 259: 14082-14087
- [53] MOJSOV S, HEINRICH G, WILSON IB, RAVAZZOLA M, ORCI L, HABENER JF
Preproglucagon Gene Expression in Pancreas and Intestine Diversifies at the Level of Post-translational Processing.
J. Biol. Chem. 1986; 261: 11880-11889
- [54] MOJSOV S, WEIR GC, HABENER JF
Insulintropin: Glucagon-like Peptide I (7-37) Co-encoded in the Glucagon Gene Is a Potent Stimulator of Insulin release in the Perfused Rat Pancreas.
J. Clin. Invest. 1987; 79: 616-619
- [55] ØRSKOV C, WETTERGREN A, HOLST JJ
Biological Effects and Metabolic Rates of Glucagonlike Peptide-1 7-36 Amide and Glucagonlike Peptide-1 7-37 in Healthy Subjects Are Indistinguishable.
Diabetes 1993; 42: 658-661
- [56] ØRSKOV C, BERSANI M, JOHNSON AH, HØJRUP P, HOLST JJ
Complete Sequences of Glucagon-like Peptide-1 from Human and Pig Small Intestine.
J. Biol. Chem. 1989; 264: 12826-12829
- [57] ROBERGE JN, BRUBAKER PL
Secretion of Proglucagon-Derived Peptides in Response to Intestinal Luminal Nutrients.
Endocrinology 1991; 128: 3169-3174
- [58] BRUBAKER PL
Regulation of Intestinal Proglucagon-Derived Peptide Secretion by Intestinal Regulatory Peptides.
Endocrinology 1991; 128: 3175-3182

-
- [59] DAMHOLT AB, BUCHAN AMJ, KOFOD H
Glucagon-Like-Peptide-1 Secretion from Canine L-Cells Is Increased by Glucose Dependent-Insulinotropic Peptide but unaffected by Glucose.
Endocrinology 1998; 139: 2085-2091
- [60] BRUBAKER PL, SCHLOOS J, DRUCKER DJ
Regulation of Glucagon-Like Peptide-1 Synthesis and Secretion in the GLUTag Enteroendocrine Cell Line
Endocrinology 1998; 139: 4108-4114
- [61] BRUBAKER PL
Control of Glucagon-Like Immunoreactive Peptide Secretion from Fetal Rat Intestinal Cultures.
Endocrinology 1988; 123: 220-226
- [62] SAIFIA S, CHEVRIER AM, BOSSHARD A, CUBER JC, CHAYVIALLE JA, ABELLO J
Galanin inhibits glucagon-like peptide-1 secretion through pertussis toxin-sensitive G Protein and ATP-dependent channels in rat ileal L-cells.
J. Endocrinol. 1998; 157: 33-41
- [63] GÖKE B, FEHMANN HC, SCHIRRA J, HARETER A, GÖKE R
Das Darmhormon Glucagon-like peptide-1 (GLP-1): aus dem Experiment in die Klinik.
Z. Gastroenterol. 1997; 35: 285-294
- [64] AHRÉN B
Glucagon-like peptide-1 (GLP-1): a gut hormone of potential interest in the treatment of diabetes.
BioEssays 1998; 20: 642-651
- [65] NAUCK MA
Glucagon-like peptide 1 (GLP-1): a potent gut hormone with a possible therapeutic perspective.
Acta Diabetol. 1998; 35: 117-129
- [66] WETTERGREN A, SCHJOLDAGER B, MORTENSEN PE, MYHRE J, CHRISTIANSEN J, HOLST JJ
Truncated GLP-1 (Proglucagon 78-107-Amide) Inhibits Gastric and Pancreatic Functions in Man.
Dig. Dis. Sci. 1993; 38: 665-673
- [67] GIRALT M, VERGARA P
Sympathetic pathways mediate GLP-1 actions in the gastrointestinal tract of the rat.
Reg. Peptides 1998; 74: 19-25

