

Aus der Medizinischen Klinik – Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Direktor: Professor Dr. med. Martin Reincke

**ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON ADULTEN
PANKREASSTAMMZELLEN ZUR ENDOKRINEN
DIFFERENZIERUNG IN RICHTUNG INSULIN
PRODUZIERENDER ZELLEN**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ulrich Grabmaier

aus Bozen

-2011-

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. J. Seißler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Klaus G. Parhofer
Prof. Dr. Manfred Haslbeck

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 17.03.2011

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	7
1.1	Stammzelltherapie des Typ 1 Diabetes Mellitus	7
1.1.1	Embryonale Stammzellen (ESCs).....	8
1.1.2	Adulte Stammzellen und Progenitorzellen	9
1.1.3	Transdifferenzierung/ Plastizität adulter Stammzellen	11
1.1.4	Probleme bei adulten pankreatischen Stammzellen/ Progenitorzellen.....	12
1.2	Pankreasentwicklung während der Embryonalphase	13
1.2.1	Anatomische und morphologische Entwicklung des Pankreas ...	13
1.2.2	Differenzierung des Endoderms , Vorderdarmentwicklung und Pankreasspezifizierung.....	14
1.2.3	Pankreatische endokrine und exokrine Progenitorzellen.....	15
1.2.4	Spezifizierung der einzelnen endokrinen Zelllinien.....	16
1.3	Charakterisierung wichtiger proendokriner Faktoren	17
1.3.1	Pdx-1	17
1.3.2	Hlxb9	18
1.3.3	Isl1	18
1.3.4	Ngn3, Hes und Notch	18
1.3.5	Die hepatocyte nuclear factors (HNF) HNF3, HNF1 und NF6	20
1.3.6	Beta2/NeuroD	20
1.3.7	Pax4 und Pax6	21
1.3.8	Nkx2.2 und Nkx6.1	21
1.3.9	MafA und MafB	22
1.4	Rolle von Transkriptionsfaktoren bei der Aufrechterhaltung der Betazellfunktion.....	22
1.5	Regulation der Betazellmasse und -funktion durch extrinsische Faktoren	24
1.5.1	Glukagon-like-Peptid-1 (GLP-1)	24
1.5.2	Natriumchlorat	25
1.5.3	Nikotinamid	25
1.5.4	Retinsäure (Vitamin A)	26
1.5.5	Natriumbutytrat	27
1.5.6	Cyclopamin	27

1.5.7	Picolinsäure	27
1.5.8	Aktivine	28
2.	Fragestellung	29
3.	Material und Methoden	30
3.1	Material.....	30
3.1.1	Reagenzien	30
3.1.2	Kits	32
3.1.3	Antikörper	32
3.1.4	Lösungen und Medien	32
3.1.5	Geräte	32
3.1.6	Verbrauchsmaterial	33
3.2.	Methoden	35
3.2.1	Versuchstiere	35
3.2.2	Isolierung der Langerhans-Inseln und Pankreasgänge aus dem murinen Pankreas	35
3.2.3	Passagieren und Klonieren der Zelllinien	36
3.2.4	Charakterisierung der Zellen	36
3.2.4.1	RNA-Isolierung	37
3.2.4.2	Bestimmung von Qualität und Quantität der RNA	38
3.2.4.3	cDNA-Synthese (Reverse Transkription der mRNA)	38
3.2.4.4	Quantitative Real-Time RT-PCR	39
3.2.4.5	Semiquantitative Reverse Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	41
3.2.4.6	Gelelektrophorese- und Dokumentation	45
3.2.4.7	FACS-Analyse	45
3.2.5	Versuche zur Differenzierung der Progenitorzellen	46
3.2.5.1	Serumfreie Kultivierung	46
3.2.5.2	Stimulation mit Natriumchlorat	47
3.2.5.3	Stimulation mit Natriumbutyrat	47
3.2.5.4	Stimulation mit LY und Activin A	48
3.2.5.5	Notchinhibition: Stimulation mit DAPT	48
3.2.5.6	Stimulation des Hexosamine-Biosynthetic-Pathways mit Glukosamin und Picolinsäure	48
3.2.5.7	Stimulation unter hypoxischen Bedingungen	49

3.2.6	Statistik	49
4.	Ergebnisse	50
4.1	Isolierung von Progenitorzellen aus Pankreasgewebe	50
4.2	Basale Charakterisierung der Progenitorzelllinien	52
4.2.1	Embryonale und stammzellassoziierte Marker	52
4.2.2	Progenitor-/ Endokrine Marker	54
4.2.3	Endodermale Marker	55
4.2.4	Abhängigkeit der Genexpression von den Kulturbedingungen ...	56
4.3	Versuche zur Differenzierung der Stammzellen	58
4.3.1	Serumfreie Bedingungen	58
4.3.2	Stimulation mit Natriumchlorat	62
4.3.3	Erhöhung der Expression von MafA durch Natriumbutyrat.....	65
4.3.4	Erhöhung der Expression von MafA durch Stimulation des Hexosamin-Biosynthese-Signalweges mit Glukosamin und Picolinsäure	68
4.3.5	Hemmung der PI-3-Kinase mit LY und Activin A	69
4.3.6	Inhibition der Gammasekretase mittels DAPT	70
4.3.7	Induktion von Ngn3 durch Picolinsäure	72
4.3.8	Induktion von Ngn3 durch Hypoxie	74
5.	Diskussion	76
5.1	Stammzellisolierung und Charakterisierung	76
5.2	Differenzierungsversuche	81
6.	Zusammenfassung	85
7.	Abkürzungsverzeichnis	86
8.	Literaturverzeichnis	88
9.	Lebenslauf	94
10.	Danksagung	97

11. Eidesstattliche Erklärung98

1. Einleitung

1.1 Stammzelltherapie des Typ 1 Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus Typ 1 entsteht durch eine selektive Zerstörung der Betazellen der Langerhans-Inseln durch CD8⁺ T-Lymphozyten.⁷⁴ Bei Diabetesmanifestation sind mehr als 90% der Betazellen zerstört, so dass ein absoluter Insulinmangel resultiert. Betazellen sind für die Produktion, Speicherung und Sekretion von Insulin verantwortlich. Da ein Fehlen von Insulin aber nicht mit dem Leben vereinbar ist, müssen Typ 1 Diabetiker ein Leben lang Insulin substituieren. Trotz der stetigen Verbesserung der Insulinpräparate und der Therapieschemata in den letzten Jahren, gelingt es nur einer limitierten Zahl der erkrankten Patienten eine normnahe Blutglukosekontrolle zu erzielen.⁸⁵ Bei vielen Patienten ist dies jedoch nicht möglich, sei es aus Gründen der Noncompliance, eines labilen Stoffwechselverhaltens auf die Nahrungsaufnahme oder der Insulinapplikation, so dass häufige Schwankungen zwischen hyper- und hypoglykämischen Blutzuckerwerten auftreten. Deshalb haben diese Patienten ein deutlich erhöhtes Risiko im Laufe ihres Lebens makro- und mikrovaskuläre Folgeschäden zu entwickeln wie Herzinfarkt oder Apoplex, diabetische Nephropathie und diabetische Retinopathie.⁸⁵ Diese vaskulären Folgeschäden stellen schlussendlich die Hauptursache für die erhöhte Morbidität und Mortalität von Menschen mit Diabetes dar.²⁰ Gegenwärtig gibt es neben der lebenslangen intensivierten Insulintherapie zwei Möglichkeiten der Behandlung: die Pankreastransplantation - zu 70–90% gekoppelt mit einer Nierentransplantation - und die Inselzelltransplantation.²⁰ Auf kurze Sicht gesehen liefern diese 2 Verfahren mit ca. 80% Insulinfreiheit im ersten Jahr nach Transplantation hervorragende Ergebnisse. Diese sind auf lange Sicht vor allem bei der Inselzelltransplantation jedoch eher ernüchternd: 5 Jahre nach einer Inselzelltransplantation sind nur noch ca. 10% der Patienten insulinunabhängig.⁶⁹ Die Pankreastransplantation liefert dabei bessere Ergebnisse (ca. 70% Insulinunabhängigkeit nach 5 Jahren), geht jedoch mit einer höheren Morbidität, Mortalität und längeren Krankenhausaufenthalten einher als die Inselzelltransplantation.²⁵ Diese Zahlen zeigen, dass der Typ 1 Diabetes prinzipiell heilbar ist. Sie zeigen aber auch, dass es auf dem Weg zu einer ursächlichen Heilung weiterhin Probleme gibt:⁸⁵

- 1) Es gibt zu wenig Spenderorgane für die hohe Zahl an Typ 1 Diabetikern.
- 2) Das Problem der Langzeittoxizität der derzeit verwendeten Immunsuppressiva schränkt die Zahl der Patienten, die für eine solche Therapie in Frage kommen, stark ein.
- 3) Nach der Transplantation kommt es zu einem progredienten Verlust von Betazellen durch eine chronische allogene Abstoßungsreaktion und das langsame Wiederaufflammen der Autoimmunität. Diese beiden Effekte sind schlussendlich hauptverantwortlich für die unbefriedigenden Langzeitergebnisse der Inselzelltransplantation.

Um diese Probleme zu überwinden, ist es notwendig nach alternativen Quellen zur Substitution insulinproduzierender Zellen zu suchen. Dabei wurden in den letzten Jahren sowohl mit embryonalen als auch mit adulten Stammzellen schon erste Erfolge erzielt.

1.1.1 Embryonale Stammzellen (ESCs)

ESCs entstammen der inneren Zellschicht der Blastozyste. Als Stammzellen dieses frühen Stadiums haben sie im Gegensatz zu adulten Stammzellen zwei große Vorteile: Erstens können ESCs nahezu unendlich proliferieren und stellen somit eine unerschöpfliche Stammzellquelle dar. Zweitens sind ESCs pluripotent und können somit zu jedem Zelltyp und jeder Gewebeart differenzieren (Abb. 3).⁸⁵ Bei der Produktion von Betazellen aus ESCs wurde bisher versucht die natürliche Ontogenese der Betazelle nachzuahmen. So veröffentlichten Arbeitsgruppen in den USA unter anderem ein effektives Protokoll, mit dem es gelang durch schrittweise Differenzierung ESCs zu Zellen zu differenzieren, die entweder in vitro Insulin produzierten, oder aber in vivo zu insulinproduzierenden Zellen ausreifen.^{18,48} Dabei orientierte man sich an der Expression von Markern, die auch in der normalen Entwicklung des Pankreas für das jeweilige Reifestadium stehen. Obwohl gezeigt wurde, dass die Herstellung von Betazell- ähnlichen Zellen aus ESCs grundsätzlich möglich ist, gibt es noch zahlreiche Probleme zu lösen:²

- 1) Die Zahl der ESCs, die zu Insulin- produzierenden Zellen ausreifen, ist klein (2-8%)

- 2) Die Zellen sezernieren wenig Insulin und dieses nicht immer glukoseabhängig
- 3) Nach Transplantation von ESCs können Teratome entstehen.
- 4) Das ethische Problem bei der Verwendung von humanen ESCs, die in Deutschland nicht hergestellt werden dürfen

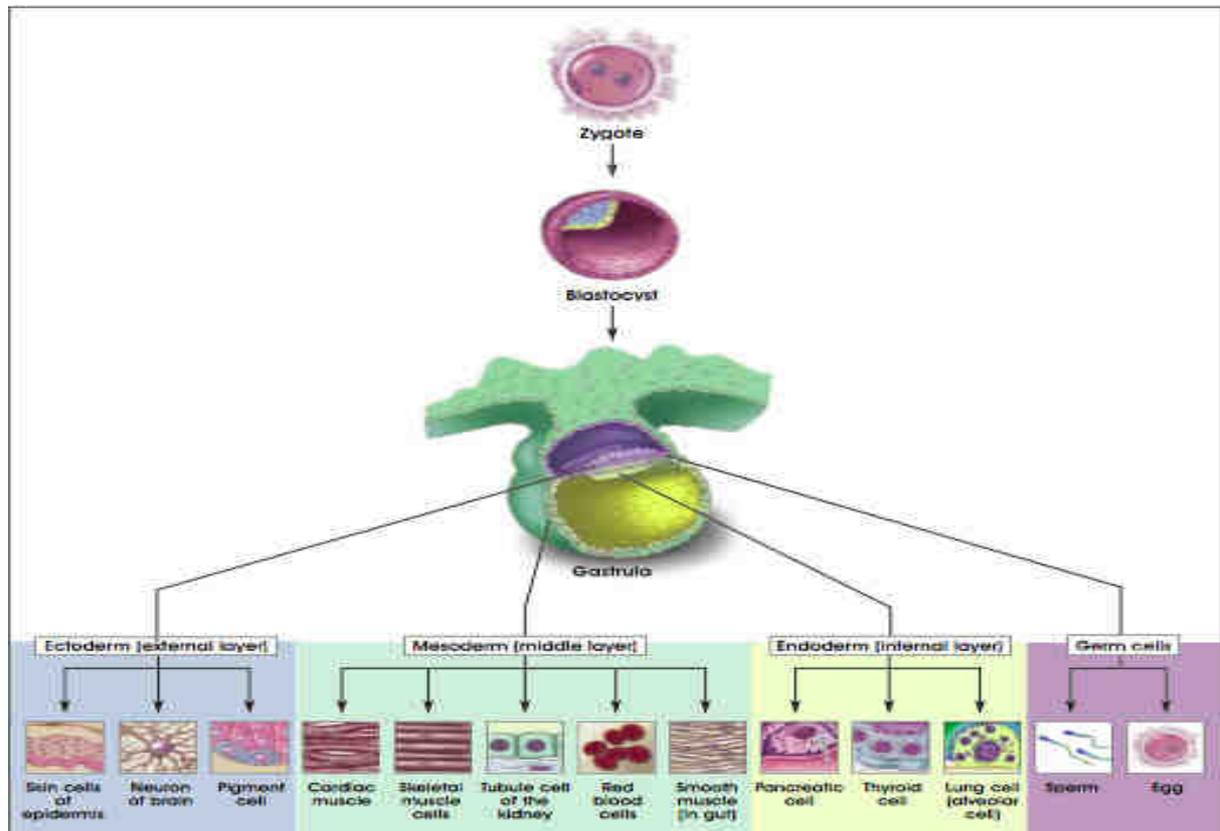


Abb. 1: Entwicklungspotential embryonaler Stammzellen. Aus der inneren Schicht der Blastozyste können Zellen aller 3 Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Endoderm) entstehen (aus <http://stemcells.nih.gov/info/basics/>; Stand März 2009).

1.1.2 Adulte Stammzellen und Progenitorzellen

In den letzten Jahren wurden in zahlreichen adulten Geweben Zellen mit Stammzeleigenschaften beschrieben, z.B. im Gehirn⁷², in der Leber¹⁰³, im Pankreas⁷⁶, in der Haut⁹³ und im Muskelgewebe⁴. Die adulten Stammzellen besitzen wichtige Aufgaben für die Gewebereparatur und -regeneration. Dieses neue Erkenntnis und die Erfolge in der Differenzierung von ESCs hat die Frage aufgeworfen, ob adulte Stammzellen für die in vitro Generierung von spezialisierten Zelltypen für die Transplantation verwendet werden können.

Bis vor wenigen Jahren bestand die allgemeine Auffassung, dass sich Betazellen nur in sehr geringem Maße regenerieren können. Die Ergebnisse aktueller Studien weisen jedoch darauf hin, dass die Betazellmasse unter bestimmten Bedingungen wie z.B. einer Schwangerschaft, der Entwicklung einer Adipositas oder nach einer Pankreasteilresektion enorm zunehmen kann. Die Mechanismen, die an der Regulation der Betazellmasse durch Neogenese und Betazellapoptose beteiligt sind, werden bis heute nur ungenügend verstanden.⁸⁵ Experimentelle Daten weisen darauf hin, dass sich Betazellen sowohl durch eine Proliferation präexistenter Betazellen wie auch durch die Differenzierung aus Stammzellen/Progenitorzellen entwickeln können.¹⁰⁶ Beispiele aus der Fachliteratur zeigen, dass diese Quellen für Betazellen kontrovers diskutiert werden: „No Pancreatic Endocrine Stem Cells?“⁵⁵ titeln Levine et al. im „New England Journal Of Medicine“ im Jahr 2004 und stellen damit die Stammzelltheorie in Frage. Im gleichen Jahr publizieren Dor et al. in „Nature“, dass die in vivo Regeneration der Betazellen nach einer partiellen Pankreatektomie wohl eher von den Betazellen selbst als von preexistierenden Stammzellen ausgeht.²² Andere Arbeitsgruppen konnten diese Fähigkeit der Selbstregeneration von Betazellen auch in vitro nachweisen. Sie fanden heraus, dass Betazellen dabei transient zu fibroblastenähnlichen Zellen dedifferenzieren, sich vermehren und anschließend wieder zu Betazellen redifferenzieren.^{27,52} Wichtig ist jedoch zu verstehen, dass diese Experimente die Existenz von adulten Stammzellen und deren Möglichkeit zur Differenzierung in Betazellen nicht verneinen. So ist es unter anderem der Arbeitsgruppe um Bonner-Weir gelungen nachzuweisen, dass im Epithel der Pankreasgänge Stamm- oder Progenitorzellen existieren, die den Marker Cytokeratin 19 (CK19) exprimieren.⁹ Diese Zellen sind im Mausmodell in der Lage, nach 90%iger Pankreatektomie oder Behandlung mit Streptozotocin, in insulinproduzierende Zellen zu differenzieren. Andere Gruppen konnten nachweisen, dass dies mit CK19-positiven Zellen auch in vitro gelingt.^{26,66} Auch aus isolierten Langerhans-Inseln konnten stammzellähnliche Zellen angezüchtet werden. Zulewski et al. ist es gelungen, Nestin-positive Vorläuferzellen aus den Inseln der Maus zu isolieren und diese später in vitro sowohl in leberähnliche Zellen als auch in exokrine und endokrine Zellen des Pankreas zu differenzieren. Die endokrinen Zellen exprimierten dabei die endokrinen Marker GLUT2, Insulin, Glukagon und den Homeodomain- Transkriptionsfaktor pancreatic and duodenal homeobox 1 (Pdx-1).¹¹² Der Beweis für die Existenz von duktalem Stammzellen/Progenitorzellen gelang schließlich durch Lineage Tracking Experimente, in denen markierte Neurogenin 3

(Ngn3)+-Progenitorzellen aus dem adulten Pankreas isoliert wurden, die sich nach der Transplantation in diabetische Mäuse zu reifen Betazellen entwickelt haben.¹⁰¹

1.1.3 Transdifferenzierung/ Plastizität adulter Stammzellen

Pluripotente Eigenschaften wurden in den letzten Jahren nicht nur bei ESCs sondern auch bei adulten Stammzellen beschrieben. Stammzellen, die aus einem Gewebe isoliert wurden, besitzen die Fähigkeit unter definierten Zellkulturbedingungen oder nach der Transplantation zu Zellen eines anderen Zell/Gewebetyps auszureifen.⁴⁷ Diese Eigenschaft von Stammzellen wird als Plastizität oder Transdifferenzierungsfähigkeit bezeichnet. Beispiele sind die Bildung von Hirn-, Muskel- und Leberzellen aus Knochenmarkstammzellen^{1,70,110}, die Generierung von Blut- und Muskelzellen aus Hirnzellen⁷, die Bildung von Pankreas- und Betazellen aus Leberzellen⁴⁴ oder die Bildung von Betazellen aus mesenchymalen Stammzellen⁹⁶. Mithilfe eindeutiger Markierungstechniken konnte in nachfolgenden Untersuchungen allerdings nachgewiesen werden, dass in vielen Experimenten keine tatsächliche Transdifferenzierung von Stammzellen in einen anderen Zelltyp aufgetreten ist, sondern die Ergebnisse durch Artefakte, durch die Fusion von Stammzellen mit Gewebezellen, oder die Induktion einer Zellregeneration aus residenten Progenitorzellen durch die transplantierten Zellen erklärt werden können.⁵⁹ Neueste Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass adulten Stammzellen tatsächlich eine hohe Plastizität aufweisen, die zellzyklusabhängig zu wechselnden Phänotypen führen kann. Es wird angenommen, dass durch reversible epigenetische Veränderungen der Chromatinstruktur Stammzellen auf Umgebungsfaktoren unterschiedlich reagieren und unterschiedliche Markerprofile exprimieren können. Diese Hypothese zur Erklärung der Stammzellplastizität wird als Kontinuum-Modell oder kinetisches Modell bezeichnet, welches dem hierarchischen Modell der Stammzellendifferenzierung gegenübersteht (Abb. 2).⁵⁴

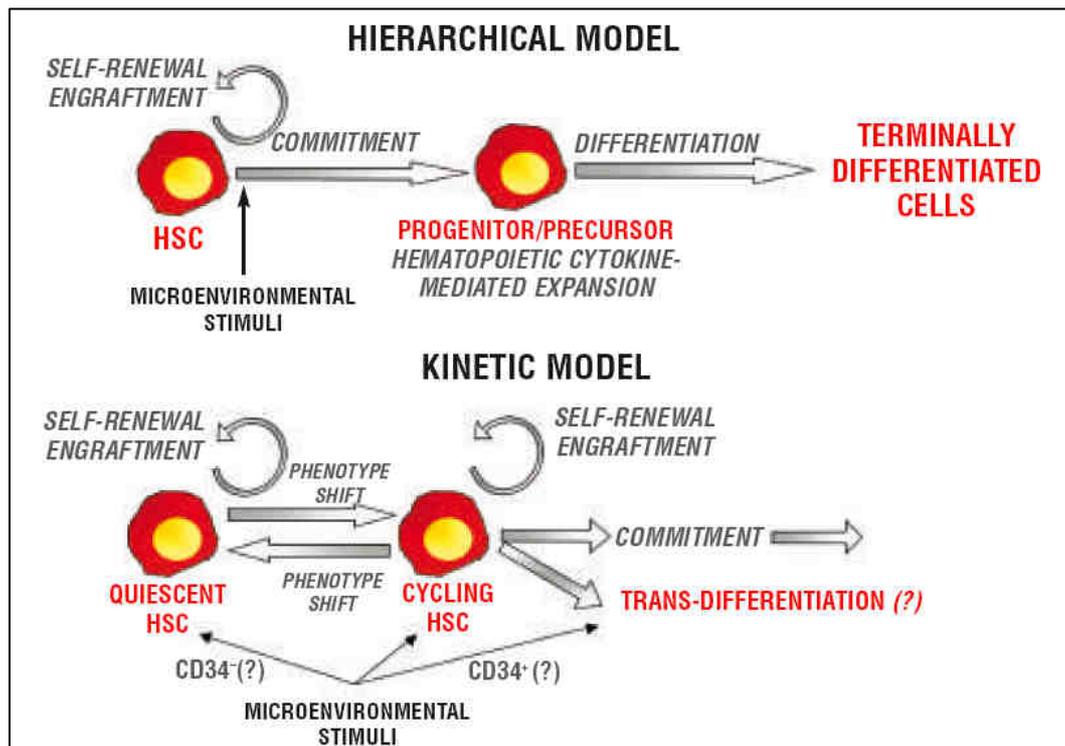


Abb. 2: Hierarchisches und Kontinuum Modell der Differenzierung von adulten Stammzellen. Im Unterschied zum Hierarchischen Modell geht das Kontinuummodell davon aus, dass der Phänotyp von Stammzellen von einem jeweiligen Zustand in einen anderen wechseln kann, je nach jeweiligem kinetischen Status der Stammzelle.⁵⁴

1.1.4 Probleme bei adulten pankreatischen Stammzellen/Progenitorzellen

Trotz enormer Fortschritte in der Stammzellforschung konnten eine Reihe wichtiger Fragen bisher nicht beantwortet werden. Momentan existieren keine molekularen Stammzellmarker mit denen die potentiellen Stammzellen eindeutig charakterisiert und definiert werden können. Meist wird deshalb eine Kombination von Markern eingesetzt, um die verwendeten Zellen zu charakterisieren, die von Labor zu Labor variieren und teilweise auch auf ausgereiften Zellpopulationen exprimiert werden. Kontrovers diskutiert wird auch die Frage der Lokalisation der Progenitorzellen in den Pankreasgängen (CK19-positive Zellen)^{9,26,32,66} oder in den Langerhans-Inseln (Nestin-positive Zellen)^{30,112}. Ebenfalls noch nicht völlig geklärt sind die physiologischen Stimuli, die die Proliferation und die Differenzierung in reife Betazellen steuern.¹² Genauso wenig bekannt ist deshalb wie weit sich die potenziellen adulten Stammzellen in der Zellkultur in ausreichendem Maße

vermehren lassen. Ähnlich wie bei den ESCs, ist es bisher nur teilweise gelungen aus adulten Stammzellen insulinproduzierende Zellen herzustellen. In allen bisherigen Publikationen waren die Betazellen nicht terminal ausgereift. Meist war die Zahl der Betazellen nur gering und die glukoseabhängige Insulinsekretion unzureichend.⁸⁵ Hier bedarf es in Zukunft weiterer Forschung, um das genaue Entwicklungspotenzial der adulten Stammzellen zu bestimmen und die Signalwege zu identifizieren, die für eine solche endgültige Reifung notwendig sind.¹¹²

1.2 Pankreasentwicklung während der Embryonalphase

1.2.1 Anatomische und morphologische Entwicklung des Pankreas

Das Pankreas besteht hauptsächlich aus drei Gewebearten: dem exokrinen Gewebe, das Enzyme für die Verdauung produziert, dem Pankreasganggewebe und den endokrinen Zellen (Langerhans-Inseln), dessen Hormone Insulin und Glukagon wesentlich den Kohlenhydrat-, Eiweiß- und Lipidstoffwechsel beeinflussen. Das Pankreas selbst entsteht schon sehr früh in der embryonalen Entwicklung; bei der Maus sprießen schon an Tag 8,5-9,5 (e8,5-e9,5) zwei Pankreasknospen aus spezialisiertem endodermalen Epithel der Vorderdarmregion aus. Aus diesen zwei Knospen entstehen zwischen e10,5 und e12,5 zwei primitive Pankreasorgane, die vor allem aus undifferenziertem duktalem Epithel bestehen. Diese zwei Organe rotieren und fusionieren in den zwei darauffolgenden Tagen e13 und e14 und formen das jetzt unpaare Bauchorgan, das Pankreas. Während exokrine Zellen erst am Tag e15 entstehen, sind endokrine Zellen schon ab e9,5 einzeln zwischen dem duktalem Epithel vorhanden. Am Tag e14 beginnen diese einzelnen Zellen stark zu proliferieren und sich ab e16 in inselähnlichen Clustern zu organisieren. Diese Inseln sind bis zum Zeitpunkt kurz vor der Geburt (e18-e19) unreif und durchlaufen innerhalb der ersten 2-3 Wochen nach Geburt einen Reifeprozess.³¹

1.2.2 Differenzierung des Endoderms, Vorderdarmentwicklung und Pankreasspezifizierung

Für die frühe Differenzierung des Endoderms und der daraus entstehenden Vorläuferzellen für die Pankreasentwicklung spielt die Chorda dorsalis eine entscheidende Rolle. Aus dem Mesendoderm entsteht unter dem Einfluss des von der Chorda dorsalis exprimierten Wachstumsfaktors „Nodal“ das Endoderm. Nodal ist ein Mitglied der Transforming growth factor-beta (TGF β)-Familie. Diese Signalkaskade ist durch ihren Einfluss auf die Limitation der Gastrulation auf den hinteren Teil des Embryos für die Erstellung einer anterior-posterior Achse unabdingbar.^{16,88} Ein weiterer, die Entstehung von Endoderm beeinflussender Signalweg ist der Wnt-Signalweg. Dies wurde 2002 von Lickert et al. verdeutlicht, die durch eine β -Catenin Knockout-Maus zeigen konnten, dass sich bei diesen Embryonen im Bereich der Endodermischiecht ektopisch mesodermale Zellen entwickeln.^{56,88} Andere, bei Vertebraten auffallend konservierte Faktoren, wie Mix-like homeodomain proteins, Gata Zinkfingerfaktoren, Sox High mobility group (HMG)- und Fox forkhead-Faktoren agieren „downstream“ von Nodal und Wnt und sind als solche essenziell für die Endodermformierung.⁸⁸ Bei der Entwicklung des Vorderdarms und der Formierung des frühen Pankreas spielen fibroblast growth factor (FGF)-, Wnt-, Retinsäure (RA)- und Sonic hedgehog (Shh)-Signalwege eine wichtige Rolle.⁸⁸ Es ist bekannt, dass sie für die Exprimierung wichtiger Schlüsselfaktoren verantwortlich sind, allen voran von Fox/HNF, ParaHox und Hoxfaktoren, die wichtige Mediatoren für die Zelldifferenzierung darstellen.^{29,88} Außerdem wurde postuliert, dass RA-Signale eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des Vorderdarms spielen, da Abänderungen dieses Signalweges zu Fehlbildungen in einigen Vorderdarmerivaten geführt haben, so z.B. in Lunge, Magen und Pankreas.^{61,88} Außerdem konnte gezeigt werden, dass RA-Signale „upstream“ von Schlüsselfaktoren wie Pancreatic duodenal homeobox factor 1 (Pdx-1) und einigen Hox-Genen agieren. Dies war erneut ein Hinweis darauf, dass Signale durch RA im Vorderdarm wichtig für eine spätere pankreatische Differenzierung sind.^{49,88} Der Hedgehog-Signalweg ist wesentlich an der Formung des Darmrohres beteiligt. Während Shh zu Beginn der Darmrohrformation noch in weiten Teilen entlang der anterior-posterior Achse exprimiert wird, wird der Faktor zu Beginn der Pankreasentwicklung im Bereich der vorderen und hinteren Pankreasknospe supprimiert. Dies geschieht erneut unter Einfluss der Chorda dorsalis, die mit den Faktoren FGF2 und Aktivin zwei effektive Inhibitoren des Shh-

