



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 14 019 T2 2006.07.20**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 305 410 B1**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/07 (2006.01)**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 14 019.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB01/03476**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 953 264.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/010346**

(86) PCT-Anmeldetag: **02.08.2001**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **07.02.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.05.2003**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **12.10.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **20.07.2006**

(30) Unionspriorität:

0018808	02.08.2000	GB
0109633	19.04.2001	GB

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(73) Patentinhaber:

Uutech Ltd., Coleraine, Northern Ireland, IE

(72) Erfinder:

**FLATT, Peter Raymond, Co. Antrim BT56 8NR, GB;
McCLENAGHAN, Neville Hugo, Co. Londonderry
BT52 1TZ, GB**

(74) Vertreter:

Grosse, Bockhorni, Schumacher, 81476 München

(54) Bezeichnung: **DURCH ELEKTROFUSION HERGESTELLTE INSULIN-PRODUZIERENDE ZELLINIE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Gegenstand der Erfindung ist die Erzeugung von Zell-Linien, die Insulin absondern. Gegenstand der Erfindung ist spezifischer Insulin erzeugende Zell-Linien, die von menschlichen pankreatischen Inselzellen abstammen.

[0002] Die begrenzte Bereitstellung von menschlichen Inseln und arbeitsintensive Verfahren für ihre Isolierung zugleich mit der merklichen funktionellen Variabilität sind inhärente Probleme, die zu einem großen Maße die Zahl der auszuführenden biochemischen Studien und Studien zur Inseltransplantation einschränken. Eine Generation von menschlichen pankreatischen B-Zell-Linien würde zum ersten Mal eine so gut wie unbeschränkte Versorgung mit reinen, Insulin absondernden Zellen, die mit einem Minimum an Aufwand gezüchtet und geerntet werden können, bereitstellen. Solche menschlichen Zell-Linien wären äußerst nützlich bei Studien zur Biologie der pankreatischen B-Zelle. Weiterhin wären solche menschlichen Zell-Linien ansprechende Alternativen zur Verwendung von primärem Gewebe in Zelltransplantationstherapien für Typ-1-Diabetes.

[0003] Eine große Anzahl an Insulinoma-Zell-Linien von Nagetieren wurde entwickelt. Die meisten stammen von transgenen Tieren, die das SV-40-Antigen-Onkogen vom Insulinom-Genpromoter exprimieren (Efrat et al., 1988; Hanahan, 1985; Santere et al., 1981). Die meisten der Zell-Linien, die durch diese Verfahren hergestellt wurden, zeigen inhärente Defekte, einschließlich Instabilität und Ausbleiben einer Reaktion auf physiologische Stimulatoren der Absonderung von Insulin (Efrat et al., 1996). Jedoch waren neueste Studien im Duplizieren vieler der Eigenschaften von vollständig differenzierten pankreatischen B-Zellen erfolgreich (Knaack et al., 1994). Beispielsweise wurde gezeigt, dass eine murine Zell-Linie von einer transgenen Maus, in die ein Insulin-Promoter-SV-40-Antigen unter der Kontrolle des durch Tetrazyklin induzierbaren Systems eingebracht wurde, Hyperglykämie in einem Maus-Diabetes-Modell rückgängig machte (Efrat et al., 1995). Diese Experimente zeigten deutlich das Potenzial von pankreatischen B-Zell-Linien für die Zelltransplantation und die Gentherapie von Diabetes (Efrat, 1998).