-
- [68] TURTON MD, O'SHEA D, GUNN I, BEAK SA, EDWARDS CMB, MEERAN K, CHOI SJ, TAYLOR GM, HEATH MM, LAMBERT PD, WILDING JPH, SMITH DM, GHATEI, MA, HERBERT J, BLOOM SR
A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding.
Nature 1996; 379: 69-72
- [69] GUTZWILLER JP, GÖKE B, DREWE J, HILDEBRAND P, KETTERER S, HANDSCHIN D, WINTERHALDER R, CONEN D BEGLINGER C
Glucagon-like peptide-1: a potent regulator of food intake in humans.
Gut 1999; 44: 81-86
- [70] ØRSKOV C, POULSEN SS
Glucagonlike Peptide-I-(7-36)-Amide Receptors Only in Islets of Langerhans - Autoradiographic Survey of Extracerebral Tissues in Rats.
Diabetes 1991; 40: 1292-1296
- [71] WEIR GC, MOJSOV S, HENDRICK K, HABENER JF
Glucagonlike Peptide I (7-37) Actions on Endocrine Pancreas.
Diabetes 1989; 38: 338-342
- [72] YAJIMA H, KOMATSU M, SCHERMERHORN T, AIZAWA, T, KANEKO T, NAGAI M, SHARP GWG, HASHIZUME K
cAMP Enhances Insulin Secretion by an Action on the ATP-Sensitive K⁺ Channel-Independent Pathway of Glucose Signaling in Rat Pancreatic Islets.
Diabetes 1999; 48: 1006-1012
- [73] WHEELER MB, LU M, DILLON JS, LENG XH, CHEN C, BOYD III AE
Functional Expression of the Rat Glucagon-Like Peptide-I Receptor, Evidence for Coupling to both Adenylyl Cyclase and Phospholipase-C.
Endocrinology 1993; 133: 57-62
- [74] KREYMANN B, GHATEI MA, WILLIAMS G, BLOOM, SR
Glucagon-like Peptide-1 7-36: a physiological incretin in man.
Lancet 1987; II: 1300-1304
- [75] ENSINCK JW, D'ALESSIO DA
The Enteroinsular Axis Revisited
New Engl J. Med. 1992; 326: 1352-1353
- [76] PENMAN E, WASS JAH, MEDBAK S, MORGAN L, LEWIS JM, BESSER GM, REES LH
Response of Circulating Immunoreactive Somatostatin to Nutritional Stimuli in Normal Subjects.
Gastroenterology 1981; 81:692-699
- [77] PETERSON B, CHRISTIANSEN J, HOLST JJ
A Glucose-Dependent Mechanism in Jejunum Inhibits Gastric Acid Secretion: A Response Mediated through Enteroglucagon?
Scand. J. Gastroenterol. 1985; 20: 193-197

-
- [78] WÓJCIKOWSKI C, MAIER V, FUSSGÄNGER R, PFEIFFER EF
Release of Glucagon-Like Immunoreactive Material (GLI) from the Isolated Perfused Jejunum of Normal and Diabetic Rats.
Horm. Metabol. Res. 1985; 17: 105-106
- [79] READ NW, McFARLANE A, KINSMAN RI, BATES TE, BLACKHALL NW, FARRAR GBJ, HALL JG, MOSS G, MORRIS AP, O'NEILL B, WELCH I, LEE Y, BLOOM SR
Effect of Infusion of Nutrient Solutions Into the Ileum on Gastrointestinal Transit and Plasma Levels of Neurotensin and Enteroglucagon.
Gastroenterology 1984; 86: 274-280
- [80] HERRMANN C, GÖKE R, RICHTER G, FEHMANN HC, ARNOLD R, GÖKE B
Glucagon-Like Peptide-1 and Glucose-Dependent Insulin-Releasing Polypeptide Plasma Levels in Response to Nutrients.
Digestion 1995; 56:117-126
- [81] JETTON TL, LIANG Y, PETTEPHER CC, ZIMMERMAN EC, COX, FG, HORVATH K, MATSCHINSKY FM, MAGNUSON MA
Analysis of Upstream Glucokinase Promoter Activity in Transgenic Mice and Identification of Glucokinase in Rare Neuroendocrine Cells in the Brain and Gut.
J. Biol. Chem. 1994; 269: 3641-3654
- [82] SCOPSI L, GULLO M, RILKE F, MARTIN S, STEINER DF
Proprotein Convertases (PC1/PC3 and PC2) in Normal and Neoplastic Human Tissues: Their Use as Markers of Neuroendocrine Differentiation.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1995; 80: 294-301
- [83] DHANVANTARI S, SEIDAH, NG, BRUBAKER, PL
Role of Prohormone Convertases in the Tissue-Specific Processing of Proglucagon.
Mol. Endocrinol. 1996; 10: 342-355
- [84] EBERT R, FRERICHS H, CREUTZFELDT W
Serum Gastric Inhibitory Polypeptide (GIP) Response in Patients with Maturity Onset Diabetes and in Juvenile Diabetics.
Diabetologia 1976; 12: 388
- [85] NAUCK M, STÖCKMANN F, EBERT R, CREUTZFELDT W
Reduced incretin effect in Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes.
Diabetologia 1986; 29: 46-52
- [86] ROVIRA A, GARROTE FJ, PASCUAL JM, SALVADOR MG, HERRERA POMBO JL, VALVERDE I
Plasma glucagon and glucagon-like immunoreactive components in Type 1 (insulin-dependent) diabetic patients and normal subjects before and after an oral glucose load.
Diabetologia 1985; 28: 80-86

