

Institut für Klinische Biochemie

■ Direktor: Prof. Dr. Sigurd Lenzen

Tel.: 0511 / 532-6525 • E-Mail: clinbiochemistry@mh-hannover.de • www.mh-hannover.de/klinische_biochemie.html

Forschungsprofil

Das Forschungsgebiet des Instituts für Klinische Biochemie der MHH ist die experimentelle Diabetologie. Der Forschungsschwerpunkt liegt im Bereich der Pankreasinseldiabetologie. Die Forschungsarbeiten beschäftigen sich mit

- 1) der insulinsekretorischen Funktion der Beta-Zellen des Pankreas und den molekularen Grundlagen der Signalerkennung und Signalvermittlung, die zur Exozytose des Insulins führen;
- 2) den Ursachen und Mechanismen der Dysfunktion und des Zelltods der Beta-Zellen des Pankreas, die dem insulinpflichtigen (Typ 1) und dem Altersdiabetes (Typ 2) zugrunde liegen;
- 3) der Entwicklung gentherapeutischer und neuer pharmakotherapeutischer Ansätze zur Behandlung und Prävention des Diabetes (Typ 1 und Typ 2).

Die Förderung der Projekte erfolgte durch folgende Drittmittelgeber:

Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) inklusive REBIRTH, Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) inklusive IFB, Deutsche Diabetes-Gesellschaft, Kommission der Europäischen Union, Brüssel

Forschungsprojekte

Aufreinigung von insulinproduzierenden, differenzierten Stammzellen aus einer CK19-positiven Zellpopulation zur Insulinersatztherapie des Diabetes mellitus

Der Typ 1 Diabetes mellitus (T1DM) ist eine Erkrankung des Kohlenhydratstoffwechsels, welche durch die progrediente Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen in den Langerhansschen Inseln des Pankreas gekennzeichnet ist. Der T1DM wird durch eine Autoimmunreaktion ausgelöst, welche die insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas zerstört. Der T1DM tritt beim Menschen vom Kindesalter bis zum jungen Erwachsenenalter auf, später wird das Auftreten seltener. Die Stoffwechsellage eines Typ-1-Diabetikers kann durch eine Insulinsubstitution behandelt werden. Allerdings ist eine Wiederherstellung der β -Zellmasse nach heutigem Kenntnisstand nicht möglich. Daraus resultiert für den Typ-1-Diabetiker eine lebenslange Abhängigkeit von regelmäßigen Insulingaben, die in Form von Injektionen erfolgt. In der Regel ist keines der gegenwärtigen Substitutionsverfahren mit Insulin, Insulinanaloga und Insulinpumpen in der Lage, die Stoffwechsellage dauerhaft zu normalisieren, so dass die Entwicklung von Spätkomplikationen nicht verhindert werden kann. Besonders im Hinblick auf die hohe Prävalenz innerhalb der Gesamtbevölkerung und die Kosten durch diese chronische Erkrankung besitzen Therapiekonzepte des T1DM mittels einer Zellersatztherapie eine enorme Bedeutung. Die Therapie des T1DM kann nicht ausschließlich durch Transplantation von humanen Spenderpankreatata durchgeführt werden, da die Anzahl geeigneter Spenderorgane limitiert ist. Daher ist ein artifizielles Organsystem aus so genannten Surrogatzellen, die über die wesentlichen Charakteristika endokriner β -Zellen verfügen, von großem medizinischem Interesse.

Die Differenzierung von embryonalen Stammzellen in insulinproduzierende Surrogatzellen könnte die Probleme der begrenzten Verfügbarkeit von Spenderpankreatata beheben. Die Voraussetzung ist, dass es in vitro gelingt, aus Stammzellen Surrogatzellen zu erzeugen, welche die entscheidenden Charakteristika von β -Zellen aufweisen. Das Ziel dieses Projekts war die Entwicklung eines Differenzierungsprotokolls, das verlässlich insulinproduzierende Surrogatzellen aus ES-Zellen generiert. Dieses Protokoll sollte mit einem Sortierungsverfahren kombiniert werden, um unerwünschte