[0004] Menschliche Insulin erzeugende Zell-Linien wären aus einer Anzahl von Gründen ein viel erstrebenswerteres Modell im Gegensatz zu Nagetier-Zell-Linien. Für die klinische Transplantation besteht ein Hauptvorteil der menschlichen Zellen gegenüber denen von anderen Spezies darin, dass da nicht das Hindernis der Heterotransplantation überwunden werden muss (Cooper et al., 1994). Allogene Transplantate sind, im Vergleich zu xenogenen Transplantaten, viel leichter vor Immunabstoßung geschützt. Eine hyperakute Abstoßung von xenogenen Transplantaten wird durch die Erkennung von Kohlenhydrat-Antigenen der Zelloberfläche durch natürlich vorkommende Antikörper verursacht (Cooper et al., 1994). Xenogene Transplantate haben auch zahlreiche ethische Bedenken und Sicherheitsbedenken aufgeworfen, einschließlich der Einbringung von unbekannten Tierpathogenen in die menschliche Population. Eine andere Sorge ist, dass immunogene Peptide, die von den xenogenen Transplantaten abgestoßen werden, Immunreaktionen hervorrufen können, die in einer Kreuzreaktivität gegen die Proteine des Empfängers resultieren könnten, damit potenziell neue Autoimmunantworten auslösend (Efrat, 1998). Ein anderer Vorteil der menschlichen pankreatischen B-Zellen ist, dass sie wahrscheinlich verträglicher in der menschlichen physiologischen Umgebung sind, im Vergleich zu den meisten tierischen B-Zellen. Darüber hinaus unterscheiden sich menschliche endokrine Zellen in einigen ihrer biologischen Eigenschaften von anderen Spezies. Beispielsweise wurde gezeigt, dass der Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) ein wirksames Mitogen für menschliche pankreatische B-Zellen ist, während es in der Maus relativ inaktiv ist (Hayek et al., 1995; Otonkoski et al., 1994).

[0005] Trotz des überwältigenden Anstoßes zur Erzeugung von menschlichen Insulin absondernden Zell-Linien ist es erwiesen, dass es außerordentlich schwierig ist, solche Zell-Linien von menschlicher, pankreatischer endokriner Abstammung herzustellen, im Vergleich zu Nagetieren (Efrat et al., 1996; Wang et al., 1997). Eine menschliche Insulinoma-Zell-Linie wurde aus einem spontanen Insulinom entwickelt, doch es wächst offensichtlich langsam und hat viele differenzierte Charakteristiken verloren (Gueli et al., 1987). Andere Forscher haben Versuche unternommen, menschliche fetale oder adulte pankreatische B-Zellen durch Transfektion mit Onkogenen zu immortalisieren (Wang et al., 1997). Jedoch wurde dieser Ansatz durch die Unfähigkeit solcher Zellen, die Exprimierung von Insulin fortzuführen und durch ihre begrenzten in vitro-Wachstumsraten zunichte gemacht (Wang et al., 1997).

[0006] Es ist ein erfindungsgemäßes Ziel, eine menschliche pankreatische Zell-Linie bereitzustellen, die zur Absonderung von Insulin fähig ist.

[0007] Erfindungsgemäß wird eine menschliche pankreatische Zell-Linie bereitgestellt, die durch Elektrofusion von normalen menschlichen Inselzellen mit unsterblichen menschlichen Zell-Linien erzeugt wurde, wobei

die menschliche pankreatische Zell-Linie zur Absonderung von Insulin fähig ist.

[0008] Typische Zell-Linien, die zur Absonderung von Insulin fähig sind, werden aus der Gruppe der Zell-Linien ausgewählt, bestehend aus der Zell-Linie, die unter der Zugangsnr. 00112811 bei der Europäischen Sammlung von Zellkulturen (ECACC), CAMR, Salisbury, Wiltshire am 28. November 2000 hinterlegt wurde, und den Zell-Linien, die unter den Zugangsnr. PTA 3523, PTA 3524 und PTA 3525 bei der American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20100–2209, USA am 17. Juli 2001 hinterlegt wurden.

[0009] Die Erfindung stellt auch ein Verfahren für die Herstellung von menschlichen pankreatischen Zell-Linien bereit, die zur Absonderung von Insulin fähig sind, das Verfahren schließt die Schritte der Elektrofusion einer Mischung aus normalen menschlichen Inselzellen mit Zellen von mindestens einer unsterblichen menschlichen Zell-Linie und der Inkubation der Mischung zur Bildung von Hybridzellen, die zur Absonderung von Insulin fähig sind, ein.

[0010] Bevorzugt werden die menschlichen Inselzellen und die unsterblichen menschlichen Zellen in einem ungefähren Verhältnis von 1:1 gemischt.

[0011] Bevorzugt erfolgt die Elektrofusion in einer Helixkammer.

[0012] Bevorzugt umfasst der Elektrofusionsschritt das Exponieren der Zellen gegenüber einer ersten Pulsphase eines Wechselstromfelds, einer zweiten Pulsphase eines Direktstromfelds oder Gleichstromfelds und einer dritten Pulsphase eines Wechselstromfelds.