-
- [87] NAUCK MA, HEIMESAAT MM, ØRSKOV C, HOLST JJ, EBERT R, CREUTZFELDT W
Preserved Incretin Activity of Glucagon-like Peptide 1 [7-36 Amide] but Not of Synthetic Human Gastric Inhibitory Polypeptide in Patients with Type-2 Diabetes Mellitus.
J. Clin. Invest. 1993; 91: 301-307
- [88] PERRET V, LEV R, PIGMAN W
Simple method for the preparation of single cell suspensions from normal and tumorous rat colonic mucosa.
Gut 1977; 18: 382-385
- [89] EVANS GS, FLINT N, SOMERS AS, EYDEN B, POTTEN CS
The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures.
J. Cell Sci. 1992; 101: 219-231
- [90] WEISER MM
Intestinal Epithelial Cell Surface Membrane Glycoprotein Synthesis.
J. Biol. Chem. 1973; 248: 2536-2543
- [91] FLINT N, COVE FL, EVANS GS
A low-temperature method for the isolation of small-intestinal epithelium along the crypt-villus axis.
Biochem. J. 1991; 280: 331-334
- [92] SOLL AH, Yamada T, Park J, THOMAS LP
Release of somatostatinlike immunoreactivity from canine fundic mucosal cells in primary culture.
Am. J. Physiol. 1984; 247: G558-G566
- [93] POITRAS P, DUMONT A, CUBER JC, TRUDEL L
Cholinergic Regulation of Motilin Release From Isolated Canine Intestinal Cells.
Peptides 1993; 14:207-213
- [94] EADE OE, ANDRE-UKENA SS, BEEKEN WL
Comparative Viabilities of Rat Intestinal Epithelial Cells Prepared by Mechanical, Enzymatic and Chelating Methods.
Digestion 1981; 21: 25-31
- [95] SOLL AH
The Actions of Secretagogues on Oxygen Uptake by Isolated Mammalian Parietal Cells.
J. Clin. Invest. 1978; 61: 370-380
- [96] BUCHAN AMJ, BARBER DL, GREGOR M, SOLL AH
Morphologic and Physiologic Studies of Canine Ileal Enteroglucagon-Containing Cells in Short-Term Culture.
Gastroenterology 1987; 93: 791-800