Zellen abzutrennen und insulinproduzierende Zellen aufzureinigen. Dazu wurde zunächst ein zuvor veröffentlichtes Differenzierungsprotokoll von Lumelsky et al. (2001) reproduziert und als Referenz verwendet. Die Differenzierung mit dem Referenzprotokoll erzeugte Zellen mit einem neuronalen Geno- und Phänotyp. Diese Zellen exprimierten die inselzellspezifischen Hormone Insulin, Somatostatin und Glucagon, ließen aber ansonsten typische Charakteristika einer endokrinen Zelle fehlen. Darüber hinaus zeigte sich, dass die differenzierten Zellen Insulin aus dem Kultivierungsmedium passiv aufgenommen hatten, was zu einer deutlichen Überschätzung des Insulingehalts führen kann. Ein neu entwickeltes 4-Stadien Differenzierungsprotokoll konnte im Gegensatz zum Referenzprotokoll ES-Zellen in annähernd monohormonale Zellen differenzieren. Durch die Entfernung des Nestinselektionsschritts des Referenzprotokolls konnte der neuronale Charakter der differenzierten Zellen signifikant reduziert werden. Die Reduzierung der Nestin-Positivität ging mit einer Erhöhung der Zellen einher, die positiv für Insulin und C-Peptid waren, was ein Nachweis für die de novo Synthese von Insulin ist und damit ausschließt, dass das Insulin durch passive Aufnahme aus dem Differenzierungsmedium in die Zellen gelangt ist. Parallel zu dieser Verbesserung konnte der endokrine, β -zellähnliche Charakter der differenzierten ES-Zellen auch durch eine erhöhte Expression des GLUT2 Glucose Transporters, Glucokinase, Pdx1 und Sur1 belegt werden. Gleichzeitig konnte eine signifikante Erhöhung der Expression der duktaalen Marker Cytokeratin 19 und Carboanhydrase 2 nachgewiesen werden. Die Implantation von differenzierten Stammzellen aus dem Referenzprotokoll und dem optimierten 4-Stadien Differenzierungsprotokoll in das durch Streptozotocin-Behandlung induzierte diabetische Mausmodell führte nur bei Zellen des neuen Differenzierungsprotokolls zu einer signifikanten Reduktion der Blutglucosekonzentration in den Bereich nicht-diabetischer Tiere. Bei ES-Zellen, die vor der Implantation mit dem Referenzprotokoll differenziert wurden, blieb eine weitere Reifung in insulinproduzierende Zellen in der in vivo Umgebung aus, während für Zellen des neuen 4-Stadien Differenzierungsprotokolls eine weitere Verstärkung des β -zellähnlichen Charakters gezeigt werden konnte. Ein weiteres Ziel dieses Projekts war die Etablierung eines Sortierungsverfahrens für CK19+ Zellen. Duktaale Zellen, die positiv für den Marker CK19 sind, spielen eine entscheidende Rolle bei der Organogenese des Pankreas. Hieraus ergab sich für die vorliegende Arbeit die Hypothese, dass eine Differenzierung von ES-Zellen in insulinproduzierende β -Zellen über einen intermediären Zelltyp mit duktaalem Charakter erfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass aufgereinigte CK19+ Zellen das Insulingen exprimierten, das Prohormon Proinsulin in Insulin und C-Peptid prozessierten und in der Lage waren, Insulin auf den Stimulus Glucose hin freizusetzen. CK19+ Zellen exprimierten 40mal mehr Insulin und hatten einen 50mal höheren Insulingehalt im Vergleich zu CK19- Zellen. Darüber hinaus zeigten CK19+ Zellen den typischen Phänotyp einer pankreatischen β -Zelle mit einem ausgeprägten Differenzierungsstatus und Insulin-Granula im Zytoplasma. Die Tatsache, dass diese Zellen positiv für Insulin und CK19 waren, unterstützt die These, dass der duktaale Zelltyp für die Organogenese von β -Zellen während der Embryonalentwicklung verantwortlich ist. Daher repräsentieren diese Zellen einen endokrinen Progenitorzelltyp, mit phänotypischen und genetischen Merkmalen einer insulinsezernierenden Zelle, die als mögliche Surrogatzellen in der Zellersatztherapie des Diabetes mellitus genutzt werden können.

■ Projektleitung: Naujok, Ortwin (Dr.) Mitarbeiter: Francini, Flavio (Dr.); Jörns, Anne (Prof. Dr.); Lenzen, Sigurd (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Bailey, Clifford (Prof. Dr.); Picton, Sally (Dr.), University of Birmingham; Förderung: DFG (REBIRTH)

Weitere Forschungsprojekte

Mechanismen der Betazell-Toxizität von proinflammatorischen Zytokinen und die Bedeutung von freien Radikalen für die Zytokintoxizität im Typ 1 Diabetes und Mechanismen der Zytoprotektion insulinproduzierender Zellen

■ Projektleitung: Gurgul-Convey, Ewa (Dr.); Mitarbeiter: Kacheva, Stella; Hanzelka, Katarzyna; Lortz, Stephan (Dr.); Mehmeti, Ilir; Jörns, Anne (Prof. Dr.); Lenzen, Sigurd (Prof. Dr.)

Mechanismen der Glucolipotoxizität gegenüber insulinproduzierenden Zellen im Typ 2 Diabetes

■ Projektleitung: Elsner, Matthias (Dr.); Mitarbeiter: Gehrmann, Wiebke, Baltrusch, Simone (Prof. Dr.); Schmitt, Heike, Lenzen, Sigurd (Prof. Dr.)

Mechanismen der Betazell-Toxizität und Diabetogenität von Schilddrüsenhormonen und Glukortikoiden

■ Projektleitung: Jörns, Anne (Prof. Dr.), Lenzen, Sigurd (Prof. Dr.)