[0013] Die erste Pulsphase kann zwischen 5 bis 10 V, bevorzugt 7 V, 2 MHz eines Wechselstromfelds für zwischen 20–40, bevorzugt 30 Sekunden, beinhalten.

[0014] Die zweite Pulsphase beinhaltet üblicherweise 40–80 V, bevorzugt 60 V, Dreifachpulse eines Gleichstromfelds, wobei jeder der Dreifachpulse 10–20, bevorzugt 15 Sekunden dauert.

[0015] Die dritte Pulsphase beinhaltet üblicherweise 5–10 V, bevorzugt 7 V, 2 MHz eines Wechselstromfelds für 20–40, bevorzugt 30 Sekunden.

[0016] Die Medien, in denen die Zellen üblicherweise inkubiert werden, umfassen Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin.

[0017] Hypoxanthin liegt üblicherweise in den Inkubationsmedien bei einer Konzentration von zwischen 0,05 µmol/l bis 0,5 µmol/l vor.

[0018] Aminopterin liegt üblicherweise in den Inkubationsmedien bei einer Konzentration von zwischen 0,2–0,6 µmol/l vor.

[0019] Thymidin liegt üblicherweise in den Inkubationsmedien bei einer Konzentration von zwischen 1020 µmol/l vor.

[0020] Die Inkubation kann in Anwesenheit von mindestens einem Sekretagogum, das aus der Gruppe umfassend Glucose, Glyceraldehyd, Arginin, Leucin und Alanin ausgewählt wurde, durchgeführt werden.

[0021] Die Inkubation kann in Anwesenheit von mindestens einer Substanz, die aus der Gruppe umfassend KCl, IBMX, Thioglucose, Tolbutamid, Diazoxid und Verapamil ausgewählt wurde, durchgeführt werden.

[0022] Eine durch das erfindungsgemäße Verfahren erzeugte Zell-Linie kann, so wirksam wie normale pankreatische B-Zellen, Glucosetransportcharakteristiken vorzeigen.

[0023] Eine durch das erfindungsgemäße Verfahren erzeugte Zell-Linie kann, entsprechend normalen pankreatischen Zellen, Glucosephosphorylierungsaktivität vorzeigen.

[0024] Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung von Insulin erzeugenden Zellen, die durch das erfindungsgemäße Verfahren erzeugt wurden, zur Bereitstellung einer Gentherapie für Typ-1-Diabetes.

[0025] Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung von Insulin erzeugenden Zellen, die durch das Verfahren erzeugt wurden, bei der Zubereitung eines Medikaments zur Behandlung von Diabetes.

[0026] Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung einer erfindungsgemäßen Zell-Linie bei der Zubereitung eines Medikaments zur Behandlung von Diabetes.

[0027] Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung einer erfindungsgemäßen Zell-Linie für die Erzeugung von Insulin.

[0028] Gegenstand der Erfindung sind auch die Zellen oder Materialien, die von den hierin offenbarten Zell-Linien abstammen, und die Verwendungen dieser.

[0029] Es wird erfindungsgemäß auch ein Verfahren für die Herstellung von menschlichen pankreatischen Zell-Linien, die zur Absonderung von Insulin fähig sind, bereitgestellt, das Verfahren schließt den Schritt des Elektrofusionierens normaler menschlicher Inselzellen mit unsterblichen menschlichen Zell-Linien zur Herstellung von Hybridzellen, die zur Exprimierung von Merkmalen normaler pankreatischer B-Zellen fähig sind, ein.

[0030] Es werden somit erfindungsgemäß menschliche pankreatische Zell-Linien, die zur Absonderung von Insulin fähig sind und durch ein Verfahren des Elektrofusionierens erzeugt wurden, bereitgestellt.

[0031] In den Beispielen wird sich auf die mit vorstehenden Zugangsnummern bezeichneten Zell-Linien mit internen Referenznummern bezogen. Diese sind Folgende:

Zugangsnr.	Interne Referenznr.
00112811	1.1B4
PTA 3523	1.1E7
PTA 3524	1.2B4
PTA 3525	1.4E7

[0032] Eine Anzahl an erfindungsgemäßen Ausführungsformen wird nun lediglich als Beispiel beschrieben. Unter Bezugnahme auf die folgenden begleitenden Abbildungen:

[0033] [Abb. 1](#) zeigt typische Schritte, die in der Erzeugung von menschlichen, Insulin absondernden pankreatischen B-Zell-Linien durch Elektrofusion enthalten sind.