Signalweges bereitstellt. Die These, dass die Shh-Inhibition dabei eine wichtige Rolle spielt, konnte durch in vitro Experimente erhärtet werden: Kim und Melton konnten 1998 zeigen, dass sich unter Gabe von Cyclopamin, eines sehr potenten Inhibitors des Shh-Rezeptors, in kultivierten Darmrohrexplantaten ektoptisch Pankreasknospen bilden.^{45,88}

1.2.3 Pankreatische endokrine und exokrine Progenitorzellen

Nachdem sich die zwei Pankreasknospen gebildet haben, bedarf es weiterer Signale, um die Proliferation und Differenzierung der einzelnen Vorläuferzellen voranzutreiben. Man fand heraus, dass FGF10 vermittelte Signale die Expansion von Pdx-1 positiven pankreatischen Progenitorzellen fördern.^{6,88} Notch-Delta-Signale resultieren in der Expression des Transkriptionsfaktors Ngn3 in ausgewählten Zellen. Diese sind multipotente Vorläuferzellen, aus denen später alle endokrinen Zellen entstehen.^{2,88} Durch laterale Inhibition (siehe Abb. 3) über Notchliganden wie Delta, Serrate und Jagged, wird sichergestellt, dass nicht die ganze Pankreasanlage zum endokrinen Apparat ausdifferenziert, sondern sich inmitten des duktales Gewebes nur einzelne Inseln endokrin spezialisieren.³⁹ Interessant ist, dass eine Nullmutation von Ngn3 im Menschen nicht zu einer gestörten Glukosetoleranz führt, was zeigt, dass im Menschen wohl noch andere, von Ngn3 unabhängige Signalwege eine wichtige Rolle für die endokrine Differenzierung spielen.^{88,97} Für die Expansion des exokrinen Zellpools spielen weiterhin Wnt-Signale eine entscheidende Rolle, jedoch soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf diese Aspekte nicht weiter eingegangen werden.⁸⁸

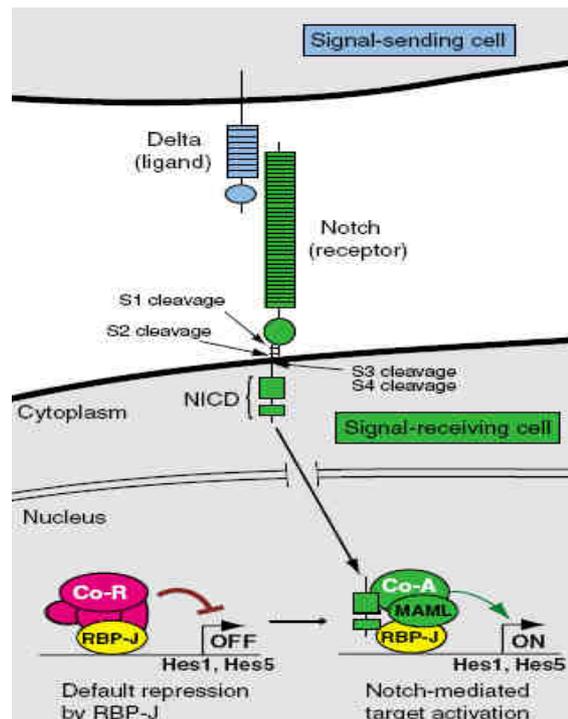


Abb. 3: Hairy enhancer of split 1 (Hes1)- vermittelte laterale Inhibition der Ngn3-Expression durch den Notch-Signalsweg über die Liganden „Delta“ und „Jagged“ benachbarter Zellen. Durch Bindung des Liganden wird der intrazelluläre Teil des Notchrezeptors (NICD) durch eine Gammasekretase abgespalten, wodurch die Signalkaskade aktiviert wird. Der abgespaltene NICD-Teil wandert in den Zellkern und aktiviert Zielgene wie Hes1 oder Hes5. Durch diesen Mechanismus wird die Entstehung einzelner Inseln inmitten von exokrinem und Ganggewebe kontrolliert.⁴³

1.2.4 Spezifizierung der einzelnen endokrinen Zelllinien

In den ausgereiften Inseln gibt es fünf verschiedene endokrine Zelltypen: Glukagon-produzierende Alphazellen, Insulin-produzierende Betazellen, Somatostatin-produzierende Deltazellen, Ghrelin-produzierende Epsylonzellen und pankreatisches Polypeptid-produzierende Zellen.⁸⁸ Zusätzlich zu dem wichtigen proendokrinen Faktor NGN3 spielen für ihre Entwicklung „downstream“ davon geschaltete Faktoren wie etwa der basic helix-loop-helix(bHLH)-Faktor NeuroD, das Zinkfingerprotein Insm1 und das LIM homeodomain-Protein Isl1 eine wichtige Rolle. Bei der Entwicklung der Betazellen sind zusätzliche Faktoren wie paired box 4 (Pax4), Pax6, die Homeoboxproteine Nkx2.2, Nkx6.1, Hlxb9 und Pdx-1 involviert, jedoch gibt es relativ wenige Studien, die zeigen konnten, wie diese Faktoren synergistisch die Transkription von zellspezifischen Zielgenen während der endokrinen Differenzierung

steuern.⁸⁸ Im nachfolgenden Kapitel soll auf einige wichtige Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren der Betazellendifferenzierung und Betazellfunktion eingegangen werden.

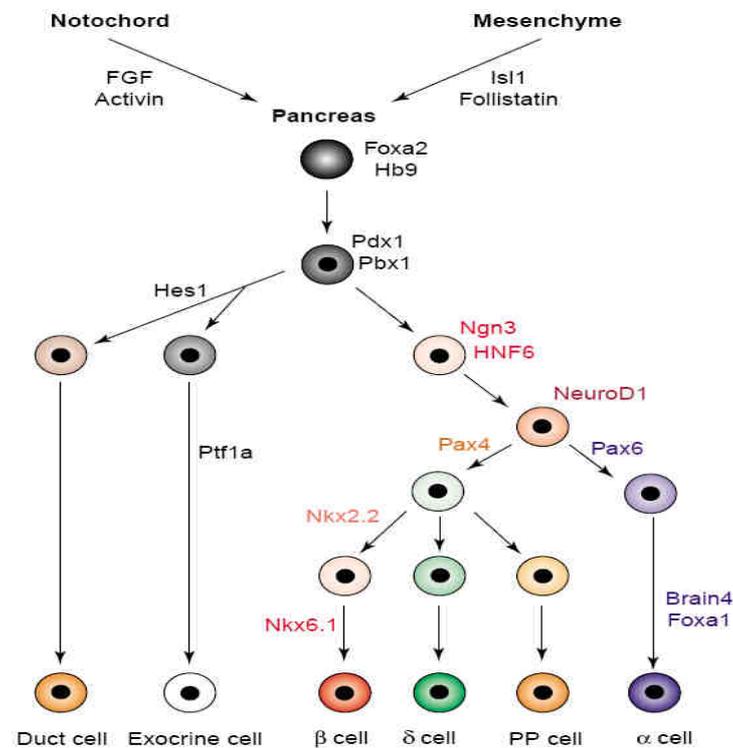


Abb. 4: Angenommener Differenzierungsweg der adulten Stammzellen bis zur ausgereiften Betazelle. Das Entwicklungsstadium ist charakterisiert durch eine stadiunabhängige sequentielle Expression von Schlüsseltranskriptionsfaktoren.¹⁵

1.3 Charakterisierung wichtiger proendokriner Faktoren

1.3.1 Pdx-1

Pdx-1 ist ein pankreasspezifisches Homeoprotein und wurde als ein Beta- und Deltazell-spezifischer Faktor identifiziert, der die Expression von Insulin und Somatostatin steuert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Pdx-1 die Expression von anderen inselspezifischen Genen reguliert, unter anderem von Glut-2, pankreatischem Polypeptid und Glukokinase. Die stabile Transfektion von Alphazellen mit Pdx-1 allein reicht aus, um in ihnen eine suffiziente Expression der Betazell-spezifischen Gene Insulin und Glukokinase zu erreichen.³¹

Während der Pankreasentwicklung im Embryo ist Pdx-1 zunächst in allen Zellen der Pankreasknospen exprimiert. Ein Versuch mit Pdx-1 Knockout-Mäusen, die eine komplette Agnese des Pankreas aufweisen, unterstreicht die Wichtigkeit dieses Faktors in der Entwicklung der Pankreasanlage. Im Verlauf der embryonalen Entwicklung limitiert sich dann die Expression von Pdx-1 mehr und mehr auf die endokrinen Zellen. Im Zeitraum um die Geburt an Tag e18,5 ist Pdx-1 schließlich fast nur noch in den Betazellen nachweisbar. Nur einige wenige Alphazellen exprimieren es zu diesem Zeitpunkt noch.³¹

1.3.2 Hlx9

Hlx9 ist wie Ngn3 ein bHLH basic helix-loop-helix (bHLH)-Transkriptionsfaktor und spielt als solcher vor allem im dorsalen Pankreasteil eine große Rolle. Hlx9 Knockout-Mäuse entwickeln keinen dorsalen Pankreas und weisen im Restpankreas kleine Inseln mit einer reduzierten Zahl an insulinproduzierenden Zellen auf.³¹

1.3.3 Isl1

Islet 1 (Isl1) ist ein Homeodomainprotein und wird im sich entwickelnden Pankreas und im zentralen Nervensystem exprimiert. Es wird von allen endokrinen Zellen des Pankreas exprimiert, jedoch nur sehr schwach in Betazellen. Versuche mit Nullmutant-Mäusen zeigten, dass Isl1 vor allem für die Entwicklung des Mesenchyms des dorsalen Pankreasteils und für die Differenzierung des dorsalen Pankreasepithels zu endokrinen Zellen verantwortlich ist. Die Entwicklung des ventralen Pankreas blieb davon jedoch unbeeinflusst.³¹

1.3.4 Ngn3, Hes und Notch

Der Notch-Signalweg hat im sich entwickelnden Pankreas vor allem die Aufgabe, Zellen in eine bestimmte Richtung zu weisen oder deren Differenzierung zu inhibieren. Dieser Mechanismus der lateralen Inhibition ist schon seit längerem bekannt.^{3,31} Abb. 3 verdeutlicht diesen Mechanismus der lateralen Inhibition: Ngn3

produzierende Zellen exprimieren an ihrer Oberfläche Deltaliganden, die an den Notch-Rezeptor von benachbarten Zellen andocken. Gammasekretasen spalten darauf den intrazellulären Teil des Notch-Rezeptors (NICD) ab; der Notch-Signalweg wird aktiviert und über eine Reihe von Faktoren die Transkription der inhibitorischen Transkriptionsfaktoren Hes1 und Hes5 vermittelt. Diese sind in der Lage, die Ngn3 Expression in der Effektorzelle wirksam zu unterdrücken, und somit eine endokrine Differenzierung dieser Zelle zu verhindern. Auf diese Weise kann die Proliferation und Differenzierung von endokrinen Progenitorzellen des Pankreas kontrolliert werden.⁴³ Dies zeigen Versuche mit Hes1 Knockout-Mäusen, bei denen die Entwicklung endokriner Zellen frühzeitig stattfindet.^{31,41} Weiter zeigten Mäuse, die den Deltalike Ligand-1 nicht exprimierten eine beschleunigte Differenzierung von Ngn3 produzierenden pankreatischen Epithelzellen.^{2,31} Außerdem sind Ngn3-Knockout-Mäuse nicht in der Lage endokrine Zellen zu bilden (siehe Abb.5).²⁸ All diese Mechanismen unterstreichen die Wichtigkeit des bHLH-Transkriptionsfaktors Ngn3, der in der Lage ist, die endokrine Differenzierung von Progenitorzellen zu fördern.

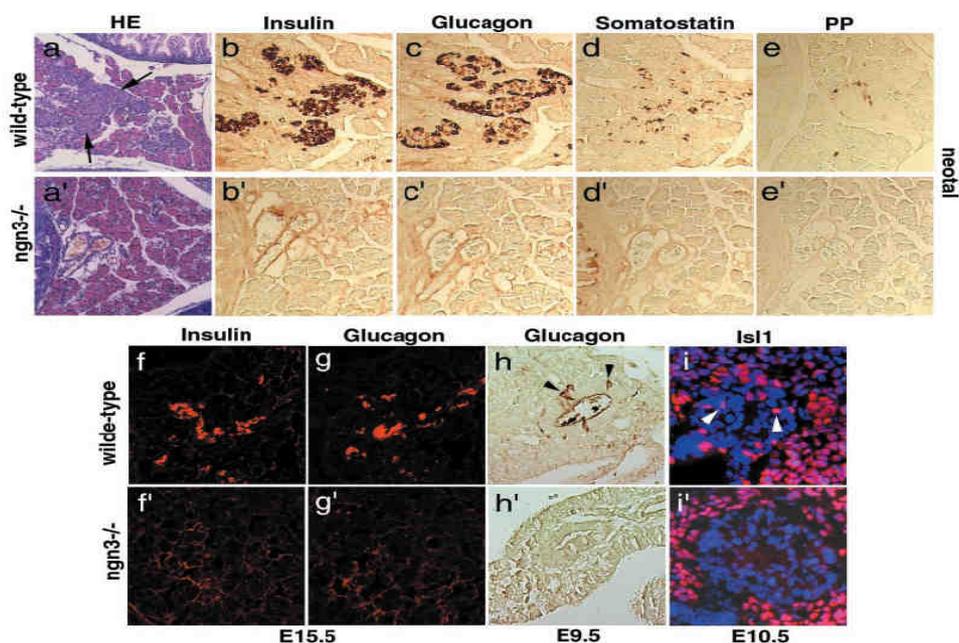


Abb.5: Ngn3 ist für die Differenzierung aller endokrinen Zelltypen des Pankreas notwendig. Langerhans-Inseln (a) und Insulin-produzierende Zellen (b und f), Glucagon- produzierende Zellen (c, g, Pfeile in h), Somatostatin (d), PP (e) und Isl1 (Pfeile in i) sind im Wildtyppankreas nachweisbar (a-h), jedoch nicht in Ngn3-Knockoutmäusen bei Geburt (vergleiche hierzu a-e mit a'-e') und in frühen Stadien der Entwicklung nachweisbar: E15.5(f, f', g und g'), e10,5 (i und i') und e9,5 (h und h'). Hematoxylin-Eosin-Färbung (HE) in a und a'.²⁸

Ngn3 ist im Embryo mit Beginn der endokrinen Differenzierung an Tag e9-e9,5 nachweisbar, erreicht seinen Expressionshöhepunkt an Tag e15,5, wird bei Geburt stark runterreguliert und ist im adulten Pankreas nur noch in geringer Stärke exprimiert. Die hepatocyte nuclear factors (HNF) HNF1alpha, HNF3beta und HNF6 wurden als Initiatoren der Ngn3-Transkription beschrieben.^{31,53}. Jedoch sind diese nicht alleinig in der Lage, die Ngn3-Expression suffizient zu fördern, sondern es wird eher ein kooperativer Effekt zwischen diesen Faktoren postuliert.³¹

1.3.5 Die hepatocyte nuclear factors (HNF) HNF1, HNF3 und HNF6

Im Pankreas werden hauptsächlich drei hepatocyte nuclear factors (HNF) exprimiert, HNF1, HNF3 und HNF6, wobei HNF3 β am stärksten sowohl in den Azinuszellen als auch in den Inselzellen exprimiert wird. Diese HNF-Faktoren sind sogenannte winged-helix-Transkriptionsfaktoren. Sie besitzen mindestens 2 Bindungsstellen für Ngn3 und scheinen durch die Rekrutierung von Histon-Acetyltransferasen und weiterer Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle in der Initiierung der Transkription von histongebundener, inaktivierter DNA zu spielen. HNF3-Faktoren sind neben der Regulation von Ngn3 auch an der Regulation des pankreatischen Transkriptionsfaktors Pdx-1 beteiligt.⁵³

Auch von den HNF1-Proteinen werden zwei unterschiedliche Subtypen im Pankreas exprimiert: HNF1 α und HNF1 β . Knockoutmäuse für HNF1 α haben kleinere Langerhans-Inseln und eine reduzierte Insulinsekretion.^{53,75}

HNF6 wird in den dukталen Zellen des sich entwickelnden Pankreas exprimiert. Diese Zellen exprimieren auch als erste Ngn3. Mäuse ohne HNF6 exprimieren signifikant weniger Ngn3 und zeigen eine bedeutende Reduktion der Inselmasse auf. Desweiteren wurden direkt auf dem Ngn3-Promoter 2 Bindungsstellen für HNF6 beschrieben.⁵³

1.3.6 Beta2/NeuroD

Der bHLH-Transkriptionsfaktor Beta2/NeuroD ist ein Schlüsselregulator der Insulingentranskription in pankreatischen Betazellen und der terminalen Differenzierung von Neuronen. In der embryonalen Entwicklung des Pankreas ist

NeuroD erstmals am Tag e9,5 nachweisbar. An Tag e17,5 ist seine Expression auf Inseln beschränkt. NeuroD1 bildet zusammen mit den anderen bHLH-Faktoren der E2A-Familie Heterodimere und reguliert die Transkription vom Insulingen und anderen betazellspezifischen Genen. Dabei wird NeuroD von Ngn3 aktiviert.³⁷

NeuroD-Knockoutmäuse sterben 3-5 Tage postpartum an den Folgen schwerer Hyperglykämien. Die Inseln dieser Mäuse sind dysmorph und weisen eine verminderte Zahl an Betazellen auf.^{31,64}

1.3.7 Pax4 und Pax6

Paired box 4 (Pax4) ist ein Homeoprotein und wird nur im ZNS und im sich entwickelnden Pankreas exprimiert. Im Pankreas wird es ab Tag e9,5 sowohl in der ventralen als auch in der dorsalen Knospe exprimiert. Zur Zeit der Geburt ist seine Expression jedoch gänzlich auf die Betazellen limitiert. Pax4-Knockoutmäuse sterben innerhalb der ersten 3 Tage nach der Geburt an Hyperglykämie und Dehydratation. Sie weisen keine Beta- und Deltazellen auf, die Zahl der Alphazellen ist vermindert, Pdx-1 wird nicht exprimiert. Dies zeigt, dass Pax4 schon in der frühen Entwicklung des Pankreas eine bedeutende Funktion in der Differenzierung von Beta- und Deltazellen hat.³¹

Auch Pax6 ist ein Homeoprotein, das schon ab Tag e9,0 in allen endokrinen Zellen des Pankreas nachweisbar ist. Es reguliert die Promotoren von Glukagon-, Insulin- und Somatostatingenen.³¹ Mäuse mit einer bestimmten Mutation des Pax6-Gens (Sey^{-/-}) haben abnormal organisierte Inseln und weisen eine reduzierte Produktion von Glukagon und Insulin auf.^{31,81} Fehlt das Gen ganz, bilden die Mäuse keine Inseln aus und sind nicht lebensfähig.^{31,89} Diese Experimente zeigen, dass auch Pax6 einen Schlüsselregulator der endokrinen Differenzierung darstellt.

1.3.8 Nkx2.2 und Nkx6.1

Nkx2.2 und Nkx6.1 sind Homeoproteine der NK2-Familie und als solche Regulatoren der pankreatischen endokrinen Differenzierung. Nkx2.2 wird in den sich entwickelnden Pankreasknospen exprimiert und beschränkt sich später auf die Alpha-, Beta- und PP-Zellen des Pankreas, während Nkx6.1 vor allem in Betazellen

des adulten Pankreas nachweisbar ist.³¹ Knockout-Mäuse für Nkx2.2 oder für Nkx6.1 sind nicht lebensfähig.^{31,92} Fehlen beide Faktoren, bilden sie keine Insulinproduzierenden Zellen aus, die Anzahl glukagonproduzierender Zellen ist vermindert.³¹ Nkx2.2-Knockoutmäuse weisen eine große Zahl unreifer endokriner Progenitorzellen auf, die keine Hormone produzieren, während sich in Nkx6.1-Knockoutmäusen eine verringerte Anzahl an Betazellen entwickelt.^{31,82}

1.3.9 MafA und MafB

MafA ist ein Mitglied der Maf-Subfamilie von Leuzin-Zipper-Faktoren. Als solches ist seine Expression auf Betazellen beschränkt und könnte neben der starken Insulinexpressionsinduktion auch eine Rolle in der Differenzierung von Betazellen spielen. Dies legt die Rolle anderer Maf-Subfamilienmitglieder nahe, die u.a. die myeloische Differenzierung aber auch die Differenzierung von Kleinhirnzellen beeinflussen.^{39,68} In der Pankreasentwicklung ist MafA schon an Tag e14 nachweisbar.³¹ Zuletzt wurde gezeigt, dass er durch seine Bindung an das C1-Element des Insulinpromotors eine wesentliche Rolle in der glukosabhängigen Transkription des Insulingens spielt. Dies zeigen auch MafA-Knockoutmäuse, die verminderte Insulintranskriptionslevel aufweisen.⁹⁵

1.4 Rolle von Transkriptionsfaktoren bei der Aufrechterhaltung der Betazellfunktion

Viele der oben genannten Faktoren spielen nicht nur in der embryonalen Entwicklung der Betazelle eine entscheidende Rolle. Während einige Faktoren wie z. B. Ngn3 oder HNF1 β nur für kurze Zeit während der Pankreasentwicklung exprimiert werden, greifen andere Faktoren wie Pdx-1, MafA, Nkx2.2 u.a. wesentlich in die Expression, Prozessierung, Speicherung und die glukoseabhängige Sekretion von Insulin ein.⁵ Durch die Cre-Lox-Technologie, einem Verfahren zum Ausschalten eines Gens in einem adulten Tier, wurde es möglich, nur die Funktion der Faktoren in den gereiften Betazellen zu studieren, ohne die embryonale Entwicklung zu beeinflussen. So zeigt die Betazell-spezifische Deletion von HNF3 β (Foxa2) eine abgeschwächte Expression der Gene für Pdx-1 und eines ATP-abhängigen Kaliumkanals.¹⁵ Die

Deletion von Pdx-1, welches mehrere Bindungsstellen für die Promotoren der Insulin-, Amylin- und Glukokinasegene besitzt (siehe Abb. 7), bewirkt eine abgeschwächte Expression von Insulin, Amylin und des GLUT2-Glukosetransporters.^{5,15} Da jedoch ein gezieltes Ausschalten, z. B. des Gens für Pdx-1, kein absolutes Fehlen der Zielgenexpression, also z. B. der Insulingenexpression hervorruft, muss man davon ausgehen, dass ein Netzwerk von Transkriptionsfaktoren Einfluss auf die Betazellfunktion hat.¹⁵ Abb. 6 stellt schematisch die Interaktion der einzelnen Faktoren in der Regulierung der Betazellfunktion dar. Ein wichtiger Faktor dieses Netzwerks ist MafA. MafA, dessen Expression durch die Glukosekonzentration in der Zelle selbst beeinflusst wird, bindet zusammen mit Pdx-1 und anderen Genen an den Insulinpromotor und sorgt somit vor allem für eine glukoseabhängige Expression des Insulingens.⁹⁵ Auch Nkx2.2 wird eine Rolle in der ausgereiften Betazelle zugeschrieben. Transgene Mäuse, die eine Repressorform von Nkx2.2 in den Betazellen exprimierten, wiesen niedrigere Spiegel an Insulin, MafA und GLUT2 auf.⁵ Bei den HNF-Faktoren HNF1 α und HNF4 α geht man davon aus, dass sie keine wesentliche Funktion in der Entwicklung der Betazelle erfüllen. Dennoch weisen Individuen mit Mutationen dieser und anderer Gene das klinische Bild eines Maturity-onset diabetes of the young (MODY), eines Typ 2 ähnlichen Diabetes des jungen Menschen auf. Man geht davon aus, dass diese Transkriptionsfaktoren vor allem die Regulation von Schlüsselgenen der ausgereiften Betazelle steuern.⁵

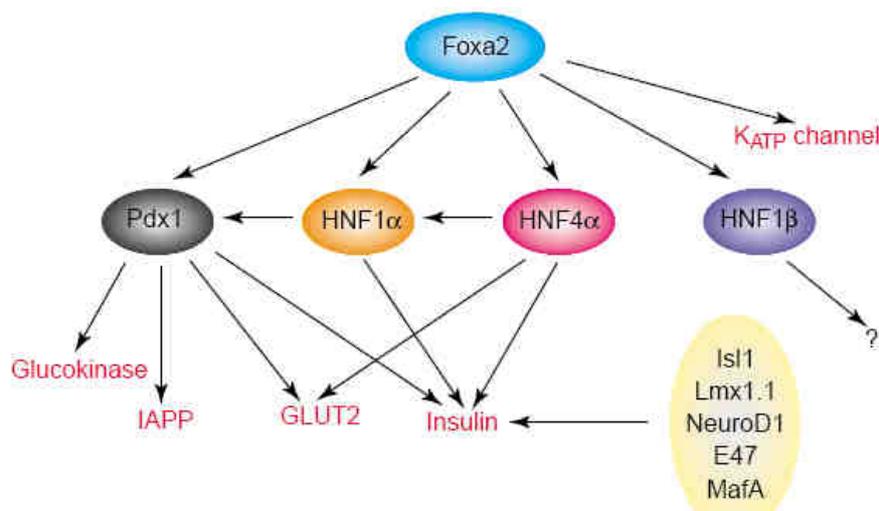


Abb. 6: Interaktion von Transkriptionsfaktoren bei der Regulation der Betazellfunktion. Vor allem die HNF-Faktoren üben auf verschiedenen Ebenen Einfluss auf die betazellspezifische Genexpression aus.¹⁵

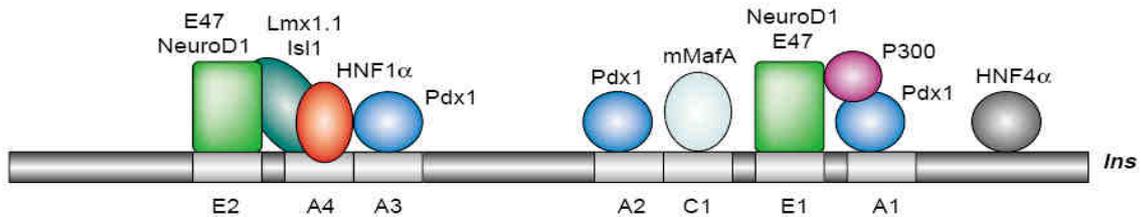


Abb. 7: Aktivierung des Insulinpromotors durch ein komplexes Zusammenspiel von Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren. NeuroD, Isl1, Pdx-1, MafA sowie HNF1 α und HNF4 α üben über direkte Bindungsstellen am Insulinpromotor Einfluss auf die Insulinexpression aus.¹⁵

1.5 Regulation der Betazellmasse und Funktion durch extrinsische Faktoren

1.5.1 Glucagon-like peptide 1 (GLP-1)

GLP-1 ist ein enteroendokrines Hormon aus den L-Zellen des Dünndarms und wird nahrungsabhängig in die Blutbahn abgegeben. Es entfaltet seine Wirkung in der Betazelle mittels eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors und eine darauffolgende Regulation des intrazellulären cAMP-Spiegels.⁵⁷ In vitro konnte außerdem nachgewiesen werden, dass GLP-1 eine Transaktivierung des epidermal growth factor receptor (EGFR), der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase), der Proteinkinase B/Akt und der Proteinkinase C ζ bewirkt. Über diese Wege stimuliert GLP-1 durch die Bindung an den GLP-1-Rezeptor an der Betazelle die Insulin-Genexpression und –Biosynthese und die streng glukoseabhängige Sekretion von Insulin, aber auch eine Proliferation von Betazellen in vitro.¹³⁻¹⁴ Im Körper entfaltet GLP-1 auch außerhalb der Betazelle seine Wirkung. So inhibiert es die Glukagonsekretion in den Alphazellen des Pankreas und die Glukoneogenese in der Leber, verzögert die Magenentleerung, wirkt sich somit hemmend auf die Nahrungsaufnahme aus und verbessert die Glukoseaufnahme in der Peripherie, also im Muskel und in den Fettzellen.⁵⁷ In klinischer Anwendung sind dabei die Gabe von GLP-1, der sehr potenten Analoga Exenetin (Byetta®) und Liraglutide (Victoza®) oder von DPP-IV-Inhibitoren, die den normalerweise sehr schnellen Abbau von GLP-1 im Blut hemmen. In Tiermodellen konnte außerdem gezeigt werden, dass GLP-1

eine Vergrößerung der Betazellmasse bewirkt und dadurch und über die oben genannten Effekte die Insulinsekretion in Tieren mit gestörter Glukosetoleranz oder Typ 2 Diabetes verbessert. Ebenso bekannt ist ein positiver Effekt auf die Betazellapoptose und auf die Glukolipotoxizität in diabetischen Tiermodellen.¹⁴ In vivo Experimente zeigten außerdem, dass GLP-1 die Proliferation von Insulinomazellen und die Proliferation, aber auch die Differenzierung von Betazellen in der Goto- Kakizakiratte, einem Typ 2 Tiermodel, fördert.⁵⁷ All diese Erkenntnisse zeigen, dass GLP-1 sowie seine Agonisten, wie z.B. Exendin-4, hoffnungsvolle Kandidaten für die Induktion zur endokrinen Differenzierung von Stammzellen darstellen.

