

Vorbemerkung

Diabetes ist inzwischen zu einer Volkskrankheit geworden, an der in Deutschland zur Zeit etwa 6 Millionen Menschen erkrankt sind, wobei 95% am Diabetes-Typ 2 (wozu der sogenannte „Alterszucker“ zählt), 5% am Diabetes-Typ 1 leiden.

Der Vortrag zeichnet die Geschichte der Zuckerkrankheit nach und konzentriert sich dann auf die Diabetes-Forschung in Gießen. Dabei wird deutlich, in welchem Maße die Gießener Arbeitsgruppen sowohl in der Grundlagenforschung wie in der Therapie weltweit eine führende Position einnehmen.

Bereits in den 1970er Jahren hatte man hier begonnen, über Transplantation von Inselzellen zu forschen, um die ausgefallenen Funktionen, die zu der Stoffwechselerkrankung

führen, zu ersetzen. Das Ziel war und bleibt weiterhin, eine Insulinunabhängigkeit der Patienten zu erreichen, den häufig mit Diabetes verbundenen Langzeitschädigungen vorzubeugen und den Kranken insgesamt eine verbesserte Lebensqualität zu ermöglichen. Die Transplantation von Inselzellen stellt ein sehr kompliziertes Verfahren dar, vor allem kommt es auch hier bei fremden Transplantaten zu Abstoßungsreaktionen des Organismus, denen medikamentös mit Immunsuppressiva gesteuert werden muss.

Wie in Bezug auf andere Krankheitsbilder werden auch für die Therapie des Diabetes große Hoffnungen an die aktuellen Biotechnologien (Stammzellforschung, Gentherapie) geknüpft, um einerseits diese Probleme zu überwinden und andererseits ausreichend Spenderorgane verfügbar zu haben.

Reinhard G. Bretzel

Diabetes mellitus und Inselzelltransplantation – neue Heilungschancen für eine Volkskrankheit?

Was ist Diabetes mellitus – Wie häufig ist diese Erkrankung – Welches sind die Folgen?

Diabetes mellitus ist eine Gruppe von Stoffwechselerkrankungen, charakterisiert durch den Leitbefund der chronischen Hyperglykämie (Blutzuckererhöhung) auf dem Boden einer gestörten Sekretion des Hormons Insulin aus den sog. Betazellen der Langerhansschen Inseln im Pankreas (Bauchspeicheldrüse) oder einer verminderten Insulinwirkung an den Hauptzielzellen (Leber-, Muskel- und Fettzellen), oder aber beider Defekte gleichzeitig.

* Dieser Vortrag wurde auf der ordentlichen Mitgliederversammlung der Gießener Hochschulgesellschaft am 5. Juni 2001 gehalten.

Die Erkrankung hat inzwischen epidemische Ausmaße angenommen. Weltweit sind etwa 150 Millionen an einem Diabetes erkrankt, bis zum Jahre 2025 rechnet die Weltgesundheitsorganisation (WHO) gar mit einer Verdoppelung auf dann 300 Millionen Diabetiker. In unserem Land wird die Zahl der Diabetesfälle auf ca. 6 Millionen geschätzt, mit zunehmender Ausbreitung dieser Volkskrankheit in den letzten Jahren. Etwa 95 von 100 Diabetikern in unserem Land sind sog. Typ-2-Diabetiker, deren Betazellen in aller Regel noch ausreichend Insulin produzieren, das aber nicht rasch und effektiv genug wirkt (Insulinresistenz). Etwa 5 von 100 Diabetikern leiden an einem sog. Typ-1-Diabetes, bei dem über einen Autoimmunprozess die Betazellen des Pankreas zerstört wur-



Abb. 1. Typische Diabetes-Folgeschäden: Neuropathisches Ulcus am Fuß, schwere Augenhintergrundveränderungen (Retinopathie), verändertes Nierenglomerulum (Nephropathie), Gangrän der Zehen durch Mikro- und Makroangiopathie

Tab. 1. Inzidenz von Folgeerkrankungen bei Patienten mit einem Diabetes mellitus in Deutschland

	Neuerkrankungsfälle	
	pro Jahr	pro Zeiteinheit
Polyneuropathie	130 000	4 min.
Retinopathie	56 000	9 min.
Tödliche Herzinfarkte	35 000	15 min.
Amputationen	28 000	19 min.
Tödliche Schlaganfälle	13 000	40 min.
Nierenersatztherapie (Dialyse)	8 000	1 Std.
Erblindungen	6 000	1,5 Std.

den, was zur Folge hat, dass sich diese Patienten lebenslang mehrmals am Tage Insulin injizieren müssen.

Der Diabetes mellitus hat aber noch ein zweites Gesicht. Die chronische Hyperglykämie führt zu generellen Gefäßschäden, wobei die diabetes-spezifische Erkrankung der kleinen Gefäße (Mikroangiopathie) Folgeschäden vorwiegend an Augen (Retinopathie), Nieren (Nephropathie) und Nervensystem (Neuropathie) bedingt. Mit dem Diabetes assoziiert ist häufig auch eine Er-

krankung der großen Gefäße (Makroangiopathie) mit Folgeschäden vorwiegend an Herz, Gehirn und peripheren Arterien. Bei etwa jedem zweiten Patienten mit einem Diabetes entwickeln sich derartige Organfolgeschäden (Abb. 1). Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungsfälle in Deutschland ist sehr hoch (Tab. 1).

Segen und Fluch der Insulininjektionstherapie

Vor der Entdeckung des Insulins 1922 durch Banting und Best (1) und der bald darauf erfolgten klinischen Anwendung überlebten insulinpflichtige Diabetiker nur wenige Jahre. Durch regelmäßige Insulininjektionen kann die Blutzuckerentgleisung beherrscht werden und – vorausgesetzt der Blutzucker wird normnahe (nüchtern < 110 mg/dl, 1 Stunde nach dem Essen < 145 mg/dl) eingestellt – es lassen sich damit die Entstehung und das Fortschreiten von Organschäden verhindern –, darin liegt der Segen der Insulintherapie. Insulin kann aber Unterzuckerungen (Hypoglykämien) bis hin

zum lebensgefährlichen Unterzuckerungsschock (Koma) auslösen. Diese Gefahr wird umso größer, je strenger der Blutzucker eingestellt wird, was auf der anderen Seite im Hinblick auf eine Organprotektion erforderlich ist. Mit dem Untergang der Betazellen ist dem Patienten auch der Messfühler zur minutengenauen Bestimmung der aktuellen Blutzuckerkonzentration abhanden gekommen. So muss er sich täglich mehrfach in die Fingerbeeren stechen, dabei einen Blutstropfen gewinnen und mit Hilfe von Glukoseteststreifen den Blutzucker vor der geplanten Insulininjektion zur Dosiskalkulation selbst messen. Im Laufe eines Diabetikerlebens werden so leicht bis zu 100.000 Fingerbeerenstiche erforderlich – Fluch der Insulininjektionstherapie!

Die Alternative – biologischer Ersatz der Betazellen durch Pankreasorgan- oder Pankreasinselzelltransplantation

Der biologische Ersatz der autoimmunologisch zerstörten Betazellen der Langerhansschen Inseln im Pankreas durch eine Transplantation

des gesamten Pankreasorgans oder von isolierten Langerhansschen Inseln (Zellen) (Abb. 2) ist derzeit die einzige Therapie, mit der sich eine vollständige Normalisierung des Blutzuckers ohne gleichzeitige Gefahr einer Unterzuckerung erzielen lässt. Da Pankreas oder Pankreasinseln von hirntoten Organspendern stammen, muss zur Verhinderung einer Abstoßung des Fremdgewebes/der Fremdzellen gegenwärtig aber noch eine keineswegs harmlose, lebenslange immunsuppressive Behandlung des Transplantatempfängers erfolgen.

Pankreasorgantransplantation bei Typ-1-Diabetikern

Die erste kombinierte Pankreas-Nieren-Organtransplantation beim Menschen erfolgte Ende 1966 an der Universität Minneapolis, USA (2), wobei die Empfängerin, eine 20 Jahre alte Patientin mit einem Typ-1-Diabetes seit dem ersten Lebensjahr, aber nur 6 Tage auf Insulininjektionen verzichten konnte. Nur zwei Monate nach der Transplantation zwangen auftretende Komplikationen dazu, das Pankreas- und

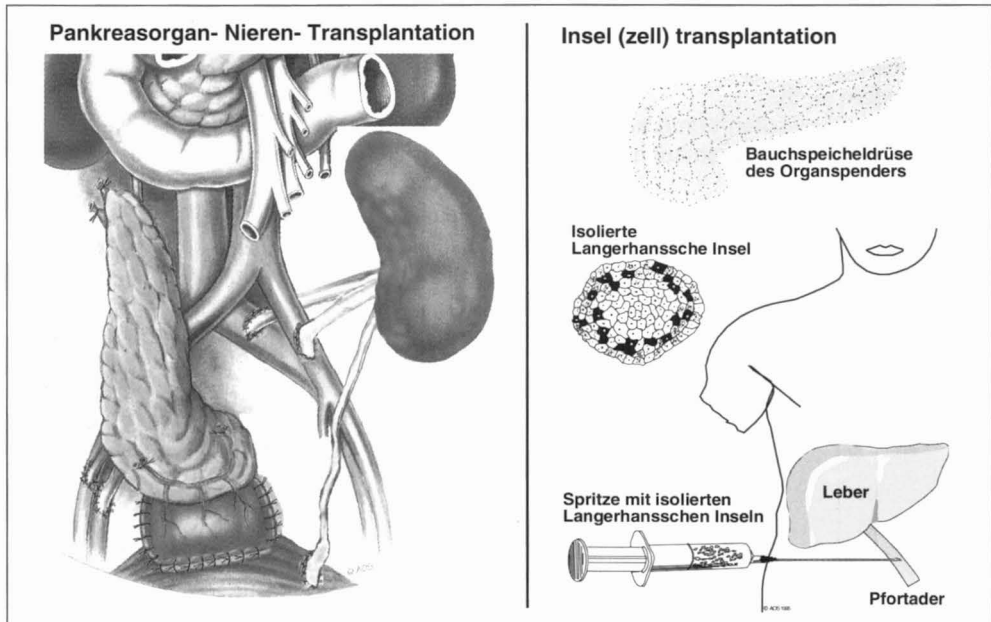


Abb. 2. Prinzip der Pankreasorgan- und Inselzelltransplantation

Nierentransplantat zu entfernen, die Patientin verstarb kurz darauf. Beim Kongress der Europäischen Transplantations-Gesellschaft 1985 in München berichteten erstmals europäische Arbeitsgruppen aus Lyon, München, Stockholm und Oslo über Ein-Jahres-Funktionsraten von 50–60% nach Pankreas-Nieren-Transplantation. In den nachfolgenden Jahren führten der Einsatz effektiverer Immunsuppressiva, verbesserte Operationstechniken und ein optimiertes Transplantationsmanagement dazu, dass bis Ende des Jahres 2000 dem International Pancreas Transplant Registry (IPTR) am Chirurgischen Department der Universität von Minnesota in Minneapolis, USA, mehr als 15 000 Pankreasorgantransplantationen bei Typ-1-Diabetikern gemeldet werden konnten (3). In Deutschland werden pro Jahr inzwischen 200–250 derartige Transplantationen – in der Regel Pankreas und Niere simultan – vorgenommen. Die Ein-Jahres-Funktionsrate der übertragenen Pankreasorgane liegt bei etwa 85%. Das bedeutet, dass gut 4 von 5 auf diese Weise behandelte Typ-1-Diabetiker auf jegliche Insulininjektion verzichten können. Damit lassen sich eine optimale Blutzuckereinstellung erzielen, gefährliche Unterzuckerungen vermeiden und das Auftreten neuer bzw. Fortschreiten bestehender diabetischer Organfolgeschäden verhindern (4, 5).