[0034] [Abb. 2](#) stellt das Insulin dar, das in das Medium in den letzten 24 Stunden durch Zellhybride (Azaguanin-resistent), die aus der Elektrofusion von menschlichen Inselzellen mit TRM-1-Zellen nach 40 Tagen Züchtung resultieren, freigesetzt wurde, die Kontrollwerte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler ($n = 6$), die anderen Werte sind Durchschnittswerte aus Doppelbestimmungen, in den Fusionen 1 und 2 wurden die Inselzubereitungen 1 bzw. 2 verwendet.

[0035] [Abb. 3](#) stellt das Insulin dar, das in das Medium in den letzten 24 Stunden durch Zellhybride (Azaguanin-resistent), die aus der Elektrofusion von menschlichen Inselzellen mit PANC-1-Zellen nach 25 Tagen Züchtung resultieren, freigesetzt wurde, die Zellen in A wurden aufgrund des hohen Insulin-Ausstoßes zur Klonierung ausgewählt, die Zellen in B, Klon 1.1B4 und 1.1E7 wurden aufgrund des Insulin-Ausstoßes zur weiteren Bewertung ausgewählt, die Kontrollwerte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler ($n = 6$), die anderen Werte sind Durchschnittswerte aus Doppelbestimmungen, in der Fusion 1 wurde die Inselzubereitung 1 verwendet.

[0036] [Abb. 4](#) stellt das Insulin dar, das in das Medium in den letzten 24 Stunden durch Zellhybride (Azaguanin-resistent), die aus der Elektrofusion von menschlichen Inselzellen mit PANC-1-Zellen nach 30 Tagen Züchtung resultieren, freigesetzt wurde, die Zellen im Well B wurden aufgrund des hohen Insulin-Ausstoßes zur Klonierung ausgewählt, der (B)-Klon 1.1E7 wurde zur weiteren Bewertung ausgewählt, die Kontrollwerte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler ($n = 6$), die anderen Werte sind Durchschnittswerte aus Doppelbestimmungen, in den Fusionen wurde die Inselzubereitung 3 verwendet.

[0037] [Abb. 5](#) stellt das Insulin dar, das in das Medium in den letzten 24 Stunden durch Zellhybride (Azaguanin-resistent), die aus der Elektrofusion von menschlichen Inselzellen mit Hup-T₃-1-Zellen nach 30 Tagen Züchtung resultieren, freigesetzt wurde, die Zellen im Well C wurden aufgrund des hohen Insulin-Ausstoßes zur Klonierung ausgewählt, der (B)-Klon 1.2B4 wurde zur weiteren Bewertung ausgewählt, die Kontrollwerte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (n = 6), die anderen Werte sind Durchschnittswerte aus Doppelbestimmungen, in der Fusion wurde die Inselzubereitung 3 verwendet.

[0038] [Abb. 6](#) zeigt (A) die Morphologie von PANC-1-Zell-Linien und (B) die Morphologie der von menschlichen Inseln stammenden 1.1B4-Zell-Linien unter Verwendung von Phasenkontrastmikroskopie (200-fache Vergrößerung).

[0039] [Abb. 7](#) zeigt (A) die Morphologie der von menschlichen Inseln stammenden 1.1E7-Zell-Linie und (B) die 1.4E7-Zell-Linie unter Verwendung von Phasenkontrastmikroskopie (200-fache Vergrößerung).

[0040] [Abb. 8](#) zeigt (A) die Morphologie der Hup-T₃-Zell-Linie und (B) die von menschlichen Inseln stammende 1.2B4-Zell-Linie unter Verwendung von Phasenkontrastmikroskopie (200-fache Vergrößerung).

[0041] [Abb. 9](#) stellt den zellulären Insulin-Gehalt von Zell-Linien, die von menschlichen Inseln abstammen, an verschiedenen Abschnitten dar, die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (n = 8), es lagen keine signifikanten Unterschiede im Insulin-Gehalt zwischen den Zell-Linien oder den ansteigenden Abschnittsnummern vor.