1.5.2 Natriumchlorat

Natriumchlorat ist ein Inhibitor der Sulphatierung von Proteoglykanen. Sulphatierte Proteoglykane, wie z.B. Heparansulphat-Proteoglykan, sind membranständige Moleküle und wichtig für die Zell-Zell-Interaktion im Zellverbund. Es wird diskutiert, dass mesenchymale Zellen im embryonalen Pankreas einen inhibitorischen Einfluss auf die Differenzierung von endokrinen Zellen haben. Dieser Effekt wird teilweise per Zell-Zellkontakt über sulfatierte Proteoglykane vermittelt.¹⁰⁷ Zertal-Zidani et al. ist es gelungen, durch eine Inhibition der Sulphatierung den inhibitorischen Einfluss der Mesenchymzellen auf die Differenzierung endokriner Zellen zu stoppen. Daraus resultierte ein massiver Anstieg der Ngn3-positiven Zellen und schlussendlich der insulinproduzierenden Zellen.¹⁰⁷

1.5.3 Nikotinamid

Nikotinamid ist eine Form des Vitamin B3, welche durch ihren Metaboliten NAD⁺ (Nicotinamid Adenin Dinucleotid) an einer großen Zahl von biologischen Prozessen, inklusive der Produktion von Energie, des Nährstoffmetabolismus, der Signaltransduktion und der Erhaltung der Integrität des Genoms, beteiligt ist.⁷⁹ Bei Versuchen mit verschiedenen Tiermodellen konnte ein betazellprotektives Potential festgestellt werden. Die einzelnen Mechanismen dieser Effekte sind nicht geklärt, jedoch wurden Hypothesen aufgestellt, dass Nikotinamid an der Beseitigung freier

Radikale beteiligt ist.⁷⁹ Schon im Jahr 1993 wurde festgestellt, dass Nikotinamid die in vitro Differenzierung von kultivierten humanen fetalen pankreatischen Zellen fördert und zu einer gesteigerten Produktion pankreatischer Hormone wie Insulin, Glukagon und Somatostatin führt. Dieses Resultat wurde vor allem auf die Inhibierung des Enzyms Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) zurückgeführt, da Inhibitoren dieses Enzyms den Effekt von Nikotinamid imitieren konnten.⁷⁹ In letzter Zeit wurde die Wirkung von Nikotinamid in verschiedensten Protokollen für die Herstellung von insulinpositiven Zellen aus Progenitorzellen untersucht: Bei den meisten Versuchen zeigte sich, dass Nikotinamid einen positive Wirkung ausübt, so dass Nikotinamid in vielen Differenzierungsprotokollen eingesetzt wird. Auch bei den jüngsten Versuchen konnte der genaue Wirkmechanismus nicht geklärt werden, jedoch vermutet man, dass die Wirkung des Agens indirekt mit der DNA-Reparation von geschädigten proliferierenden Zellen und mit dem Chromatinumbau zusammenhängt.⁷⁹

1.5.4 Retinsäure (Vitamin A)

Aufgrund seiner Schlüsselrolle in der Entwicklung von Ektoderm und Mesoderm in vivo wurde all-trans-Retinsäure (RA) schon in zahlreichen Studien zur neuronalen Differenzierung in vitro untersucht. Aufgrund von Anhaltspunkten, RA würde auch in der frühen embryonalen Entwicklung des Pankreas eine Rolle spielen, wurde RA auch auf seine Potenz die Differenzierung zu insulinproduzierenden Zellen zu fördern, untersucht. Dabei gewann man die Erkenntnis, dass RA die Differenzierung von sogenannten „Embryonic Bodies“ (Zellaggregat aus embryonalen Stammzellen) zu endodermalen Vorläuferzellen induzieren kann.⁷⁹ Einer anderen Arbeitsgruppe gelang es durch Kombination von RA mit Activin A, in einem einfachen drei Schritte Modell insulinproduzierende Zellen generieren. Trotz einiger Erkenntnisse, sind auch bei Retinsäure die genauen Mechanismen, die für die Induktion der Differenzierung verantwortlich sind, nicht im Detail bekannt.⁷⁹

1.5.5 Natriumbutyrat

Natriumbutyrat ist eine organische Säure, die das Differenzierungspotenzial von fetalen pankreatischen Zellen steigert. Außerdem ist bekannt, dass sie in Inseln die Insulinsekretion sowie Betazell-Genexpression fördert. Auch bei Natriumbutyrat ist der genaue Mechanismus unklar. Diskutiert wird eine Inhibierung von Histon-Deacetylasen, die eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Genexpression, Zellproliferation und Differenzierung spielen.⁷⁹

1.5.6 Cyclopamin

Cyclopamin ist ein Alkaloid und ein sehr potenter Inhibitor des Shh-Signalweges. Die Inhibierung dieses Pathways durch Activin β -B und FGF2 während der embryonalen Entwicklung induziert die Expression von Pdx-1 und die damit verbundene pankreatische Differenzierung. Bei in vitro Versuchen mit murinen embryonalen Stammzellen konnte für Cyclopamin gezeigt werden, dass es die Expression von Pdx-1 und Insulin induziert.⁷⁹

1.5.7 Picolinsäure

Picolinsäure ist als Katabolit von Tryptophan ein Kationenchelator der u.a. in der Lage ist, Eisenionen zu binden. In der Literatur wird beschrieben, dass Picolinsäure die Glutamine:Fructose-6-Phosphat-Amidotransferase (GFAT) in Makrophagen induziert. Wahrscheinlich läuft diese Induktion dabei über das sogenannte Hypoxia Responsive Element (HRE).⁶⁰ In der Betazelle ist die GFAT das Schlüsselenzym im Hexosamin-Biosynthese-Signalweg. Dieses Enzym konvertiert Fructose-6-Phosphat zu Glukosamin-6-Phosphat (GlcN-6-P), welches sehr schnell zu Uridin-5-diphosphat-N-acetylglukosamin (UDP-GlcNAc) umgewandelt wird. UDP-GlcNAc ist ein Substrat für die O- und N-Glykosilierung von Proteinen.⁹⁵ Vanderford et al. konnten zeigen, dass die Aktivierung des Hexosamin-Biosynthese-Signalweges die Expression von MafA induziert.⁹⁵ Effekte auf weitere Faktoren der endokrinen Differenzierung des Pankreas sind bis dato jedoch nicht bekannt.

1.5.8 Aktive

Aktive gehören zur transforming growth factor beta (TGF- β)-Superfamilie. Diese wichtigen Moleküle steuern im Embryo die Differenzierung verschiedener Zelltypen. Aktive A fördert die Betazellendifferenzierung von humanen fetalen pankreatischen Zellen *in vitro*.^{19,108} AR42J-Zellen azinären Ursprungs differenzieren bei Gabe von Aktive A zu endokrinen Zellen. Eine Kombination von Aktive A und Betacellulin, einem Mitglied der Epidermal-Growth-Factor-Familie, induziert die weitere Differenzierung von AR42J und duktalem Zellen zu insulinproduzierenden Zellen.^{62,66} Die Tatsache, dass Aktive auch bei Pankreatektomie oder Streptozotocinbehandlung in duktalem Zellen hochreguliert sind, lässt darauf schließen, dass sie auch im adulten Pankreas die Betazellneogenese beeinflussen.¹⁰⁹ Durch Inhibition von Aktive A, etwa durch Follistatin, wird eine stärkere Proliferation aber verminderte Differenzierung von duktalem Zellen zu insulinproduzierenden Zellen erreicht. Dies zeigt, dass Wachstum und Differenzierung einer präzisen Kontrolle von Aktive-Signalwegen unterliegen.¹⁰⁸

2. Fragestellung

In der Diabetologie wird, wie in fast allen Bereichen der Medizin, intensiv nach neuen Quellen für Stammzellen gesucht, um durch Krankheit geschädigtes Gewebe zu ersetzen oder zu regenerieren. Trotz großer Erfolge in den letzten Jahren auf dem Gebiet der Stammzellforschung ist es bis dato nicht gelungen voll funktionstüchtige Betazellen aus Stammzellen zu generieren. Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren:

1. Die Isolierung von adulten, murinen duktalem Stammzellen und die darauffolgende Charakterisierung mittels FACS und RT-PCR.
2. Untersuchung verschiedener Medien und Kulturbedingungen auf ihren Einfluss auf die Expression wichtiger basaler Marker wie Pdx-1 und MafA. Es sollten Kulturbedingungen für eine Differenzierung in Richtung endokrine Progenitorzelle etabliert werden.
3. Untersuchung des Potentials von „Small Molecules“ hinsichtlich Förderung der endokrinen Differenzierung in Richtung reifer Betazellen

Mit diesen Experimenten sollten erste Daten generiert werden, um die Frage zu klären, inwieweit Pdx-1 exprimierende Stammzellen aus Inseln und Ductuli des murinen Pankreas ohne Gentransfer mit Hilfe von „Small Molecules“ in der Lage sind, endokrin zu differenzieren.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1	Reagenzien	Lieferanten
	Aktivin A	R&D Systems (Minneapolis)
	Agarose	Sigma (Taufkirchen)
	Alcian Blue 8GX	Sigma (Taufkirchen)
	B27-Supplement	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
	Betacellulin	R&D Systems (Minneapolis)
	Cutasept F	BODE Chemie (Hamburg)
	Cyclopamin	Sigma (Taufkirchen)
	DAPT	Sigma (Taufkirchen)
	Desferrioxamin	Sigma (Taufkirchen)
	Dexamethason	Sigma (Taufkirchen)
	Dispase	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
	DMSO (Dimethylsulphoxide)	Sigma (Taufkirchen)
	DNA Ladder (100bp)	Promega (Mannheim)/ New England Biolabs
	rhEGF	Strathman Biotech GmbH (Hannover)
	Ethanol	Merck (Darmstadt)
	Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
	Exendin-4	Sigma (Taufkirchen)
	rmFGF	R&D Systems (Minneapolis)
	Fibronektin (aus Rattenplasma)	Sigma (Taufkirchen)
	FKS: fetales Kälberserum	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
	Formaldehyd (36,5%)	Sigma (Taufkirchen)
	Gammasekretase-Inhib. X	Calbiochem (Nottingham)
	Gammasekretase-Inhib. XX	Calbiochem (Nottingham)

Gelatine 2%	Sigma (Taufkirchen)
GLP-1	Sigma (Taufkirchen)
GLP-1 1-37	Sigma (Taufkirchen)
Glukosamin	Sigma (Taufkirchen)
Hematoxylin QS	Linaris (Wertheim)
Hepatocyte Growth Factor (HGF)	Sigma (Taufkirchen)
Hydrocortison	Sigma (Taufkirchen)
Indomethacin	Sigma (Taufkirchen)
Insulin	Sigma (Taufkirchen)
Isobutyl-Methylxanthin	Sigma (Taufkirchen)
Isofluran	Abbott (Wiesbaden)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kaisers Glyceringelatine	Merck (Darmstadt)
Liberase	Roche (Mannheim)
Loading Dye	Promega (Mannheim)
LY-294,002 hydrochlorid	Sigma (Taufkirchen)
Natriumbutyrat	Sigma (Taufkirchen)
Natriumchlorat	Sigma (Taufkirchen)
Nicotinamid	Sigma (Taufkirchen)
dNTP-Mix (je 5 mM)	Qiagen (Hilden)
dNTP-Mix (je 10 mM)	Promega (Mannheim)
PACAP-38	Bachem (Weil am Rhein)
PBS	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin (20x)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Picolinsäure	Sigma (Taufkirchen)
Retinsäure	Sigma (Taufkirchen)
RNase-Inhibitor (30 U/μl)	Eppendorf (Hamburg)
Saponin	Fluka (Taufkirchen)
Serum Replacement (SR)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Trypanblau	Biochrom AG (Berlin)

Trypsin-EDTA (10x)

Gibco Invitrogen (Karlsruhe)

3.1.2 Kits

GoTaq® Flexi DNA Polymerase	Promega (Mannheim)
HotStarTaq Plus	Qiagen (Hilden)
LightCycler FastStart DNA MasterPlus SYBR Green I	Roche (Mannheim)
Omniscript Reverse Transkription	Qiagen (Hilden)
High Pure RNA Isolation Kit	Roche (Mannheim)
Vector Mounting Medium with DAPI	Linaris (Wertheim)
Vector NovaRED (für Peroxidase)	Linaris (Wertheim)

3.1.3 Antikörper

Neurogenin3 goat anti-mouse polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
Polyclonal Rabbit Anti-Goat IgG	DAKO (Hamburg)

3.1.4 Lösungen und Medien

Advanced DMEM/F12 (1:1)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Dulbeccos's modyfied eagle medium	Sigma (Taufkirchen)

3.1.5 Geräte

Absaugpumpe	HLC (Bovenden)
Analysewaage Kern 770	Kern & Sohn (Karlsruhe)
BD FACS Calibur	BDBiosciences (Heidelberg)
BIOFUGE fresco	Heraeus (Hanau)

BioPhotometer 6131	Eppendorf (Hamburg)
Deckgläser	Menzel- Gläser (Braunschweig)
Digitalkamera SP500VZ	Olympus (Hamburg)
Elektrophoresekammer	MWG Biotech (Ebersberg)/ BioRad
Fireboy eco	Integra Biosciences (Fernwald)
Geldokumentationssystem	Intas (Göttingen)
IKAMAG Magnetrührer	IKA (Staufen)
Inkubator Heracell	Heraeus (Hanau)
Inkubator APT.LINE CB	Binder (Tuttlingen)
LightCycler	Roche (Mannheim)
Mikroskop Fluovert	Leitz (Wetzlar)
Mini-Zentrifuge Spectrafuge	NeoLab (Heidelberg)
pH- Meter pH 720	WTW (Weilheim)
Pipetten 2, 10, 100, 1000 µl	Gilson (Middleton)
Pipetten 10, 20, 100, 200, 1000 µl	Eppendorf (Hamburg)
Pipetus Pipettierhilfe	Hirschmann (Eberstadt)
Sterilbank Hera safe	Heraeus (Deutschland)
Thermocycler: GeneAmp PCR System 9700	PE Applied Biosystems (Weiterstadt)
Vortex-Schüttler	VWR International (Darmstadt)
Wasserbad WNB 7-45	Memmert (Schwabach)
Zentrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg)

3.1.6 Verbrauchsmaterial	Hersteller
Cryobabies (Etiketten)	Diversified Biotech (Boston)
Culture Slides (4 Chamber)	BD / Falcon (Heidelberg)
Discardit II Spritze 2, 5, 10 ml	BD (Heidelberg)
Latexhandschuhe Semper Care	Semperit Techn. Produkte (Wien)
LightCycler Cappillaries	Roche (Mannheim)

Mikrotiterplatten (6 Well)	Corning (München)
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
15 / 50 ml Zentrifugenröhrchen	Corning (München)
PCR-Tubes (0.2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Brand (Wertheim)
Pipettenspitzen RNase free 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt (Nümbrecht)
Serologische Pipetten	BD / Falcon (Heidelberg)
Spritzenvorsatzfilter	Millipore (Schwalbach)
Tissue-Tek Cryomold Biopsy	Sakura (Japan)
Tissue-Tek O.C.T. Compound	Sakura (Japan)
Zellkulturflaschen	Corning (München)
Zellschaber (cell scraper)	Sarstedt (Nümbrecht)

3.2. Methoden

3.2.1 Versuchstiere

Zur Gewinnung von Zellen aus dem Pankreas wurden männliche 6-12 Wochen alte C57BL/6 Mäuse verwendet, die von Harlan-Winkelmann bezogen wurden. Der Versuch ist von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Geschäftszeichen: 55.2-1-54-2531-126-06).

3.2.2 Isolierung der Langerhans-Inseln und Pankreasgänge aus dem murinen Pankreas

Die C57BL/6 Mäuse wurden nach Isoflurannarkose durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde das Abdomen großräumig eröffnet und die Maus durch einen Vena Cava-Schnitt blutentleert. Nach Auffinden des Pankreasganges wurde dieser nah an der Einmündung in das Duodenum abgeklemmt. Dann wurde der Gallengang aufgesucht und in diesen retrograd unter dem Mikroskop und mit Hilfe einer 30 G- Kanüle langsam 2 ml Liberase in den Gallengang injiziert, sodass das Pankreas sich aufblähte. Dann wurde die Klemme gelöst, das Pankreas entnommen, in eine kleine Petrischale gelegt und 2-3 ml Kollagenase hinzugegeben. Das Pankreas wurde so bei 37° C ca. 20 min enzymatisch aufgespalten. Zum Stoppen der enzymatischen Spaltung wurden 10 ml kaltes HBSS mit 1% fetal calf serum (FCS) + 0,5% Penicillin/Streptomycin (P/S) hinzugegeben. Das restliche Gewebe wurde durch Auf- und Abpipettieren mechanisch zerkleinert und in ein Falcon gegeben. Anschließend wurde das Gewebe 3x bei 4°C und mit 200 g vier Minuten lang zentrifugiert, dabei der Überstand jeweils verworfen und neues HBSS hinzugegeben.

Das Zellpellet wurde in ca. 10 ml HBSS mit 1% FCS + 0,5% P/S aufgenommen und in eine Petrischale überführt. Anschließend wurden die Inseln und die Pankreasgänge unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Pasteurpipette von Hand geerntet.

3.2.3 Passagieren und Klonieren der Zelllinien

Die gewonnen Inseln und Pankreasgänge sowie die Gesamtzellsuspension des verdauten Pankreas wurden jeweils in eine 25 cm² große Zellkulturflasche gegeben, die unbeschichtet oder mit Poly-L-Lysin (15 µg/ml verdünnt in H₂O) und/oder Kollagen (0,75 µg/ml verdünnt in PBS) vorbeschichtet waren. Das Kulturmedium bestand aus DMEM 4500/DMEM F12 im Verhältnis 2:1 + 10% FCS + 5% B27 + 20 ng/ml bFGF + 1% P/S kultiviert (Medium 1) oder DMEM 4500 + 10% FCS + 20 ng/ml EGF + 1% P/S (Medium 2). Nach 36 Std. wurden die nicht adhärenen Zellen durch vorsichtiges Abspülen entfernt. Dies wurde an Tag 4 und 6 wiederholt. Zwischen Tag 10-20 erfolgte die erste Passagierung durch Inkubation mit Trypsin-EDTA (T/E). Dazu wurde zuerst das alte Medium in ein Falcon gegeben und für das spätere Neutralisieren von T/E aufbewahrt. Dann wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und fünf Minuten bei 37° C mit 1x T/E behandelt. Die Zellen, die sich ablösten, wurden einmal mit Medium plus 10% FCS zentrifugiert (8 min 120 g) und auf einer neuen Zellkulturflasche ausgesät. Die fest adhärenen Zellen wurden verworfen. Auf diese Weise konnte die Kontamination mit Fibroblasten reduziert werden. Durch Kontrolle unter dem Mikroskop wurde das Zellwachstum täglich kontrolliert. Zellkulturflaschen, in denen ein Wachstum von Fibroblasten zu verzeichnen war, wurden verworfen. Nach 3-6 Passagen erfolgte eine Klonierung auf Einzelzellebene. Hierfür wurden die trypsinierten Zellen gezählt und in einer Konzentration von 0,3 Zellen pro Well einer 96-Well Zellkulturplatte in 100 µl Medium ausgesät. Wells, in denen Einzelklone anwuchsen, wurden anschließend durch Trypsin-EDTA geerntet und zunächst in einer 25 cm² Zellkulturflasche und anschließend in einer 75 cm² Zellkulturflasche weiter gezüchtet. Die Passagierung erfolgte alle 6-8 Tage im Verhältnis 1:20 -1:30.

3.2.4 Charakterisierung der Zellen

Die Charakterisierung der isolierten Zelllinien mH und mDP erfolgte durch eine Kombination aus Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) und FACS-Analysen. Hierzu wurden die Zellen entweder in 25 cm² Zellkulturflaschen oder in 6-Well Platten ausgesät. Die Analyse der basalen Markerexpression erfolgte

nach einer Kultivierung von 4-5 Tagen mit DMEM 4500, 10% FCS und 1% P/S sowie einer in dieser Zeit erreichten Zellkonfluenz von ca. 90%.

3.2.4.1 RNA- Isolierung

Beim Umgang mit RNA ist es wichtig auf RNasefreie Arbeitsbedingungen zu achten. RNasen kommen ubiquitär, vor allem aber auf der Haut vor, sind sehr hitze- und chemikalienbeständig und sind in der Lage, RNA zu degradieren. Um den Arbeitsplatz und die Reaktionsgefäße RNasefrei zu halten, wurden folgende Vorkehrungen getroffen:

- Tragen von Latex-Einmalhandschuhen beim Umgang mit RNA
- Benutzung von RNasefreien Tubes von Eppendorf
- Reinigung der Arbeitsfläche mit RNase-zerstörendem Spray (RNase Free)

Für die RNA-Isolation verwendeten wir das „High Pure RNA Isolation Kit“ von Roche. Die Zellen wurden am Ende des jeweiligen Versuches mit PBS gewaschen und dann jeweils mit 400 µl Lysispuffer und 200 µl PBS lysiert und bei -20°C eingefroren oder sofort weiterverarbeitet. Hierbei wurde wie vom Hersteller empfohlen folgendes Protokoll verwendet:

1. Lysat auf die Säule geben und 15 Sekunden bei 10000 RPM abzentrifugieren.
2. Die Säule mit darin gebundener RNA und Verunreinigungen 20 Minuten mit 1:10 verdünnter DNase bei Raumtemperatur inkubieren.
3. 500 µl Waschpuffer 1 hinzugeben und 15 Sekunden bei 10000 RPM abzentrifugieren.
4. 500 µl Waschpuffer 2 hinzugeben und 15 Sekunden bei 10000 RPM abzentrifugieren.
5. 200 µl Waschpuffer 1 hinzugeben und 2 Minuten bei 13000 RPM abzentrifugieren.
6. Säule in ein neues RNase freies 1,5 ml Eppendorf Tube geben.
7. 50-100 µl Elutionspuffer auf die Säule geben und 1 Minuten bei 10000 RPM abzentrifugieren.
8. Eppendorf enthält die gereinigte RNA.

9. Lagerung der RNA bei -80°C.

3.2.4.2 Bestimmung von Qualität und Quantität der RNA

Die Quantifizierung der RNA wurde mittels eines Biophotometers von Eppendorf durchgeführt. 5 µl RNA wurden mit 65 µl Elution Buffer verdünnt und bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Für jede Probe wurde eine neue Messküvette verwendet.

Aus dem Quotient 260/280 der Wellenlängen konnte man die Verunreinigung mit Proteinen bestimmen. Ein Quotient von 1,9-2,1 bedeutet reinste RNA, bei Quotienten < 1,8 muss man mit Proteinverunreinigung rechnen. Mit dem „High Pure RNA Isolation Kit“ von Roche wurde in der vorliegenden Untersuchung meist eine Reinheit von ca. 1,7 erreicht.

3.2.4.3 cDNA-Synthese (Reverse Transkription der mRNA)

Bei der Synthese von cDNA aus der aufgereinigten RNA bedient man sich des Enzyms Reverse Transkriptase (RT), welches erstmals 1970 aus Retroviren isoliert wurde. Die RT hat eine RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität und ist somit in der Lage, aus einer einzelsträngigen RNA einen RNA-DNA-Hybridstrang zu synthetisieren. Aus diesem erfolgt durch die DNA-Polymerase-Aktivität die Vervollständigung zum doppelsträngigen DNA-Strang.

Wir bedienen uns bei der Synthese des „Omniscript Reverse Transcription Kits“ von Qiagen

Hierbei wurde nach einem sechs-Schritte-Protokoll verfahren:

1. Die Reagenzien auf Eis auftauen und kurz zentrifugieren.
2. Verdünnen des RNase Inhibitors auf eine Endkonzentration von 10 Units/µl mit 1x RT Buffer.
3. Herstellung des Mastermixes: siehe Tab. 2. Für jede RNA- Probe wurde jeweils ein Mastermix mit (+RT) und ein Mastermix ohne das Enzym Reverse Transkriptase (-RT) hergestellt. Das durch Weglassen der RT fehlende Volumen im Mastermix wurde mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Die Proben

ohne Reverse Transkriptase dienen bei der darauf folgenden PCR und Gelelektrophorese als Negativkontrolle.

4. Verteilen des Mastermixes auf RNasefreie Reaktionsgefäße.
5. Hinzugabe von maximal 2 µg RNA pro 20 µl Mastermix.
6. Inkubation für 60 Minuten bei 37°C.

Komponenten	Volumen/Reaktionsgefäß	Endkonzentration
Mastermix		
10x Buffer RT	2 µl	1x
dNTP Mix (5mM pro dNTP)	2 µl	0,5 mM pro dNTP
Oligo- dT Primer (10µM)	2 µl	1 µM
Rnase Inhibitor (30 U/µl)	1 µl	10 Units
Omniscript Reverse Transcriptase-Konzentration	1 µl	4 Units
Rnase- freies Wasser	Variabel; maximal 12 µl	
Template RNA		
RNA	Variabel	Max 2 µg/ 20 µl Mastermix
Endvolumen	20 µl	

Tab. 2: Reaktionskomponenten des Mastermixes für die RT-PCR. Pro 20 µl Mastermix konnten max. 2 µg RNA umgeschrieben werden.

3.2.4.4 Quantitative Real-Time RT-PCR

Mit dem LightCycler®-System von Roche ist es möglich, eine quantitative RT-PCR durchzuführen. Der LightCycler bedient sich des Farbstoffes Sybr Green I, welcher nur fluoresziert, wenn er an Doppelstrang DNA gebunden ist.

Dabei wird aufgrund der Fluoreszenzzunahme der Beginn der exponentiellen cDNA-Produktzunahme während der PCR erfasst. Die exponentielle Produktzunahme entspricht hierbei dem sog. Crossing Point, welcher mit der Anfangskopienzahl der zu amplifizierenden cDNA-Sequenz korreliert und deshalb zur Bestimmung der Anfangskonzentration herangezogen werden kann.

Im Anschluss an die online RT-PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Jedes PCR-Produkt besitzt eine charakteristische Schmelztemperatur, welche sowohl von seiner Länge als auch von den enthaltenen GC Basenduplets

abhängig ist. Aufgrund dieser Schmelzkurve konnte man falsche PCR-Produkte aufgrund von Verunreinigungen oder DNA-Kontamination erkennen.

In unserem Fall diente die Light Cycler RT-PCR der quantitativen Bestimmung des House Keeping Gens β -Aktin und somit zur Normierung der einzelnen Proben auf den gleichen cDNA Gehalt. Beim Pipettieren des Mastermixes und der Proben war es wichtig, die Kapillaren (Messgefäße des Light Cyclers) und Reaktionsgefäße stets gekühlt zu halten. Außerdem wurde nur in leicht abgedunkelten Räumen pipettiert, um ein vorzeitiges Fluoreszieren des Farbstoffes Sybr Green I zu verhindern. Zuerst wurden jeweils 3 μ l Wasser und 2 μ l Probe in die Kapillaren pipettiert. Dann wurde ein Mastermix erstellt. Tab. 3 zeigt die einzelnen Komponenten des Mastermixes. Dieser wurde nun in alle Kapillaren gegeben. Die erste Kapillare diente als Negativkontrolle und enthielt nur Mastermix und 5 μ l H₂O.

Die Kapillaren 2-5 enthielten die Standards für die Standardkurve. Die Herstellung der Standards erfolgte aus einem Standard mit 10⁸ Kopien eines linearisierten Plasmids mit einem klonierten β -Aktin Insert über eine absteigende Verdünnungsreihe. Die so entstandenen vier Standards enthielten 10⁷, 10⁶, 10⁵ und 10⁴ Kopien β -Aktin. Jeweils wurden 5 μ l Standards in die Kapillaren 2-5 gegeben. Die Kapillaren 6-32 enthielten die einzelnen Proben. Zum Schluss wurden die Kapillaren mit den dafür vorgesehenen Deckeln verschlossen und 5 Sekunden bei 3000 RPM zentrifugiert.

Komponenten	Volumen/ Reaktion
Mastermix	
Wasser	7 μ l
Forward Primer β -Aktin	2 μ l
Reverse Primer β -Aktin	2 μ l
Sybr Green I	4 μ l
Template DNA	
CDNA	2 μ l
Wasser	3 μ l
Endvolumen	20 μl

Tab. 3: Komponenten für die LightCycler-PCR auf β -Aktin

Die Amplifizierungsbedingungen für β -Aktin gestalteten sich wie folgt:

- 1) Initiale Denaturierung der DNA: 2 min bei 95°C
- 2) Denaturierung der DNA: 10s bei 95°C
- 3) Annealing der Primer: 2s bei 68°C
- 4) Extension: 25s bei 72°C
- 5) Schmelzkurve: 5min auf 100°C erhitzen
- 6) Kühlen: 30s bei 40°C

Die Schritte 2-4 wurden vor Schritt 5 und 6 in 40 Zyklen wiederholt.

3.2.4.5 Semiquantitative Reverse Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifikation kleiner beliebiger Teilabschnitte der RNA. Die Methode bedient sich dabei einer hitzebeständigen DNA-abhängigen DNA-Polymerase.