Die Rate an chirurgischen Komplikationen bei der Pankreasorgantransplantation ist aber

noch immer beträchtlich. So muss in etwa 30% der Fälle die Bauchhöhle wieder eröffnet werden, um intraabdominelle Infektionen (Peritonitis, Abszessbildungen), Transplantatthrombosen, Anastomosenleakagen usw. zu behandeln (6). Die Mortalitätsraten im Zeitraum von 1 bis 3 Jahren nach der Transplantation liegen bei 5–7%. Die Langzeitüberlebenschancen der Patienten nach einer simultanen Pankreas-Nieren-Transplantation sind aber bedeutend besser als für Diabetiker an der Dialyse und auch größer als jene von Patienten nach alleiniger Nierentransplantation (7).

Insel(zell)transplantation bei Typ-1-Diabetikern

Rudolf Virchow (1821–1902) vermutete erstmals eine inkretorische Funktion (Abgabe von Inkretinen = Hormonen) des Pankreas neben der schon bekannten exkretorischen Funktion (Abgabe von Verdauungssäften). Sein Doktorand Paul Langerhans beschrieb in seiner Dissertationsschrift (1869) eigenartige „Zellhaufen“, eingestreut in die Bauchspeicheldrüse (Abb. 3). Er hatte aber keinerlei Vorstellungen zur Funktion dieser später nach ihm benannten Langerhansschen Inseln. Das ca. 70 g schwere Pankreas enthält etwa 1 Million derartige Inseln, die nur 2–4% der Gewebsmasse dieses Organs ausmachen. Eine Insel hat einen Durchmesser von max. 500 µm (1/2 Millimeter), ent-



Abb. 3. Wegbereiter der Inselzelltransplantation. Von links: Paul Langerhans (1847–1888), Oskar Minkowski (1858–1931), Josef von Mering (1849–1908)

hält ca. 2000 Zellen, wovon 80% insulinproduzierende Betazellen sind. Transplantiert wird der Zellverband, die Inseln. Um den Unterschied zur Pankreasorgantransplantation herauszustellen, wird in den letzten Jahren vermehrt von Inselzelltransplantation gesprochen, wobei aber die Transplantation von intakten Inseln gemeint ist und keineswegs die von Einzelzellen.

Im April 1889 besuchte Oskar Minkowski, Schüler Naunyns und Assistenzarzt an der Medizinischen Klinik der Universität Königsberg, das Hoppe-Seylersche Institut an der Universität Straßburg. Zusammen mit Josef von Mering begann er mit Pankreatektomie-Experimenten am Hund (8) (Abb. 3). Sie beobachteten, dass nach totaler Pankreatektomie ein Diabetes entstand (Mering, Minkowski, 1890). Am 18. Dezember 1891 berichtete Oskar Minkowski in einem Vortrag vor der Naturwissenschaftlich-Medizinischen Gesellschaft Straßburg über den Fortgang ihrer Experimente und schilderte, dass sie durch Autotransplantation von Pankreasfragmenten unter die Bauchhaut nach Pankreatektomie beim Hund einen Diabetes verhindern konnten (9). Sie schlossen aus ihren Experimenten, dass die Bauchspeicheldrüse „etwas“ sezerniert, was die Glukoseaufnahme in die peripheren Gewebe vermittelt. Heutzutage wissen wir natürlich, dass dieses „etwas“ das Hormon Insulin ist, welches erst 30 Jahre später aus Pankreasgewebe extrahiert und wenig später erstmals insulinbedürftigen Diabetikern injiziert werden konnte (1). Dieser Vortrag, am 1. Februar 1892 in der *Berliner Klinischen Wochenschrift* veröffentlicht, ist die erste Mitteilung über eine Inseltransplantation an die Wissenschaftswelt. Bereits ein Jahr darauf erfolgt die erste Pankreasfragmenttransplantation beim Menschen. Dr. P. Watson Williams und sein Kollege, der Chirurg Harsant, transplantierten am 20. Dezember 1893 einen 15-jährigen Jungen mit einem Typ-1-Diabetes am Royal Infirmary Hospital in Bristol, England. Drei Stücke („each the size of a Brazil nut“) eines Pankreas vom frisch geschlachteten Schaf wurden übertragen (10). Sie beobachteten, dass die Glukosurie zurückging. Der Junge verstarb aber wenige Tage später.

Die Dissertationsschrift von Paul Langerhans, die tierexperimentellen Arbeiten von Oskar Minkowski und Josef von Mering am Hund und die erste (Xeno-)Transplantation von tierischen Pankreasfragmenten bei einem Diabetiker, durchgeführt in Bristol, sind Pionierarbeiten, die den Weg hin zur erfolgreichen Inseltransplantation beim Menschen bahnten (11). Doch es sollte noch ein steiniger, sehr langer Weg nahezu über ein ganzes Jahrhundert hindurch werden bis zu ersten Berichten über erfolgreiche Inseltransplantationen beim Menschen (Scharp et al. 1990).

Langjährige tierexperimentelle Entwicklung – Erste Insel-Autotransplantation beim Menschen und erste Insel-Allotransplantation bei einem diabetischen Patienten am Klinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen

Unsere tierexperimentellen Untersuchungen zur Inseltransplantation an verschiedenen diabetischen Modellen überwiegend der Ratte, aber auch der Maus, begannen wir vor nun 30 Jahren zunächst an der Universität Ulm in der Abteilung für Endokrinologie, Diabetologie und Stoffwechsel (Direktor Prof. Dr. med. Dr. mult. h. c. E. F. Pfeiffer). Nach der Berufung von Konrad Federlin 1976 auf den Lehrstuhl für Innere Medizin und Endokrinologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, verbunden mit der Leitung der Medizinischen Poliklinik, setzten wir unsere Arbeiten an der Klinik im Rodthohl fort (13). Im Jahre 1985 wurden die Arbeiten mit dem Wissenschaftspreis der JLU Gießen, 1986 mit dem Ferdinand-Bertram-Preis der Deutschen Diabetes-Gesellschaft und 1999 mit dem Bürger-Büsing-Preis des Bundes diabetischer Kinder und Jugendlicher ausgezeichnet. In Kooperation mit der Chirurgischen Arbeitsgruppe von Prof. Hopt, zunächst Universität Tübingen, später Universität Rostock, folgten tierexperimentelle Inseltransplantationen beim Hund und Schwein. Frühzeitige Kontakte erlaubten uns, mehrfach die auf dem Gebiet der experimentellen und klinischen Inselzelltrans-

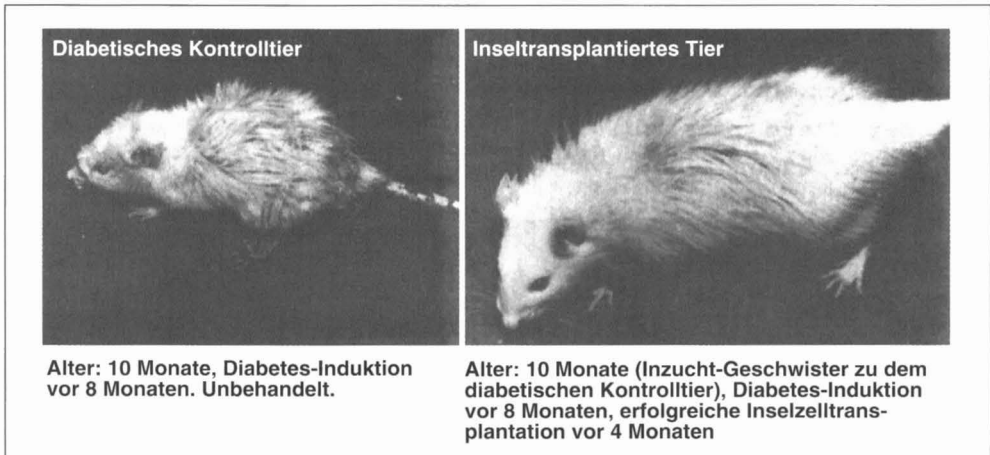


Abb. 4. Chemisch-toxisch induzierter Diabetes mellitus am Modell der Ratte. Gleichaltrige Inzuchtgeschwister mit Diabetes (links) und nach erfolgreicher Inseltransplantation (rechts)

plantation forschenden Arbeitsgruppen aus allen Kontinenten zum Erfahrungsaustausch zusammenzubringen und internationale Workshops abzuhalten: Im Jahre 1980 einen International Workshop on Islet Isolation, Culture and Cryopreservation in Verbindung mit dem Jahreskongress der Deutschen Diabetes-Gesellschaft in Gießen (14); im Jahre 1988 ein International Symposium on Immunological and Dynamic Aspects of Insulin Substitution in Diabetes Mellitus aus Anlass des 60. Geburtstages von Prof. Dr. med. Konrad Federlin (15); im Jahre 1989 einen International Workshop on Methods in Islet Transplantation Research in Bad Nauheim (16); im Jahre 1995 den Fifth Islet Workshop der Deutschen Diabetes-Gesellschaft aus Anlass der 30. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft in Nürnberg (17); im Jahre 1996 in Gießen ein International Symposium on Endocrine Cell Transplantation and Genetic Engineering als offizielles Satellitensymposium des Weltkongresses 1996 der International Society of Endocrinology in San Francisco, USA (18).

Tierexperimentelle Erkenntnisse

An Modellen eines Autoimmundiabetes und eines chemisch-toxisch induzierten Diabetes von Nagern konnte gezeigt werden, dass sich

neben der diabetischen Hyperglykämie faktisch alle weiteren Stoffwechselfparameter durch Inseltransplantation anhaltend normalisieren lassen (19). Dabei wird im Gegensatz zur Insulininjektionstherapie die Blutzuckerhomöostase wieder vollständig hergestellt ohne die Gefahr einer Unterzuckerung (Hypoglykämie). Transplantationen im syngenem System (Inzucht/Zwillingspaare) bewiesen, dass diabetische Tiere bereits vier Monate nach Transplantation sich nicht mehr von einem gesunden Normaltier unterscheiden. Hingegen hinterlässt das unbehandelte diabetische Geschwistertier einen schwerkranken Eindruck (Abb. 4).

Auch das zweite Gesicht des Diabetes, die Organfolgeschäden, lassen sich durch eine frühzeitige Inseltransplantation verhindern, bereits bestehende initiale Schäden noch zurückbilden. Dies gilt – bis auf die diabetische Linsentrübung (Katarakt) – für alle Organfolgeschäden (19, 20).

Erste Autotransplantation von Langerhansschen Inseln beim Menschen in Gießen

Im Jahre 1978 wurde in Kooperation mit der Klinik für Allgemein- und Thoraxchirurgie (Leiter Prof. Dr. med. Konrad Schwemmler) an der Justus-Liebig-Universität Gießen erstmals bei

einem Patienten nach totaler Duodenopankreatektomie (wegen schmerzhafter, chronisch-rezidivierender Pankreatitis mit Duodenalstenose) eine autologe Transplantation der aus dem geschädigten Pankreasorgan isolierten Langerhansschen Inseln in die Pfortader der Leber vorgenommen (21). Der Patient konnte in der Folge zwar nicht gänzlich auf Insulininjektionen verzichten, hatte aber nur noch einen geringen Resttagesbedarf von Insulin. Dies war die erste autologe Inseltransplantation beim Menschen im Bereich von EUROTRANSPLANT (Beneluxländer, Deutschland, Österreich und neuerdings Slowenien).