-
- [97] KOOP I, BUCHAN AMJ
Cholecystokinin Release From Isolated Canine Epithelial Cells in Short-Term Culture.
Gastroenterology 1992; 102: 28-34
- [98] XUE W, CHEY WY, SUN Q, CHANG TM
Characterization of Secretin Release in Secretin Cell-Enriched Preparation Isolated from Canine Duodenal Mucosa.
Dig. Dis. Sci. 1993; 38: 344-352
- [99] MILTENYI BIOTEC GmbH
Magnetic Cell Sorting and Separation of Biomolecules. Katalog 1999
- [100] DYNAL
Cell Separation and Protein Purification. Technical Handbook. 2. Auflage.
Dynal A.S, Oslo, 1996
- [101] NAVONE F, JAHN R, DI GIOIA G, STUKENBROK H, GREENGARD P, DE CAMILLI P
Protein p38: An Integral Membrane Protein Specific for Small Vesicles of Neurons and Neuroendocrine Cells.
J. Cell Biol. 1986; 103: 2511-2527
- [102] WIEDENMANN B, HUTTNER WB
Synaptophysin and chromogranins/secretogranins- widespread constituents of distinct types of neuroendocrine vesicles and new tools in tumor diagnosis.
Virchows Archiv B Cell Pathol. 1989; 58: 95-121
- [103] CIRULLI V, BAETENS D, RUTISHAUSER U, HALBAN PA, ORCI L, ROUILLER DG
Expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in rat islets and its role in islets cell type segregation.
J. Cell Sci. 1994; 107: 1429-1436
- [104] ROSE ML
HLA antigens in tissues. In DYER P, MIDDLETON D: Histocompatibility Testing - A practical Approach. IRL Press, Oxford, 1993: 191-210
- [105] KLARESKOG L, FORSUM U
Tissue Distribution of Class II Transplantation Antigens: Presence on Normal Cells. In: SOLHEIM BG, MØLLER E, FERRONE S: HLA Class II Antigens - A comprehensive Review of Structure and Function. Springer-Verlag, Heidelberg, 1986: 339-355
- [106] DIANOVA
Rhodamine Red-X und Carbocyanin gekoppelte Sekundärantikörper. Produkt- und Preisliste inklusive allgemeiner Produktinformationen zu Sekundärantikörpern von Jackson ImmunoResearch. Dianova, Hamburg, 1998

-
- [107] PENINSULA LABORATORIES
General Protocol for Immunofluorescence Kit. Peninsula Laboratories Inc., San Carlos.
- [108] LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 1951; 193: 265-275
- [109] KOMMISSION FÜR ENZYMDIAGNOSTIK UND STANDARDISIERUNG.
Standard Method for Determination of Alkaline Phosphatase (AP) Activity.
Z. Klin. Chem. Klein. Biochem. 1972; 10: 290
- [110] BOEHRINGER MANNHEIM
Cell Biology: Enzymes for Tissue Dissociation. Seite 13
- [111] DYNAL
Bioscience Product Katalogue 1999. Dynal A.S, Oslo, 1999
- [112] MILTENYI BIOTECH GmbH
Datenblatt: CD16 Microbeads for isolation of eosinophils. Appendix
- [113] DYNAL
Dynabeads Biomagnetic Separation, Cells & Proteins, Nucleic Acids, Microorganisms. Product Catalogue 1998. Dynal A.S, Oslo, 1998
- [114] DIENER M, HUG F, STRABEL D, SCHARRER E
Cyclic AMP-dependent regulation of K⁺ transport in the rat distal colon.
Br. J. Pharmacol. 1996; 118: 1477-1487
- [115] EBERL T, SCHMID T, HENGSTER P, WÖDLINGER R, OBERHUBER G, WEISS H, HEROLD M, WALDENBERGER F, MARGREITER R
Protective Effect of Various Preservation Solutions on Cultured Endothelial Cells.
Ann. Thorac. Surg. 1994; 58: 489-495
- [116] FRESENIUS
Euro-Collins-Lösung, Multiorgan-Perfusionssystem. Fresenius AG, Bad Homburg
- [117] PEDERSON RA, BUCHAN AMJ, ZAHEDI-ASL S, CHAN CB, BROWN JC
Effect of jejunoileal bypass in the rat on the enteroinsular axis.
Reg. Peptides 1982; 5: 53-63
- [118] ROTH KA, HERTZ JM, GORDON JI,
Mapping Enteroendocrine Cell Populations in transgenic Mice Reveals an Unexpected Degree of Complexity in Cellular Differentiation within the Gastrointestinal Tract.
J. Cell Biol. 1990; 110: 1791-1801