Biochemische, molekularmorphologische, immunologische und genetische Charakterisierung der LEW.1AR1/Ztm-iddm Ratte, ein neues Tiermodell des Typ 1 Diabetes mellitus

■ Projektleitung: Jörns, Anne (Prof. Dr.); Mitarbeiter: Arndt, Tanja (Dr.), Taivankhuu, Terbish (Dr.), Elsner, Matthias (Dr.), Lenzen, Sigurd (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Hedrich, Hans-Jürgen (Prof. Dr.), Wedekind, Dirk (Dr.), Bleich, Andre (Prof. Dr.), Institut für Versuchstierkunde der MHH

Posttranslationale Regulation des Glucosesensorenzyms Glucokinase in Beta-Zellen des Pankreas und der Leber

■ Projektleitung: Baltrusch, Simone (Prof. Dr.); Mitarbeiter: Langer, Sara, Schmitt, Heike, Kaminski, Martin, Lenzen, Sigurd (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Agius, Lorraine (Prof. Dr.), Newcastle University, UK, Okar, David (Dr.), University of Minneapolis, Gloyn, Anna (Dr.), Oxford University

Gentherapie des Diabetes mellitus durch Etablierung einer extrapancreatischen Insulin-ersatzproduktion

■ Projektleitung: Elsner, Matthias (Dr.); Mitarbeiter: Jörns, Anne (Prof.); Lenzen, Sigurd (Prof.)

Molekularmorphologische Charakterisierung der Beta-Zellschädigung im humanen Pankreas von Typ 1 und Typ 2 - Diabetikern im Vergleich zu Gesunden

■ Projektleitung: Jörns, Anne (Prof. Dr.); Mitarbeiter: Lenzen, Sigurd (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Becker, Thomas (PD Dr.); Bektas, Hüseyin (Prof. Dr.); Meyer zu Vilsendorf, Andreas (Dr.); Klempnauer, Jürgen (Prof. Dr.), Allgemein-, Viszeral-, und Transplantationschirurgie der MHH und Frühauf, Nils (PD Dr.), Deutsche Stiftung Organtransplantation, Region Nord

Originalpublikationen

Arndt T, Wedekind D, Weiss H, Tiedge M, Lenzen S, Hedrich HJ, Jorns A. Prevention of spontaneous immune-mediated diabetes development in the LEW.1AR1-iddm rat by selective CD8+ T cell transfer is associated with a cytokine shift in the pancreas-draining lymph nodes. *Diabetologia* 2009;52(7):1381-1390

Frerker N, Raber K, Bode F, Skripuletz T, Nave H, Klemann C, Pabst R, Stephan M, Schade J, Brabant G, Wedekind D, Jacobs R, Jorns A, Forssmann U, Straub RH, Johannes S, Hoffmann T, Wagner L, Demuth HU, von Hörsten S. Phenotyping of congenic dipeptidyl peptidase 4 (DP4) deficient

Dark Agouti (DA) rats suggests involvement of DP4 in neuro-, endocrine, and immune functions. *Clin Chem Lab Med* 2009;47(3):275-287

Hatlapatka K, Wienbergen A, Kuhne C, Jorns A, Willenborg M, Rustenbeck I. Selective enhancement of nutrient-induced insulin secretion by ATP-sensitive K+ channel-blocking imidazolines. *J Pharmacol Exp Ther* 2009;331(3):1033-1041

Mokhtari D, Barbu A, Mehmeti I, Vercamer C, Welsh N. Overexpression of the Nuclear Factor- κ B subunit c-Rel protects against human islet cell death in vitro. *Am*

J Physiol Endocrinol Metab 2009;DOI: 10.1152/ajpendo.00212.2009

Mokhtari D, Kerblom B, Mehmeti I, Wang X, Funa NS, Olerud J, Lenzen S, Welsh N, Welsh M. Increased Hsp70 expression attenuates cytokine-induced cell death in islets of Langerhans from Shb knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;387(3):553-557

Naujok O, Francini F, Picton S, Bailey CJ, Lenzen S, Jorns A. Changes in gene expression and morphology of mouse embryonic stem cells on differentiation into insulin-producing cells in vitro and in vivo. *Diabetes Metab Res Rev* 2009;25(5):464-476

Roma LP, Bosqueiro JR, Cunha DA, Carneiro EM, Gurgul-Convey E, Lenzen S, Boschero AC, Souza KL. Protection of insulin-producing cells against toxicity of dexamethasone by catalase overexpression. *Free Radic Biol Med* 2009;47(10):1386-1393

Abstracts

2009 wurden 20 Abstracts publiziert.

Diplome

Brix, Anke (Dipl.-Biochemiker): Molekulare Charakterisierung von zur Beta-Zell Dysfunktion führenden Glucokinase-mutanten.

Schröter, Saskia (Dipl.-Biochemiker): Die Expression des Eisentransporters DMT1 in insulin-produzierenden Zellen und seine Regulation durch Hypoxie und proinflammatorische Zytokine.

Wissenschaftspreise

Naujok, Ortwin (Dr. rer. nat.): Förderpreis der Deutschen Diabetes-Gesellschaft