[0042] [Abb. 10](#) stellt die Glucose-Empfindlichkeit der von menschlichen Inseln stammenden 1.1B4- (A), 1.1E7- (B), 1.4E7- (C) und 1.2B4-(D) Zellen dar, 40 Minuten Vorinkubation folgend, wurden die Wirkungen der verschiedenen Glucose-Konzentrationen während Inkubationen von 60 Minuten getestet, die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (n = 12), *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 im Vergleich zu 0 mM Glucose.

[0043] Abbildung 11 stellt das freigesetzte Insulin aus den von menschlichen Inseln stammenden Klonen in 1,1 mM Glucose als % des zellulären Insulin-Gehalts dar, 40 Minuten Vorinkubation folgend, wurden die Wirkungen von 1,1 mM Glucose während einer Inkubation von 60 Minuten getestet, die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (n = 12).

[0044] [Abb. 12](#) stellt die Glucose-Empfindlichkeit der von menschlichen Inseln stammenden 1.1B4- (A), 1.1E7- (B), 1.4E7- (C) und 1.2B4-(D) Zellen in Anwesenheit von IBMX (200 μ M) dar, 40 Minuten Vorinkubation folgend, wurden die Wirkungen von verschiedenen Glucose in Anwesenheit von IBMX (200 μ M) während Inkubationen von 60 Minuten getestet, die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (n = 12), *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 im Vergleich zu 0 mM Glucose in Anwesenheit von 200 μ M IBMX).

[0045] [Abb. 13](#) stellt die Wirkungen von IBMX (200 μ M) auf die Glucose-Empfindlichkeit der von menschlichen Inseln stammenden 1.1B4-Zellen dar, 40 Minuten Vorinkubation folgend, wurde die Absonderung von Insulin nach Inkubationen von 60 Minuten in Anwesenheit der angezeigten Sekretagoga gemessen, die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (n = 12), $\Delta\Delta\Delta p$ < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle bei derselben Glucose-Konzentration.

[0046] [Abb. 14](#) stellt die Wirkungen von IBMX (200 μ M) auf die Glucose-Empfindlichkeit der von menschlichen Inseln stammenden 1.1E7-Zellen dar, 40 Minuten Vorinkubation folgend, wurde die Absonderung von Insulin nach Inkubationen von 60 Minuten in Anwesenheit der angezeigten Sekretagoga gemessen, die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (n = 12), $\Delta\Delta\Delta p$ < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle bei derselben Glucose-Konzentration.

[0047] [Abb. 15](#) stellt die Wirkungen von IBMX (200 μ M) auf die Glucose-Empfindlichkeit der von menschlichen Inseln stammenden 1.4E7-Zellen dar, 40 Minuten Vorinkubation folgend, wurde die Absonderung von Insulin nach Inkubationen von 60 Minuten in Anwesenheit der angezeigten Sekretagoga gemessen, die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (n = 12), Δp < 0,05, $\Delta\Delta\Delta p$ < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle bei derselben Glucose-Konzentration.

[0048] [Abb. 16](#) stellt die Wirkungen von IBMX (200 μ M) auf die Glucose-Empfindlichkeit der von menschlichen Inseln stammenden 1.2B4-Zellen dar, 40 Minuten Vorinkubation folgend, wurde die Absonderung von Insulin nach Inkubationen von 60 Minuten in Anwesenheit der angezeigten Sekretagoga gemessen, die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (n = 12).

[0049] [Abb. 17](#) stellt die Glucose-Empfindlichkeit der von menschlichen Inseln stammenden 1.1B4- (A), 1.1E7- (B), 1.4E7- (C) und 1.2B4-Zellen in Anwesenheit von 5-Thiogluco- (2 mM) dar, 40 Minuten Vorinkubation folgend, wurden die Wirkungen verschiedener Glucose-Konzentrationen in Anwesenheit von 5-Thiogluco- (2 mM) während Inkubationen von 60 Minuten gemessen, die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler ($n = 12$) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

[0050] [Abb. 18](#) stellt die Wirkungen von 5-Thiogluco- (2 mM) auf die Glucose-Empfindlichkeit der von menschlichen Inseln stammenden 1.1B4-Zellen dar, 40 Minuten Vorinkubation folgend, wurde die Absonderung von Insulin nach Inkubationen von 60 Minuten in Anwesenheit der angezeigten Sekretagoga gemessen, die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler ($n = 12$), $\Delta\Delta p < 0,01$, $\Delta\Delta\Delta p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle bei derselben Glucose-Konzentration.