-
- [119] SHARMA R, SCHUMACHER U
The diet and gut microflora influence the distribution of enteroendocrine cells in the rat intestine.
Experientia 1996; 52: 664-670
- [120] URIBE A, ALAM M, MIDVEDT T, SMEDFORS B, THEODORSSON E
Endogenous Prostaglandins and Microflora Modulate DNA Synthesis and Neuroendocrine Peptides in the rat Gastrointestinal Tract.
Scand. J. Gastroenterol. 1997; 32: 691-699
- [121] HARTMANN F, OWEN R, BISSELL DM
Characterization of isolated epithelial cells from rat small intestine.
Am. J. Physiol. 1982; 242: G147-G155
- [122] EVANS EM, WRIGGLESWORTH JM, BURDETT K, POVER WFR
Studies on epithelial cells isolated from guinea pig small intestine.
J. Cell Biol. 1971; 51: 452-464
- [123] SOUBA WW, SMITH RJ, WILMORE DW
Glutamine Metabolism by the Intestinal Tract.
J. Parent. Ent. Nutr. 1985; 9: 608-617
- [124] WILMORE DW
Metabolic Support of the gastrointestinal Tract. Potential Gut Protection during Intensive Cytotoxic Therapy.
Cancer 1997; 79: 1794-1803
- [125] WATFORD M, LUND P, KREBS HA
Isolation and Metabolic Characteristics of Rat and Chicken Enterocytes.
Biochem. J. 1979; 178: 589-596
- [126] PORTELA-GOMES GM, STRIDSBERG M, JOHANSSON H, GRIMELIUS L
Co-localization of synaptophysin with different neuroendocrine hormones in the human gastrointestinal tract.
Histochem. Cell Biol. 1999; 111: 49-54
- [127] WYNICK D, BLOOM SR
Magnetic Bead Separation of Anterior Pituitary Cells.
Neuroendocrinology 1990; 52: 560-565
- [128] LEA T, VARTDAL F, DAVIES C, UGELSTAD J
Magnetic monosized polymer particles for fast and specific fractionation of human mononuclear cells.
Scand. J. Immunol. 1985; 22: 207-216
- [129] FALKO JM, CROCKETT SE, CATALAND S, O'DORISIO TM, KRAMER W, MAZZAFERRI EL
The effect of increasing doses of ingested glucose on insulin and gastric inhibitory polypeptide (GIP) concentrations in man.
Clin. Endocrinol. 1980; 13:587-593

-
- [130] EVANS GS, FLINT N, POTTEN CS
Primary cultures for studies of cell regulation and physiology in intestinal epithelium.
Ann. Rev. Physiol. 1994; 56: 399-417
- [131] BENYA RV, SCHMIDT LN, JASMINDER S, LAYDEN TJ, RAO MC
Isolation, characterization and attachment of rabbit distal colon epithelial cells.
Gastroenterology 1991; 101: 692-702
- [132] BOUDREAU N, SYMPSON CJ, WERB Z, BISSELL MJ
Suppression of ICE and Apoptosis in Mammary Epithelial Cells by Extracellular Matrix.
Science 1995; 267: 891-893
- [133] HAGUE A, HICKS DJ, BRACEY TS, PARASKEVA C
Cell-cell contact and specific cytokines inhibit apoptosis of colonic epithelial cells: growth factors protect against c-myc-independent apoptosis.
Br. J. Cancer 1997; 75: 960-968
- [134] KLEINMAN HK, MCGARVEY ML, HASSELL JR, STAR VL, CANNON FB, LAURIE GW, MARTIN GR
Basement Membrane Complexes with Biological Activity.
Biochemistry 1986; 25: 312-318
- [135] NAGLE WA, SOLOFF BL, MOSS AJ, HENLE KJ
Cultured Chinese Hamster Cells Undergo Apoptosis after Exposure to Cold but Nonfreezing Temperatures.
Cryobiology 1990; 27: 439-451
- [136] KRUMAN II, GUKOVSKAYA AS, PETRUNYAKA VV, BELETSKY IP, TREPAKOVA ES
Apoptosis of Murine BW 5147 Thymoma Cells Induced by Cold Shock.
J. Cell. Physiol. 1992; 153: 112-117
- [137] MUELLER AR, NALESNIK MA, LANGREHR JM, RAO PN, SNYDER JT, HOFFMAN RA, SCHRAUT WH
Evidence that small bowel preservation causes primarily basement membrane and endothelial rather than epithelial cell injury.
Transplantation 1993; 56: 1499-1504
- [138] SHAH KA, SHUREY S, GREEN, CJ
Characterization of apoptosis in intestinal ischaemia-reperfusion injury - a light and electron microscopic study.
Int. J. Exp. Path. 1997; 78: 355-363