Erste erfolgreiche allogene Inseltransplantation bei einer Typ-1-Diabetikerin in Gießen

Nach intensiven Entwicklungsarbeiten, insbesondere zur Optimierung der Inselisolierungsverfahren mittels Kollagenase-Enzymgemisch

am Pankreas des Schweines und des Menschen (22, 23) konnte erstmals am 26. November 1992 in Gießen eine Inseltransplantation bei einer Typ-1-Diabetikerin durchgeführt werden mit nachfolgender, mehrere Jahre anhaltender Insulinunabhängigkeit (24). Es sollte die erste allogene Inseltransplantation bei diabetischen Patienten innerhalb des Bereichs von EURO-TRANSPLANT sein. Die 37-jährige Patientin hatte vier Jahre zuvor als Lebendspende eine Niere ihrer Mutter transplantiert bekommen. Mit einem neuartigen Verfahren wurden 350 000 isolierte Langerhanssche Inseln (6150 pro kg Körpergewicht) von nur einem Spenderpankreas in Lokalanästhesie mittels Seldinger-Kathedertechnik transkutan-transhepatisch über das Pfortadersystem in die Leber eingeschwenkt (25) (siehe auch Abb. 7). Nach schrittweiser Dosisreduktion von Cortison konnte nach mehr als einem Jahr die Insulinunabhängigkeit erreicht werden (Abb. 5).

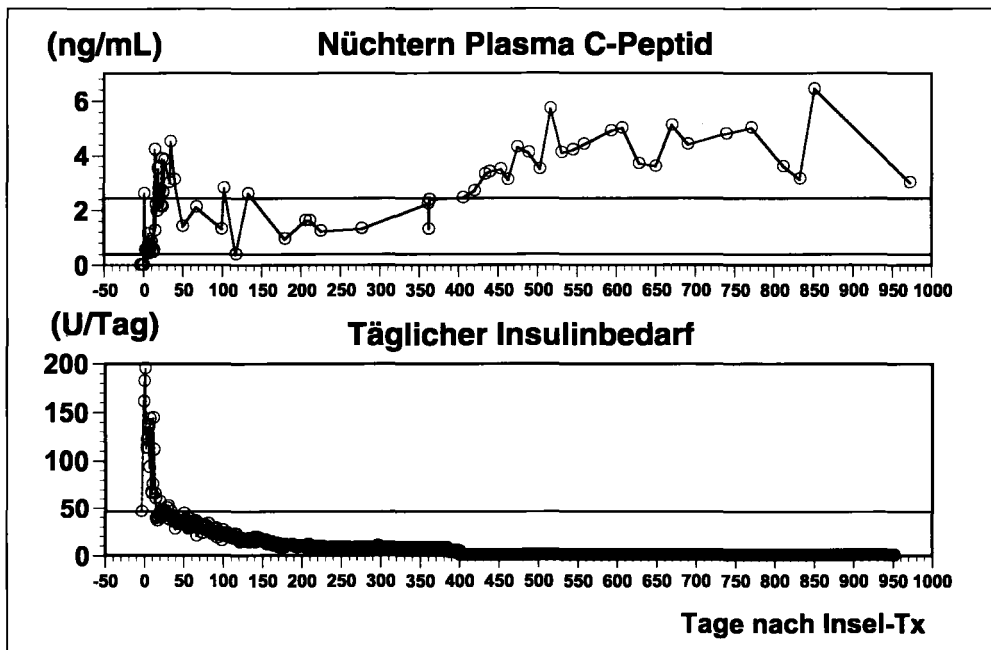


Abb. 5. Erste Insel-nach-Nieren-Transplantation am 26.11.1992 bei einer Typ-1-Diabetikerin. Verlauf der Nüchtern-Plasma-C-Peptidkonzentration nach Inselzelltransplantation (oben) und des täglichen Insulinbedarfs (unten). Insulinunabhängigkeit nach etwa 400 Tagen erreicht. Eingezeichnet Normalbereich (oben) bzw. täglicher Insulinbedarf vor der Transplantation (48 U/d; unten)

Aktueller Stand der Inselzelltransplantation

Vor mehr als zehn Jahren haben wir an unserer Klinik ein International Islet Transplant Registry (ITR) eingerichtet. Die Zentren melden auf freiwilliger Basis ihre Transplantationen und die Verlaufsergebnisse nach Gießen. Nach grober Schätzung werden auf diese Weise gegenwärtig mehr als 95% aller weltweit durchgeführten Inselzelltransplantationen erfasst. Die Daten werden in regelmäßigen Intervallen analysiert und einmal jährlich in einem Newsletter publiziert. Über unsere Internetadresse sind die Analysen abrufbar (<http://www.med.uni-giessen.de/itr>).

Analyse der Daten des Internationalen Inseltransplantations-Registers (ITR)

Im Zeitraum von 1974 bis 31. Dezember 2000 wurden insgesamt 445 humane Inselzelltransplantationen bei Typ-1-Diabetikern gemeldet (26). Gießen nimmt mit 66 derartigen Eingriffen die Spitzenstellung ein. In der letzten Dekade 1990–1999 wurden 355 Fälle erfasst (Tab. 2). In allen Fällen bestand vor der Inselzelltransplantation keine relevante Restsekretion von Insulin mehr (gemessen anhand fehlender C-Peptidsekretion), so dass alle nach der Transplantation beobachteten Insulineffekte vom Inseltransplantat ausgegangen sein müssen. Die Ein-Jahres-Überlebensrate von Patienten liegt bei 96%, in 41% der Fälle funktionieren die Inseln nach 1 Jahr noch, bei 11% der Patienten konnte das Maximalziel Insulinunabhängigkeit erreicht werden (Tab. 3). Dieses erwünschte Ziel, auf jegliche Insulininjektion verzichten zu können, wird immer dann mit hoher Wahrscheinlichkeit erreicht, wenn folgende Kriterien eingehalten werden: eine kalte Ischämiezeit des Spenderpankreas von ≤ 8 Stunden, eine Anzahl von ≥ 6000 Inseln (Inseläquivalente bezogen auf einen durchschnittlichen Diameter von 150 μm) pro Kilogramm Körpergewicht des Empfängers, die Leber als Implantationsort über das Pfortadersystem und eine Induktionsimmunsuppression des Empfängers mit mono- oder polyklonalen Antikörpern. Insulinunabhängigkeit nach Transplantation von Inseln aus

Tab. 2. Adulte Simultane Insel-Nieren-Transplantation (SIK) oder Insel-nach-Nieren-Transplantation (IAK) bei Typ-1-Diabetikern 1990–1999. Institutionen und Anzahl Fälle. Nach ITR Newsletter No. 9, 2001

Gesamtzahl transplantierten Patienten	355
Fälle pro Institution	
– Gießen	66
– Mailand	42
– Minneapolis	35
– Miami	32
– Pittsburgh	26
– Edmonton	20
– Genf	19
– St. Louis	14
– 29 weitere Institutionen mit ≤ 10 Fällen pro Institution	99

Tab. 3. Adulte Simultane Insel-Nieren-Transplantation (SIK) oder Insel-nach-Nieren-Transplantation (IAK) bei Typ-1-Diabetikern 1990–1999. Ergebnisse ein Jahr nach Transplantation bei 237 vor der Transplantation C-Peptid negativen Fällen. Nach ITR Newsletter No. 9, 2001

Patienten-Überlebensrate	96%
Inselfunktionsrate*	41%
Insulinunabhängigkeitsrate	11%
Längster Fall von Insulinunabhängigkeit bisher	6 Jahre

* Patienten mit basalem C-Peptid $\geq 0,5$ ng/ml

Tab. 4. Insulinunabhängigkeit nach Transplantation adulter Inseln aus nur einem Spenderorgan bei Typ-1-Diabetikern. Nach ITR Newsletter No. 9, 2001

Institution	Jahr der Tx	Anzahl Fälle
Gießen	1992–1997	11
Mailand	1990–1999	4
Minneapolis	1992–1995	3
Zentren mit jeweils 1 Fall (Zürich, Paris, Genf, Miami, Pittsburgh)	1978–1996	5
Gesamt		23

nur einem Spenderpankreas ist bisher erst in 23 Fällen erreicht worden (Tab. 4).

Inseltransplantationen am Zentrum Gießen

Indikationen – Kontraindikationen – Anzahl der Transplantationen. Wegen der erforderlichen lebenslangen Immunsuppression werden Inselzelltransplantationen nach wie vor nur auf eine kleine Zielgruppe von Typ-1-Dia-

Tab. 5. Indikationen und Kontraindikationen für eine Inselzelltransplantation. Stand Jahr 2000

Indikationen bei Typ-1-Diabetes mellitus	
1.	Vorausgegangene (> 6 Monate) Nierentransplantation (IAK)
2.	Präterminale/terminale Niereninsuffizienz (SIK)
3.	Vorausgegangene andere Organtransplantation (z. B. Leber) oder Immunsuppression aus anderer Indikation
Kontraindikationen	
1.	Alter weniger als 18 Jahre oder mehr als 65 Jahre
2.	Diabetesdauer weniger als 10 Jahre
3.	Diabetesmanifestation nach dem 35. Lebensjahr
4.	C-Peptid Restsekretion (Plasma C-Peptid 6 min. nach 1 mg Glukagon i.v. $\geq 0,2$ ng/ml)
5.	Kreatinin-Clearance weniger als 45 ml/min (außer bei SIK)
6.	Portale Hypertension
7.	Floride Infektionen, insbesondere auch Hepatitis B und C
9.	Florides Ulcus ventriculi oder duodeni
10.	Psychose
11.	Noncompliance
12.	Medikamenten- oder Drogenabusus
13.	Malignom, falls nicht geheilt und rezidivfrei für mindestens 5 Jahre
Relative Kontraindikationen für eine Inselzelltransplantation	
1.	Übergewicht (BMI > 28,0)
2.	Insulinresistenz (Insulintagesbedarf > 0,9 IU pro kg KG)

betikern beschränkt. Die Indikationen für eine Inselzelltransplantation – Stand Ende 2001 – sind in Tabelle 5 zusammen mit den relativen und absoluten Kontraindikationen aufgelistet. In diesen Empfängergruppen haben wir im Zeitraum vom 26. November 1992 bis 4. November 2001 insgesamt 74 Typ-1-Diabetiker transplantiert (Tab. 6). Dabei wurden in 43 Fällen Inseln simultan mit einer Niere (Simultaneous-Islet-Kidney, SIK) transplantiert, in 24 Fällen Inseln nach vorangegangener Nierentransplantation (Islet-After-Kidney, IAK) und einmal nach vorangegangener Lebertransplantation (Islet-After-Liver, IAL). In 6 Fällen wurden Inseln alleine (Islet-Transplant-Alone, ITA), d. h. ohne vorangegangene oder simultane anderweitige Organtransplantation transplantiert. Mit den Universitätskliniken in Stockholm (Karolinska-Institut)/Schweden, Würzburg, Gent/Belgien, Lübeck und Berlin (Rudolf-Virchow-Klinikum, Charité) bestehen Kooperationen,

Tab. 6. Klinische Inselzelltransplantationen am Zentrum Gießen im Zeitraum November 1992 bis November 2001