[0051] [Abb. 19](#) stellt die Wirkungen von 5-Thiogluco- (2 mM) auf die Glucose-Empfindlichkeit der von menschlichen Inseln stammenden 1.1E7-Zellen dar, 40 Minuten Vorinkubation folgend, wurde die Absonderung von Insulin nach Inkubationen von 60 Minuten in Anwesenheit der angezeigten Sekretagoga gemessen, die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler ($n = 12$), $\Delta\Delta\Delta p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle bei derselben Glucose-Konzentration.

[0052] [Abb. 20](#) stellt die Wirkungen von 5-Thiogluco- (2 mM) auf die Glucose-Empfindlichkeit der von menschlichen Inseln stammenden 1.1E7-Zellen dar, 40 Minuten Vorinkubation folgend, wurde die Absonderung von Insulin nach Inkubationen von 60 Minuten in Anwesenheit der angezeigten Sekretagoga gemessen, die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler ($n = 12$), $\Delta p < 0,05$, $\Delta\Delta p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle bei derselben Glucose-Konzentration.

[0053] [Abb. 21](#) stellt die Wirkungen von 5-Thiogluco- (2 mM) auf die Glucose-Empfindlichkeit der von menschlichen Inseln stammenden 1.2B4-Zellen dar, 40 Minuten Vorinkubation folgend, wurde die Absonderung von Insulin nach Inkubationen von 60 Minuten in Anwesenheit der angezeigten Sekretagoga gemessen, die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler ($n = 12$), $\Delta\Delta\Delta p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle bei derselben Glucose-Konzentration.

[0054] [Abb. 22](#) stellt die Wirkungen der bekannten Stimulatoren der pankreatischen B-Zell-Funktion auf die Absonderung von Insulin aus den von menschlichen Inseln stammenden 1.1B4-Zellen bei 5,6 oder 11,1 mM Glucose, Diagramm A bzw. B, dar, 40 Minuten Vorinkubation folgend, wurden die Wirkungen verschiedener Zugaben bei 5,6 (A) oder 11,1 (B) mM Glucose getestet, die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler ($n = 12$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ im Vergleich zu 5,6 (A) oder 11,1 (B) mM Glucose allein.

[0055] [Abb. 23](#) stellt die Wirkungen der bekannten Stimulatoren der pankreatischen B-Zell-Funktion auf die Absonderung von Insulin aus den von menschlichen Inseln stammenden 1.1E7-Zellen bei 5,6 oder 11,1 mM Glucose, Diagramm A bzw. B, dar, 40 Minuten Vorinkubation folgend, wurden die Wirkungen verschiedener Zugaben bei 5,6 (A) oder 11,1 (B) mM Glucose getestet, die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler ($n = 8$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ im Vergleich zu 5,6 (A) oder 11,1 (B) mM Glucose allein.

[0056] [Abb. 24](#) stellt die Wirkungen der bekannten Stimulatoren der pankreatischen B-Zell-Funktion auf die Absonderung von Insulin aus den von menschlichen Inseln stammenden 1.1E7-Zellen bei 5,6 oder 11,1 mM Glucose, Diagramm A bzw. B, dar, 40 Minuten Vorinkubation folgend, wurden die Wirkungen verschiedener Zugaben bei 5,6 (A) oder 11,1 (B) mM Glucose getestet, die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler ($n = 12$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ im Vergleich zu 5,6 (A) oder 11,1 (B) mM Glucose allein.

[0057] [Abb. 25](#) stellt die Wirkungen der bekannten Stimulatoren der pankreatischen B-Zell-Funktion auf die Absonderung von Insulin aus den von menschlichen Inseln stammenden 1.2B4-Zellen bei 5,6 oder 11,1 mM Glucose, Diagramm A bzw. B, dar, 40 Minuten Vorinkubation folgend, wurden die Wirkungen verschiedener Zugaben bei 5,6 (A) oder 11,1 (B) mM Glucose getestet, die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler ($n = 12$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ im Vergleich zu 5,6 (A) oder 11,1 (B) mM Glucose allein.