-
- [139] PETERS SMA, RAUEN U, TIJSEN MJH, BINDELS RJM, VAN OS CH, DE GROOT H, WETZELS JFM
Cold preservation of isolated rabbit proximal tubules induces radical-mediated cell injury.
Transplantation 1998; 65: 625-632
- [140] POITOUT V, OLSON LK, ROBERTSON RP
Insulin-secreting cell lines: Classification, characteristics and potential applications.
Diabetes & Metabolism 1996; 22: 7-14
- [141] HERRMANN-RINKE C, VÖGE A, HESS M, GÖKE B
Regulation of glucagon-like peptide-1 secretion from rat ileum by neurotransmitters and peptides.
J. Endocrinol. 1995; 147: 25-31
- [142] DUMOULIN V, DAKKA T, PLAICANCIE P, CHAYVIALLE JA, CUBER JC
Regulation of Glucagon-Like Peptide-1-(7-36) Amide, Peptide YY, and Neurotensin Secretion by Neurotransmitters and Gut Hormones in the Isolated Vascularly Perfused Rat Ileum.
Endocrinology 1995; 136: 5182-5188
- [143] ROBERGE JN, GRONAU KA, BRUBAKER PL
Gastrin-Releasing Peptide Is a Novel Mediator of Proximal Nutrient-Induced Proglucagon-Derived Peptide Secretion from the Distal Gut.
Endocrinology 1996; 137: 2383-2388
- [144] MOGHIMZADEH E, EKMAN R, HÅKANSON R, YANAIHARA N, SUNDLER F
Neuronal gastrin-releasing peptide in the mammalian gut and pancreas.
Neuroscience 1983; 10: 553-563
- [145] NAUCK MA, BARTELS E, ØRSKOV C, EBERT R, CREUTZFELDT W
Additive Insulinotropic Effects of Exogenous Synthetic Human Gastric Inhibitory Polypeptide and Glucagon-Like Peptide-1-(7-36) Amide Infused at Near-Physiological Insulinotropic Hormone and Glucose Concentrations.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1993; 76: 912-917
- [146] ROCCA AS, BRUBAKER PL
Role of the Vagus Nerve in Mediating Proximal Nutrient-Induced Glucagon-Like Peptide-1 Secretion.
Endocrinology 1999; 140: 1687-1694
- [147] TOFT-NIELSEN M, MADSBAD S, HOLST JJ
Exaggerated secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) could cause reactive hypoglycaemia.
Diabetologia 1998; 41: 1180-1186
- [148] DEETJEN P, SPECKMANN EJ (EDS.)
Physiologie. 2. Auflage. Urban & Schwarzenberg, München, 1994: 443