Anzahl Inseltransplantationen nach Kategorie	Summe	74	
	IAK	24	
	SIK	23	
	ITA	6	
	IAL	1	
Kollaborative Programme	Summe	11	
	Stockholm	2	
	SIK	5	
	Würzburg	SIL	1
	Gent	Auto	1
	Lübeck	Auto	1
Berlin (RV)	Allo/Auto	1	

IAK Insel nach Niere; SIK simultan Insel/Niere; ITA Inseln alleine; IAL Inseln nach Leber; SIL simultan Insel/Leber

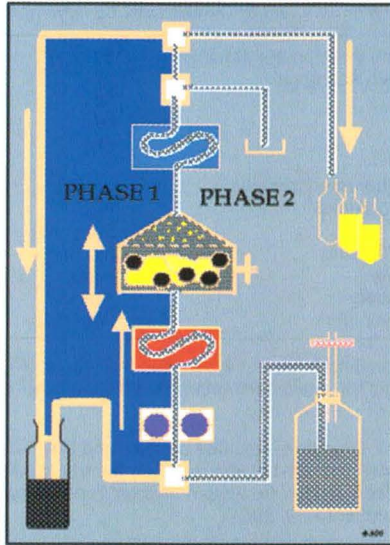
Tab. 7. Ein-Jahres-Resultate der SIK- und IAK-Transplantationen bei Typ-1-Diabetikern am Zentrum Gießen im Vergleich zu den Resultaten anderer Zentren (nach ITR Newsletter No. 9, 2001)

	SIK (n = 35)	IAK (n = 21)
Patientenüberleben	35/35	19/21
Inselfunktion	86% (38%)	47% (34%)
Insulinunabhängigkeit	17% (7%)	21% (7%)
Nierenfunktion	97%	100%

Angaben in Klammern: Vergleichswerte anderer Zentren (ITR-Daten)

wobei von diesen Zentren Spenderpankreaata nach Gießen zur Inselisolierung geschickt werden. Die Inselpräparationen werden nach Rücksendung in den jeweiligen Zentren Patienten transplantiert, so in bisher zusammen 11 Fällen.

Das Gießener Protokoll. Es wurde ein spezielles Transplantationsprotokoll entwickelt, welches der kritischen frühen Implantationsphase („Engraftment“) der Inseln besondere Aufmerksamkeit widmet (27). Damit konnten wir in einer Pilotstudie die Überlebenschancen der transplantierten Inseln in der frühen Phase, d. h. in den ersten Tagen und Wochen, entscheidend verbessern (28). Anstelle einer detaillierten Schilderung der Protokollbestandteile sollen in einer Bildfolge die wichtigsten Schritte illustriert werden (Abb. 6 a–f und Abb. 7 a–d): Inselisolierung durch automatisierte Kollagenasedigestion-Suspensionsreinigung



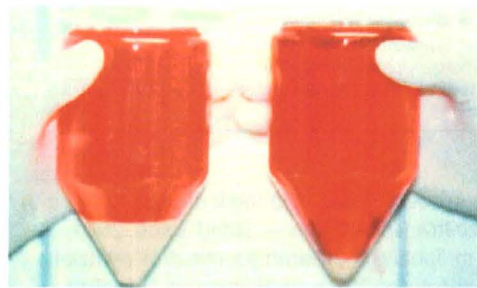
a)



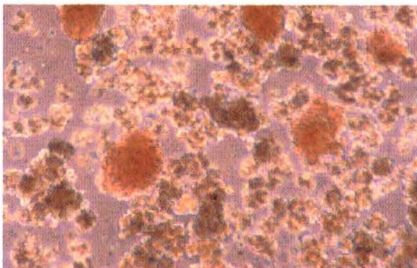
b)



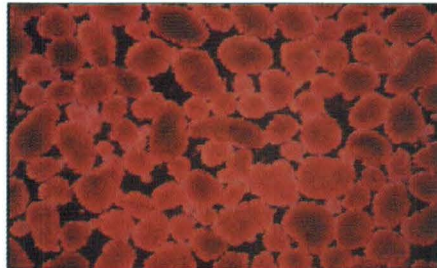
c)



d)

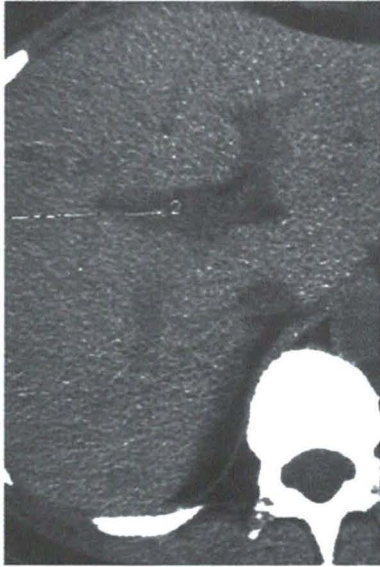


e)



f)

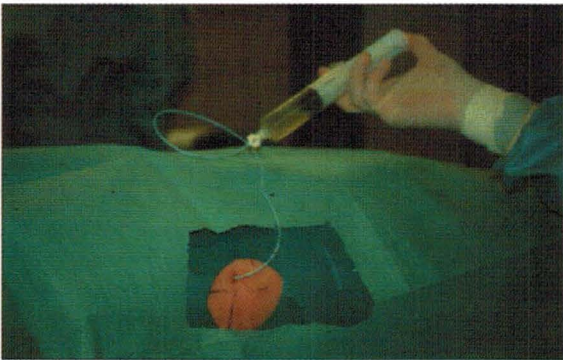
Abb. 6. Inselisolierung und Reinigung nach dem Gieblers Protokoll. a) Schematische Darstellung der enzymatischen Pankreasdigestion und Inselisolierung (modifiziert nach Ricordi C et al., 1988). b) Blick in die sterilen Laborräume. c) Exstirpiertes Pankreasorgan (70–100 g) mit kanuliertem Gangsystem vor Perfusion. d) Zellmasse (Sediment) nach Kollagenaseisolierung (links) und nachfolgender Reinigung über Dichtegradientenzentrifugation (rechts). e) Ungereinigte Inselpräparation. f) Hochgereinigte Inselpräparation



a)



b)



c)



d)

Abb. 7. Inselzelltransplantation mittels Katheterisierung des Pfortadersystems in Lokalanästhesie. a) Computertomographische Darstellung des Pfortadersystems. b) Kontrastmitteldarstellung der korrekten Katheterlage in der Pfortader. c) Infusion der Zellsuspension. d) Verschlussene kleine Punktionsstelle

mittels Dichtegradientenzentrifugation – perkutan-transhepatische Katheterisierung der Pfortader unter CT-Steuerung in Lokalanästhesie und Einschwemmung der Inseln in die Leber – Verschluss der Punktionsstelle. Im Prinzip könnte der Eingriff ambulant erfolgen. Die Patienten befinden sich aber noch 7–10 Tage unter stationärer Beobachtung wegen der doch stärkeren, potentiell mit Nebenwirkungen behafteten Behandlung mit immunsuppressiven Medikamenten.

Ergebnisse im Ein-Jahres-Verlauf nach Transplantation. In 56 Fällen einer simultanen Insel-Nieren-Transplantation bzw. Insel-nach-Nieren-Transplantation überblicken wir einen Zeitraum von jeweils 1 Jahr nach Transplantation. Dabei überlebten die Inseln in 86% bzw. 47% der Fälle 1 Jahr (Tab. 7). Insulinunabhängigkeit konnte in 17% bzw. 21% der Fälle erreicht werden. Die Erfolgsraten der übrigen Inseltransplantationszentren liegen dagegen deutlich niedriger. Selbst wenn das Maximalziel Insulinunabhängigkeit nicht erreicht wird, mit anderen Worten

der Patient noch (geringe) Mengen an Insulin täglich injizieren muss, so übt die Funktion der Inseln sehr günstige Effekte aus. Wichtige Stoffwechselfparameter, wie die hepatische Glukoseproduktion, der Protein- und Lipidmetabolismus usw. werden normalisiert, wie in gemeinsamen Studien unserer Arbeitsgruppe mit der Mailänder Gruppe gezeigt werden konnte (29, 30). Erste Untersuchungen im direkten Vergleich mit alleiniger Nierentransplantation weisen auch auf eine deutliche Verbesserung wichtiger Endorganfunktionen hin, wie die Myokard-Ejektionsfraktion, die diastolische Myokardfunktion, die basale NO-Freisetzung aus den Endothelien und die NO-abhängige Endotheldilatation, woraus sich möglicherweise die beobachtete höhere Überlebensrate inseltransplantierten Patienten erklären lässt (31). In eigenen Untersuchungen konnte zudem gezeigt werden, dass kombiniert Insel-Nieren-transplantierte Typ-1-Diabetiker praktisch keine Hypoglykämien mehr erleiden, wohingegen sich die Situation bei nur nierentransplantierten Typ-1-Diabetikern faktisch unverändert darstellt (Abb. 8).

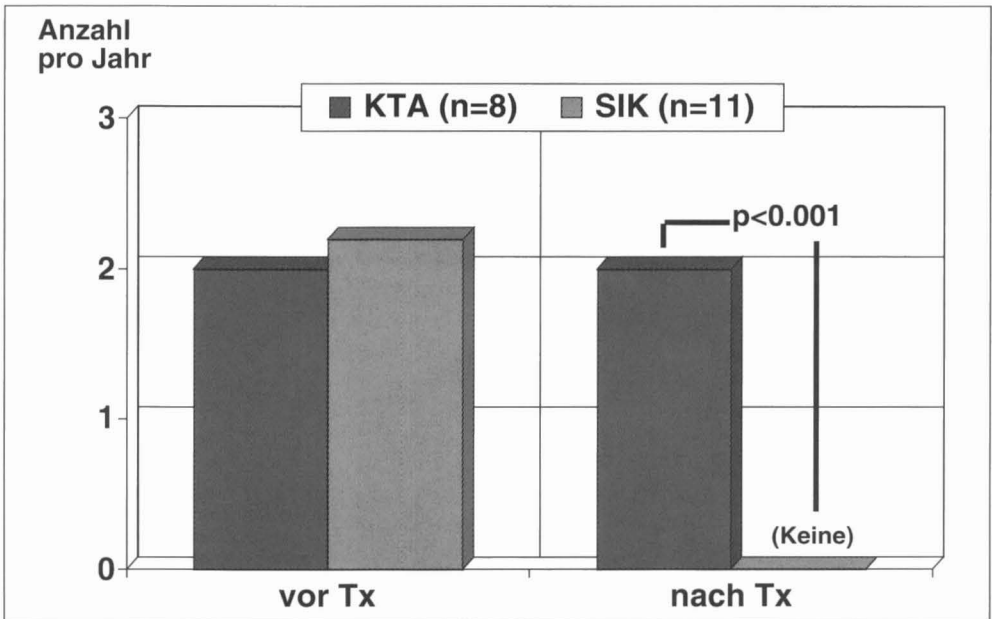


Abb. 8. Anzahl schwerer Hypoglykämien pro Jahr vor und nach alleiniger Nieren-Transplantation (KTA) bzw. simultaner Insel-Nieren-Transplantation (SIK)

Wie lange bleibt die Funktion der transplantierten Inseln erhalten?

Aus Untersuchungen nach autologer Inseltransplantation bei pankreatektomierten Patienten sind Überlebenszeiten der Inseln nach Implantation in die Leber von mehr als 13 Jahren bekannt (26).

Funktionierende, allogene Inseltransplantate mit konsekutiver Insulinunabhängigkeit des Typ-1-diabetischen Empfängers wurden über einen Zeitraum von mehr als 5 Jahren beschrieben (26).