[0058] [Abb. 26](#) stellt die Wirkungen der bekannten Stimulatoren der pankreatischen B-Zell-Funktion auf die Absonderung von Insulin aus den von menschlichen Inseln stammenden 1.1B4-, 1.1E7-, 1.4E7- und 1.2B4-Zellen, Diagramm A, B, C bzw. D, dar, 40 Minuten Vorinkubation folgend, wurden die Wirkungen verschiedener Zugaben bei 16,7 mM Glucose während Inkubationen von 60 Minuten getestet, die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler ($n = 12$), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ im Vergleich zu 16,7 mM Glucose allein, die Wirkungen von EGTA wurden in Calcium-freiem Puffer bestimmt.

[0059] [Abb. 27](#) stellt die Wirkungen der Abschnittsnummer auf die Stimulation der Absonderung von Insulin aus den von menschlichen Inseln stammenden, Insulin absondernden Zell-Linien dar, 40 Minuten Vorinkubation folgend, wurden die Wirkungen von verschiedenen Zugaben während einer Inkubationsdauer von 60 Minuten getestet, die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler ($n = 12$), $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ im Vergleich zu 0 mM Glucose, es lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Abschnitten 17 und 40 vor.

[0060] [Abb. 28](#) zeigt eine Western-Blot-Analyse für das GLUT-1-Glucose-Transporterprotein in (A) PANC-1-Zellen und abstammenden, klonierten, menschlichen Inselzellen und (B) Hup-T₃-Zellen und abstammenden, klonierten, menschlichen Inselzellen, worin L für Leber von der Wistar-Ratte steht, die als positive Kontrolle verwendet wurde, und C stellt die parentalen Zellen von PANC-1 bzw. Hup-T₃ dar.

[0061] [Abb. 29](#) zeigt eine Western-Blot-Analyse für das Glucokinase-Protein in (A) PANC-1-Zellen und abstammenden, klonierten, menschlichen Inselzellen und (B) Hup-T₃-Zellen und abstammenden, klonierten, menschlichen Inselzellen, worin L für Leber von der Wistar-Ratte steht, die als positive Kontrolle verwendet wurde, und C stellt die parentalen Zellen von PANC-1 bzw. Hup-T₃ dar.

[0062] [Abb. 30](#) veranschaulicht die Aufnahme von 3-O-Methyl-D-[1-³H]-Glucose durch PANC-1-Zellen oder durch die von menschlichen Inseln stammenden 1.1B4-Zellen bei niedriger und hoher Glucose-Konzentration, die Inkubationen wurden bei 37°C bei 1,1 oder 16,7 mM Glucose für die Dauer von 0 bis 360 Sekunden ausgeführt. Die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler ($n = 3$), $***p < 0,001$ im Vergleich zu PANC-1 bei 16,7 mM Glucose, $\Delta p < 0,05$ im Vergleich zu PANC-1 bei 1,1 mM Glucose.

[0063] [Abb. 31](#) veranschaulicht die Aufnahme von 3-O-Methyl-D-[1-³H]-Glucose durch PANC-1-Zellen oder durch die von menschlichen Inseln stammenden 1.1E7-Zellen bei niedriger und hoher Glucose-Konzentration, die Inkubationen wurden bei 37°C bei 1,1 oder 16,7 mM Glucose für die Dauer von 0 bis 360 Sekunden ausgeführt, die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler ($n = 3$), $***p < 0,001$ im Vergleich zu PANC-1 bei 16,7 mM Glucose.

[0064] [Abb. 32](#) veranschaulicht die Aufnahme von 3-O-Methyl-D-[1-³H]-Glucose durch PANC-1-Zellen oder durch die von menschlichen Inseln stammenden 1.1E7-Zellen bei niedriger und hoher Glucose-Konzentration, die Inkubationen wurden bei 37°C bei 1,1 oder 16,7 mM Glucose für die Dauer von 0 bis 360 Sekunden ausgeführt, die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler ($n = 3$), $*p < 0,05$, $***p < 0,001$ im Vergleich zu PANC-1 bei 16,7 mM Glucose.