-
- [149] LÖFFLER, G, PETRIDES PE
Biochemie und Pathobiochemie. 5. Auflage. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1997: 1010
- [150] DUMOULIN V, MORO F, BARCELO A, DAKKA T, CUBER JC
Peptide YY, Glucagon-Like Peptide-1, and Neurotensin Responses to Luminal Factors in the Isolated Vascularly Perfused Rat Ileum.
Endocrinology 1998; 139: 3780-3786
- [151] HOYT EC, LUND PK, WINESETT DE, FULLER CR, GHATEI MA, BLOOM, SR, ULSHEN MH
Effects of Fasting, Refeeding, and Intraluminal Triglyceride on Proglucagon Expression in Jejunum and Ileum.
Diabetes 1996; 45: 434-439
- [152] NAUCK MA
Is glucagon-like peptide 1 an incretin hormone?
Diabetologia 1999; 42: 373-379
- [153] RAWDON BB, ANDREW A
Origin and Differentiation of Gut Endocrine Cells.
Histol. Histopath. 1993; 8: 567-580
- [154] McCLENAGHAN NH, FLATT PR
Engineering cultured insulin-secreting pancreatic B-cell lines.
J. Mol. Med. 1999; 77: 235-243
- [155] VAN SCHILFGAARDE R, DE VOS P
Factors influencing the properties and performance of microcapsules for immunoprotection of pancreatic islets.
J. Mol. Med. 1999; 77: 199-205
- [156] OGAWA Y, NOMA Y, DAVILLI AM, WU YJ, THORENS B, BONNER-WEIR S, WEIR GC
Loss of glucose-induced insulin secretion and GLUT2 expression in transplanted β -cells.
Diabetes 1995; 44: 75-79
- [157] GUTNIAK M, ØRSKOV C, HOLST JJ, AHRÉN B, EFENDIC S
Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36)amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus.
N Engl. J. Med 1992; 326: 1316-1322
- [158] CREUTZFELDT WOC, KLEINE N, WILLMS B, ØRSKOV C, HOLST JJ, NAUCK MA
Glucagonostatic Actions and Reduction of Fasting Hyperglycemia by Exogenous Glucagon-Like Peptide I (7-36) Amide in Type I Diabetic Patients.
Diabetes Care 1996; 19: 580-586

-
- [159] FREYSE EJ, KNOSPE S, BECHER T, EL HAG O, GÖKE B, FISCHER U
Glucagon-Like Peptide-1 has No Insulin-Like Effects in Insulin-Dependent Diabetic Dogs Maintained Normoglycemic and Normoinsulinemic.
Metabolism 1999; 48: 134-137
- [160] HOLZ IV GG, KÜHTREIBER WM, HABENER JF
Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37).
Nature 1993; 361: 362-365
- [161] DACHICOURT N, SERRADAS P, BAILBÉ D, KERGOAT M, DOARÉ L
Glucagon-like peptide-1(7-36)-amide confers glucose sensitivity to previously glucose-incompetent β -cells in diabetic rats: *in vivo* and *in vitro* studies.
J. Endocrinol. 1997; 155: 369-376
- [162] SHEN HQ, ROTH MD, PETERSON RG
The Effect of Glucose and Glucagon-Like Peptide-1 Stimulation on Insulin Release in the Perfused Pancreas in a Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus Animal Model.
Metabolism 1998; 47: 1042-1047
- [163] BYRNE MM, GLIEM K, WANK U, ARNOLD R, KATSCHINSKI M, POLONSKY KS, GÖKE B
Glucagon-Like Peptide 1 Improves the Ability of the β -Cell to Sense and Respond to Glucose in Subjects With Impaired Glucose Tolerance.
Diabetes 1998; 47: 1259-1265
- [164] GUTNIAK MK, LARSSON H, HEIBER SJ, JUNESKANS OT, HOLST JJ, AHRÉN B
Potential therapeutic levels of glucagon-like peptide 1 achieved in humans by a buccal tablet.
Diabetes Care 1996; 19: 843-848
- [165] TODD JF, EDWARDS CMB, GHATEI MA, MATHER HM, BLOOM SR
Subcutaneous glucagon-like peptide-I improves postprandial glycaemic control over a 3-week period in patients with early Type 2 diabetes.
Clin. Sci. 1998; 96: 325-329
- [166] EDWARDS CMB, TODD JF, GHATEI MA, BLOOM SR
Subcutaneous glucagon-like peptide-1 (7-36)amide is insulinotropic and can cause hypoglycaemia in fasted healthy subjects.
Clin. Sci. 1998; 96: 719-724
- [167] MENTLEIN R, GALLWITZ B, SCHMIDT WE
Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum.
Eur. J. Biochem. 1993; 214: 829-835