Die Polymerase-Kettenreaktionen wurden in 25 μ l Ansätzen durchgeführt. Wir bedienten uns für die Herstellung des Mastermixes des GoTaq® Flexi DNA Polymerase-Kit von Promega. Tab. 4 zeigt eine Auflistung der PCR Reagenzien. Pro PCR Reaktion wurde eine β -Aktinkopienzahl zwischen 1×10^5 und 1×10^6 eingesetzt. Die verwendete Konzentration ist jeweils bei der Darstellung der Ergebnisse angeführt. Bei jeder PCR wurde cDNA aus Geweben/ Organen mitgeführt, die das entsprechende Genprodukt exprimieren (Positivkontrolle). Des Weiteren wurde jeweils eine Probe mitgeführt, bei der keine RT-Reaktion erfolgt ist (-RT Probe), um evtl. Kontaminationen mit genomischer DNA auszuschliessen. In Tab. 5 sind die Amplifikationsbedingungen dargestellt. Tab. 6 zeigt die von uns verwendeten Primersequenzen.

Komponenten	Volumen	Konzentration
5x GoTaq Flexi Buffer	10 µl	1x
MgCl ₂ - Lösung, 25mM	2-8 µl	1,0-4,0 mM
PCR Nukleotide, je 10mM	1 µl	0,2 mM je dNTP
Forward Primer	0,5 µl	0,1-1,0 µM
Reverse Primer	0,5 µl	0,1-1,0 µM
GoTaq DNA Polymerase (5U/µl)	0,25 µl	1,25 Units
Template DNA	0,3-2,0 µl	<0,2 µg/20 µl

Tab. 4: Volumen bzw. verwendete Konzentrationen der jeweiligen PCR- Reagenzien

Schritt	Temperatur	Dauer	Nummer der Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	2 Minuten	1 Zyklus
Denaturierung	95°C	30 Sekunden	26- 35 Zyklen
Annealing	55°C-63°C	30 Sekunden	26- 35 Zyklen
Extension	72°C	1 Minute	26- 35 Zyklen
Finale Extension	72°C	5 Minuten	1 Zyklus
Aufbewahrung	4°C	-	1 Zyklus

Tab.5: Amplifikationsbedingungen der semiquantitativen RT-PCR.

Name	A: Forward (5'-3') B: Reverse (3'-5')	PCR- Produktg röße (bp)	Positiv- kontrolle
β-Aktin	A: ACCCACA CTGTGCCCATCTA B: GCCACAGGATTCCATACCCA	342	β-Aktin- Plasmid
BCRP1	A: CCATAGCCACAGGCCAAAGT B: GGGCCACATGATTCTTCCAC	327	Embryonic bodys
CK19	A: GTCCTACAGATTGACAATGC B: CACGCTCTGGATCTGTGACAG	569	Lunge
CK20	A: TGGGGGCAATGGGAAACTGG B: CTGCCGGCGAAGAACCTCAAC	457	Embryonic bodys

Hes1	A: CAGCCAGTGTCAACACGACAC B: TCGTTCATGCACTCGCTGAA	307	mDP-Zellen
Hes5	A: CGCATCAACAGCAGCATAGAG B: TGAAGTGGTAAAGCAGCTTC	269	Kleinhirn
HNF1 β	A: GTTGAAATTCCAAGAGTGACTTGCTC B: CTTTAATGGGAGGCTTCCTGAGATG	281	Pankreas
HNF3 β	A: CCTCTATGTAGACTACTGCTTCTC B: CCTGGATTTCCACCATGTCCAGAATG	277	mDP-Zellen
HNF4 α	A: CTTCTTCTTCATGCCAG B: ACACGTCCCCATCTGAAG	270	mDP-Zellen
HNF6	A: GCAATGGAAGTAATTCAGGGCAG B: CATGAAGAAGTTGCTGACAGTGC	461	Pankreas
Integrin α 6	A: AGGAGTCGCGGGATATCTTT B: CAGGCCTTCTCCGTCAAATA	503	Embryonic bodys
Isl1	A: TCTAAGGTGTACCACATCGAGTGT B: GCAGGCTGATCTATGTCGCTT	632	mH-Zellen
MafA	A: AGGCCTTCCGGGGTCAGAG B: TGGAGCTGGCACTTCTCGCT	370	Inseln
NanoG	A: GCACCAACTCAACTTCTGAGC B: CTCGAGAGTAGCCACCATATC	265	Embryonic bodys
Nestin	A: CCATCCGGGCCCCTGAAGTCG B: GCAAGGGGGAAGAGAAGGATGTCG	576	mDP-Zellen
NeuroD	A: CTGATCTGGTCTCCTTCGTACAG B: GATGCGAATGGCTATCGAAAG	540	Embryonic bodys
Ngn3	A: CATACTAGGGACTGCTCCGA B: CATAAAGCTGTGGTCCGCTA	510	Transfizierte mDP-Zellen
Nkx2.2	A: CTCTTCTCAAAGCGCAGAC B: AACCAACCGTGGTAAGGATCG	514	Pankreas
Nkx6.1	A: TTCTCTGGACAGCAAATCTTTCG B: CTGAGTGATTTTCTCGTCGTCA	297	Pankreas
Notch1	A: TTACAGCCACCATCACAGCCACACC B: ATGCCCTCGGACCAATCAGA	377	Embryonic bodys
Notch3	A: ATATATATGGAGTTGCTCCCTTCC B: GGCTTTGAGCAGACAAGACCCCTT	304	Embryonic bodys

Oct4	A: GGCGTTCTCTTTGGAAAGGTGTTC B: CTCGAACCACATCCTTCTCT	313	Embryonic bodys
P75NTR	A: GTGCGGGGTGGGCTCAGGACT B: CCACAAGGCCCAACCACAGG	422	Embryonic bodys
Pax4	A: GTGAGCAAGATCCTAGGACGC B: CGGGGAGAAGATAGTCCGATT	378	transfizierte mDP-Zellen
Pax6	A: TCACAGCGGAGTGAATCAGC B: TATCGTTGGTACAGACCCCTC	377	Embryonic bodys
Pdx-1	A: GACATCTCCCCATACGAAGT B: GTCCCGCTACTACGTTTCTTAT	452	mDP-Zellen
Proinsulin1	A: CTGTTGGTGCACCTTCCTACC B: GCAGTAGTTCTCCAGCTGGT	315	Pankreas
Proinsulin2	A: TCAAGCAGCACCTTTGTGGTT B: GTTGCAGTAGTTCTCCAGCTG	254	Pankreas
Sox1	A: GCCGCGCCGCAAGACCAAGAC B: CGCCGTAAGGGATGCCGCCGTAGC	476	Kleinhirn
Sox2	A: GGAGTGGAACCTTTTGTCCGA B: TTCATGTAGGTCTGCGAGCTG	423	Kleinhirn
Sox3	A: TTCGCACTCGCAGCGCGCGTGCCTCGG B: ACGGCCAAACTTTCGGTCCTC	320	Embryonic bodys
Sox9	A: GCAAGCTGGCAAAGTTGATCT B: GCTGCTCAGTTCACCGATG	105	Hoden
Sox10	A: GGAGGTTGCTGAACGAAAGTG B: TCCATGTTGGACATTACCTCG	445	Kleinhirn
Sox15	A: TGGAGCGTCTGGGGGACTTC B: TGGGGATAGGTAAGGGGAGAAAG	526	Embryonic bodys
Sox17	A: AAGGCGAGGTGGTGGCGAGTAG B: CCTGGCAGTCCCGATAGTGG	489	Großhirn

Tab. 6: Verwendete Primer mit Sequenz, Produktlänge in Basenpaaren (bp) sowie Ursprungsgewebe der jeweiligen Positivkontrolle.

3.2.4.6 Gelelektrophorese und Dokumentation

Nukleinsäuren haben aufgrund der negativen Nettoladung ihrer Phosphatgruppen die Eigenschaft, in einem elektrischen Feld zur Anode zu wandern. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit abhängig von der Größe der Nukleinsäuren.

Zur Herstellung von Agarosegelen wurde 1,5 g Agarose in 100 ml Pufferlösung aufgeköcht, 5 µl Ethidiumbromid hinzugefügt und in entsprechenden Gelkammern erhärtet.

Jeweils 20 µl PCR-Produkt wurde in die Geltaschen pipettiert und bei 95 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Größe der aufgetrennten PCR-Produkte wurde mit einem mitgeführten Größenstandard verglichen. Die fertigen Gele wurden mit dem Dokumentationssystem von Intas unter UV-Licht fotografiert und digitalisiert gespeichert.

3.2.4.7 FACS-Analyse

Mit der Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting = FACS) ist es möglich mittels spezifischer monoklonaler Antikörper, die mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert sind, die Expression von Oberflächenmolekülen oder intrazellulären Proteinen nachzuweisen. Im FACS-Gerät befindet sich ein ständiger Fluss einer Trägerflüssigkeit, durch die die Zellen einzeln an einem Laserlicht vorbeigeführt werden. Trifft der Laserstrahl auf eine Zelle wird das Licht gestreut. Das Vorwärtsstreulicht (FSC) sagt etwas über die Größe der Zelle aus und das Seitwärtsstreulicht (SSC) beschreibt die Granularität. Die Ergebnisse der Streulichtmessungen werden in einem „Dot-Plot“ Diagramm dargestellt, auf dessen X-Achse das FSC und Y-Achse das SSC aufgetragen ist.

Die Färbung der Zellen erfolgte nach folgender Methode:

- Ernten der Zellen durch Inkubation in EDTA-PBS Lösung.
- Aufteilen der Zellen in Reagenzröhrchen (ca 300.000 Zellen pro Röhrchen).
- Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen durch Inkubation in PBS mit 1% FCS und 1%iger Lösung Fc-Block (CD16/CD32) für 15 min bei 4°C.
- Inkubation der Zellen in 100µl PBS-1% FCS Lösung mit 1 µl Primärantikörper (FITC oder PE markiert) oder Isotypantikörper für 30 min bei 4°C im Dunkeln.

- Zweimaliges Waschen und Zentrifugieren der Zellen mit PBS.
- Resuspension der Zellen in 250 µl PBS-Lösung (mit 1% FCS) aufnehmen.
- Zu der Suspension der gefärbten Zellen wurden 250 µl Formalin (4%) zur Fixierung hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation für 20min bei Raumtemperatur und in Dunkelheit. Das Formalin wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS-Lösung und Zentrifugieren (mit 1% FCS) entfernt. Am Ende wurde das Pellet in 250 µl PBS-Lösung (mit 1% FCS) aufgenommen und bis zur Messung bei 4°C in Dunkelheit aufbewahrt.

Die FACS-Analyse erfolgte mit dem „FACS Calibur“ Gerät der Firma BDBiosciences (Heidelberg), die erfassten Rohdaten wurden per Computer mit der Software WinMDI Version 2.9 ausgewertet.

3.2.5 Versuche zur Differenzierung der Progenitorzellen

3.2.5.1 Serumfreie Kultivierung

Zellkulturmedien, die 10% des reich an wachstumsbeeinflussenden Faktoren beinhaltenden FCS enthalten, stellen keine optimale Bedingung für die Differenzierung von Stammzellen dar. Zahlreiche Substanzen, die in unbekannter und stets unterschiedlicher Menge im Serum enthalten sind, beeinflussen maßgeblich die Proliferation und Differenzierung der Zellen.

Auch werden in der Literatur Differenzierungsprotokolle, sei es bei der Differenzierung von embryonalen als auch von adulten Stammzellen, stets mit wenig FCS oder mit serumfreien Medien, wo FCS z.B. durch Serum Replacement (SR) oder B27-Supplement ersetzt wurde, angegeben.

Deshalb wurde untersucht, welche Konzentrationen an FCS oder Serum Replacement und welche Wachstumsdauer die optimalen Bedingungen für eine spätere Differenzierung darstellen. Nach 5-tägiger Vorinkubation in Medium 2 (10% FCS) waren die Zellen ausreichend gut konfluent gewachsen, so dass Zell-Zell-Kontakt bestand. Anschließend wurde die Expression von Differenzierungsmarkern

nach Kultivierung in Medium mit nur 1% FCS und unter serumfreien Bedingungen mit SR (1-20%) über 4-6 Tage untersucht.

3.2.5.2 Stimulation mit Natriumchlorat

Zur Stimulation mit Natriumchlorat sähten wir 200.000 Zellen pro 25 cm²-Zellkulturflasche aus, ließen sie über Nacht bei Standardmedium (DMEM 4500 (=450 mg/dl Glukose) + 10% FCS + 1% P/S) adherieren und stimulierten sie am nächsten Tag in DMEM 1000 (=100 mg/dl Glukose) + 10% FCS + 1% P/S oder DMEM 450 mg/dl Glukose + 10% FCS + 1% P/S für 3, 5, und 7 Tage mit 10 mM bzw. 40 mM Natriumchlorat. Die Kontrollen in den Versuchen mit 40 mM Natriumchlorat wurden mit 40 mM NaCl inkubiert. Für die PCR-Methode wurden jeweils 0,5µl cDNA verwendet. Zur Normierung der cDNA- Mengen wurde vorher jeweils eine Gelelektrophorese auf Aktin durchgeführt.

3.2.5.3 Stimulation mit Natriumbutytrat

Für die Stimulation mit Natriumbutytrat wurden die Zellen zuerst analog zum Versuch mit Natriumchlorat über Nacht im Standardmedium (DMEM 450 mg/dl Glukose + 10% FCS + 1% P/S) belassen und am darauffolgenden Tag in DMEM 100 mg/dl Glukose oder DMEM 450 mg/dl Glukose + 10% FCS + 1% P/S für 3, 5 oder 7 Tage mit 2 mM bzw. 4 mM Natriumbutytrat stimuliert.

Für die danach folgenden Versuche (Stimulation über 24h bzw. 48h) wurden die Zellen zuerst 5 Tage im Standardmedium (DMEM 450 mg/dl Glukose + 10% FCS + 1% P/S) belassen und anschließend in DMEM mit unterschiedlichen Konzentrationen Glucose (100 mg/dl bzw. 450 mg/dl Glukose) mit 2 mM bzw. 4 mM Natriumbutytrat über 24h bzw. 48h stimuliert.

3.2.5.4 Stimulation mit LY 294002 und Aktivin A

Die frisch kultivierten Zellen (1:10 bis 1:30 gesplittet) wurden zuerst 2 Tage in Standardmedium (DMEM 450 mg/dl Glukose + 10% FCS + 1% P/S) belassen. Am 3. Tag wurde auf serumfreie Bedingungen gewechselt (DMEM 450 mg/dl Glukose + 2% SR + 1% P/S) und am 8. Tag unter serumfreien Bedingungen mit 1 µl/ml LY 294002 und/ oder mit 10 µl/ml AktivinA stimuliert. Da LY 294002 in DMSO gelöst war, wurde zu den Kontrolle DMSO (1 µl/ml Medium) hinzugegeben.

3.2.5.5 Notchinhibition: Stimulation mit DAPT

Die frisch kultivierten Zellen (1:10 bis 1:30 gesplittet) wurden entweder über Nacht im Standardmedium belassen und ab dem 2. Tag bei 1% FCS für 2, 4, oder 6 Tage mit 10 µM bzw. 20 µM DAPT stimuliert oder aber zuerst 5 Tage unter Standardbedingungen kultiviert und ab dem 6. Tag bei 1% FCS bzw. 10% für 2, 4 oder 6 Tage mit 10 µM bzw. 20 µM DAPT stimuliert.

3.2.5.6 Stimulation des Hexosamine-Biosynthese-Signalweges mit Glukosamin und Picolinsäure

Die frisch kultivierten Zellen (1:10 bis 1:30 gesplittet) wurden zuerst 5 Tage im Standardmedium (DMEM 450 mg/dl Glukose + 10% FCS + 1% P/S) belassen und darauf für 24h bzw. 48h mit 2 mM Glukosamin + 10 mM Nikotinamid stimuliert.

Die Stimulation mit Picolinsäure (PA) erfolgte nach Vorinkubation in Standardmedium (DMEM 450 mg/dl Glukose + 10% FCS + 1% P/S) für 5 Tage gefolgt von DMEM 450 mg/dl Glukose + 2% Serum-Replacement (SR) für 4 Tage und schließlich DMEM 100 mg/dl Glukose + 2% SR für 2 Tage. In manchen Versuchsreihen (dann in folgenden Kapiteln mit „PA/NAD+X“ gekennzeichnet; siehe Kapitel 4.3.7; Abb. 34) wurden die Zellen zusätzlich zu Picolinsäure/Nicotinamid ab Tag 8 für 4 Tage mit 2µM Retinsäure (RA), ab Tag 10 für 2 Tage zusätzlich zu RA mit NGF (100 ng/ml), PACAP (0,1 µM), DAPT (1 µM) stimuliert. Picolinsäure wurde in einer Konzentration von 10mM in Verbund mit 10 mM Nikotinamid (NAD) dem Medium (DMEM 240 mg/dl Glukose + 2% SR + 1% P/S) zugemischt. Die Stimulation erfolgte über jeweils 24h,

36h, 40h und 48h. Bei den ON/OFF-Versuchen (siehe Kapitel 4.3.7; Abb. 33) wurden die Zellen nach 24h Stimulation wieder in DMEM 240mg/dl + 2% SR + 1% P/S inkubiert und nach weiteren 24h erneut mit 10 mM PA + 10 mM NAD stimuliert.

3.2.5.7 Stimulation unter hypoxischen Bedingungen

Für die Stimulation unter hypoxischen Bedingungen verwendeten wir das in der Publikation von Manzari et al. verwendete Protokoll.⁶⁰ Dabei wurde im Brutschrank die Sauerstoffsättigung auf 1% erniedrigt, die Stickstoffzufuhr auf 94% erhöht und die CO₂-Zufuhr bei 5% belassen. Um Schwankungen im Sauerstoffgehalt durch das Öffnen des Brutschranks zu vermeiden, wurde im Inkubator ein Überdruck von 35 psi erzeugt. Vor Stimulation wurde das Medium drei Stunden im Inkubator belassen, damit es sich equilibrieren konnte. Die Stimulation erfolgte über 24h ohne Zusatz oder im Verbund mit 10mM Nicotinamid und/ oder 10mM Picolinsäure/ Desferrioxamin. Die Kultivierung der Zellen bis zum Stimulationszeitpunkt erfolgte analog zu 3.2.5.6., ohne den Zusatz von RA, PACAP, DAPT und NGF.

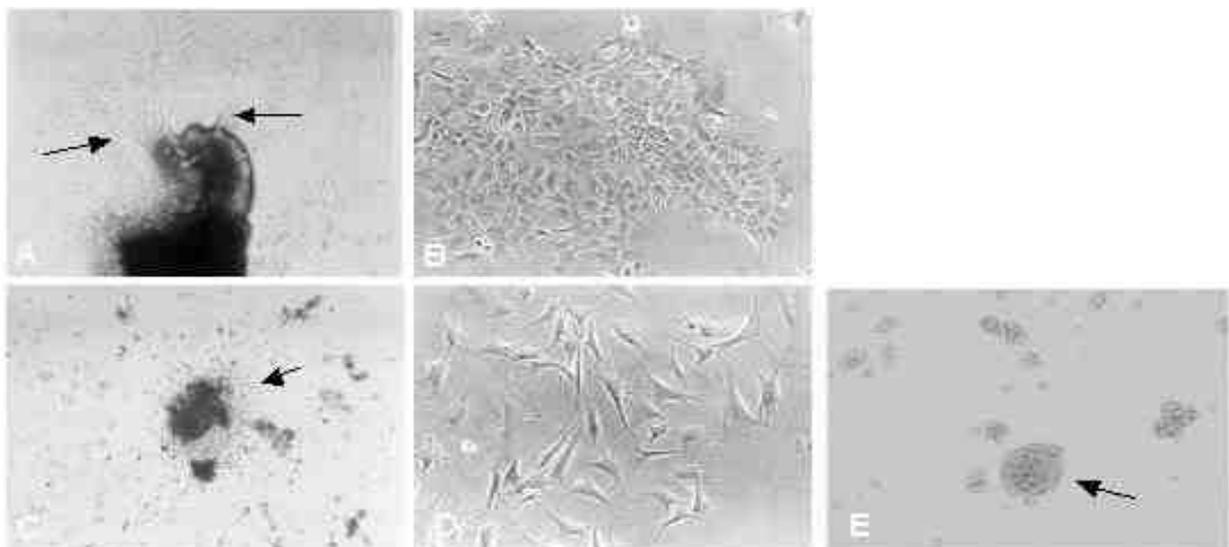
3.2.6 Statistik

Die Ergebnisse der FACS-Analysen wurden mit dem t-Test für unabhängige Stichproben analysiert. Unterschiede mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit (p-Wert) von < 0,05 wurden als signifikant gewertet. Die Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism Version 3.0. Wenn nicht anders aufgeführt wurden alle Versuche mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Isolierung von Progenitorzellen aus Pankreasgewebe

Nach der Entnahme des Pankreas und der enzymatischen Spaltung mittels Kollagenase wurden die Pankreasgänge und die Langerhans-Inseln von Hand unter dem Stereomikroskop geerntet. Isolierte Pankreasgänge, -Inseln und die unfraktionierte Pankreaszellsuspension wurden anschließend in Medium 1 oder Medium 2 kultiviert. Nach 1-2 Wochen konnte bei 4 von 7 Mäusen ein Auswachsen von Zellen in Medium 2 aus den Ductuli (Auswachsen von mDP-Zellen) beobachtet werden (Abb. 8). Aus der Gesamtpankreaszellsuspension (mH-Zellen) war ein Zellwachstum bei Verwendung von Medium 1 zu beobachten. Primärzellen mit einem epithelialen Phänotyp konnten jedoch nur bei Verwendung von Kollagenbeschichteten Platten und Medium 2 mit 10% FCS und 20 ng/ml EGF gewonnen werden. Nach 2-3 Wochen waren genug Zellen gewachsen, dass man die Zellen lösen und in neue Zellkulturflaschen verteilen konnte.



Zellen. A: Auswachsen der Zellen aus dem Pankreasgang (mDP-Zellen); B: Morphologie der mDP Zellen bei Passage 30; C: Auswachsende Zellen aus Pankreasgesamtzellsuspension (mH-Zellen); D: Morphologie der mH-Zellen bei Passage 28; E: Isolierte Langerhans-Insel nach enzymatischer Spaltung der Pankreata mit Kollagenase.

Nach der Klonierung auf Einzelzellebene ist es gelungen, aus den Pankreasgängen insgesamt 12 Zelllinien (mDP) mit einer pflastersteinähnlichen, epithelialen Morphologie mit kuboiden Zellen (Abb. 8,B) und aus der Gesamtzellsuspension 16 Zelllinien (mH) mit einer eher spindelförmigen fibroblastenähnlichen Struktur (Abb. 8,D) zu isolieren. Diese wurden mehrmals gesplittet und in flüssigem Stickstoff asserviert. Für die vorliegenden Untersuchungen wurden Zellen in der 25-40. Passage verwendet. Die Verdopplungszeit der mDP-Zellen lag über 7 Tage gemittelt bei ca. 1,6 Tagen, die der mH-Zellen ebenfalls über 7 Tage gemittelt bei 1,1 Tagen (Abb. 9). In einem Langzeitexperiment wurden die Zellen kontinuierlich kultiviert. Hier zeigte sich, dass beide Zelllinien für mehr als 1 Jahr mit mehr als 100 Passagen kultiviert werden konnten, ohne dass sich die Morphologie geändert hat. Werden die Zellen auf Platten kultiviert, die eine Oberfläche aufweisen, auf der Zellen nicht anwachsen können („low adherence“), bilden die mDP- und die mH-Zellen Zellcluster, sogenannte Spheren (Abb. 9, C). Somit erfüllen sowohl die mDP- als auch die mH-Zellen drei wichtige Charakteristika von Stammzellen: Die Zellkoloniebildung mit der Möglichkeit der Klonierung aus Einzelzellen, eine stabile Proliferationsrate (Self-Renewal) und die Eigenschaft der Spherenbildung.

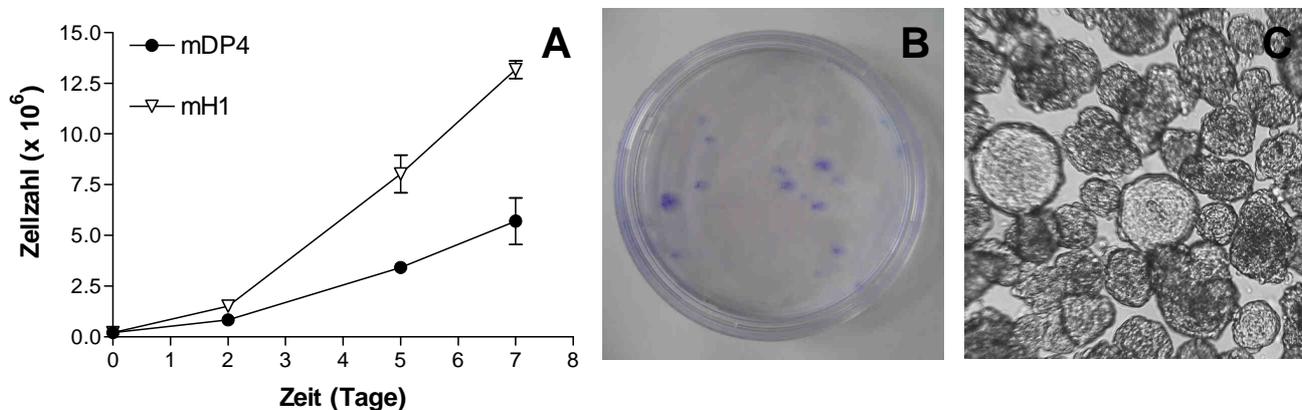


Abb. 9: Bestimmung der Proliferationsrate der Kolonieformation und der Spherenbildung

A: Proliferation der Zelllinien mDP und mH; B: Formation von Kolonien im Colony-Assay [mDP: 14/50 Zellklone bilden Spheren aus]; C: Spherenbildung der mDP-Zellen in speziellen „low adherence“ Platten.

4.2 Basale Charakterisierung der Progenitorzelllinien

Um die Zellen in Hinblick auf ihr basales Gen- und Proteinexpressionsmuster zu charakterisieren, wurde jeweils eine Zelllinie mDP und mH ausgewählt. Die Zelllinien wurden in eine 25 cm² Zellkulturflasche ausgesät und 5 Tage in DMEM 4500 mit 10% FCS und 1% Pen/Strep (Basalmedium) kultiviert. Aus diesen Zellen wurde dann die RNA isoliert und FACS-Analysen durchgeführt

4.2.1 Embryonale und Stammzell-assoziierte Marker

Untersucht wurden Marker, die in embryonalen Stammzellen oder verschiedenen Populationen von adulten Stammzellen aus dem Knochenmark, aus der Leber oder dem Gehirn beschrieben worden waren. Wie erwartet, waren die mDP- und die mH-Zellen negativ für die typischen embryonalen Marker Oct4 und Nanog (Abb. 10).

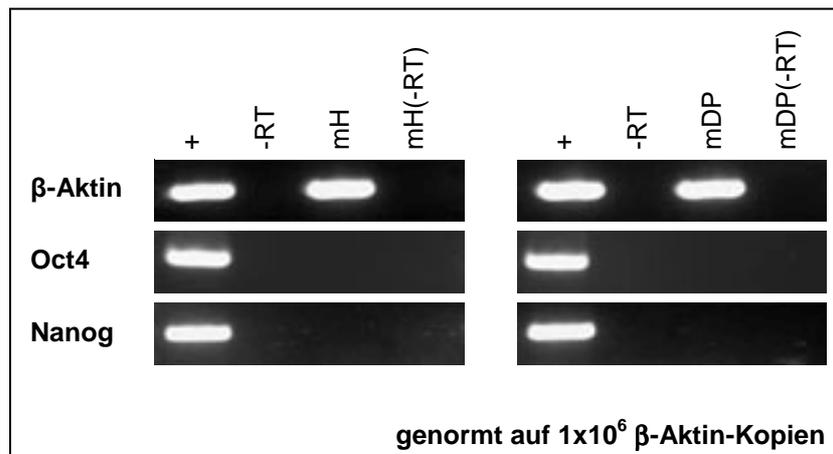


Abb.10: Analyse der Expression von embryonalen Markern in den Zelllinien mDP und mH durch RT-PCR. (+ = Positivkontrolle; -RT = ohne „reverse“ Transkription)

Das Expressionsmuster der mH-Zellen und der mDP-Zellen weist einige wichtige stammzellassoziierte Marker auf. Beide Zelllinien sind positiv für BCRP1, Nestin, Sox9, p75NTR und Integrin α 6. Die mDP-Zellen exprimieren außerdem das Cytokeratin CK19, welches in der Literatur bei differenzierungsfähigen duktalem Stammzellen bereits beschrieben worden ist.⁹ Weitere Marker für neuronale Stammzellen wie z.B. Sox2, Sox3, Sox7, Sox10 oder Sox30 waren negativ. Sox15 wurde von beiden, Sox17 nur von den mDP-Zellen schwach exprimiert (Abb. 11).