Bei dem an unserem Zentrum in Gießen mit bisher mehr als 4½ Jahren Insulinunabhängigkeit längsten Fall, handelt es sich um eine zum Zeitpunkt der Inseltransplantation 41 Jahre alte Patientin mit einem seit dem 10. Lebensjahr und über 31 Jahre bestehenden Typ-1-Diabetes. Am 6. April 1997 wurde bei der Patientin nach 1½ Jahren Dialysebehandlung eine simultane Insel-Nieren-Transplantation an unserem Zentrum vorgenommen (469 000 Inseln, 7 900 pro kg Körpergewicht) (Tab. 8). Zweihundert Tage später konnte die Patientin auf jegliche Insulininjektion verzichten, ein Zustand, der bis heute anhält.

Jüngste Entwicklungen auf dem Gebiet der klinischen Inselzelltransplantation – die eigentliche Zielgruppe

Die eigentliche Zielgruppe für einen biologischen Ersatz des erkrankten Inselapparates stellen Typ-1-Diabetiker dar, die noch nicht im Stadium des chronischen Nierenversagens und sonstiger Organfolgeschäden angekommen sind, mithin auch Kinder und jugendliche Diabetiker (Abb. 9). Ziel einer Inselzelltransplantation ist hierbei, eine optimale Blutzuckereinstellung zu erreichen, um Organfolgeschäden erst gar nicht entstehen zu lassen und lebensbedrohliche Unterzuckerungen (Hypoglykämien) zu vermeiden. Indikationen für eine derartige alleinige Inseltransplantation (Islet-Transplant-Along, ITA) könnten in der Erprobungsphase nicht-urämische Typ-1-Diabetiker sein, die unter häufigen schweren Hypoglykämien und/oder einer defekten Gegenregulation

Tab. 8. Langanhaltende Insulinunabhängigkeit nach erfolgreicher Inselzelltransplantation am Zentrum Gießen

Bisher längster Fall von anhaltender Insulinunabhängigkeit	> 5 Jahre
- Pat.: R. K., weiblich, 41 Jahre	
- Dauer des Diabetes-Typ 1 (ED 1965):	31 Jahre
- Dialysepflichtigkeit seit:	11/1995
- Simultane Insel-Nieren-Tx: (Inseln aus 1 Spenderpankreas)	6. 4. 1997

(Ausfall der gegenregulatorischen Sekretion von Glukagon und Katecholaminen) oder einer gestörten Hypoglykämiewahrnehmung leiden.

Erste Inseltransplantation alleine bei nicht urämischen Typ-1-Diabetikern am Zentrum Gießen – Internationale NIH-Multicenterstudie

Unsere Arbeitsgruppe hat im Jahre 1996 erstmals alleinige Inseltransplantationen bei 5 Patienten mit oben beschriebener Problematik durchgeführt. Die lokale Ethik-Kommission hatte uns auf Antrag eine vierwöchige Behandlung der Inseltransplantatempfänger mit einem kommerziell noch nicht verfügbaren sog. CD4-Antikörper zusammen mit dem Immunsuppressivum Cyclosporin A erlaubt. Die Inseln funktionierten über den gesamten 4-Wochen-Zeitraum in 3 von 5 Fällen. Nach Beendigung der immunsuppressiven Therapie ging die Inselfunktion in allen Fällen verloren. Es ist uns offenbar nicht gelungen, mit diesem Therapieschema eine dauerhafte Immuntoleranz – wofür es durchaus Hinweise aus Tierexperimenten gab – zu etablieren. Wir konnten aber zeigen, dass bei den Patienten mit funktionstüchtigen Inseltransplantaten nach 4 Wochen die Hypoglykämiewahrnehmung und eine nahezu normale Gegenregulation auf künstlich induzierte Hypoglykämie wiederhergestellt ist (32).

Im Juli 2000 erschien eine Publikation der Arbeitsgruppe in Edmonton, Kanada, die unter Verwendung von Inselpräparationen aus wenigstens zwei Spenderpankrea bei allen nicht-urämischen Typ-1-diabetischen Empfängern (7 von 7) ihrer ersten Studie nach Inseltransplantation alleine (ITA) eine anhaltende In-

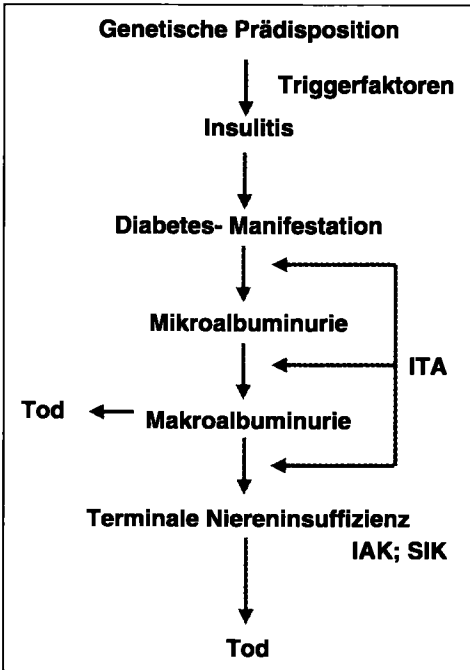


Abb. 9. Wahl des Zeitpunktes einer Inselzelltransplantation im Verlaufe eines Typ-1-Diabetes mellitus

sulinunabhängigkeit und eine Verhinderung weiterer hypoglykämischer Episoden erreichten (33). Mittlerweile liegt die Zahl der nach 1 Jahr insulinunabhängigen Fälle an diesem Zentrum bei 12 von 15 (80% der Fälle). Die Besonderheit des sog. Edmonton-Protokolls liegt in der Verwendung eines steroidfreien Immunsuppressionsprotokolls und der sequentiellen Transplantation von Inseln über mehrere Wochen hinweg, bis die Insulinunabhängigkeit erreicht ist. Sein Nachteil ist neben der dauerhaften Immunsuppression – wenn auch ohne Steroide – der „Verbrauch“ von mehreren Spenderpankreaten pro Empfänger.

Die National Institutes of Health (NIH) der USA initiierten nun im Rahmen eines großen Forschungsprogrammes „Immune Tolerance Network“ eine internationale Multicenterstudie zur Überprüfung und weiteren Anwendung des Edmonton-Protokolls in der Indikationsgruppe Inseltransplantation alleine (ITA) bei schwer einstellbarem Diabetes (sog. Brittle-Diabetes). Drei Zentren in Europa (Gießen, Genf

Tab. 9. Immune Tolerance Network Multicenter-Studie des NIH. Teilnehmende und autorisierte Zentren

Boston (Harvard)	Genf
Edmonton	Gießen
Miami	Mailand
Minneapolis	
Seattle	
St. Louis	
Washington	

www.immunetolerance.org

und Mailand) wurden neben 6 amerikanischen und einem kanadischen Zentrum eingeschlossen und erhalten dazu NIH-Fördermittel (Tab. 9). Studienbeginn war zum Jahreswechsel 2001/2002, Details können unter der Internet-Adresse <http://www.immunetolerance.org> eingesehen werden. Diese Studie mit insgesamt 40 einzuschließenden Behandlungsfällen bildet den Kontrollarm für noch zu entwickelnde effektive Protokolle zur Etablierung einer anhaltenden Immuntoleranz.

Inselzelltransplantation 2002 – Probleme und Forschungsperspektiven

Die Hürden auf dem Weg zu einer breiten klinischen Anwendung dieses Verfahrens mit dem Ziel Insulinunabhängigkeit sind vielfältig (Abb. 10): Zum einen mag die Masse der dauerhaft implantierten Inseln nicht immer ausreichend sein (34). Zum anderen kann es durch die Allogenität der Inseln zur Inselabstoßung kommen, auch die Persistenz der Autoimmunität im Empfängerorganismus mag zum Betazelluntergang im Transplantat beitragen (35). Schließlich stellen potentiell diabetogene Immunsuppressiva und die Insulinresistenz ganz besondere Anforderungen an die Insulinsekretionskapazität der übertragenen Inseln. Fehlende Marker als Frühzeichen einer etwaigen Inselabstoßung komplizieren die Situation zusätzlich.

Zukünftig durch Immuntoleranzinduktion lebenslange Immunsuppression des Empfängers unnötig?

Der Kontakt zwischen antigenpräsentierenden Zellen im Transplantat (APC) und den T-Zellen

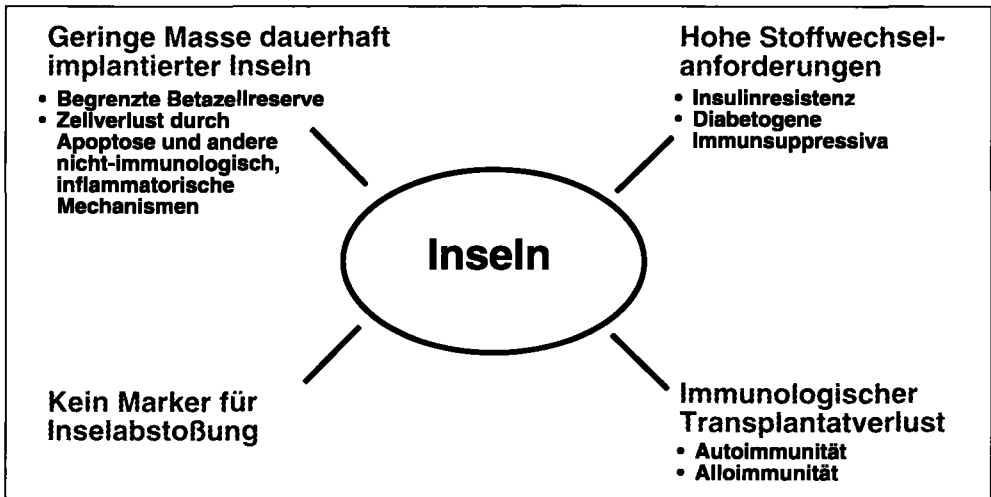


Abb. 10. Hürden auf dem Weg zur Insulinunabhängigkeit nach Inselzelltransplantation bei Typ-1-Diabetes mellitus

des Empfängers vollzieht sich auf drei Ebenen und wird vermittelt über Adhäsionsmoleküle, den T-Zellrezeptor (Signal 1) und ein ko-stimulatorisches Signal 2 (Abb. 11). Statt generell alle Kontaktebenen zu blockieren, erscheint es nach neueren Erkenntnissen sinnvoll, selektiv und möglicherweise nur temporär Signal 1, besser evtl. Signal 2 zu blockieren, um auf diese Weise eine dauerhafte Immuntoleranz zu erzeugen. Im Tierexperiment erwiesen sich solche Strategien mit Anti-CD4 und Anti-CD8 monoklonalen Antikörpern (gegen Signal 1) oder Anti-CD40L und CTLA4Ig (gegen Signal 2) als effektiv. Speziell durch die Blockade der CD40-CD40L-Interaktion konnte kürzlich eine Immuntoleranz gegenüber Inselzellen nach intrahepatischer Transplantation bei Affen erreicht werden (36, 37). Diese Ergebnisse stimmen hoffnungsvoll, dass derartige Strategien auch bei der klinischen Inseltransplantation zum Erfolg führen könnten. Mehrere Arbeitsgruppen forschen gegenwärtig an der Entwicklung entsprechender klinischer Protokolle. Vorausgesetzt, eine lebenslange Immunsuppression kann durch die Etablierung einer Immuntoleranz vermieden werden, ließe sich die Inselzelltransplantation einer großen Zahl auch kindlicher und jugendlicher Typ-1-Diabetiker anbieten. Spätestens dann sind wir aber mit einem weiteren Problem, dem der begrenzten