-
- [168] PEDERSON RA, WHITE HA, SCHLENZIG D, PAULY RP, McINTOSH CHS, DEMUTH HU
Improved Glucose Tolerance in Zucker Fatty Rats by Oral Administration of the Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor Isoleucine Thiazolidide.
Diabetes 1998; 47: 1253-1258
- [169] HOLST JJ, DEACON CF
Inhibition of the Activity of Dipeptidyl-Peptidase IV as a Treatment for Type 2 Diabetes.
Diabetes 1998; 47: 1663-1670
- [170] GREIG NH, HOLLOWAY HW, DE ORE KA, JANI D, WANG Y, ZHOU J, GARANT MJ, EGAN JM
Once daily injection of exendin-4 to diabetic mice achieves long-term beneficial effects on blood glucose concentrations.
Diabetologia 1999; 42: 45-50
- [171] BURCELIN R, DOLCI W, THORENS B
Long-Lasting Antidiabetic Effect of a Dipeptidyl Peptidase IV-Resistant Analog of Glucagon-Like Peptide-1.
Metabolism 1999; 48: 252-258

Danksagung

Bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit haben mir viele Menschen geholfen. Ich möchte mich daher an dieser Stelle bei folgenden Personen besonders bedanken:

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Andreas Gardemann für das Thema, das mich fasziniert hat, für die Bereitstellung der Sachmittel, die ihm von der DFG zugesprochen wurden und dafür, daß er jederzeit für ein fachliches Gespräch für mich da war.

Herrn Prof. Dr. Dr. Katz danke ich für die abschließende Finanzierung und das Interesse an meiner Arbeit.

Mein Dank gilt Frau Monika Fink für ihre Mitarbeit an meinen Versuchen während der ersten 1 ½ Jahre. Die Zusammenarbeit mit ihr war auch menschlich eine große Bereicherung.

Danke ebenso an Frau Ivonne Becker, die mich in vielen Gesprächen auf produktive Ideen gebracht hat. Frau Dr. Bei Huang und Frau Dr. Nadia Al-Fakhri danke ich für die Einarbeitung in die Herstellung von Gefrierschnitten und dafür, daß ich ihr Kryotom jederzeit benutzen durfte. Vielen Dank auch an Frau Dorothee Engel, Frau Heike Weidemann und Herrn Peter Zimmermann für ihre Unterstützung, außerdem an die vielen Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie, die hier nicht im einzelnen genannt wurden.

Weiterhin sei der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Diener am Institut für Physiologie des Fachbereichs Veterinärmedizin gedankt. Ohne die monatelange, zuverlässige Bereit-stellung von Rattendünndarm durch die Technischen Assistentinnen und Doktorandinnen der Arbeitsgruppe wäre meine Arbeit nicht durchführbar gewesen. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Gerhard Schultheiß, der mir zusätzlich viele wertvolle Ratschläge gegeben hat.

Ich bedanke mich bei Frau Tina Heep dafür, daß sie mir wie selbstverständlich ebenfalls viele Rattendärme zur Verfügung gestellt hat.

Mein Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Daniel, die trotz ihres Universitätswechsels die Aufgabe, diese Arbeit mitzubetreuen, ernst genommen hat.

Bei meinem Bruder Martin bedanke ich mich für das professionelle Einscannen der Fotos für diese Arbeit.

Mein letzter und größter Dank gilt meinem Mann Kai, ohne den diese Arbeit niemals entstanden wäre.

Lebenslauf

Name: Jutta Maaß
Adresse: Wilsonstraße 8
35392 Gießen
Telefon: 0641/72982

geboren am: 03.01.1972
in: Friedberg (Hessen)

Familienstand: verheiratet (seit 29.05.1998)
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung: 1978 - 1982 Philipp-Dieffenbach-Grundschule
Friedberg
1982 - 1991 Augustiner-Gymnasium Friedberg
Juni 1991 Abitur

Studium: Oktober 1991 - Oktober 1996
Studium der Haushalts- und Ernährungswissen-
schaften an der Justus-Liebig-Universität Gießen
Abschluß als Diplom-Oecotrophologin

November 1996 - Juni 1999
Arbeit an der Promotion
am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Beruflicher Werdegang: seit Juli 1999
bei Russell Reynolds Associates, Frankfurt