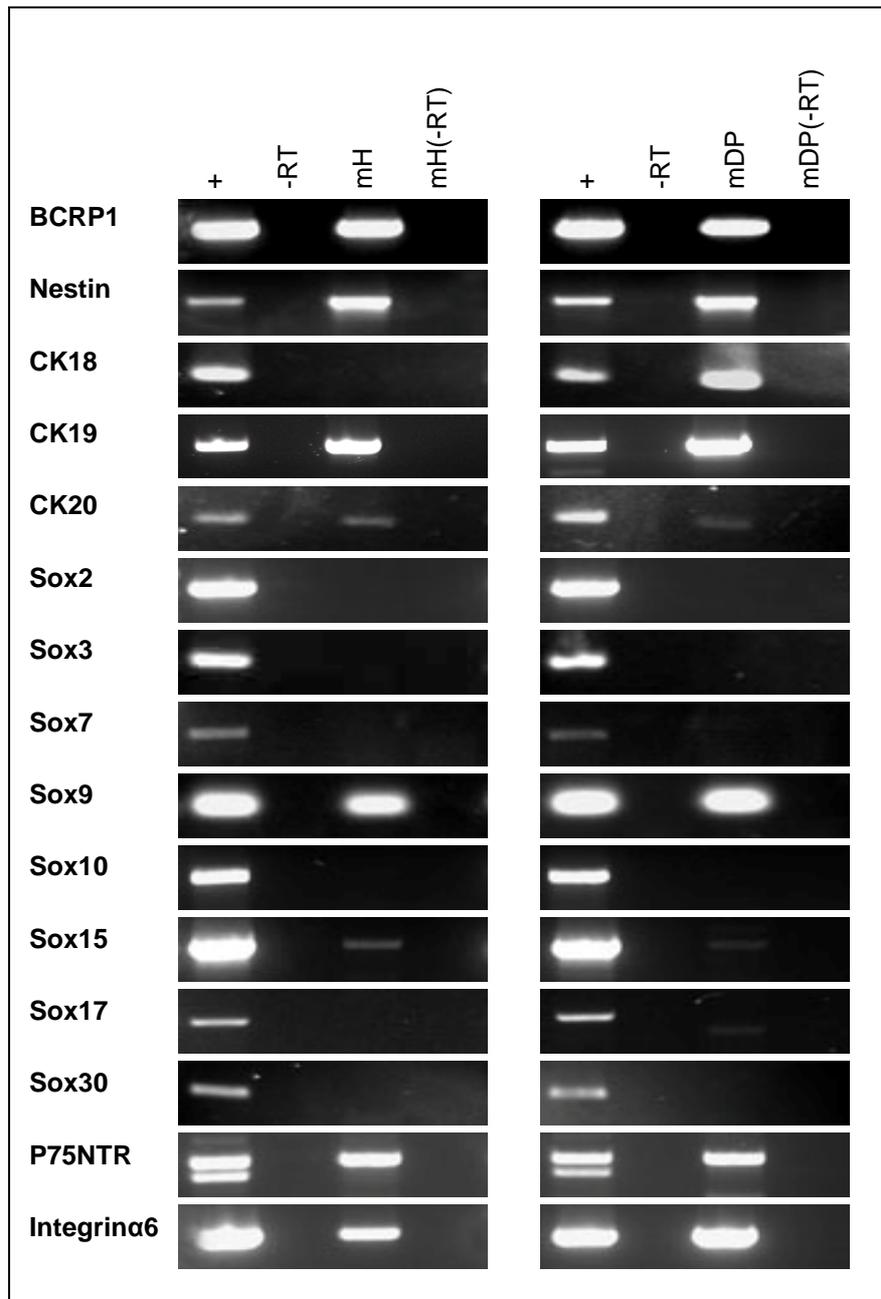


Abb. 11: Analyse der Expression von stammzellassoziierten Markern in den Zelllinien mDP und mH durch RT-PCR. Nestin, Sox9, p75NTR und Integrin α 6 wurden von beiden Zellen exprimiert. Neuronale Stammzellmarker wie etwa Sox2, Sox3, Sox7, Sox10 und Sox30 waren sowohl bei den mH- als auch bei den mDP-Zellen negativ. Beide Zelllinien exprimierten sehr schwach Sox15. Die mDP-Zellen exprimierten sehr schwach außerdem Sox17 und zeigen außerdem eine deutliche Expression der Zytokeratine 18 und 19.

Ebenso negativ waren hämatopoetische Stammzellmarker (CD34, CD117), mesenchymale Marker (CD73, CD105) und Sca-1 (Abb. 12).

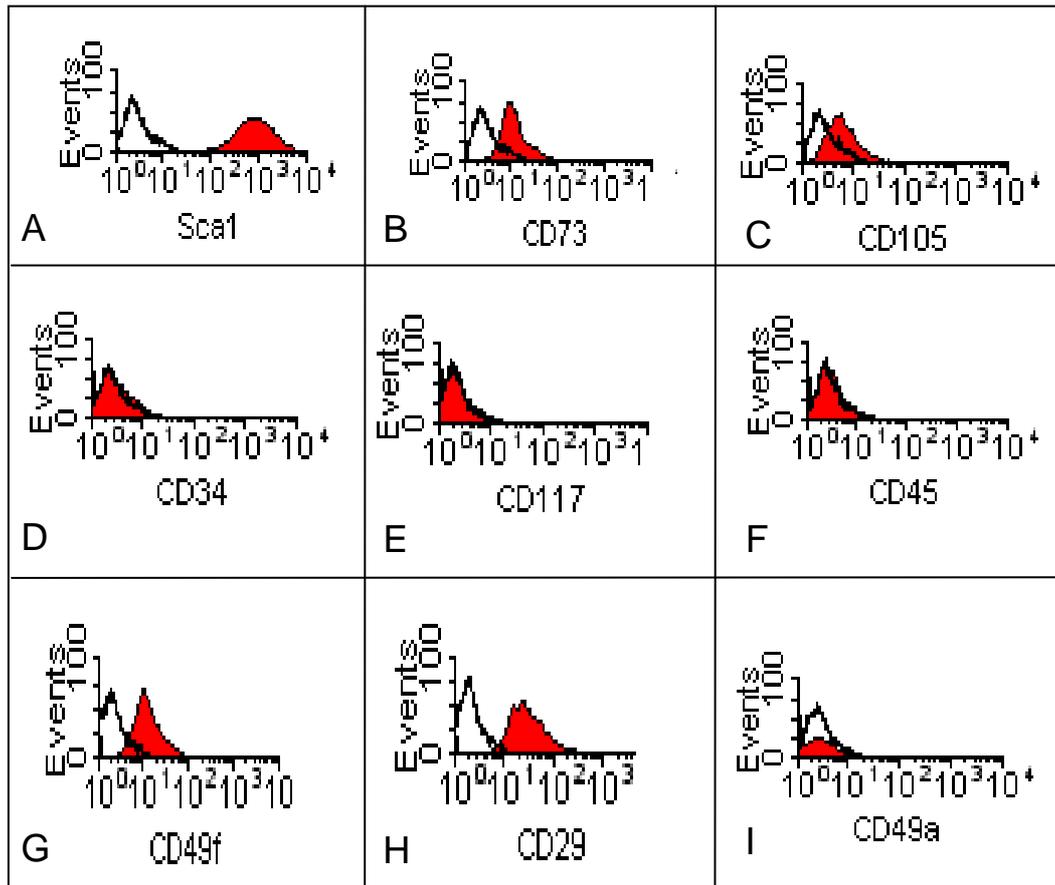


Abb. 12: Stammzellassoziierte Marker der mDP-Zellen: Sca1 (A), Mesenchymale Stammzellmarker CD73 und CD105 (B und C), Hämatopoetische Stammzellmarker CD34, CD117 und CD45 (D-F) und Integrine $\alpha 6$ (CD49f), $\beta 1$ (CD29) und $\alpha 1$ (CD49a), (G-I).

4.2.2. Progenitor-/ Endokrine Marker

Sowohl die mH- als auch die mDP-Zellen exprimierten nach 5 Tagen Kultivierung in Standardmedium Pdx-1. Während diese Expression bei den mDP-Zellen stabil war, zeigten andere Versuche mit den mH-Zellen eine deutlich schwächere, variable Expression. Beide Zelllinien zeigten eine starke Expression von MafA. mH-Zellen exprimierten zusätzlich Isl1. Alle anderen in der Embryogenese des Pankreas „downstream“ von Pdx-1 geschalteten Faktoren, wie Ngn3, NeuroD, Pax4, Pax6, Nkx2.2, Nkx6.1 waren bei beiden Zelllinien jedoch negativ. Proinsulin1 und Proinsulin2 waren wie erwartet basal nicht nachweisbar (Abb. 13).

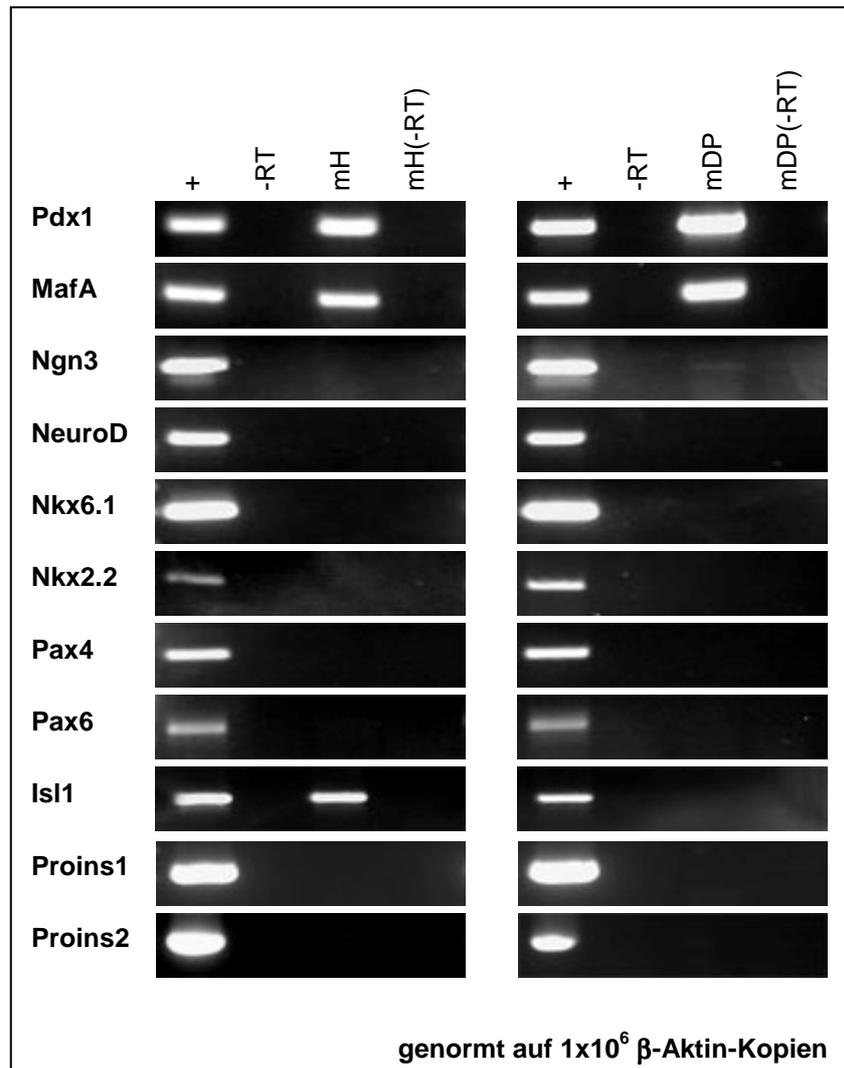


Abb. 13: Analyse der Expression von proendokrinen Transkriptionsfaktoren in den Zelllinien mDP und mH durch RT-PCR. Pdx-1 wird in mDP-Zellen stabil exprimiert. Die mH-Zellen wiesen in weiteren Versuchen eine schwächere und variable Expression von Pdx-1 auf. Beide Zellen sind stark positiv für MafA. Isl1 wird nur von den mH-Zellen exprimiert. Alle Faktoren downstream von Pdx-1, einschließlich Proinsulin1 und Proinsulin2 waren negativ.

4.2.3. Endodermale Marker

Die mDP-Zellen exprimierten alle HNF-Faktoren, die in der embryonalen Entwicklung des Pankreas eine endokrine Differenzierung induzieren (Abb. 14). Die mH-Zellen waren für HNF1 β , HNF3 β , HNF4 α und HNF6 negativ.

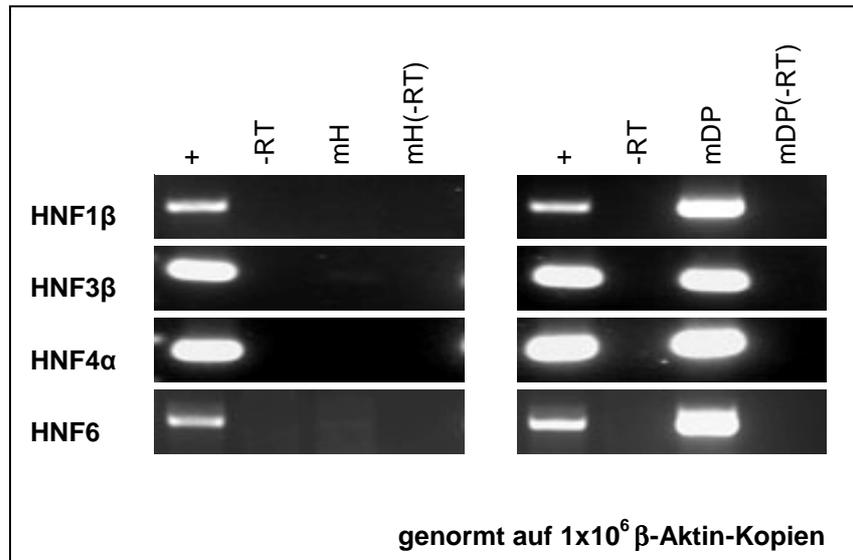


Abb. 14: Analyse der Expression von endodermalen Markern in den Zelllinien mDP und mH durch RT-PCR. Während die mDP-Zellen eine starke Expression der HN-Faktoren aufwies, exprimierten die mH-Zellen keinen der hier analysierten HN-Faktoren.

4.2.4. Abhängigkeit der Genexpression von den Kulturbedingungen

Während einige wichtige Marker für die pankreatische Entwicklung (Pdx-1, HN-Faktoren) auch direkt nach dem Passagieren und nach nur 3 Tagen Wachstum stabil exprimiert wurden, war die Expression von MafA zeitabhängig. Noch am Tag 3 war MafA komplett negativ (Abb. 15).

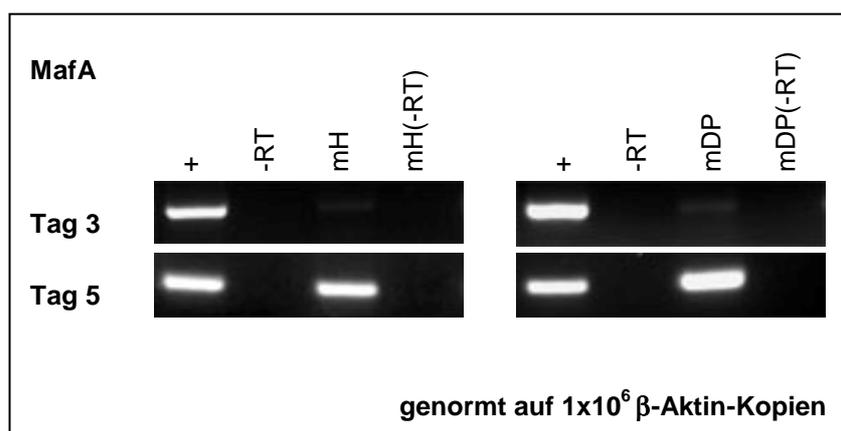


Abb. 15: Analogie der Expression von MafA am Tag 3 und Tag 5 der Kultivierung der mH- und mDP-Zellen

Erst im weiteren Verlauf ab Tag 5 erfolgte eine Hochregulation. Wodurch diese Induktion der Expression zustande kam ist unklar. Da die Zellen in Kultur bei den gegebenen Kulturbedingungen bei Tag 3 erst zu 75% konfluent waren, kann die

Hypothese aufgestellt werden, dass Zell-Zell-Kontakte oder eine verminderte Zellproliferationsrate bei 100% Konfluenz (Tag 5) hier eine wesentliche Rolle spielten (Abb. 4 G). Ein ähnliches Bild fand sich bei der Analyse des endodermalen Transkriptionsfaktors Sox17 (Abb. 16).

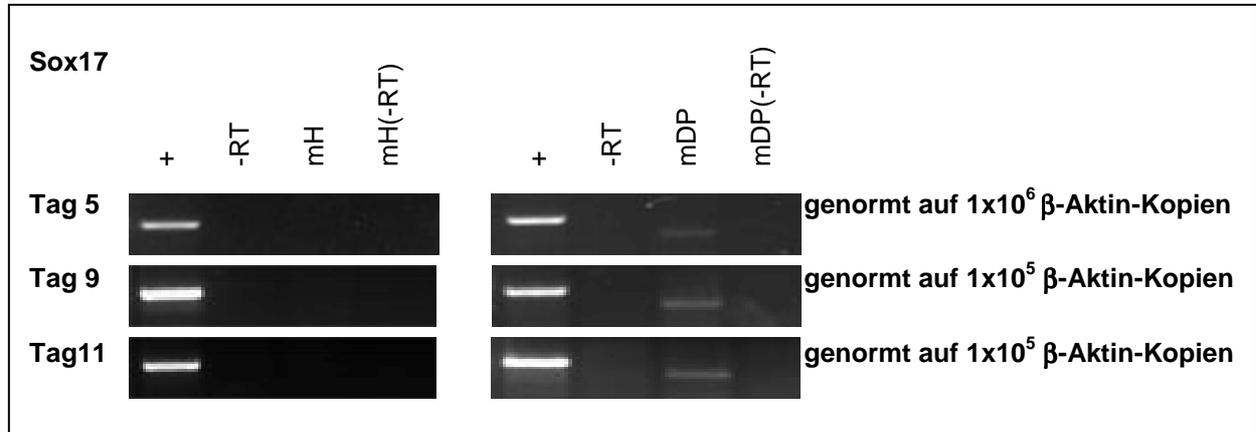


Abb. 16: Abhängigkeit der Sox17-Expression von der Zeit nach der Passagierung. Ab Tag 9 zeigte sich eine verstärkte Expression bei mDP-Zellen (PCR mit 10% der cDNA im Vergleich zu Tag 5). Dies kann durch Ersatz von FCS durch SR noch gesteigert werden (Abb. 18).

Sox17 war am Tag 5 in der Kultur bei den mH-Zellen nicht und bei den mDP-Zellen nur schwach nachweisbar. Eine längere Kultivierung sowie der Wechsel von FCS auf Serum Replacement wirkten sich positiv auf die Expression von Sox17 aus (Abb. 18).

4.3. Versuche zur Differenzierung der Stammzellen

4.3.1. Serumfreie Bedingungen

Für die Differenzierungsversuche wurde berücksichtigt, dass sowohl die mH- als auch mDP-Zellen nach 5 Tagen Kultivierung in Basalmedium MafA exprimieren. Deshalb wurde dieser Schritt beibehalten und die Bedingungen erst ab Tag 6 variiert.

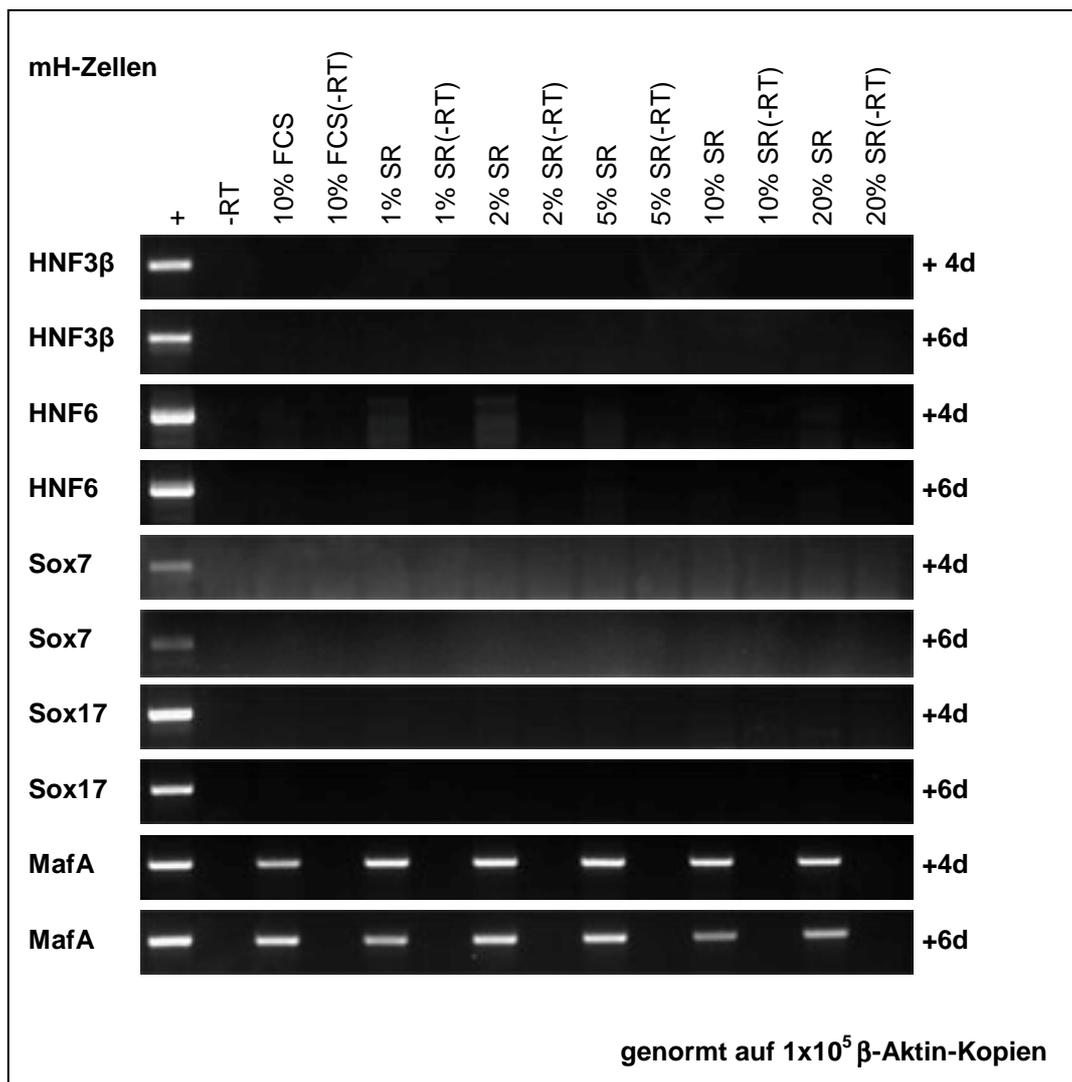


Abb.17: Versuche zur Induktion der Expression endodermaler/ proendokriner Transkriptionsfaktoren in mH-Zellen durch Variation der FCS- oder Serum Replacement-Konzentration (SR). Die Zellen wurden zunächst für 5 Tage in Basalmedium kultiviert bis die Zellen konfluent gewachsen waren. Anschließend wurden die Zellen für weitere 4-6 Tage unter den angegebenen Bedingungen kultiviert. Ein Einfluss auf das Expressionsmuster der HN-Faktoren, von Sox7, Sox17 und MafA konnte bei den mH-Zellen nicht beobachtet werden.

In Abb. 17 ist das Expressionsmuster einzelner wichtiger Marker (HNF3 β , HNF6, Sox7, Sox17, MafA, Ngn3) nach Variation der Inkubationszeit und der Serum- und SR-Konzentration dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass sich allein durch die genannten Änderungen der Medien/Kultivierungszeit bei den mH-Zellen keine Änderung im Expressionsmuster der genannten Faktoren einstellte. Weder die Expression der HNF-Faktoren, noch die der Stammzellmarker Sox7/Sox17, noch die MafA-Expression wurde wesentlich beeinflusst.

Bei den mDP-Zellen (Abb. 18) hingegen zeigte sich eine interessante Entwicklung bzgl. des Stammzellmarkers Sox17: In Zusammenschau mit Abb. 16 ist ersichtlich, dass Sox17 an Tag 5 noch nicht exprimiert wurde, während ab Tag 9 (Tag 5+4) sowohl bei Kultivierung mit FCS wie auch mit Serum Replacement eine Expression des Markers nachgewiesen werden konnte, was eine weitere Differenzierung der mDP-Zellen in definitives Endoderm anzeigen könnte. Die stärkste Expression wurde dabei nach 5+6 Tagen mit 20% SR erreicht (Sox17 +6d). Die MafA-Expression wurde durch die genannten Änderungen nicht beeinflusst. Eine, wie in diesem Falle, bloße Entfernung von FCS reichte nicht aus, um die mDP-Zellen in Richtung endokrine Progenitorzellen ausreifen zu lassen (keine Expression von Ngn3). Für die weiteren Differenzierungsversuche wurde schließlich das Protokoll mit Vorinkubation in Basalmedium mit 10% FCS für 5 Tage gefolgt von 2% SR über 4-6 Tage ausgewählt, da es eine gute Balance zwischen Zellüberleben und Serumkonzentrationen darstellte. SR wurde gegenüber FCS auch deshalb bevorzugt, da die enthaltenen Faktoren wie Insulin und IGF-1 bekannt und stets in gleicher Konzentration vorhanden sind.

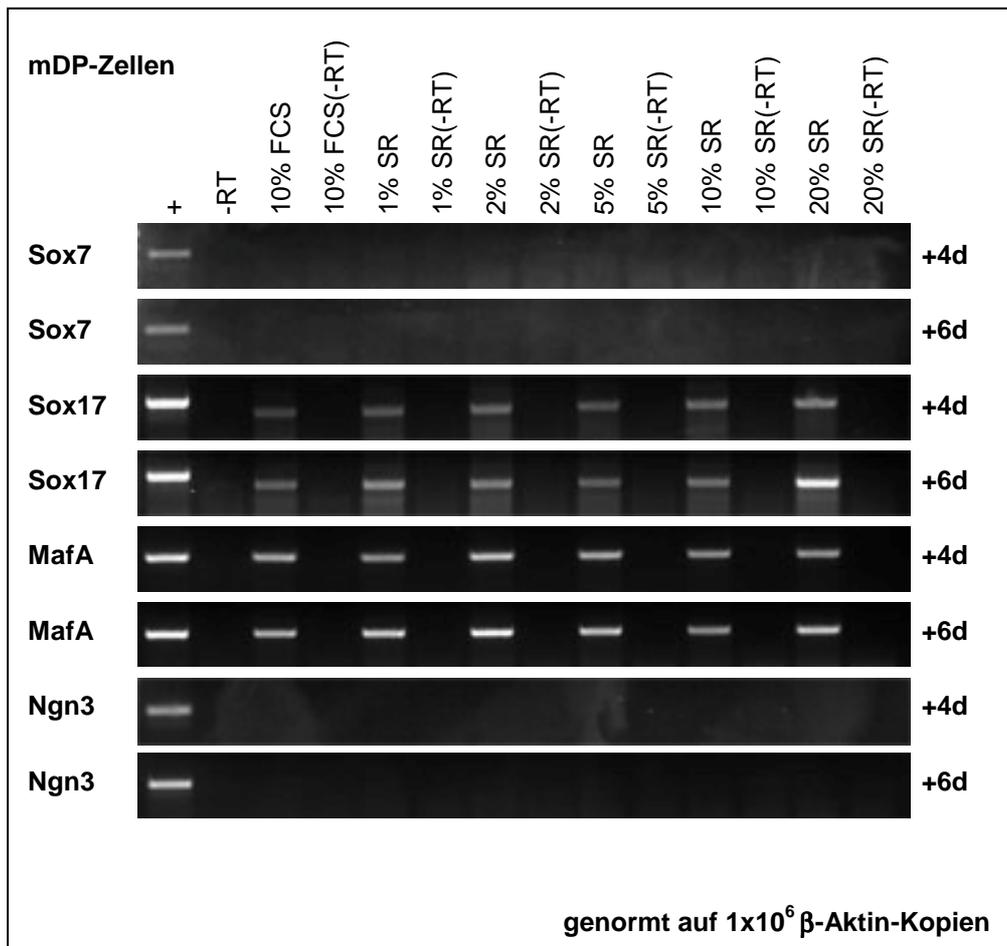


Abb. 18: Versuche zur Induktion der Expression endodermaler/ proendokriner Transkriptionsfaktoren in mDP-Zellen durch Variation der Supplemetierung mit FCS oder Serum Replacement (SR) Konzentration. Die Zellen wurden zunächst für 5 Tage in Basalmedium kultiviert bis die Zellen konfluent gewachsen waren. Anschließend wurden die Zellen für weitere 4-6 Tage (+4d oder +6d) unter den angegebenen Bedingungen kultiviert. Auch hier zeigte sich kein Einfluss des Expressionsmusters der genannten Faktoren durch die unterschiedlichen Konzentrationen an SR. Lediglich 20% SR für 6 Tage (+6d) schien einen positiven Effekt auf die Sox17-Expression zu haben.

Eine Änderung der Kulturbedingungen von 10% FCS auf Serum Replacement schien richtungsweisend zu sein. Deshalb erprobten wir ob B27, ein anderes serumfreies Supplement, ebenfalls eine positive Wirkung auf unsere Zellen in Bezug auf die Differenzierung zu endokrinen Zellen haben könnte. Wir mussten jedoch feststellen, dass unter 1% B27 die mDP-Zellen nicht überlebten und die mH-Zellen zwar überlebten, aber kaum proliferierten (Abb. 19). Da eine Erhöhung der Konzentration auch nur eine Erhöhung der darin enthaltenen Wachstumsfaktoren bedeutet hätte, wurde der Ansatz verworfen und es konnten keine weiteren Differenzierungsversuche mit B27 initiiert werden.



Abb. 19: Kultivierung von mH-Zellen in DMEM 450 mg/dl Glukose mit 1% B27. Auch nach mehreren Tagen ist kaum Proliferation sichtbar. Nach ca. 14 Tagen sterben die Zellen ab. Dargestellt ist Tag 7 nach Umstellung auf B27.