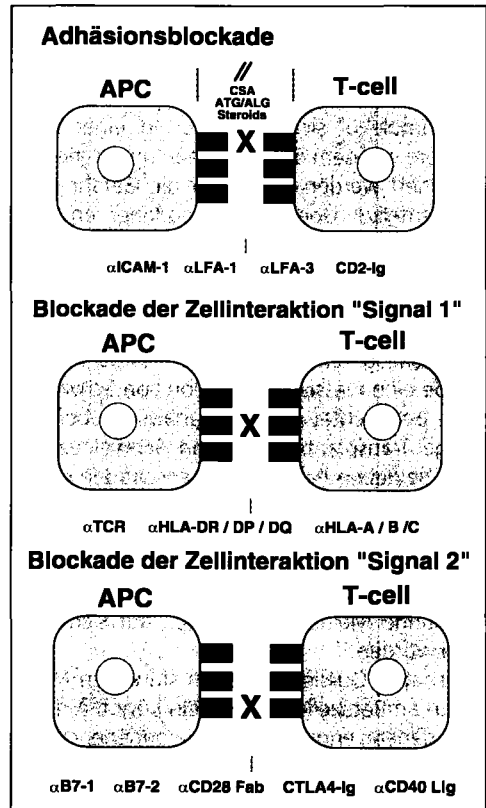


Abb. 11. Pathomechanismen der allogenen Abstoßungsreaktion und mögliche Blockadeebenen

Verfügbarkeit von humanen Spenderpankrea-
ta, konfrontiert, denn nur etwa 1200 Organe
stehen im Bereich von EUROTRANSPLANT pro
Jahr zur Verfügung. Wo sollen die Inselzellen
herkommen – gibt es Alternativen zur Inselzell-
transplantation?

Transplantation tierischer Inseln (Xenotransplantation) – Stammzelltransplantation – Gentherapie?

Nahezu routinemäßig gewinnen wir etwa ein-
mal pro Woche und bisher ausschließlich zu
Forschungszwecken isolierte Langerhanssche
Inseln aus dem Pankreas adulter Schlachthof-
schweine. Millionen von tiefgefrorenen Inseln
stehen zur Verfügung und können aufgetaut
ihre Funktion wieder aufnehmen, nach Trans-
plantation in diabetische Empfänger den Dia-
betes anhaltend heilen (38, 39). Gleiches könn-
te auf die klinische Situation beim Menschen
übertragen werden, da Schweineinsulin früher
vielfach klinisch gegeben wirksam ist und das
Insulinmolekül sich auch nur in einer Ami-
nosäure von dem des Menschen unterscheidet.
Diskutiert werden muss aber die Gefahr einer
akzidentellen Übertragung porkiner endoge-
ner und für den Menschen möglicherweise pa-
thogener Retroviren (PERV) des Schweines. Bei
In-vitro-Versuchen und in vivo durch Transplan-
tation von Schweineinseln in schwer immunge-
schwächte Empfängertiere (SCID-Mäuse)
wurde eine massive Replikation von Schweine-
viren beobachtet. Bei Metaanalysen über bis-
herige Transplantationen von Schweinezellen
und -geweben beim Menschen wurden derar-
tige Infektionen bisher aber nicht beobachtet.
Dennoch ist zu fragen, ob potentielle Empfän-
ger inzwischen geforderte strenge Sicherheits-
auflagen (Quarantäne vor evtl. Eingriffen, le-
benslange Meldepflichten etc.) auf sich neh-
men würden.

Alternative Quellen für einen ständigen Nach-
schub an Betazellen und Inseln könnten durch
ein „genetic engineering“ gewonnene, das In-
sulingen tragende Zelllinien oder immortalisier-
te Betazell-Linien, aber auch expandierte und
weiter differenzierte embryonale Stammzellen
oder adulte somatische Stammzellen sein. Auf

die faszinierenden Perspektiven der Stammzell-
transplantation soll hier näher eingegangen
werden.

**Embryonale Entwicklung des Pankreas
und molekulare Kaskaden in der Betazell-
differenzierung.** Das Pankreas entwickelt sich
aus Vorläuferzellen im Bereich des primordialen
Darmrohrs durch Verschmelzung einer dorsalen
und ventralen Pankreasanlage. Die endokri-
nen Zellen gehen aus einer gemeinsamen plu-
ripotenten Vorläuferzelle hervor, sind zunächst
diffus im Gewebe verteilt und bilden später in
der Nachbarschaft zu den Gangstrukturen des
Exokriniums die sog. Langerhansschen Inseln.
Auf molekularer Ebene wird die Pankreasent-
wicklung durch eine Expression der Gene und
Transkriptionsfaktoren Hb-9 und PDX-1 am 8.
Tag der Embryonalentwicklung induziert (Abb.
12) (40). Die zentrale Bedeutung von PDX-1
zeigt sich auch beim Menschen in einer Pank-
reasagenesie in betroffenen homozygoten Pati-
enten (41). Von der zentralen Vorläuferpopula-
tion an PDX-1/Hb-9 positiven Zellen ausgehend
erfolgt die weitere Differenzierung in endokri-
ne und exokrine Vorläuferzellen. Dabei gelingt
die Differenzierung in die endokrine Zelllinie
durch eine Suppression des Notch/RBP-Jk-Sig-
nalweges (in Richtung exokrine Zellen) und
gleichzeitige Aktivierung der Neurogenin-3-Ex-
pression (42, 43) (Abb. 12). Die weitere Diffe-
renzierung der ngn-3-positiven Vorläuferzellen
zu den definitiven, nur für ein Hormon positiven
Zellen der Langerhansschen Inseln wird
über komplexe Kaskaden der Aktivierung und
Inhibition spezifischer Transkriptionsfaktoren
gesteuert, wobei der Expression von PAX-4
eine Schlüsselrolle für die Differenzierung in
Betazellen zukommt (44) (Abb. 12).

**Pankreas- und Betazellregeneration im
Tiermodell.** Betazellen Langerhansscher Inseln
im Pankreas neugeborener Mäuse sind nach
chemisch-toxischer Schädigung (Streptozoto-
cin, Alloxan) regenerationsfähig. Gleiches gilt
für das adulte Pankreas von Mäusen und Rat-
ten nach partieller Pankreatektomie. Dabei
geht die Neogenese endokriner Zellen in Pank-
reasgangepithelien vonstatten. Das molekulare

Programm der embryonalen Pankreasentwicklung scheint hierbei reaktiviert zu werden (45). Möglicherweise haben duktale Zellen die Kapazität zur Rückdifferenzierung/Reprogrammierung in Vorläuferzellstadien. Prinzipiell können neue Betazellen aber auch durch Teilung intrinsulärer Betazellen entstehen. In der Tat haben wir bei unseren frühen Inseltransplantationsexperimenten im Streptozotocin-Diabetesmodell der Ratte nach Inseltransplantation im autochtonen Pankreas der Empfängertiere eine, wie wir es nannten, „intra-insuläre Betazellregeneration“ und „duktales Neoformation von Betazellen“ gefunden. Dies führt zu einer morphogenetisch erfassten Betazellmasse von 26% der Norm nach Inseltransplantation, verglichen mit nur 3% der Norm bei nicht

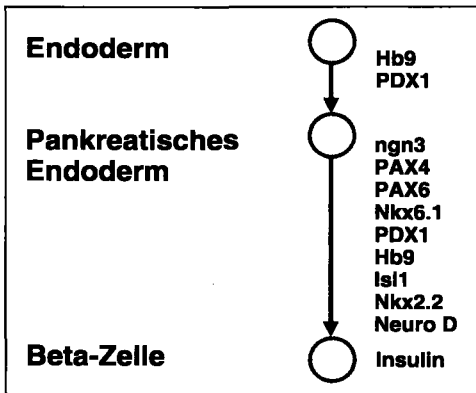


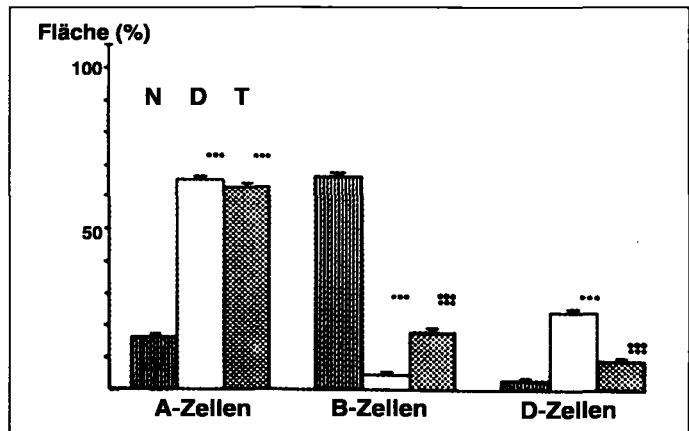
Abb. 12. Wichtige Gene und Transkriptionsfaktoren für die Betazellentwicklung

inseltransplantierten, weiterhin diabetischen Kontrolltieren (46, 47) (Abb. 13).

Ex-vivo/in-vitro-Expansion und Differenzierung von Stammzellen in insulinproduzierende Betazellen. Die gegenwärtig attraktivste und am meisten favorisierte Methode zur Gewinnung einer ausreichend großen Masse von insulinproduzierenden Zellen zu Transplantationszwecken ist die Expansion einer Stammzellpopulation mit nachfolgender Differenzierung. Unter einer Stammzelle verstehen wir jede undifferenzierte Zelle eines Organismus, die sich einerseits selbst vermehren kann und andererseits reifere, differenziertere Tochterzellen hervorzubringen vermag. Dabei sind die prinzipiellen Vor- und Nachteile embryonaler Stammzellen auf der einen und den adulten, somatischen Stammzellen auf der anderen Seite evident (Tab. 10).

Embryonale Stammzellen sowohl der Maus als auch des Menschen konnten kürzlich in Zellkultur expandiert und zu insulinproduzierenden Betazellen weiter differenziert werden (48–50). In diabetische Tiere transplantiert, konnte der Blutzucker der Empfängertiere normalisiert werden (48, 49). Gegenwärtig bestehen aber insbesondere in Deutschland erhebliche Bedenken gegen eine Forschung an und den therapeutischen Einsatz von humanen embryonalen Stammzellen. Auf aktuelle „Empfehlungen der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Forschung mit menschlichen Stamm-

Abb. 13. Regeneration und Neoformation von Betazellen im Pankreas diabetischer Ratten nach erfolgreicher Inselzelltransplantation in die Leber. Fläche der endokrinen Zellen in Inseln von normalen (N), diabetischen (D) und transplantierten (T) Ratten



zellen“ vom 3. Mai 2001 im Vorfeld der Bundstagsdebatte soll hier stellvertretend hingewiesen werden (<http://www.dfg.de/aktuell/dokumentation.html>).

Aus ethischer Sicht weniger problematisch gestalten sich Forschung und etwaige Therapie mit (adulten) somatischen Stammzellen. Allerdings sind adulte pankreatische Stammzellen als Vorläuferzellen etwaiger insulinproduzierender Zellen noch nicht eindeutig identifiziert. So genannte Nestin-positive duktaile Pankreaszellen könnten die relevanten Progenitorzellen sein (51). Eine erste Zellkulturmethode zur in-vitro-Expansion und Differenzierung humaner Pankreasgangzellen in insulinproduzierende Zellen wurde kürzlich beschrieben (52). Im Tierexperiment an diabetischen NOD-Mäusen konnte durch eine Transplantation adulter somatischer Pankreasstammzellen die Stoffwechselslage normalisiert werden (53).