4.3.2 Stimulation mit Natriumchlorat

Zertal Zedani et al. veröffentlichten 2007 in Diabetologia, dass Natriumchlorat den inhibitorischen Effekt von Mesenchym auf sich differenzierende Progenitorzellen im Pankreas hemmt und somit eine Differenzierung in endokrine Zellen fördert.¹⁰⁷ Wir untersuchten deshalb, ob Natriumchlorat in einer Konzentration von 10-40 mM bei 100 mg/dl oder 450 mg/dl Glukosekonzentration einen Einfluss auf die Differenzierung der mH- und mDP-Zellen hat.

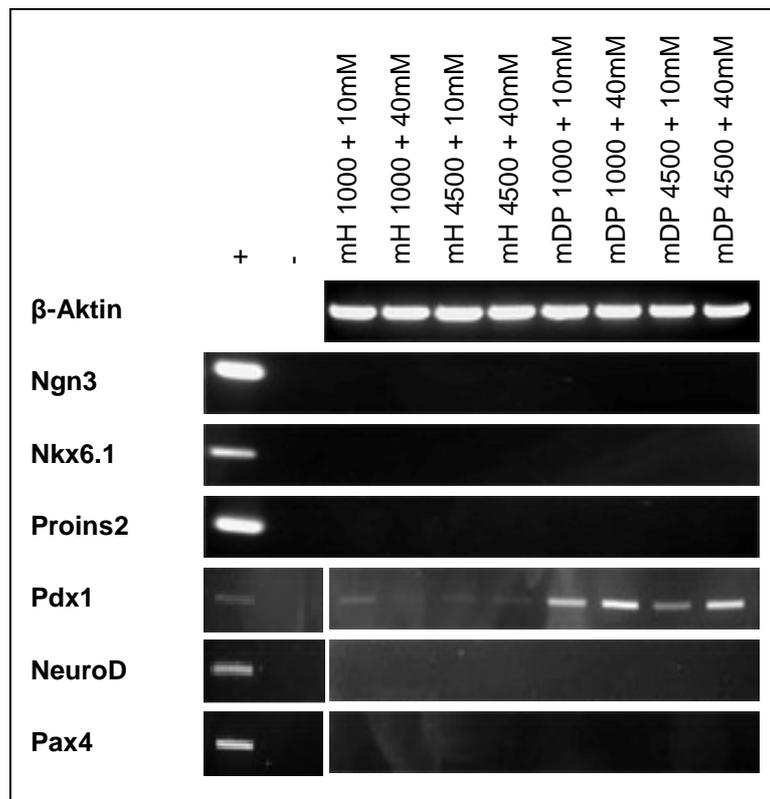


Abb. 20: Expression proendokriner Faktoren nach 3d Stimulation mit 10 mM/ 40mM Natriumchlorat bei Niedrig- und Hochglukose. 1000 = DMEM 100 mg/dl Glukose. 4500 = DMEM 450 mg/dl Glukose. 10 mM bzw. 40 mM = [c] Natriumchlorat. Ngn3, NeuroD, Nkx6.1, Pax4 und Proinsulin2 bleiben negativ. Pdx-1 scheint durch 40mM bei mDP-Zellen im Vergleich zu 10 mM Natriumchlorat verstärkt exprimiert zu werden. Dies konnte in späteren Versuchen (Abb. 23) nicht verifiziert werden. cDNA genormt auf β -Aktin.

Weder durch 3-, 5- oder 7-tägige Stimulation mit Natriumchlorat konnte in unseren Experimenten die Expression proendokriner Faktoren wie Ngn3, NeuroD, Nkx6.1, Pax4 und Proinsulin1 und 2 positiv beeinflusst werden. Die Expression von Pdx-1 schien durch eine Stimulation von 3 Tagen durch hohe Chloratkonzentrationen positiv beeinflussbar zu sein. Eine Steigerung der Expression von Pdx-1 konnte im 7 Tage-Versuch nicht mehr gezeigt werden.

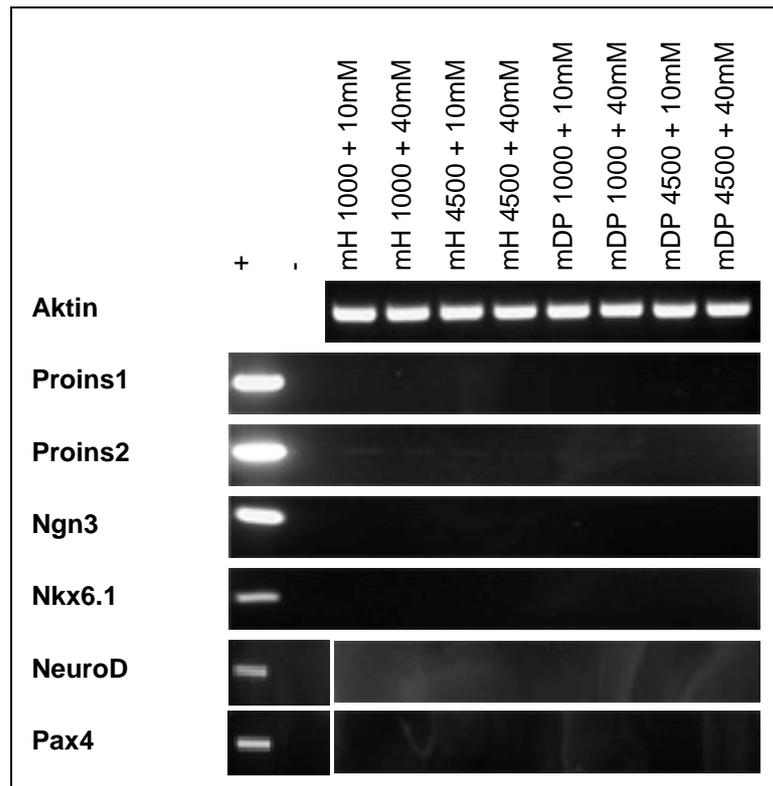


Abb. 21: Expression proendokriner Faktoren nach 5 Tagen Stimulation mit 10 mM / 40 mM Natriumchlorat bei Niedrig- und Hochglukose. 1000 = DMEM 100 mg/dl Glukose. 4500 = DMEM 450 mg/dl Glukose. 10 mM bzw. 40 mM = [c] Natrium-chlorat. Auch hier schien die Expression wichtiger proendokriner Faktoren durch Natriumchlorat unbeeinflusst. cDNA genormt auf β -Aktin.

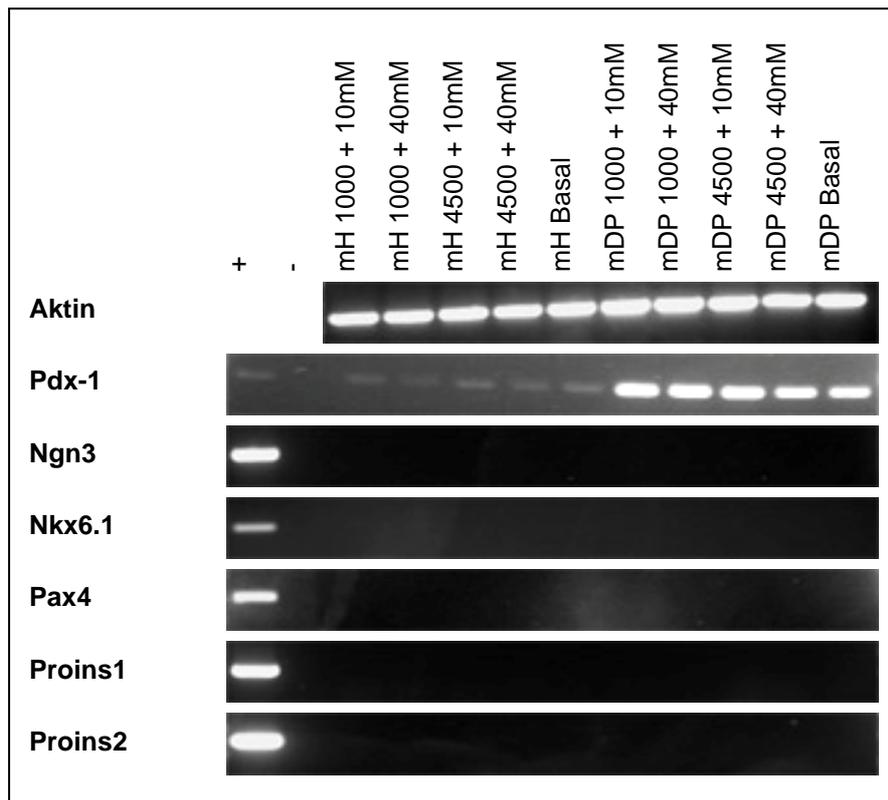


Abb. 22: Expression proendokriner Faktoren nach 7 Tagen Stimulation mit 10 mM / 40 mM Natriumchlorat bei Niedrig- und Hochglukose. 1000 = DMEM 100 mg/dl Glukose. 4500 = DMEM 450 mg/dl Glukose. 10 mM bzw. 40 mM = [c] Natriumchlorat. Auch hier zeigte sich keine Änderung der Expression proendokriner Faktoren. Ein Einfluss auf die Expression von Pdx-1 konnte hier nicht mehr dargestellt werden. cDNA genormt auf β -Aktin.

Um eine etwaige Veränderung der Pdx-1-Expression nach 3 Tagen Stimulation mit Natriumchlorat zu verifizieren, wurde der 3 Tage-Versuch mit den mDP-Zellen bei Niedrigglukosekonzentration wiederholt. Hierbei konnte jedoch kein Einfluss mehr auf die Pdx-1-Expression festgestellt werden. Auch andere proendokrine Faktoren blieben weiterhin unbeeinflusst. MafA war nach 3-tägiger Stimulation zwar schon schwach nachweisbar, jedoch fand sich kein Unterschied zu den Kontrollen mit 40 mM NaCl, was keinen direkten positiven Effekt von Natriumchlorat auf die MafA-Expression erkennen ließ. Vielmehr bestärkte dies unsere These, dass die Expression von MafA bei den gegebenen Bedingungen nach 3 bis 4 Tagen initiiert wird.

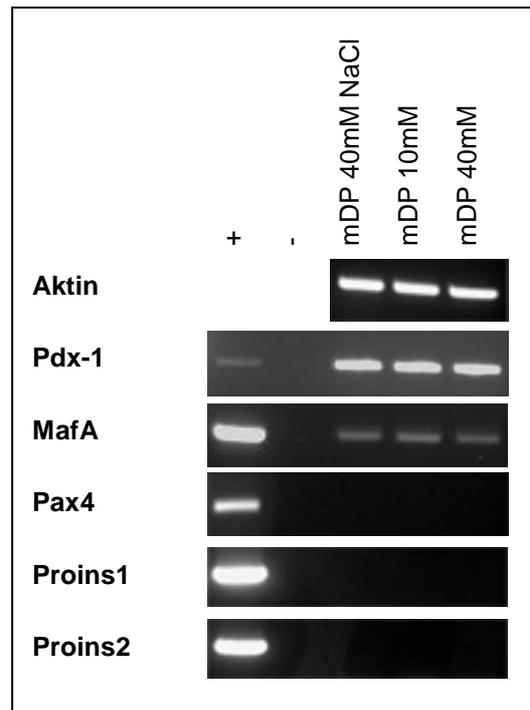


Abb. 23: Keine Beeinflussung der Expression von Pdx-1, MafA, Pax4, Proins1 und Proins2 nach 3 Tagen Stimulation mit 10 mM/ 40 mM Natriumchlorat und 100 mg/dl Glukose. 10 mM bzw. 40 mM = [c] Natriumchlorat. cDNA genormt auf β -Aktin.

4.3.3 Erhöhung der Expression von MafA durch Natriumbutyrat

Wir konnten erstmals zeigen, dass die MafA-Expression durch eine 24-stündige Stimulation mit 4mM Natriumbutyrat induziert werden kann (Abb. 24).

Auch bei den mH-Zellen konnte eine Steigerung der MafA-Expression durch Natriumbutyrat erzielt werden. Nach 5 Tagen Stimulation war diese am stärksten bei einer Konzentration von 4mM und, im Vergleich zu Niedrigglukose allein, deutlich erhöht (Abb. 25).

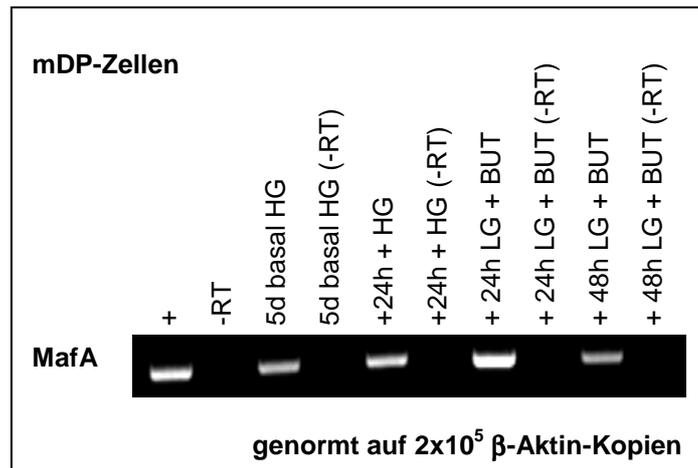


Abb. 24: Einfluss von Natriumbutyrat auf die MafA-Expression. Natriumbutyrat verstärkt die Expression von MafA. LG = low glucose = 100 mg/dl Glukose. HG = high glucose = 450 mg/dl Glukose. BUT = 4 mM Natriumbutyrat. Basal = DMEM 450 mg/dl Glukose + 10% FCS + 1% P/S.



Abb. 25: Stimulation der mH-Zellen für 5 Tage mit Natriumbutyrat bei Niedrigglukose. Natriumbutyrat führt zu einer deutlichen Steigerung der MafA-Expression. LG = low glucose = 100 mg/dl Glukose. HG = high glucose = 450 mg/dl Glukose. BUT = 4 mM Natriumbutyrat. 2 mM/ 4 mM = [c] Natriumbutyrat. Basal = DMEM 450 mg/dl Glukose + 10% FCS + 1% P/S.

Der Effekt von 4 mM Natriumbutyrat konnte auch mit einer weitaus kürzeren Inkubationszeit von 24h bzw. 48h bei den mH-, aber auch bei den mDP-Zellen erzielt werden. Hier zeigte sich erneut, dass Natriumbutyrat in einer Konzentration von 4 mM zusammen mit einer Niedrigglukosekonzentration von 100 mg/dl stärker die Expression von MafA anregte als eine Hochglukosekonzentration von 450 mg/dl allein. Eine Inkubationszeit über 24h schien dabei die Expression stärker zu beeinflussen als 48h Inkubationszeit.

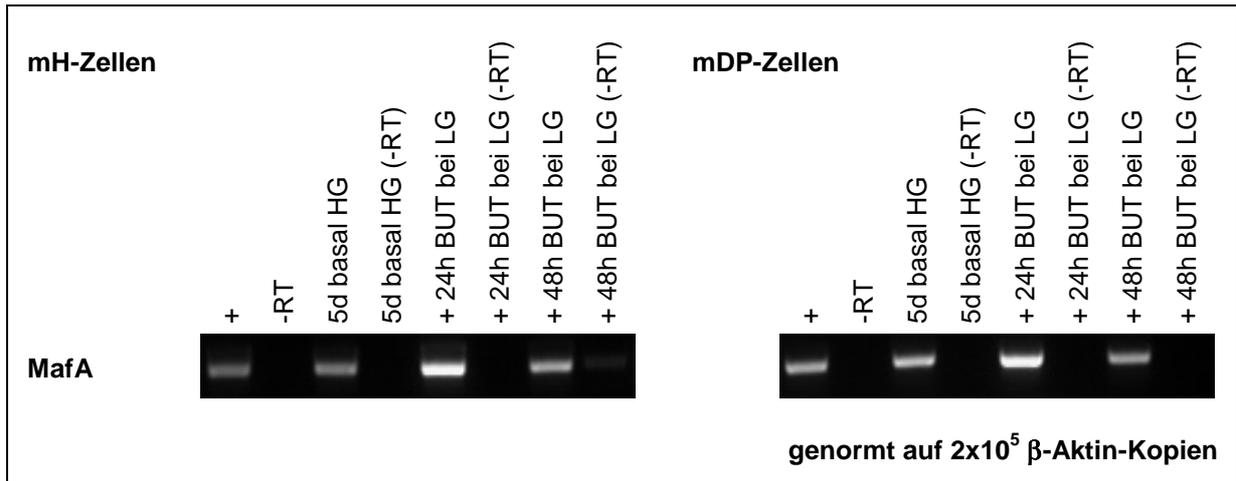


Abb. 26: MafA wird auch durch eine Inkubation über 24h mit 4 mM Natriumbutyrat und niedrigen Glukosekonzentrationen stärker stimuliert als nach 5-tägigem Wachstum bei hohen Glukosekonzentrationen allein. LG = low glucose = 100 mg/dl Glukose. HG = high glucose = 450 mg/dl Glukose. BUT = 4 mM Natriumbutyrat. Basal = DMEM 450 mg/dl Glukose + 10% FCS + 1% P/S.

4.3.4 Erhöhung der Expression von MafA durch Stimulation des Hexosamin-Biosynthese-Signalweges mit Glukosamin und Picolinsäure

Wir konnten bei den mH-Zellen beobachten, dass durch Stimulation mit Glukosamin und damit über die Erhöhung des Flusses durch den Hexosamin-Biosynthese-Signalweges die Expression von MafA gesteigert werden kann. Auch 4 mM Picolinsäure, ebenfalls ein Induktor dieses Signalweges, führte nach 24-stündiger Inkubation bei 100 mg/dl Glukosekonzentration zu einer Steigerung der MafA-Expression im Vergleich zur Kontrolle, die 24h nur mit Niedrigglukose behandelt worden war. Die stärkste Induktion von MafA wurde allerdings durch 4 mM Natriumbutyrat erreicht.

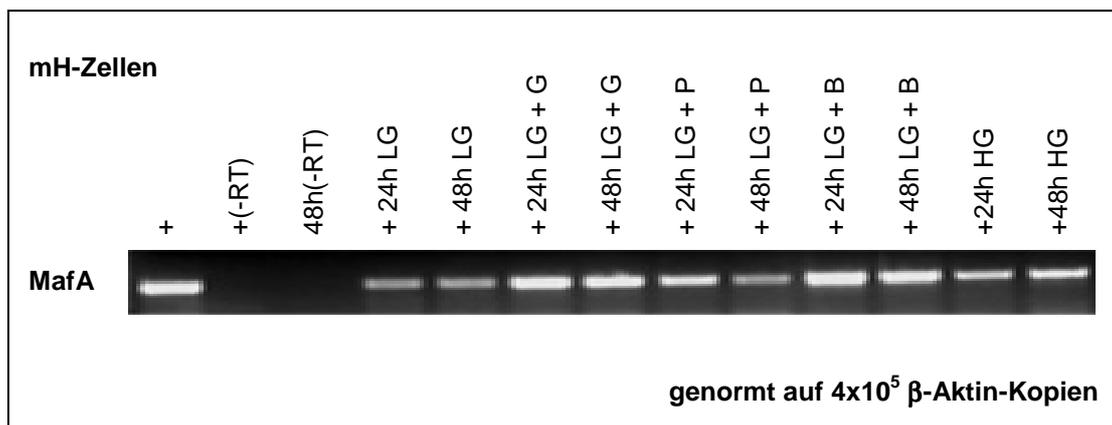


Abb. 27: Erhöhung der Expression von MafA durch Glukosamin und Picolinsäure: mH-Zellen wurden zuerst 5 Tage mit DMEM 4500 + 10% FCS + 1% P/S vorinkubiert, dann wie beschrieben stimuliert. Man sieht eine deutliche Expressionsteigerung durch alle drei Stimulantien im Vergleich zu den Zellen, die 24 Std./48 Std. mit Niedrigglukosekonzentration behandelt wurden. Die höchste Expression wurde durch Natriumbutyrat erreicht. LG = low glucose = 100 mg/dl Glukose; HG = high glucose = 450 mg/dl Glukose; G = 2 mM Glukosamin + 10 mM Nikotinamid; P = 4 mM Picolinsäure; B = 4 mM Natriumbutyrat.

4.3.5 Hemmung der PI-3-Kinase mit LY und Activin A

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass Activin A embryonale Stammzellen in endodermale Progenitorzellen differenzieren kann. Durch Verwendung des PI-3-Kinaseinhibitor LY 294002 in Kombination mit Activin A konnte die Rate der differenzierten Zellen auf über 80% gesteigert werden.⁶³ Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die Kombination Activin A und LY 294002 oder LY 294002 allein eine Auswirkung auf den Marker Sox17 oder, bei mH-Zellen, auf die HN-Faktoren besitzt (Abb. 28). Wie in der Abb. 28 ersichtlich, hat LY 294002 allein oder in Kombination mit Activin A keinen oder aber einen negativen Einfluss auf die Expression endodermaler Marker. Zur Kontrolle, ob LY 294002 allein oder in Kombination mit Activin A eventuell eine endokrine Differenzierung induziert, wurden die mDP-Zellen auf eine eventuelle Expression von Ngn3 untersucht. Hier zeigte sich ebenfalls kein positiver Effekt.

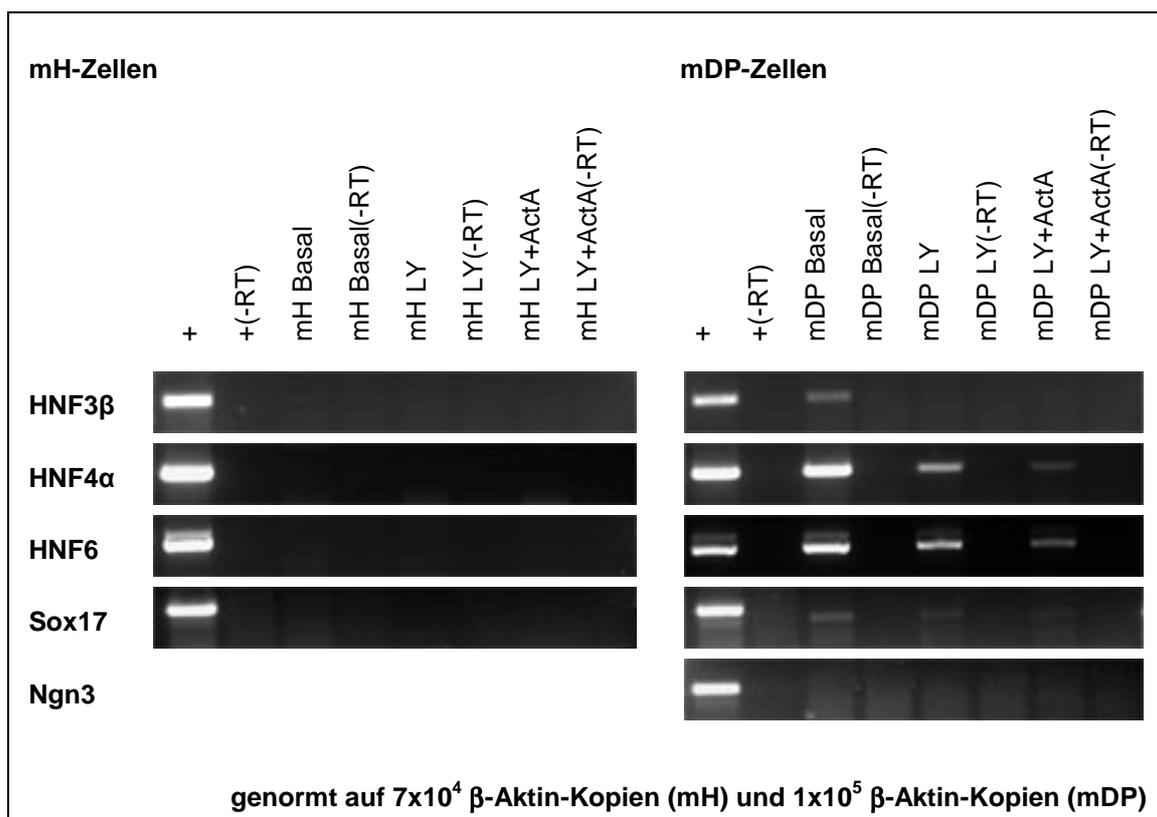


Abb. 28: Einfluss von LY 294002 auf die HN-Faktoren. LY 294002 wirkt sich bei den mDP-Zellen negativ auf endodermale Faktoren aus. Es zeigte sich keine Wirkung auf endodermale Faktoren bei den mH-Zellen sowie keine Wirkung auf die Expression von Ngn3 bei den mDP-Zellen. LY= LY 294002 50 μM; ActA = 100 nM Activin A

4.3.6 Inhibition der Gammasekretase mittels DAPT

Der Notch-Signalweg hat einen bedeutenden inhibitorischen Einfluss auf die Ngn3-Expression und somit auf die endokrine Differenzierung von Stammzellen. In der Literatur ist beschrieben, dass der Gammasekretaseinhibitor DAPT (N-[N-(3,5-Difluorphenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butylester), durch Inhibierung der Gammasekretase die Abspaltung des intrazellulären Anteils des Notchrezeptors verhindert und somit die Signalkaskade blockiert.⁴⁶

Deshalb wurde anhand der Expression von Hes1, einem Notch-Effektorgen, untersucht, ob DAPT in mH- und mDP-Zellen eine signifikante Inhibition des Notch-Signalweges induziert. Zwar exprimieren beide Zelllinien sowohl Notch1 und Hes1 (Abb. 29), leider konnte jedoch durch den Einsatz von DAPT in unterschiedlichen Konzentrationen sowie zu unterschiedlichen Stimulationszeitpunkten und über unterschiedliche Stimulationszeitspannen hinweg kein signifikant inhibitorischer Effekt auf die Hes1-Expression gezeigt werden (Abb. 30).

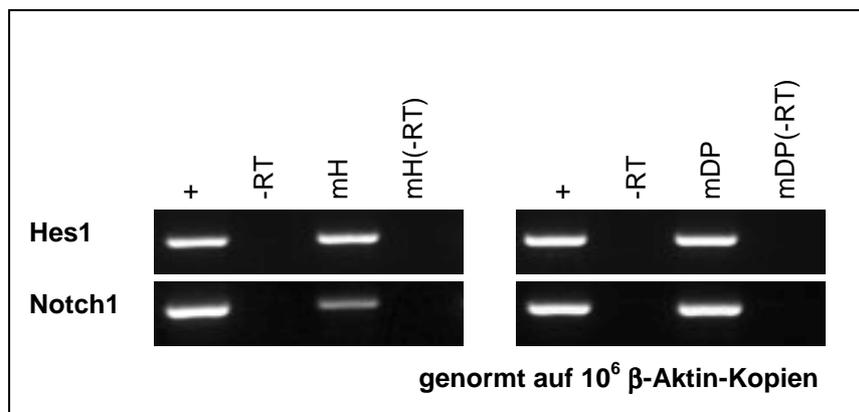


Abb. 29: Expression von Notch1 und Hes1 bei den mH- und mDP-Zellen. Beide Zelllinien exprimieren Hes1 und Notch1.

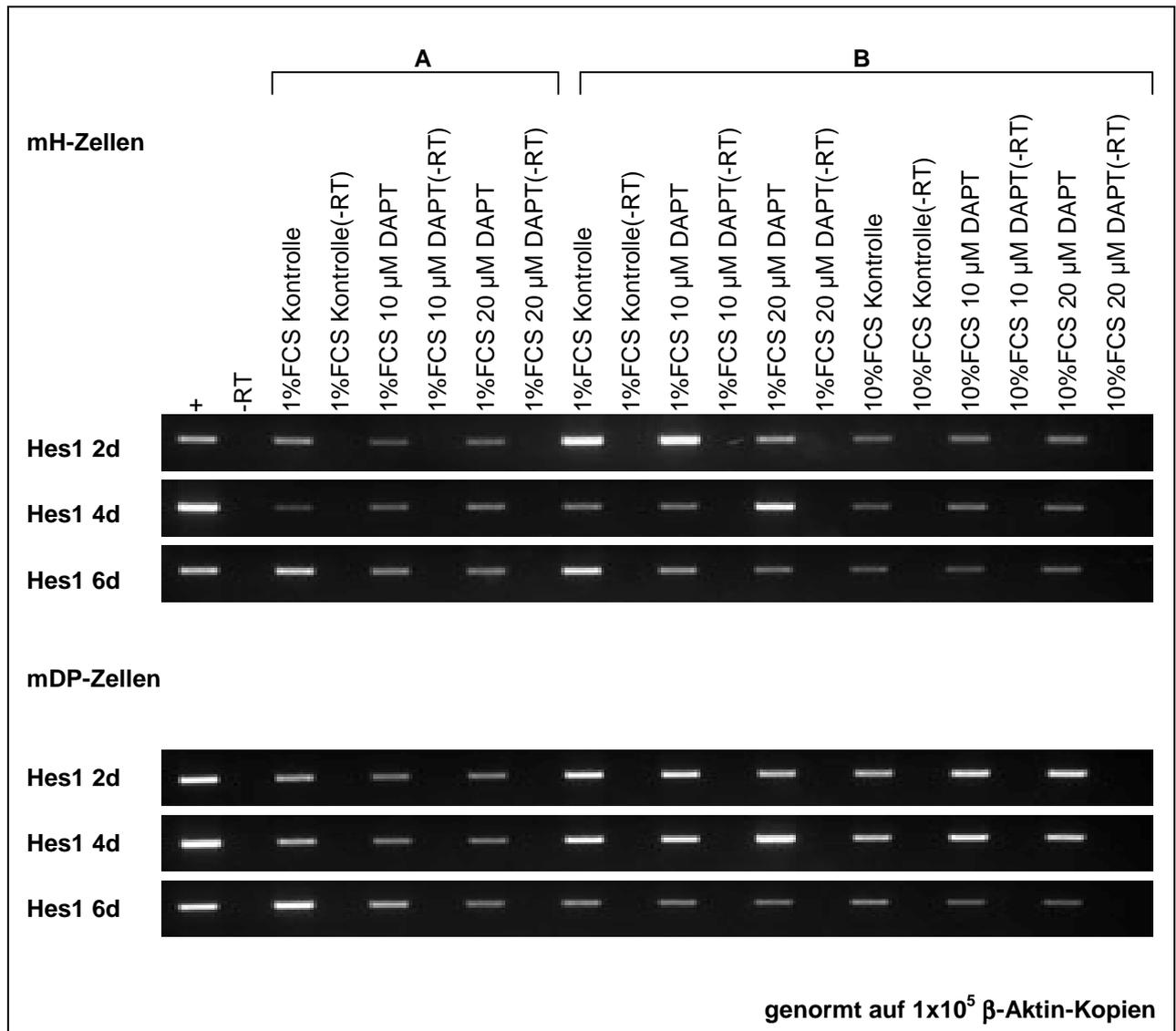


Abb. 30: Einfluss des Gammasekretaseinhibitors DAPT auf die Hes1-Expression: Eine Hes1-Inhibition konnte durch die Stimulation mit DAPT nicht schlüssig nachgewiesen werden. A: Zellen nach einem Tag Wachstum bei Standardmedium stimuliert. B: Zellen nach 5 Tagen Standardmedium stimuliert.

4.3.7 Induktion von Ngn3 durch Picolinsäure

Picolinsäure ist in der Lage unter serumfreien Konditionen die Ngn3-Expression der mDP-Zellen zu induzieren. Schon nach 24 Stunden Inkubation mit 10 mM PA + 10 mM NAD kam es zu einer deutlichen Expression. Diese konnte durch längere Inkubationszeiten (36 bis 40 Stunden) noch gesteigert werden. Inkubationszeiten über 40 Stunden waren für die Zellen jedoch schädlich und ab 48 Stunden zeigten sich deutliche Zeichen von Zelltod (Ablösen der Zellen von der Zellkulturflasche).

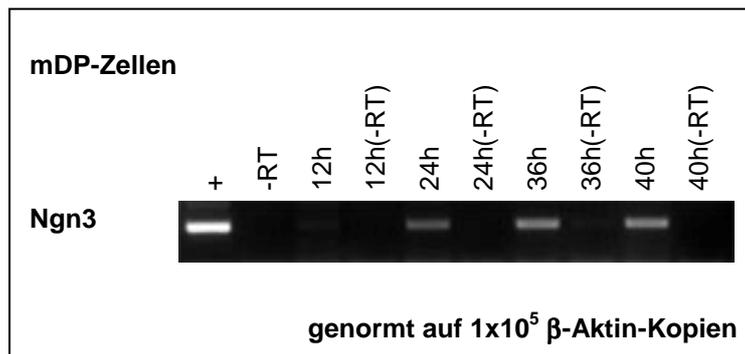


Abb. 31: Einfluss von PA auf die Expression von Ngn3. 10 mM PA/ 10 mM NAD induzieren nach 24h die Ngn3-Expression. Die höchste Expression erzielten wir nach 36h/40h.

Zusätzlich wurde dem Medium 10 mM NAD hinzugegeben, da es als Zellschutz fungiert und darüber hinaus proendokrine Eigenschaften besitzt (siehe 1.5.3). Nikotinamid selbst hatte bei unseren Zelllinien jedoch keinen Einfluss auf die Induktion der Ngn3-Expression (Abb. 32). Nach Absetzen der Stimulation war die Ngn3-Expression wieder rückläufig und schon nach 12 Stunden nicht mehr nachweisbar.

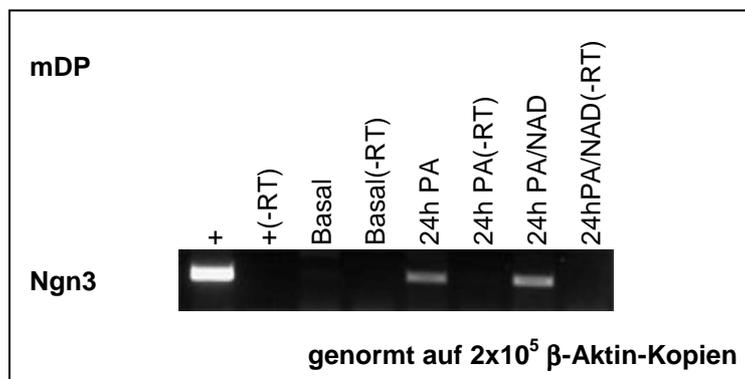


Abb. 32: Einfluss von NAD auf die Ngn3-Expression. Die Zugabe von NAD beeinflusst die Induktion von Ngn3 durch PA nicht.

Wurden die Zellen erneut stimuliert, nachdem sie vorher 24h in Basalmedium kultiviert worden waren, war Ngn3 abermals induzierbar (ON/OFF; Abb. 33)

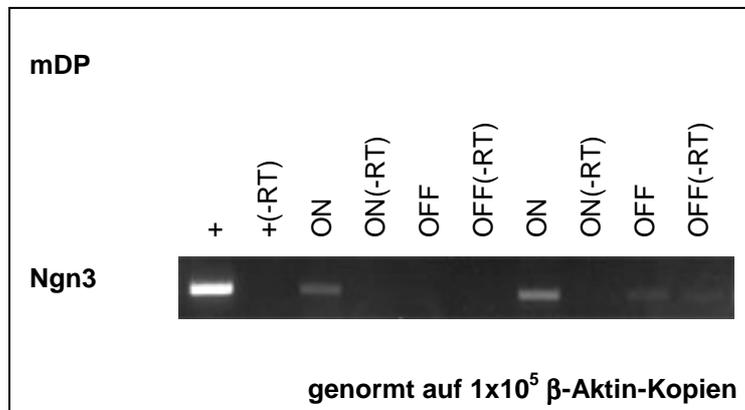


Abb. 33: Einfluss der wiederholten Stimulation durch PA. Ngn3 wird nach Beendigung der Stimulation mit PA wieder runter reguliert, kann jedoch durch erneute Stimulation mit PA wieder induziert werden.

PA induziert Ngn3 nicht über eine Inhibition des Notch-Signalweges. Abb. 34 zeigt, dass eine Inhibition der Hes1-Transkription nicht unbedingt für eine Induktion von Ngn3 erforderlich ist. Andererseits ist es uns gelungen, durch eine Zugabe von DAPT und von weiteren Faktoren wie RA, NGF und PACAP, Hes1 teilweise zu inhibieren. Trotz einer starken Steigerung der Ngn3-Expression und einer Inhibition von Hes1 waren „downstream“ davon geschaltete Faktoren wie Nkx6.1, Nkx2.2, Pax4, Pax6, Proinsulin1 und 2 weiterhin nicht nachweisbar (Abb. 34).

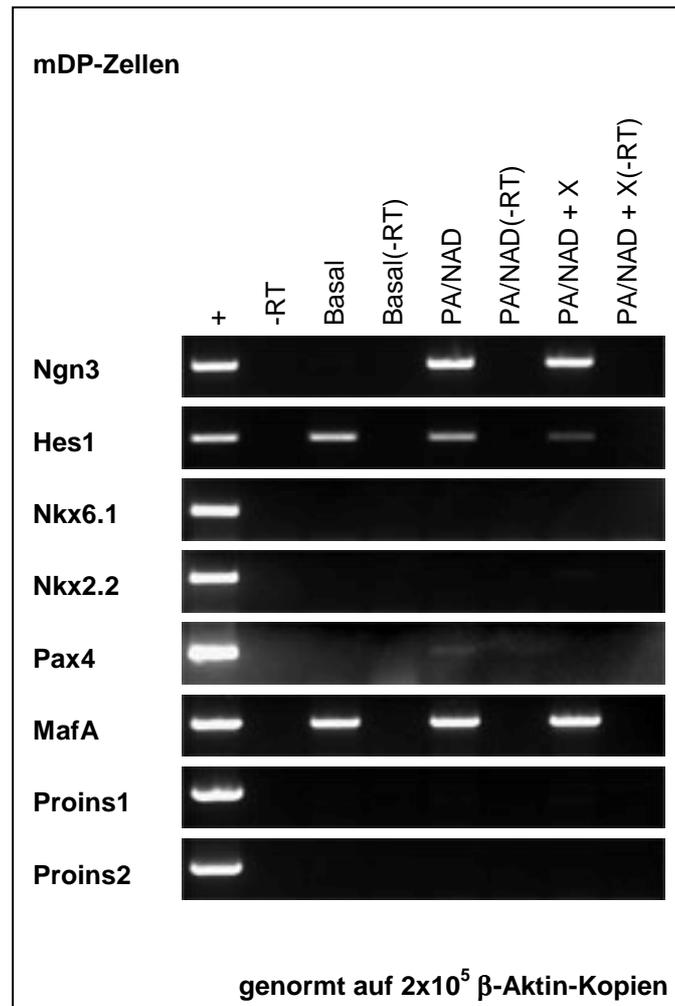


Abb. 34: PA induziert Ngn3 unabhängig von Hes1 in mDP-Zellen. Eine Wirkung auf andere proendokrine Faktoren oder auf Insulin, konnte nicht nachgewiesen werden. PA = 10 mM Picolinsäure; NAD = 10 mM Nikotinamid; X = PACAP 0,1 μ M + DAPT 1 μ M + Retinsäure 2 μ M + Exendin4 10 nM.

4.3.8 Induktion von Ngn3 durch Hypoxie

In der Literatur wird beschrieben, dass PA sowie Desferrioxamin (DFX) eine Hypoxie durch Induktion des Transkriptionsfaktors Hypoxia Responsive Element (HRE) simulieren können.⁶⁰ Durch eine 24-stündige Inkubation unter hypoxischen Bedingungen (1% O₂) wurde die Expression von Ngn3 in mDP-Zellen induziert (Abb. 35). Auch hier hatte Nikotinamid keinen zusätzlichen positiven Einfluss auf die Expression. Dieser konnte durch die Zugabe von PA oder DFX aufgehoben werden.

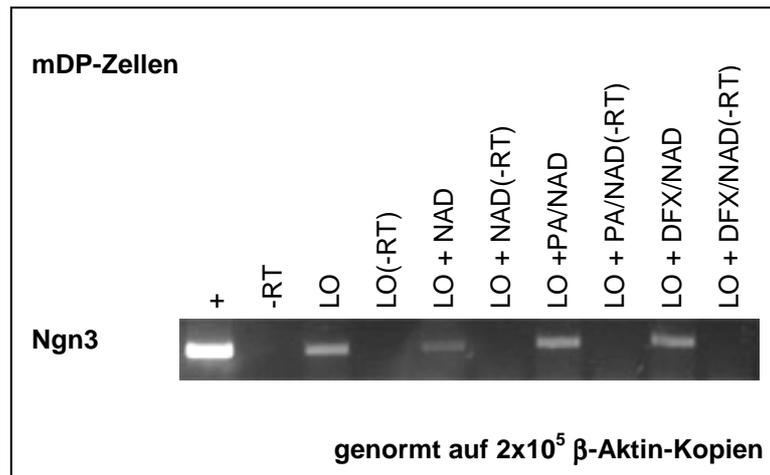


Abb. 35: Hypoxie induziert die Ngn3-Expression in mDP-Zellen. NAD hatte dabei einen eher hemmenden Einfluss auf die Induktion von Ngn3 durch Hypoxie. Dieser hemmende Einfluss konnte durch PA und DFX aufgehoben werden. LO = 1% O₂ für 24h; PA = 10 mM Picolinsäure; NAD = 10 mM Nikotinamid; DFX = 1 mM Desferrioxamin

5. Diskussion

5.1 Stammzellisolierung und Charakterisierung

Trotz intensiver Forschung eines ganzen Jahrzehnts ist es bis dato noch nicht gelungen, aus embryonalen oder adulten Stammzellen ausgereifte und komplett funktionstüchtige Betazellen herzustellen, die Insulin in ausreichendem Maße physiologisch sezernieren. Diese Tatsache weist auf die Komplexität hin, die einer solchen in vitro Reifung von Vorläuferzellen zu Grunde liegt. In der vorliegenden Arbeit sollte ein Beitrag dazu geleistet werden die Isolierungs- und Expansionsmethoden für potenzielle pankreatische Stammzellen zu optimieren und erste Daten zur Detektion der Differenzierungsbedingungen für die schrittweise Ausreifung in endokrine Progenitorzellen und Betazellen zu gewinnen. In der Arbeit ist es gelungen ein Protokoll zu entwickeln, mit dem bisher nicht beschriebene epitheliale Progenitorzellen aus murinem Pankreas angezüchtet werden können, die stabil den wichtigen Transkriptionsfaktor Pdx-1 exprimieren. Eine weitere wichtige Erkenntnis war, dass durch die Modulation der Kultur- und Wachstumsfaktoren essentielle Faktoren für die Betazellentwicklung und Betazellfunktion, wie z.B. Ngn3 und MafA, induziert werden können. Untersuchungen möglicher Signalwege, die die von uns beschriebenen Effekte erklären können, haben im Rahmen dieser Arbeit noch zu keinem schlüssigen Konzept geführt. Dennoch stimmen diese Daten optimistisch, dass es auf Grundlage der vorliegenden Studie in Zukunft gelingen könnte, aus adulten Stammzellen reife Betazellen herzustellen. Dadurch würden sich völlig neue Therapieoptionen für die Zelltherapie des Typ 1 Diabetes ergeben.

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Zellquelle für die Gewinnung von adulten Stammzellen zu erschließen, die das Potential für eine endokrine Differenzierung besitzen könnte. Aufgrund der ethischen Problematik und der potenziellen Gefahr der Teratomentstehung wurden von vorneherein die embryonalen Stammzellen ausgeschlossen und der adulte Mauspankreas als Quelle ausgewählt. Erste Lineage-Tracing-Experimente wiesen darauf hin, dass es möglich ist, dass im adulten Pankreas von Vertebraten keine Stammzellen residieren, die das Potential besitzen in vivo zu Betazellen auszureifen.²² Andererseits konnten mehrere

Forschergruppen multipotente Zellen in den Langerhans-Inseln, Pankreasgängen und zentroazinären Anteilen des Pankreas isolieren, die unter definierten Bedingungen wichtige endokrine Faktoren aufweisen.^{10,59,65,80,90,113} Neuere Lineage-Tracing-Experimente konnten außerdem zeigen, dass im Pankreas im Bereich der Gänge, der zentroazinären Anteile oder der Langerhans-Inseln auch bei adulten Mäusen Stammzellen existieren.⁸ Aufgrund dieser Befunde lag der Fokus der Arbeit auf der Generierung von Stammzelllinien aus adultem Pankreasgewebe der Maus.

Nach primärer Separation von Pankreasorganfragmenten wie z.B. Gängen, Inseln und exokriner/ endokriner Gesamtzellsuspension wurde das Auswachsen von Zelllinien unter Verwendung verschiedener Zellkulturmatrices und supplementierter Medien untersucht. Nach zahlreichen Versuchen erwies sich DMEM Medium mit hoher Glukosekonzentration (450 mg/dl) mit 10% FCS und 20 ng/ml EGF und der Einsatz von Kollagen beschichteten Zellkulturflaschen als am besten geeignet, Primärzelllinien mit epithelalem oder fibroblasten-ähnlichem Phänotyp zu gewinnen. Dieses modifizierte DMEM-Medium erwies sich in mehreren unabhängigen Experimenten auch als geeignet, die Zelllinien nach der Klonierung auf Einzelzellebene in der Langzeitkultur mit einem stabilen Phänotyp zu kultivieren. Neben der Fähigkeit der Koloniebildung aus Einzelzellen und der guten Proliferation (hohe Self-Renewal Kapazität) waren sowohl die mDP- wie auch die mH-Zellen fähig Sphären zu bilden, so dass drei wichtige Eigenschaften vorhanden waren, die embryonalen und adulten Stammzellen zugeschrieben werden. Der Nachweis der Pluripotenz war nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde im Rahmen einer anderen Promotionsarbeit nachgewiesen, dass die mDP-Zellen die Fähigkeit besitzen in verschiedene Zelltypen wie z.B. Adipozyten und β III-Tubulin-positiven Neuronen zu differenzieren (Daten hier nicht gezeigt).

Nach der Etablierung der Kulturbedingungen war die entscheidende Frage, ob die von uns isolierten Zelllinien auch bekannte Stammzellmarker exprimieren. Bis heute wurde noch kein Marker beschrieben, mit dem adulte Stammzellen klar identifiziert werden können. In vielen Arbeiten wurden deshalb eine Kombination von zell- oder entwicklungsspezifischen Transkriptionsfaktoren bzw. Oberflächenmolekülen sowie die Selbstregenerations- und Proliferationseigenschaften eingesetzt, um

Progenitorzellen und Stammzellen in verschiedenen Geweben wie z.B. Knochenmark, Gehirn, Leber Pankreas oder Muskel zu subklassifizieren.

Im Hinblick auf die weitere Charakterisierung der Zelllinien wurden Stammzellmarker, die in vorangehenden Arbeiten embryonalen pluripotenten Stammzellen (Oct4, Nanog) in Side-Population Zellen (Sca1 und BCRP1), adulten murinen und/oder humanen neuronalen Progenitorzellen (Nestin, Sox1, Sox2, Sox3, p75NTR), Muskelprecursorzellen (Sox7 und Sox15) oder endodermalen Vorläuferzellen Endoderms (Sox17) zugeschrieben wurden, mittels FACS-Analyse und RT-PCR untersucht.^{11,21,23,36,50,67,83,87,105}

Wie erwartet waren die embryonalen Stammzellmarker Oct4 und Nanog in allen Zelllinien negativ. Um einen hämatopoetischen Ursprung unserer Zellen auszuschließen, wurden hämatopoietische Marker (CD34, CD45, CD117) untersucht. Für all diese Marker waren unsere Zellen ebenfalls negativ. Auffällig war eine starke Expression von BCRP1 und Sca1, Nestin, Sox9 und des Neurotrophin-Rezeptors (p75NTR) sowohl in den mDP-Zellen wie auch in den mH-Zellen, die die Hypothese unterstützen, dass es sich bei den mDP- und den mH-Zellen um Progenitorzellen handelt. Die Koexpression von Nestin und P75NTR könnte auf einen neuroektodermalen Ursprung hindeuten.

Nestin, ein Marker der ursprünglich in neuronalen Stammzellen beschrieben worden war⁸⁴, wurde mittlerweile aber auch in Stammzellen des Pankreas¹¹³, der Leber³⁵ und der Haut^{58,94} beschrieben. P75NTR ist ebenfalls nicht nur in neuronalen Stammzellen sondern z.B. auch in Stammzellen des Haarfollikels nachgewiesen worden.^{73,86} Die anderen untersuchten neuronalen stammzellassoziierten Marker wie Sox2, Sox3, Sox7, Sox10 und Sox30 waren negativ. Stammzellen mit Expression des ABC-Transporters BCRP1 und Sca1 konnten sowohl aus Knochenmark wie auch aus Muskel, Testes und Pankreas isoliert werden, sodass diese wahrscheinlich als generelle Marker für Progenitorzellen angesehen werden können.³⁸

Weitere Analysen von Molekülen, die bei der Aufrechterhaltung des Stammzellpools in bestimmten Nischen beschrieben worden sind, zeigten einen positiven Nachweis für CD29 und CD49f. Oberflächenmoleküle, die in mesenchymalen Stromazellen (CD73, CD105) beschrieben worden sind, waren in den mDP-Zellen schwach positiv (die mH-Zellen wurden hierauf nicht untersucht).

Zusammenfassend kann das nachgewiesene Markerprofil insgesamt die Hypothese der Stammzellnatur der mDP- und mH-Zellen unterstützen. Es stellt sich die Frage welcher bisher bekannten Zellpopulation die mDP- und die mH-Zellen zuzuordnen

sind. Während das Fehlen der Expression von CD34, CD45 und CD117 die Eingruppierung als hämatopoetische Stammzellen weitgehend ausschließt, ist es zunächst überraschend, dass die Zelllinien neurodermale Marker – also Elemente des Ektoderm – als auch endodermale Marker aufweisen, was Hinweise auf das Vorliegen einer Mischpopulation aus ektodermalen und endodermalen Stammzellen geben könnte. Da die beiden hier vorliegenden Zelllinien jedoch aus einzelnen Zellklonen entstanden sind, ist dies auszuschließen. Die Expression von Markern verschiedener Keimblätter einer aus einem Zellklon entstandenen Population ist in der Literatur bereits u.a. für Knochenmarkstammzellen beschrieben worden und wurde als Hinweis auf die enorme Plastizität von adulten Stammzellen gedeutet.¹⁰⁰ Andererseits wird z.B. Nestin sowohl in mesodermalen Zelllinien, als auch in jenen ektodermalen Ursprungs exprimiert, was ein Hinweis darauf ist, dass einzelne Marker nicht spezifisch für eine bestimmte Zellpopulation sind.^{78,99} In der Literatur zu Pankreasstammzellen finden sich wenige vergleichbare Arbeiten. Zumeist wurden einige wenige Faktoren wie CK19 und Nestin als Hinweis für den möglichen Ursprung der jeweiligen Stammzelle aufgeführt, die Zellen jedoch meist nicht auf Marker der unterschiedlichen Keimblätter untersucht.^{65,113} Einige wenige Gruppen wie z.B. Ramiya et al. oder Sugiyama et al. führten breitere Untersuchungen der Expressionsmuster der Stammzellen – etwa auf hämatopoetische Marker – durch.^{76,91} Während Ramiya et al. keine Expression von hämatopoetischen Markern wie Erythropoietin oder CD34 auf den von ihnen verwendeten Stammzelllinien nachweisen konnten, entdeckten Sugiyama et al., dass der hämatopoetische Faktor CD133 auch auf Ngn3-positiven epithelialen Vorläuferzellen exprimiert wird. Dies wiederum zeigt erneut, dass einzelne Faktoren nicht spezifisch für die jeweiligen Keimblätter sind. All diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Einteilung von Stammzellen nach ihrer möglichen Keimblattzugehörigkeit, obwohl in der Literatur weit verbreitet, problematisch ist und sicher nicht aufgrund der Expression eines Markers gemacht werden kann. Will man doch eine Einteilung durchführen, so kann man in Zusammenschau der bei unserer mDP-Zelllinie exprimierten Marker von einem endodermalen Ursprung ausgehen. Bei der mH-Zelllinie ist diese Zuteilung nicht so klar.

In vorangehenden Studien wurden Pdx-1, CK19, Nestin, Sox9, Sca1, aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) sowie thymocyte 1.1 (Thy1.1) als pankreatische Stammzellmarker identifiziert.^{10,59,65,80,90} Auch unsere Zelllinien weisen einige dieser

in der Literatur häufig beschriebenen Faktoren und Oberflächenmarker wie Pdx-1, CK19, Nestin, Sca1 und Sox9 auf. Besonders interessant ist dabei die stabile Expression von Pdx-1 in den mDP-Zellen, da Pdx-1 eine zentrale Rolle für die embryonale Entwicklung des Pankreas besitzt und auch während der Entwicklung von Inselzellen aus embryonalen Stammzellen exprimiert wird.^{10,31,59}

Der Expression von Pdx-1 kommt in vielen Veröffentlichungen als Hauptregulator für die Reifung und Funktion von insulinproduzierenden Zellen eine besondere Rolle zu.¹¹³ Auch in Experimenten zur Transdifferenzierung von z.B. Leberzellen allein durch Pdx-1-Überexpression konnte die Wichtigkeit dieses Faktors für die endokrine Differenzierung unterstrichen werden.²⁴ Darüber hinaus exprimiert unsere mDP-Zelllinie die für die Somatogenese des endokrinen Pankreas wichtigen HNF-Faktoren.⁹⁸ Obwohl aus der embryonalen Genese des Pankreas bekannt ist, dass diese eine tragende Rolle bei der endokrinen Differenzierung spielen, ist bislang in der Literatur keine Pdx-1 positive Zelllinie beschrieben worden, die stabil die HNF-Faktoren HNF1 β , HNF3 β , HNF4 α sowie HNF6 exprimiert.¹⁵ Dieses Expressionsmuster ist vereinbar mit endodermalen frühen Progenitorzellen, die pankreatisch determiniert sind.

So ließ uns die Expression von Pdx-1 sowie der für die weitere Differenzierung und Funktion von Inselzellen wichtigen HNF-Faktoren vermuten, dass die mDP-Zellen das Potential besitzen könnten, in insulinproduzierende Zellen zu differenzieren.^{51,53} In Hinblick auf den Weg von einer Vorläuferzelle zur reifen Betazelle (siehe Kapitel 1.2.4.) stand uns mit der mDP-Zelllinie somit eine Stammzelle zur Verfügung, die sich theoretisch in alle 4 Gewebearten des Pankreas differenzieren ließe. Aufgrund der Eigenschaften der mH-Zellen erschienen diese von vorneherein als weniger gut geeignet für die endokrine Differenzierung. Dies hat sich in den einzelnen Stimulationsversuchen auch bestätigt. Durch Differenzierungsansätze mit Activin A und dem Phosphatidylinositol 3-Kinase- Inhibitor LY-294,002, einem Protokoll aus der Arbeitsgruppe D'Amour zur effizienten Differenzierung von humanen embryonalen Stammzellen zu Mesendoderm und schließlich definitivem Endoderm, versuchten wir vergeblich, die Expression der HNF-Faktoren bei den mH-Zellen zu induzieren.⁶³ Auch eine Stimulation mit Picolinsäure, die bei den mDP-Zellen schlussendlich zu einer Induktion von Ngn3 führte, zeigte bei den mH-Zellen keinen Effekt. Lediglich konnte eine Regulation des MafA- Transkriptionsfaktors durch Natriumbutyrat bemerkt werden. Ein wesentlicher Vorteil für eine weitere Differenzierung konnte daraus jedoch leider nicht abgeleitet werden. Dies alles hatte

zur Folge, dass wir im Laufe der Experimente auf die zusätzliche Stimulation der mH-Zellen verzichteten und uns nur noch auf die mDP-Zellen konzentrierten.

5.2 Differenzierungsversuche

Ein Medium, das 10% des reich an wachstumsbeeinflussenden Faktoren beinhaltenden FCS enthält, stellt keine optimale Bedingung für die Differenzierung von Stammzellen dar. Substanzen wie Insulin und IGF-1, die in unbekannter Menge und stets in unterschiedlichen Mengen im Serum enthalten sind, beeinflussen maßgeblich die Proliferation und Differenzierung der Zellen. Auch werden in der Literatur Differenzierungsprotokolle, sei es bei der Differenzierung von embryonalen als auch von adulten Stammzellen, stets mit wenig FCS oder aber mit serumfreien Medien, wo FCS durch Serum Replacement oder B27-Supplement ersetzt wurde, angegeben.¹⁸ Wir untersuchten deshalb, welche Konzentrationen an FCS oder Serum Replacement (SR) und welche Wachstumsdauer die optimalen Startbedingungen für eine spätere Differenzierung darstellten. Dabei wurde berücksichtigt, dass die Zelllinien nach 5 Tagen Kultivierung in Medium mit 10% FCS MafA exprimieren, weshalb dieser Schritt beibehalten wurde und die Bedingungen erst ab Tag 6 variiert wurden. 5 Tage Kultur in Basalmedium waren auch notwendig, um eine adäquate Zahl an Zellen zu bekommen, die gut konfluent gewachsen waren und somit ausreichend Zell-Zell-Kontakt herstellen konnten. Zell-Zell-Kontakt beeinflusste maßgeblich die Expressionsprofile und die Differenzierungsfähigkeit der Zellen. Entscheidend war, dass bei allen Konzentrationen des Serums aber auch unter serumfreien Bedingungen die Expression von MafA nicht negativ beeinflusst wurde. Außerdem konnte man erkennen, dass ab Tag 9, Sox17 hochreguliert wurde, während es an Tag 5 noch nicht nachweisbar war. Für die weiteren Differenzierungsversuche wurde schließlich das Protokoll mit 2% SR über 4-6 Tage nach 5 Tagen mit 10% FCS ausgewählt, da es eine optimale Balance zwischen Zellüberleben und minimalen Serumkonzentrationen darstellte. SR wurde gegenüber FCS auch deshalb bevorzugt, da enthaltene Faktoren wie z.B. Insulin und IGF-1 bekannt und stets in gleicher Konzentration enthalten sind.