Es besteht berechtigte Hoffnung, dass auf der Grundlage unseres Wissens über die Embryonalentwicklung des Pankreas und die molekulare Kaskade mit den relevanten Genen und Transkriptionsfaktoren zur Betazellendifferenzierung sich Expansion und Differenzierung von Progenitor-Stammzellen so weit beeinflussen lassen, dass eine ausreichend große Masse insulinproduzierender Zellen und Zellverbände für die spätere klinische Transplantation gewonnen werden kann.

Somatische Gentherapie zur Heilung des Typ-1-Diabetes. Im Tierexperiment wurden inzwischen erste Grundlagen zu einer Gentherapie erarbeitet. Diese in-vivo-Transfektionsansätze würden alle immunologischen Probleme

der Fremdgewebe- und Fremdzelltransplantation umgehen. So konnten Zellen des Hypophysenmittellappens und GIP-sezernierende K-Zellen des terminalen Ileums der Ratte, aber auch Hepatozyten durch gentechnische Transfektion mit dem Insulin-/Proinsulingen mit Erfolg zur Insulinsekretion gebracht werden (54, 55). Einen anderen Weg geht die Arbeitsgruppe von Frau Ferber in Israel. Diese Gruppe konnte durch Infektion von Mäuselebern mit einem Adenovirus, das für das PDX-1 Gen codierte, Hepatozyten in Betazellen mit nachfolgender Insulinproduktion differenzieren (56). Allerdings erfolgt in allen bisherigen Modellen mit somatischer Gentherapie die Insulinsekretion der transfizierten Zellen nicht stoffwechselbedarfsgerecht. In der Regel versterben die Tiere in der Hypoglykämie. Der Weg zu einer klinischen Anwendung der in-vivo-Gentherapie scheint ebenso lang wie gefährlich, in Anbetracht von Todesfällen bei ersten klinischen Anwendungen in den USA.

Ausblick auf die Entwicklung der klinischen Inselzelltransplantation in den nächsten Jahren

Vorhersagen über die breite klinische Anwendung von Inselzelltransplantationen sind ein Wagnis. Schon in den siebziger Jahren wurde die Ablösung der klinisch etablierten Pankreasorgantransplantation durch die Inselzelltransplantation unmittelbar erwartet. Die lange Durststrecke hat uns eines Besseren belehrt. Allerdings nahm die Forschung auf diesem Gebiet in den letzten Jahren rasch Fahrt auf, so dass eine routinemäßige 1:1-Inselzelltransplantation (1 Spenderorgan/1 Empfänger) nach allgemeiner Einschätzung demnächst zu erwarten

Tab. 10. Charakteristika embryonaler und adulter Stammzellen

Embryonale SC	
	Permanente Zell-Linien
	Undifferenziert
	Pluripotent („physiol. Programmierung“)
Adulte SC	
	Primärkulturen (nicht permanent)
	Differenziert („committed“)
	Multipotent (Reprogrammierung)
	Autolog

Tab. 11. Zukunft der klinischen Inselzelltransplantation – Versuch einer Vorhersage

2003	Routineprotokolle für eine erfolgreiche 1:1 Inselzelltransplantation
2003	Lizenzierte Inselpräparationen nach GMP-Kriterien
2004	Günstige Kosten-Nutzen-Relation aufgezeigt
2005	Effektive Immuntoleranzprotokolle etabliert
> 2005 (?)	Erste erfolgreiche Stammzelltransplantation bei Typ-1-Diabetes mellitus

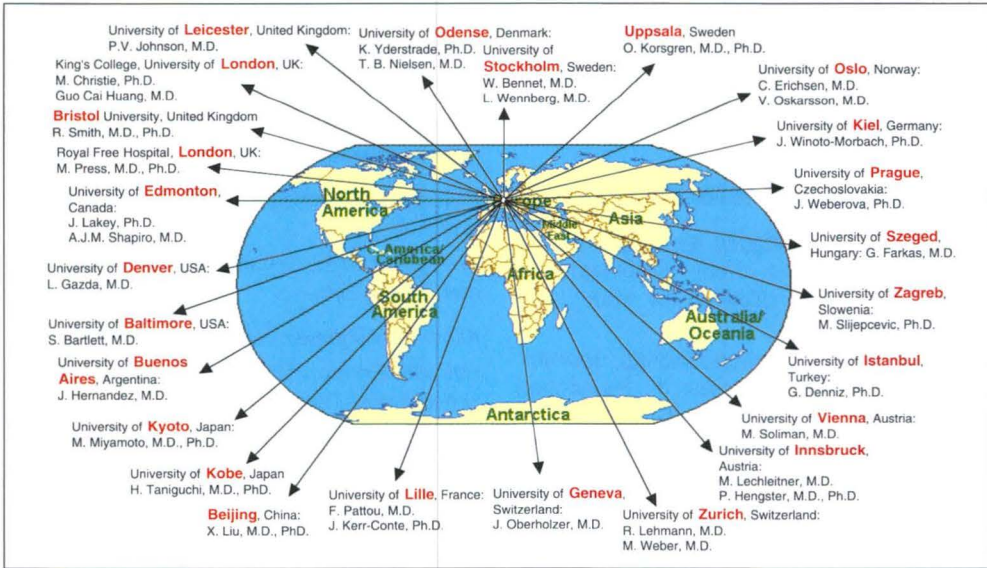


Abb. 14. Inselzelltransplantations-Zentrum Gießen – internationales Trainingszentrum für Inselisolierungen

ten ist (Tab. 11). Die Lizenzierung von Inselpräparationen nach GMP-Kriterien und der Nachweis einer günstigen Kosten-Nutzen-Relation dieses Verfahrens werden folgen. Binnen der nächsten fünf Jahre hofft man, effektive Protokolle zur Induktion einer Immuntoleranz gegenüber Inseln gefunden zu haben. Auf eine erfolgreiche Stammzell-Inseltransplantation bei Typ-1-Diabetikern wird man wohl noch länger warten müssen. Das Faszinierende am Konzept der Stammzelltransplantation ist nicht nur der nahezu unbegrenzte Nachschub an transplantierbarem Zellmaterial; mit einer vor der geplanten Zell- oder Organtransplantation vorgenommenen Spender-Stammzellübertragung gelingt offenbar die Etablierung eines „mixed chimerism“ mit daraus resultierender Immuntoleranz. In der Folge können Spenderzellen oder Organe ohne immunsuppressive Behandlung des Empfängers transplantiert werden, wie kürzlich experimentell im Mausmodell nachgewiesen (57, 58).

Gießen als Trainings-Center für Inselisolierung und Inseltransplantation

Auf dem Gebiet der Inselzelltransplantation hat sich in den letzten zehn Jahren ein intensiver in-

ternationaler Erfahrungsaustausch entwickelt. Aufgrund unserer langjährigen Expertise insbesondere zur Isolierung Langerhansscher Inseln aus dem Schweinepankreas und humanen Pankreas suchten Kollegen verschiedener internationaler Zentren unsere Arbeitsgruppe auf und wurden in die Methodik der Gewinnung von reinen Inselpräparationen eingewiesen (Abb. 14). Auf Anregung des Editor-in-Chief der Zeitschrift *Transplantation* und unter der Schirmherrschaft der International Pancreas and Islet Transplantation Association führten wir im letzten Jahr einen ersten International Islet Isolation Training Workshop durch. Forscher aus 14 Ländern haben daran teilgenommen.

Forschungsförderung der Gießener Arbeitsgruppe Inselzelltransplantation

Während der langen Phase der experimentellen Entwicklung der Inseltransplantation und der ersten klinischen Anwendung erfuhren wir, beginnend Anfang der siebziger Jahre, Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), das Bundesministerium für Forschung und Technologie bzw. Bildung und Forschung (BMFT/BMBF), die Deutsche Transplantations-Gesellschaft (DTG), die Deutsche Diabetes-Ge-

sellschaft (DDG) und Drittmittel der Industrie. In den letzten Jahren kam eine umfangreiche Förderung durch die Juvenile Diabetes Research Foundation (JDRF), USA, und die National Institutes of Health (NIH), USA, hinzu.

Gegenwärtig geförderte Forschungsprojekte

1. Strategies for Prolonged Islet Graft Survival in IDDM. Sponsor: Juvenile Diabetes Research Foundation (JDRF), New York, USA, 1997–2002
2. Human Islet Distribution Program. Sponsor: Juvenile Diabetes Research Foundation (JDRF), New York, USA, 1998–2003
3. Immune Modulation and Tolerance Induction to Human Islets. Sponsor: National Institutes of Health (NIH), Bethesda, USA, 1999–2004
4. Comparison of Deuterium and NMR-Spectroscopy for Analysis of Liver Glycogen Kinetics. Sponsor: Institute for Microtherapy, Bochum, 2000–2002
5. Regulation der Neovaskularisierung von isolierten Langerhansschen Inseln. Sponsor: Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), 2000–2003
6. Isolation, propagation and differentiation of human intra-islet and ductal precursor cells for substitution of insulin producing pancreatic b-cells for treatment of diabetes mellitus. Sponsor: Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), 2001–2003
7. Collaborative Network for Clinical Research on Immune Tolerance. Sponsor: National Institutes of Health (NIH), Bethesda, USA, 2002–2008

Danksagung

Dank gilt den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Inselzelltransplantation der Medizinischen Klinik und Poliklinik III:

Alexandra Alt, Daniel Brandhorst, Heide Brandhorst, Mathias Brendel, Kiriaki Chabaloglou, Michael Eckhard, Torsten Eich, Hans-Peter Hammes, Birte Hußmann, Markus Iken, Clemens Jaeger, Henning Jahr, Birgit Janczik, Yoshiyuki Kawakami, Yi Lai, Thomas Linn, Markus

Mann, Gudrun Pfeiffer, Kerstin Schneider, Claudia Schöder, Andreas Schultz, Barbara Schultz, Daniel Winter.

Weiterhin gilt zu danken für die jahrelange gute Kooperation:

Abteilung Nephrologie der Medizinischen Klinik und Poliklinik II

Wolfgang Ernst, Schirin Friemann, Rolf Weimer, Stefan Zinn.

Klinik für Allgemein- und Thoraxchirurgie

Helmut Grimm, Winfried Padberg, Konrad Schwemmler, Thomas Zimmermann.

Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin

Gregor Bein

Abteilung Diagnostische Radiologie

Andreas Breithöcker, Dirk Lommel, Wigbert S. Rau, Klaus Rauber, Bernd Weimar.

Klinik für Psychosomatik und Psychotherapie

Wolfgang Milch, Christian Reimer.