Doch durch alleinige Optimierung der Kulturbedingungen ist eine Differenzierung zu terminal ausgereiften Betazellen nicht möglich. Im Folgenden möchte ich nun auf die

einzelnen Versuche zur Differenzierung eingehen und Parallelen zu der aktuellen Literatur ziehen:

Die endodermalen Faktoren HNF1 β , HNF3 β , HNF4 α und HNF6 spielen in der Regulation des endokrinen Pankreas, v.a. durch ihren Einfluss auf die Expression von Pdx-1 oder Ngn3, eine tragende Rolle (siehe Kapitel 1.3.5). Dass diese Beobachtungen aus der Organogenese auch in vitro Bestand haben, zeigen erfolgreiche Differenzierungsversuche von embryonalen Stammzellen zu insulinproduzierenden Zellen über endodermale Zwischenstufen.^{48,63} Da bei diesen Versuchen durch Activin A eine endokrine Spezifizierung sowie durch den Einsatz eines PI-3-Kinaseinhibitors wie LY42900 in Verbund mit Activin A additive Effekte im Hinblick auf diese endodermale Spezifizierung erzielt wurden, erhofften wir uns von einer Stimulation mit LY42900 und Activin A einen positiven Einfluss auf die Expression der endodermalen Faktoren bei den mH-Zellen. Es konnte jedoch durch die Stimulation mit LY42900 und Activin A keine Induktion der genannten HNF-Faktoren erzielt werden. Bei den mDP-Zellen kam es sogar zu einer verminderten Expression der HN-Faktoren, was sich in Hinblick auf die Ergebnisse bei embryonalen Stammzellen nicht eindeutig erklären lässt. Wie in vitro Studien an INS832/13-Zellen zeigen, könnten jedoch Proteine wie z.B. forkhead box O1 (FoxO1) durch die Inhibierung des PI-3-Kinaseweges aktiv werden und somit zu den von uns beschriebenen Effekten von u.a. HNF3 β führen.¹⁴

Natriumbutyrat ist eine Histondeacetylaseinhibitor, der schon in zahlreichen Arbeiten zu embryonalen und adulten Stammzellen für Differenzierungsansätze in neuronale, hepatische und pankreatische Zellen verwendet wurde.^{71,77,102,104,111} Von diesen Ergebnissen inspiriert, erhofften wir uns positive Effekte auf die Differenzierung. Zwar führte die Stimulation mit Natriumbutyrat, im Gegensatz zu zitierten Arbeiten nicht zur Induktion von Pdx-1, Ngn3, Pax4, Nkx2.2, Nkx6.1 oder zur Insulinproduktion (Abbildungen hier nicht gezeigt), jedoch konnten wir eine starke Induktion des Faktors MafA beobachten.^{33,71,102} Diese Induktion von MafA durch Natriumbutyrat ist bislang in der Literatur nicht beschrieben. MafA wurde häufig in Zusammenhang mit der endokrinen pankreatischen Entwicklung, bei reifen Betazellen oder insulinproduzierenden Insulinomzellen beschrieben.^{5,95} Nur wenige Publikationen jedoch beschreiben bisher MafA als einen auch bei unreifen, nicht

insulinproduzierenden Progenitorzellen exprimierten Faktor.⁴² Mit unseren Beobachtungen konnten wir diese These bestätigen.

Wie in der Literatur bei Inselzellen beschrieben, erzielten wir durch Stimulation mit Glukosamin ebenso eine gesteigerte Expression von MafA. Erklärt wird diese Induktion durch eine Erhöhung des Flusses durch den Hexosamin-Biosynthese-Signalweg.⁹⁵ Mit Picolinsäure, einem Stimulator des Schlüsselenzymes Glutamin:Fructose-6-Phosphat Amidotransferase (GFAT), entdeckten wir in der Literatur einen anderen Induktor dieses Signalweges und erzielten damit ähnliche Ergebnisse wie mit Glukosamin.⁶⁰ Da Picolinsäure jedoch in der Literatur hypoxie-imitierende Eigenschaften über eine HIF1 α -abhängige Induktion des Hypoxia-Responsive-Element (HRE) zugeschrieben werden und Hypoxie als ein die Differenzierung von Betazellen stimulierender Faktor angesehen wird, untersuchten wir mögliche Regulationen von endokrinen Faktoren.^{34,95} In der Tat entdeckten wir erstmals eine starke Regulation des endokrinen Schlüsselfaktors Ngn3 durch Picolinsäure (siehe Abb. 34). Erstaunlich ist, dass diese Regulation unabhängig vom Notch/Hes-Signalweg zu sein scheint (siehe Abb. 34), obwohl in der Literatur die Ngn3-Expression häufig mit einer „Downregulation“ des Ngn3-inhibierenden Faktors Hes1 in Verbindung gebracht wird.^{2,40-41,53} Unsere Versuche den Notch-Signalweg mit spezifischen Inhibitoren wie z.B. DAPT gezielt zu supprimieren, brachte keine Erfolge hinsichtlich der endokrinen Differenzierung, im Gegensatz zu den Ergebnissen von anderen Gruppen, die eine suffiziente Inhibition von Hes1 mit DAPT beschrieben hatten.¹⁷

Dass Hypoxie-Signalwege für die Aktivierung von Ngn3 wichtig sind, zeigt die Tatsache, dass Hypoxie in unseren Versuchen den gleichen Effekt auf die Ngn3-Expression hatte wie Picolinsäure. Derartige Effekte von Hypoxie auf adulte pankreatische Progenitorzellen sind bislang in der Literatur nicht beschrieben. Ebenfalls unbekannt ist der hier beobachtete direkte Zusammenhang zwischen HRE und Ngn3. Erstaunlich ist jedoch weiterhin, dass unsere Zelllinien, obwohl sie wichtige Faktoren wie Pdx-1, die HN-Faktoren und nach Induktion auch Ngn3 exprimieren, nachgeschaltete Faktoren wie NeuroD, Pax4, Nkx2.2 oder Nkx6.1 nicht hochregulieren und keine Insulinproduktion aufweisen (siehe Abb. 34). Es ist zu vermuten, dass bisher noch nicht bekannte inhibitorisch wirksame Signalwege in unseren Stammzelllinien aktiviert sind, die eine Ausdifferenzierung in endokrine

Zellen hemmen, oder dass für eine nachhaltige Aktivierung des endokrinen Differenzierungsweges zusätzliche Faktoren wichtig sind. Eine weitere Erklärung wäre, dass unsere Zellen die genannten Transkriptionsfaktoren zwar auf RNA-Ebene nicht aber in ausreichendem Maße auf Proteinebene exprimieren. Um diese Hypothese auszuschließen, sollten immunhistochemische Analysen zum Nachweis von Pdx-1, der HN-Faktoren und von Ngn3 durchgeführt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten somit die ersten Faktoren für eine proendokrine Differenzierung der mDP Zellen identifiziert werden. Eine Expression von Proinsulin oder Insulin ist in unseren bisherigen Versuchen nicht gelungen. In weiteren Experimenten soll Schritt für Schritt die sequentielle Differenzierung von der Stammzelle bis hin zur reifen Betazellen mittels RT-PCR, Immunhistologie, FACS-Analysen und funktionellen Stimulationstests untersucht werden.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, pankreatische Stammzellen aus murinen Pankreata zu isolieren, in der Zellkultur zu vermehren und zu charakterisieren. Ausgangspunkt waren isolierte Pankreasgänge und eine Gesamtzellsuspension von Pankreaszellen. Nach der Austestung verschiedener Zellkulturbedingungen ist es gelungen, ein Protokoll zu etablieren mit dem sich Zellen (mDP und mH) isolieren lassen, die Stammzellcharakteristika wie eine hohe Selbsterneuerungskapazität und Kolonieformation aufweisen. Außerdem waren auf RT-PCR und FACS-Ebene stammzellassoziierte Marker wie z.B. Pdx-1, CK18, CK19, Nestin, BCRP1, Sca1 und p75NTR nachweisbar. Die mDP-Zellen waren durch den Nachweis von Pdx-1 und verschiedener HN-Faktoren als endodermale Pankreasprogenitorzelllinie charakterisiert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden verschiedene, teils in der Literatur beschriebene Differenzierungsprotokolle eingesetzt, um die endokrine Differenzierung zu induzieren. In den Hypoxieversuchen und mittels Picolinsäure ist es gelungen, einen neuartigen, bisher in der Literatur bei adulten Stammzellen nicht beschriebenen Weg zur proendokrinen Differenzierung zu beschreiben: Es konnte nachgewiesen werden, dass Hypoxie zur Regulation proendokriner Marker wie Ngn3 führt und Picolinsäure – ein Induktor des Hypoxia-Responsive-Element – den Effekt von Hypoxie auf die Zelllinie imitieren kann. Eine definitive Ausreifung in insulinproduzierende Zellen konnte in den vorliegenden Experimenten bis dato noch nicht erzielt werden. Dies muss in weiteren Studien systematisch erforscht werden.

7. Abkürzungsverzeichnis

ALDH1	aldehyde dehydrogenase 1
BCRP1	breast cancer resistance protein 1 (=ABCG2)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	complementary DNA
CK	Cytokeratin
d	Tag(e)
DAPT	N-[N-(3,5-Difluorphenacetyl)-l-alanyl]-S-phenylglycin-t-butylester (γ -Sekretase Inhibitor)
DFX	Desferrioxamin
DMEM	Dulbecco's modified essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
e	embryonic day
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FGF	Fibroblast growth factor
FCS	Fetal calf serum
FOXO1	forkhead box O1
GATA	GATA binding protein (Transkriptionsfaktor, der die Sequenz GATA erkennt)
GFAT	Glutamine:Fructose-6-Phosphat-Amidotransferase
GlcN-6-P	Glukosamin-6-Phosphat
GLP-1	glucagon-like peptide 1
h	Stunde(n)
Hes	hairy and enhancer of split
HG	high glucose
Hlxb9	homeobox gene HB9
HNF	hepatocyte nuclear factor
HRE	hypoxia responsive element

Isl1	insulin gene enhancer protein Islet-1
LG	low glucose
MafA	musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A
mM	Millimolar
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NAD	Nikotinamid
NeuroD	neurogenic differentiation 1
NGF	nerve growth factor
Ngn3	Neurogenin 3
Nkx2.2	NK2 transcription factor related, locus 2
Nkx6.1	NK6 homeobox 1
P75NTR	Neurotrophin Rezeptor
PA	Picolinsäure
PACAP	pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
Pax	paired box gene
PCR	polymerase chain reaction
Pdx-1	pancreatic duodenum homeobox protein 1
PI-3-K	Phosphatidylinositol-3-kinase
Proins1	Proinsulin 1
Proins2	Proinsulin 2
P/S	Penicillin/Streptomycin
RA	Retinsäure
rh	recombinant human
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
RT-PCR	reverse transkriptase polymerase chain reaction
Sca1	stem cell antigen 1
Sox	SRY (sex determining region Y)-box
SR	serum replacement
TGF- β	transforming growth factor beta
Thy1.1	thymocyte 1.1 (CD90)
UDP-GlcNAc	uridin-5-diphosphat-N-acetylglukosamin
z.B.	zum Beispiel

8. Literaturverzeichnis

1. Abuljadayel, I.S. Induction of stem cell-like plasticity in mononuclear cells derived from unmobilised adult human peripheral blood. *Curr Med Res Opin* **19**, 355-375 (2003).
2. Apelqvist, A., *et al.* Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* **400**, 877-881 (1999).
3. Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D. & Lake, R.J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**, 770-776 (1999).
4. Asakura, A. Stem cells in adult skeletal muscle. *Trends Cardiovasc Med* **13**, 123-128 (2003).
5. Bernardo, A.S., Hay, C.W. & Docherty, K. Pancreatic transcription factors and their role in the birth, life and survival of the pancreatic beta cell. *Mol Cell Endocrinol* **294**, 1-9 (2008).
6. Bhushan, A., *et al.* Fgf10 is essential for maintaining the proliferative capacity of epithelial progenitor cells during early pancreatic organogenesis. *Development* **128**, 5109-5117 (2001).
7. Bjornson, C.R., Rietze, R.L., Reynolds, B.A., Magli, M.C. & Vescovi, A.L. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* **283**, 534-537 (1999).
8. Bonner-Weir, S., *et al.* Transdifferentiation of pancreatic ductal cells to endocrine beta-cells. *Biochem Soc Trans* **36**, 353-356 (2008).
9. Bonner-Weir, S., *et al.* In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7999-8004 (2000).
10. Bonner-Weir, S., *et al.* The pancreatic ductal epithelium serves as a potential pool of progenitor cells. *Pediatr Diabetes* **5 Suppl 2**, 16-22 (2004).
11. Brazel, C.Y., *et al.* Sox2 expression defines a heterogeneous population of neurosphere-forming cells in the adult murine brain. *Aging Cell* **4**, 197-207 (2005).
12. Brink, C. Promoter elements in endocrine pancreas development and hormone regulation. *Cell Mol Life Sci* **60**, 1033-1048 (2003).
13. Buteau, J., Foisy, S., Joly, E. & Prentki, M. Glucagon-like peptide 1 induces pancreatic beta-cell proliferation via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Diabetes* **52**, 124-132 (2003).
14. Buteau, J., Spatz, M.L. & Accili, D. Transcription factor FoxO1 mediates glucagon-like peptide-1 effects on pancreatic beta-cell mass. *Diabetes* **55**, 1190-1196 (2006).
15. Chakrabarti, S.K. & Mirmira, R.G. Transcription factors direct the development and function of pancreatic beta cells. *Trends Endocrinol Metab* **14**, 78-84 (2003).
16. Conlon, F.L., *et al.* A primary requirement for nodal in the formation and maintenance of the primitive streak in the mouse. *Development* **120**, 1919-1928 (1994).
17. Crawford, T.Q. & Roelink, H. The notch response inhibitor DAPT enhances neuronal differentiation in embryonic stem cell-derived embryoid bodies independently of sonic hedgehog signaling. *Dev Dyn* **236**, 886-892 (2007).
18. D'Amour, K.A., *et al.* Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **24**, 1392-1401 (2006).
19. Demeterco, C., Beattie, G.M., Dib, S.A., Lopez, A.D. & Hayek, A. A role for activin A and betacellulin in human fetal pancreatic cell differentiation and growth. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 3892-3897 (2000).

20. Dieterle, C., *et al.* [Therapy of diabetes mellitus. Pancreas transplantation, islet transplantation, stem cell and gene therapy]. *Internist (Berl)* **47**, 489-496, 498-501 (2006).
21. Diks, S.H., *et al.* The novel gene *asb11*: a regulator of the size of the neural progenitor compartment. *J Cell Biol* **174**, 581-592 (2006).
22. Dor, Y., Brown, J., Martinez, O.I. & Melton, D.A. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* **429**, 41-46 (2004).
23. Ebata, K.T., Zhang, X. & Nagano, M.C. Expression patterns of cell-surface molecules on male germ line stem cells during postnatal mouse development. *Mol Reprod Dev* **72**, 171-181 (2005).
24. Ferber, S., *et al.* Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat Med* **6**, 568-572 (2000).
25. Frank, A., *et al.* Transplantation for type I diabetes: comparison of vascularized whole-organ pancreas with isolated pancreatic islets. *Ann Surg* **240**, 631-640; discussion 640-633 (2004).
26. Gao, R., *et al.* Characterization of endocrine progenitor cells and critical factors for their differentiation in human adult pancreatic cell culture. *Diabetes* **52**, 2007-2015 (2003).
27. Gershengorn, M.C., *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition generates proliferative human islet precursor cells. *Science* **306**, 2261-2264 (2004).
28. Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M. & Guillemot, F. neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1607-1611 (2000).
29. Grapin-Botton, A. Antero-posterior patterning of the vertebrate digestive tract: 40 years after Nicole Le Douarin's PhD thesis. *Int J Dev Biol* **49**, 335-347 (2005).
30. Guz, Y., Nasir, I. & Teitelman, G. Regeneration of pancreatic beta cells from intra-islet precursor cells in an experimental model of diabetes. *Endocrinology* **142**, 4956-4968 (2001).
31. Habener, J.F., Kemp, D.M. & Thomas, M.K. Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology* **146**, 1025-1034 (2005).
32. Hao, E., *et al.* Beta-cell differentiation from nonendocrine epithelial cells of the adult human pancreas. *Nat Med* **12**, 310-316 (2006).
33. Haumaitre, C., Lenoir, O. & Scharfmann, R. Histone deacetylase inhibitors modify pancreatic cell fate determination and amplify endocrine progenitors. *Mol Cell Biol* **28**, 6373-6383 (2008).
34. Heinis, M., *et al.* Oxygen Tension Regulates Pancreatic {beta}-Cell Differentiation Through Hypoxia-Inducible Factor 1{alpha}. *Diabetes* **59**, 662-669 (2010).
35. Herrera, M.B., *et al.* Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. *Stem Cells* **24**, 2840-2850 (2006).
36. Hoshi, N., Kusakabe, T., Taylor, B.J. & Kimura, S. Side population cells in the mouse thyroid exhibit stem/progenitor cell-like characteristics. *Endocrinology* **148**, 4251-4258 (2007).
37. Huang, H.P., *et al.* Regulation of the pancreatic islet-specific gene BETA2 (neuroD) by neurogenin 3. *Mol Cell Biol* **20**, 3292-3307 (2000).
38. Huls, M., Russel, F.G. & Masereeuw, R. The role of ATP binding cassette transporters in tissue defense and organ regeneration. *J Pharmacol Exp Ther* **328**, 3-9 (2009).

39. Jensen, J. Gene regulatory factors in pancreatic development. *Dev Dyn* **229**, 176-200 (2004).
40. Jensen, J., *et al.* Independent development of pancreatic alpha- and beta-cells from neurogenin3-expressing precursors: a role for the notch pathway in repression of premature differentiation. *Diabetes* **49**, 163-176 (2000).
41. Jensen, J., *et al.* Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nat Genet* **24**, 36-44 (2000).
42. Jin, C.X., *et al.* Conversion of immortal liver progenitor cells into pancreatic endocrine progenitor cells by persistent expression of Pdx-1. *J Cell Biochem* **104**, 224-236 (2008).
43. Kageyama, R., Ohtsuka, T. & Kobayashi, T. The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis. *Development* **134**, 1243-1251 (2007).
44. Kim, S., *et al.* Streptozotocin-induced diabetes can be reversed by hepatic oval cell activation through hepatic transdifferentiation and pancreatic islet regeneration. *Lab Invest* **87**, 702-712 (2007).
45. Kim, S.K. & Melton, D.A. Pancreas development is promoted by cyclopamine, a hedgehog signaling inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13036-13041 (1998).
46. Kimura, K., *et al.* Activation of Notch signaling in tumorigenesis of experimental pancreatic cancer induced by dimethylbenzanthracene in mice. *Cancer Sci* **98**, 155-162 (2007).
47. Krause, D.S., *et al.* Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* **105**, 369-377 (2001).
48. Kroon, E., *et al.* Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol* **26**, 443-452 (2008).
49. Kumar, M., Jordan, N., Melton, D. & Grapin-Botton, A. Signals from lateral plate mesoderm instruct endoderm toward a pancreatic fate. *Dev Biol* **259**, 109-122 (2003).
50. Lagace, D.C., *et al.* Dynamic contribution of nestin-expressing stem cells to adult neurogenesis. *J Neurosci* **27**, 12623-12629 (2007).
51. Lantz, K.A., *et al.* Foxa2 regulates multiple pathways of insulin secretion. *J Clin Invest* **114**, 512-520 (2004).
52. Lechner, A., Nolan, A.L., Blacken, R.A. & Habener, J.F. Redifferentiation of insulin-secreting cells after in vitro expansion of adult human pancreatic islet tissue. *Biochem Biophys Res Commun* **327**, 581-588 (2005).
53. Lee, J.C., *et al.* Regulation of the pancreatic pro-endocrine gene neurogenin3. *Diabetes* **50**, 928-936 (2001).
54. Lemoli, R.M., *et al.* Stem cell plasticity: time for a reappraisal? *Haematologica* **90**, 360-381 (2005).
55. Levine, F. & Mercola, M. No pancreatic endocrine stem cells? *N Engl J Med* **351**, 1024-1026 (2004).
56. Lickert, H., *et al.* Formation of multiple hearts in mice following deletion of beta-catenin in the embryonic endoderm. *Dev Cell* **3**, 171-181 (2002).
57. List, J.F. & Habener, J.F. Glucagon-like peptide 1 agonists and the development and growth of pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **286**, E875-881 (2004).
58. Lorenz, K., *et al.* Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. *Exp Dermatol* **17**, 925-932 (2008).
59. Madsen, O.D. Stem cells and diabetes treatment. *APMIS* **113**, 858-875 (2005).

60. Manzari, B., *et al.* Induction of macrophage glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase expression by hypoxia and by picolinic acid. *Int J Immunopathol Pharmacol* **20**, 47-58 (2007).
61. Martin, M., *et al.* Dorsal pancreas agenesis in retinoic acid-deficient Raldh2 mutant mice. *Dev Biol* **284**, 399-411 (2005).
62. Mashima, H., *et al.* Genes expressed during the differentiation of pancreatic AR42J cells into insulin-secreting cells. *Diabetes* **48**, 304-309 (1999).
63. McLean, A.B., *et al.* Activin a efficiently specifies definitive endoderm from human embryonic stem cells only when phosphatidylinositol 3-kinase signaling is suppressed. *Stem Cells* **25**, 29-38 (2007).
64. Naya, F.J., *et al.* Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev* **11**, 2323-2334 (1997).
65. Noguchi, H., *et al.* Establishment of mouse pancreatic stem cell line. *Cell Transplant* **18**, 563-571 (2009).
66. Ogata, T., Park, K.Y., Seno, M. & Kojima, I. Reversal of streptozotocin-induced hyperglycemia by transplantation of pseudoislets consisting of beta cells derived from ductal cells. *Endocr J* **51**, 381-386 (2004).
67. Okano, H. Stem cell biology of the central nervous system. *J Neurosci Res* **69**, 698-707 (2002).
68. Olbrot, M., Rud, J., Moss, L.G. & Sharma, A. Identification of beta-cell-specific insulin gene transcription factor RIPE3b1 as mammalian MafA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6737-6742 (2002).
69. Onaca, N., *et al.* Pancreatic islet cell transplantation: update and new developments. *Nutr Clin Pract* **22**, 485-493 (2007).
70. Orlic, D. Adult bone marrow stem cells regenerate myocardium in ischemic heart disease. *Ann N Y Acad Sci* **996**, 152-157 (2003).
71. Otonkoski, T., Ustinov, J., Huotari, M.A., Kallio, E. & Hayry, P. Nicotinamide and sodium butyrate for the induction of fetal porcine beta-cell differentiation prior to transplantation. *Transplant Proc* **29**, 2045 (1997).
72. Pagano, S.F., *et al.* Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb. *Stem Cells* **18**, 295-300 (2000).
73. Peters, E.M., *et al.* p75 Neurotrophin Receptor-Mediated Signaling Promotes Human Hair Follicle Regression (Catagen). *Am J Pathol* **168**, 221-234 (2006).
74. Pinkse, G.G., *et al.* Autoreactive CD8 T cells associated with beta cell destruction in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18425-18430 (2005).
75. Pontoglio, M., *et al.* Defective insulin secretion in hepatocyte nuclear factor 1alpha-deficient mice. *J Clin Invest* **101**, 2215-2222 (1998).
76. Ramiya, V.K., *et al.* Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med* **6**, 278-282 (2000).
77. Ren, M., *et al.* Effects of sodium butyrate on the differentiation of pancreatic and hepatic progenitor cells from mouse embryonic stem cells. *J Cell Biochem* **109**, 236-244 (2010).
78. Rieske, P., *et al.* A population of human brain cells expressing phenotypic markers of more than one lineage can be induced in vitro to differentiate into mesenchymal cells. *Exp Cell Res* **315**, 462-473 (2009).
79. Roche, E., Jones, J., Arribas, M.I., Leon-Quinto, T. & Soria, B. Role of small bioorganic molecules in stem cell differentiation to insulin-producing cells. *Bioorg Med Chem* **14**, 6466-6474 (2006).

80. Rovira, M., *et al.* Isolation and characterization of centroacinar/terminal ductal progenitor cells in adult mouse pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 75-80 (2010).
81. Sander, M., *et al.* Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. *Genes Dev* **11**, 1662-1673 (1997).
82. Sander, M., *et al.* Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas. *Development* **127**, 5533-5540 (2000).
83. Savage, J., Conley, A.J., Blais, A. & Skerjanc, I.S. SOX15 and SOX7 differentially regulate the myogenic program in P19 cells. *Stem Cells* **27**, 1231-1243 (2009).
84. Schwartz, P.H., *et al.* Isolation and characterization of neural progenitor cells from post-mortem human cortex. *J Neurosci Res* **74**, 838-851 (2003).
85. Seissler, J. & Schott, M. Generation of insulin-producing beta cells from stem cells--perspectives for cell therapy in type 1 diabetes. *Horm Metab Res* **40**, 155-161 (2008).
86. Shihabuddin, L.S., Hertz, J.A., Holets, V.R. & Whittemore, S.R. The adult CNS retains the potential to direct region-specific differentiation of a transplanted neuronal precursor cell line. *J Neurosci* **15**, 6666-6678 (1995).
87. Shimoda, M., *et al.* Sox17 plays a substantial role in late-stage differentiation of the extraembryonic endoderm in vitro. *J Cell Sci* **120**, 3859-3869 (2007).
88. Spence, J.R. & Wells, J.M. Translational embryology: using embryonic principles to generate pancreatic endocrine cells from embryonic stem cells. *Dev Dyn* **236**, 3218-3227 (2007).
89. St-Onge, L., Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Mansouri, A. & Gruss, P. Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas. *Nature* **387**, 406-409 (1997).
90. Stevenson, K.S., *et al.* Isolation, characterization, and differentiation of thy1.1-sorted pancreatic adult progenitor cell populations. *Stem Cells Dev* **18**, 1389-1398 (2009).
91. Sugiyama, T., Rodriguez, R.T., McLean, G.W. & Kim, S.K. Conserved markers of fetal pancreatic epithelium permit prospective isolation of islet progenitor cells by FACS. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 175-180 (2007).
92. Sussel, L., *et al.* Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells. *Development* **125**, 2213-2221 (1998).
93. Toma, J.G., *et al.* Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* **3**, 778-784 (2001).
94. Toma, J.G., McKenzie, I.A., Bagli, D. & Miller, F.D. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells* **23**, 727-737 (2005).
95. Vanderford, N.L., Andrali, S.S. & Ozcan, S. Glucose induces MafA expression in pancreatic beta cell lines via the hexosamine biosynthetic pathway. *J Biol Chem* **282**, 1577-1584 (2007).
96. Vija, L., *et al.* Mesenchymal stem cells: Stem cell therapy perspectives for type 1 diabetes. *Diabetes Metab* **35**, 85-93 (2009).
97. Wang, Z., Dolle, P., Cardoso, W.V. & Niederreither, K. Retinoic acid regulates morphogenesis and patterning of posterior foregut derivatives. *Dev Biol* **297**, 433-445 (2006).
98. Wilson, M.E., Scheel, D. & German, M.S. Gene expression cascades in pancreatic development. *Mech Dev* **120**, 65-80 (2003).

99. Wislet-Gendebien, S., Wautier, F., Leprince, P. & Rogister, B. Astrocytic and neuronal fate of mesenchymal stem cells expressing nestin. *Brain Res Bull* **68**, 95-102 (2005).
100. Woodbury, D., Reynolds, K. & Black, I.B. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J Neurosci Res* **69**, 908-917 (2002).
101. Xu, X., *et al.* Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell* **132**, 197-207 (2008).
102. Yamada, S., *et al.* Differentiation of adult hepatic stem-like cells into pancreatic endocrine cells. *Cell Transplant* **14**, 647-653 (2005).
103. Yang, L., *et al.* In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8078-8083 (2002).
104. Yao, X., *et al.* Histone deacetylase inhibitor promotes differentiation of embryonic stem cells into neural cells in adherent monoculture. *Chin Med J (Engl)* **123**, 734-738 (2010).
105. Young, K.M., Merson, T.D., Sotthibundhu, A., Coulson, E.J. & Bartlett, P.F. p75 neurotrophin receptor expression defines a population of BDNF-responsive neurogenic precursor cells. *J Neurosci* **27**, 5146-5155 (2007).
106. Zaret, K.S. & Grompe, M. Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas. *Science* **322**, 1490-1494 (2008).
107. Zertal-Zidani, S., Bounacer, A. & Scharfmann, R. Regulation of pancreatic endocrine cell differentiation by sulphated proteoglycans. *Diabetologia* **50**, 585-595 (2007).
108. Zhang, Y.Q., *et al.* Inhibition of activin signaling induces pancreatic epithelial cell expansion and diminishes terminal differentiation of pancreatic beta-cells. *Diabetes* **53**, 2024-2033 (2004).
109. Zhang, Y.Q. & Sarvetnick, N. Development of cell markers for the identification and expansion of islet progenitor cells. *Diabetes Metab Res Rev* **19**, 363-374 (2003).
110. Zhao, Y., Glesne, D. & Huberman, E. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2426-2431 (2003).
111. Zhou, M., *et al.* Differentiation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes induced by a combination of cytokines and sodium butyrate. *J Cell Biochem* **109**, 606-614 (2010).
112. Zulewski, H. Stem cells with potential to generate insulin producing cells in man. *Swiss Med Wkly* **136**, 647-654 (2006).
113. Zulewski, H., *et al.* 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).

Lebenslauf

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen recht herzlich danken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit tatkräftig unterstützt haben:

Mein erster und ganz besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. Jochen Reißler für die interessante Aufgabenstellung und die Möglichkeit diese Arbeit in der Diabetologie der Medizinischen Klinik - Innenstadt durchzuführen.

Meinen Kollegen aus dem Labor, namentlich Monika Offers, Dr. Christine Sattler und Miriam Nath, sowie allen übrigen Doktoranden möchte ich für die nette Arbeitsatmosphäre, Unterstützung und Hilfe danken.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern für die Möglichkeit, studiert haben zu dürfen. Danke für die vielseitige Unterstützung die ganzen Jahre über.

Danke Martin.

Danke, Christine, dass du für mich da warst und bist. Und alle Verspätungen geduldig ertragen hast.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe und keine anderen als die hier angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit wurde weder in dieser noch in ähnlicher Form bei einer anderen Institution vorgelegt.

München, 12. Dezember 2010