Literatur

1. Banting FG, Best CH: The internal secretion of the pancreas. *J. Lab. Clin. Invest* 7:251–266, 1922
2. Kelly WD, Lillehei RC, Merkel FK, Idezuki Y, Goetz FC: Allotransplantation of the pancreas and duodenum alone with the kidney in diabetic nephropathy. *Surgery* 61: 827–837, 1967
3. Bland BJ: International Pancreas Transplant Registry. *Newsletter* 13: 1–24, 2001
4. Robertson RP, Davis C, Larsen J, Stratta R, Sutherland DER: Pancreas and islet transplantation for patients with diabetes. Technical review. *Diabetes Care* 23: 112–116, 2000
5. Bolinder J, Wahrenberg H, Linde B, Tyden G, Groth CG, Östman J: Improved glucose counterregulation after pancreas transplantation in diabetic patients with unawareness of hypoglycemia. *Transplant Proc.* 23: 1667–1669, 1991
6. Gruessner RWG, Sutherland DER, Troppmann C, Benedetto E, Hakim N, Dunn DL, Gruessner AC: The surgical risk of pancreas transplantation in the cyclosporine era: an overview. *J. Am. Coll. Surg* 185: 128–144, 1997
7. Smets YFC, Westendorp RGJ, van der Pijl JW, de Charro FT, Ringers J, de Fijter JW, Lemkes HHPJ: The effect of simultaneous pancreas-kidney transplantation on mortality of patients with type-1 diabetes mellitus and end-stage renal failure. *Lancet* 353: 1915–1919, 1999

8. Benedum J: The early history of endocrine cell transplantation. *J. Mol. Med.* 77: 30–35, 1999
9. Minkowski O: Weitere Mittheilungen über den Diabetes mellitus nach Exstirpation des Pankreas. *Berliner Klin. Wochenschr.* 29: 90–94, 1892
10. Williams PW: Notes on diabetes treated with extract and by grafts of sheep's pancreas. *Brit. Med. J* 2: 1303, 1894
11. Bretzel RG: What is the cause of (type 1) diabetes mellitus – how can we cure this disease? (Comment) *J. Mol. Med.* 80: 3–4, 2002
12. Scharp DW, Lacy PE, Santiago JV, McCullough CS, Weide LG, Falqui L, Marchetti P, Gingerich RL, Jaffe AS, Cryer PE et al.: Insulin independence after islet transplantation into type I diabetic patients. *Diabetes* 39: 515–518, 1990
13. Bretzel RG: Inseltransplantation und Diabetes mellitus. Experimentelle Grundlagen und klinische Versuche. Pflaum, München, 1984, 1–644
14. Federlin K, Bretzel RG: Islet Isolation, Culture and Cryopreservation. Thieme, Stuttgart, 1981, 1–199
15. Bretzel RG: Diabetes mellitus. Immunologische und dynamische Aspekte der Insulinsubstitution. Springer, Berlin, 1990, 1–283
16. Federlin K, Bretzel RG, Hering BJ: Methods in Islet Transplantation Research. *Horm. Metabol. Res. Suppl. Ser.* 25: 1–241, 1990
17. Bretzel RG: Fifth Islet Workshop. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 103 suppl. 2: 1–159, 1995
18. Bretzel RG, Brendel MD: Endocrine Cell Transplantation and Genetic Engineering. *J. Mol. Med.* 77: 25–254, 1999
19. Bretzel RG, Federlin K: Pankreas- und Inseltransplantation bei Diabetes mellitus. *Internist* 28: 254–261, 1987
20. Federlin KF, Bretzel RG: The effect of islet transplantation on complications in experimental diabetes of the rat. *World J. Surg.* 8: 169–178, 1984
21. Dobroschke J, Schwemmler K, Langhoff G, Laube H, Bretzel RG, Federlin K: Autotransplantation von Langerhansschen Inseln nach totaler Duodenopancreatektomie bei einem Patienten mit chronischer Pankreatitis. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 103: 1905–1910, 1978
22. Bretzel RG, Hering BJ, Federlin KF: Islet cell transplantation in diabetes mellitus – from bench to bedside. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 103 suppl. 2: 143–159, 1995
23. Brandhorst D, Brandhorst H, Hering BJ, Federlin K, Bretzel RG: Islet isolation from the pancreas of large mammals and humans: 10 years of experience. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 103 suppl. 2: 3–14, 1995
24. Bretzel RG, Browatzki CC, Schultz A, Brandhorst H, Klitscher D, Bollen CC, Raptis G, Friemann S, Ernst W, Rau WS, Hering BJ: Klinische Inseltransplantation bei Diabetes mellitus. Bericht des Internationalen Inseltransplantationsregisters und Erfahrungen am Zentrum Giessen. *Diab. Stoffw.* 2: 378–390, 1993
25. Weimar B, Rauber K, Brendel MD, Bretzel RG, Rau WS: Percutaneous transhepatic catheterization of the portal vein: a combined CT- and fluoroscopy-guided technique. *Cardiovasc. Intervent. Radiol.* 22: 342–344, 1999
26. Brendel MD, Hering BJ, Schultz AO, Bretzel RG: International Islet Transplant Registry. *Newsletter* 8 (No. 9): 1–20, 2001
27. Hering BJ, Bretzel RG, Hopt UT, Brandhorst H, Brandhorst D, Bollen CC, Raptis G, Helf F, Grossmann R, Mellert J, Ernst W, Scheuermann EH, Schoeppe W, Rau W, Federlin K: New protocol toward prevention of early human islet allograft failure. *Transplant Proc.* 26: 570–571, 1994
28. Bretzel RG, Brandhorst D, Brandhorst H, Eckhard M, Ernst W, Friemann S, Rau W, Weimar B, Rauber K, Hering BJ, Brendel MD: Improved survival of intraportal pancreatic islet cell allografts in patients with type-1 diabetes mellitus by refined peritransplant management. *J. Mol. Med.* 77: 140–143, 1999
29. Luzi L, Hering BJ, Socci C, Raptis G, Battezzati A, Terruzzi I, Falqui L, Brandhorst H, Brandhorst D, Regalia E, Brambilla E, Secchi A, Perseghin G, Maffi P, Bianchi E, Mazzaferro V, Genari L, di Carlo V, Federlin K, Pozza G, Bretzel RG: Metabolic effects of successful intraportal islet transplantation in IDDM. *J. Clin. Invest.* 97: 2611–2618, 1996
30. Luzi L, Perseghin G, Brendel MD, Terruzzi I, Battezzati A, Eckhard M, Brandhorst D, Brandhorst H, Friemann S, Socci C, di Carlo V, Piceni Sereni L, Benedini S, Secchi A, Pozza G, Bretzel RG: Metabolic effects of restoring partial b-cell function after islet allotransplantation in type 1 diabetic patients. *Diabetes* 50: 277–282, 2001
31. Fiorina P, Maffi P, Bertuzzi F, Rossetti C, Fazio F, Astorri E, di Carlo V, Pozza G, Secchi A: Longterm islet function could improve actuarial survival and cardiovascular outcome in uremic IDDM kidney transplanted patients. *Acta Diabetol* 37: 151 (Abstr), 2000
32. Meyer C, Hering BJ, Grossmann R, Brandhorst H, Brandhorst D, Gerich J, Federlin K, Bretzel RG: Improved glucose counterregulation and autonomic symptoms after intraportal islet transplants alone in patients with long-standing type 1 diabetes mellitus. *Transplantation* 66: 233–240, 1998
33. Shapiro AMJ, Lakey JRT, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV: Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N. Engl. J. Med.* 323: 230–238, 2000
34. Bennet W, Sundberg B, Groth CG, Brendel MD, Brandhorst D, Brandhorst H, Bretzel RG, Elgne G, Larsson R, Nilsson B, Korsgren O: Incompatibility between human blood and isolated islets of Langerhans. A finding with implications for clinical intraportal islet transplantation? *Diabetes* 48: 1907–1914, 1999
35. Jaeger C, Brendel MD, Hering BJ, Eckhard M, Bretzel RG: Progressive islet graft failure occurs significantly earlier in autoantibody-positive than in autoantibody-negative IDDM recipients of intrahepatic islet allografts. *Diabetes* 46: 1907–1910, 1997
36. Kenyon NS, Chatzipetron M, Masetti M, Ranuncoli A, Oliveira M, Wagner JL, Kirk AD, Harlan DM, Burkly LC, Ricordi C: Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in rhesus monkeys treated with humanized anti-CD 154. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 8132–8137, 1999

37. Kenyon NS, Fernandez LA, Lehmann R, Masetti M, Ranuncoli A, Chatzipetron M, Iaria G, Han D, Wagner JL, Ruiz P, Berho M, Inverardi L, Alejandro R, Mintz DH, Kirk AD, Harlan DM, Burky LC, Ricordi C: Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in baboons treated with humanized anti-CD 154. *Diabetes* 48: 1473–1481, 1999
38. Bretzel RG, Schneider J, Federlin K: Cryopreservation and transplantation of rat, porcine and human pancreatic islets in experimental diabetes mellitus. *Horm. Metabol. Res. Suppl. Ser. 12*: 78'80, 1982
39. Brandhorst H, Brandhorst D, Hering BJ, Bretzel RG: Significant progress in porcine islet mass isolation utilizing Liberase HI for enzymatic low-temperature pancreas digestion. *Transplantation* 68: 355–361, 1999
40. Edlund H: Transcribing the pancreas. *Diabetes* 47: 1817–1823, 1958
41. Stoffers DA, Zinkin NT, Stanojevic V, Clarke WL, Habener JF: Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat. genet.* 15: 106–110, 1997
42. Apelqvist A, Li H, Sommer L, Beatus P, Anderson DJ, Honjo T, Hrabe de Angelis M, Lendahl U, Edlund H: Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* 400: 877–881, 1999
43. Gradwohl G, Dierich A, Le Meur M, Guillemot F: Neurogenin 3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 1607–1611, 2000
44. Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Torres M, Oliver G, Gruss P: The Pax 4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature* 386: 399–402, 1997
45. Bonner-Weir S, Baxter LA, Schuppert GT, Smith FE: A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes* 42: 1715–1720, 1993
46. Bretzel RG, Richardt M, Menden A, Federlin K: Pankreas-B-Zellregeneration nach Inseltransplantation beim experimentellen Diabetes mellitus. *Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med.* 90: 1471–1477, 1984
47. Richardt M, Menden A, Bretzel RG, Federlin K: Islet transplantation in experimental diabetes of the rat. VIII. B-cell restoration following islet transplantation. Preliminary results. *Horm. Metabol. Res.* 16: 551–552, 1984
48. Soria B, Roche E, Berna G, Leon-Quinto T, Reig JA, Martin F: Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 49: 157–162, 2000
49. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R: Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 292: 1389–1394, 2001
50. Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzuckerman M: Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 50: 1691–1697, 2001
51. Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Muller B, Vallejo M, Thomas MK, Habener JF: Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* 50: 521–533, 2001
52. Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkevich K, Song KH, Sharma A, O'Neill JJ: In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 7999–8004, 2000
53. Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Schatz DA, Peck AB, Cornelius JG: Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat. Med.* 6: 278–282, 2000
54. Cheung AT, Dayanandan B, Lewis JT, Korbitt GS, Rajotte RV, Bryer-Ash M, Boylan MO, Wolfe MM, Kieffer TJ: Glucose-dependent insulin release from genetically engineered K cells. *Science* 290: 1959–1962, 2000
55. Lee HC, Kim SJ, Kim KS, Shin HC, Yoon JW: Remission in models of type 1 diabetes by gene therapy using a single-chain insulin analogue. *Nature* 408: 483–488, 2000
56. Ferber S, Halkin A, Cohen H, Ber I, Einav Y, Goldberg I, Barshack I, Seiffers R, Kopolovic J, Kaiser N, Karasik A: Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat. Med.* 6: 568–572, 2000
57. Fändrich F, Lin X, Chai GX, Schulze M, Ganten D, Bader M, Holle J, Huang D-S, Parwaresch R, Zavazava N, Binas B: Preimplantation-stage stem cells induce long-term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning. *Nat. Med.* 8: 171–178, 2002
58. Adler SH, Bensinger SJ, Turka LA: Stemming the tide of rejection. *Nat. Med.* 8: 107–108, 2002