[0065] [Abb. 33](#) veranschaulicht die Aufnahme von 3-O-Methyl-D-[1-³H]-Glucose durch Hup-T₃-Zellen oder durch die von menschlichen Inseln stammenden 1.2B4-Zellen bei niedriger und hoher Glucose-Konzentration, die Inkubationen wurden bei 37°C bei 1,1 oder 16,7 mM Glucose für die Dauer von 0 bis 360 Sekunden ausgeführt, die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler ($n = 3$), $*p < 0,01$, $***p < 0,001$ im Vergleich zu Hup-T₃ bei 16,7 mM Glucose.

[0066] [Abb. 34](#) veranschaulicht die Glucosephosphorylierungsaktivitäten der PANC-1-Zellen und der von menschlichen Inseln stammenden 1.1B4-, 1.1E7- und 1.4E7-Zellen, lösliche Zytoplasma-Fractionen wurden spektrophotometrisch zur Bestimmung der relativen Beiträge von Glucokinase und Hexokinase zu den gesamten Glucosephosphorylierungsaktivitäten der Zellen untersucht, die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler ($n = 3$), $*p < 0,01$, $***p < 0,001$ im Vergleich zu PANC-1-Zellen, der prozentuale Beitrag zur gesamten Glucosephosphorylierungsaktivität ist in Klammern angegeben.

[0067] [Abb. 35](#) veranschaulicht die Glucosephosphorylierungsaktivitäten der Hup-T₃-Zellen und der von menschlichen Inseln stammenden 1.2B4-Zellen, lösliche Zytoplasma-Fractionen wurden spektrophotometrisch zur Bestimmung der relativen Beiträge von Glucokinase und Hexokinase zu den gesamten Glucosephosphorylierungsaktivitäten der Zellen untersucht, die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler ($n = 3$), es lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Zell-Typen vor, der prozentuale Beitrag zur gesamten Glucosephosphorylierungsaktivität ist in Klammern angegeben.

[0068] [Abb. 36](#) veranschaulicht die Glucoseoxidation von D-[U-¹⁴C]-Glucose in PANC-1-Zellen und in den von menschlichen Inseln stammenden 1.1B4-, 1.1E7- und 1.4E7-Zellen, die Inkubationen wurden bei 37°C bei verschiedenen Glucose-Konzentrationen ausgeführt, die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler ($n = 3$), $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ im Vergleich zu 1,1 mM Glucose.

[0069] [Abb. 37](#) veranschaulicht die Wirkungen von 5-Thiogluco-
se auf die Glucoseoxidation von D-[U-¹⁴C]-Glucose in PANC-1-Zellen, in den von menschlichen Inseln stammenden 1.1B4-, 1.1E7- und 1.4.E7-Zellen, die Inkubationen wurden bei 37°C bei verschiedenen Glucose-Konzentrationen ausgeführt, die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (n = 3), $\Delta\Delta p < 0,001$ im Vergleich zu derselben Glucose-Konzentration bei Abwesenheit von 5-Thiogluco-
se, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 im Vergleich zu 1,1 mM Glucose bei Abwesenheit von 5-Thiogluco-
se.

[0070] [Abb. 38](#) veranschaulicht die Glucoseverwertung von D-[5-³H]-Glucose in PANC-1-Zellen und in den von menschlichen Inseln stammenden 1.1B4-, 1.1E7- und 1.4.E7-Zellen bei An- oder Abwesenheit von 5-Thiogluco-
se, die Inkubationen wurden bei 37°C bei verschiedenen Glucose-Konzentrationen ausgeführt, die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (n = 3), ***p < 0,001 im Vergleich zu 1,1 mM Glucose bei Abwesenheit von 5-Thiogluco-
se, $\Delta p < 0,05$ im Vergleich zu derselben Glucose-Konzentration bei Abwesenheit von 5-Thiogluco-
se.

[0071] [Abb. 39](#) veranschaulicht die Glucoseoxidation von D-[U-¹⁴C]-Glucose in Hup-T₃-Zellen und in den von menschlichen Inseln stammenden 1.2B4-Zellen, die Inkubationen wurden bei 37°C bei verschiedenen Glucose-Konzentrationen ausgeführt, die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (n = 3), *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 im Vergleich zu 1,1 mM Glucose.

[0072] [Abb. 40](#) veranschaulicht die Wirkungen von 5-Thiogluco-
se auf die Glucoseoxidation von D-[U-¹⁴C]-Glucose in Hup-T₃-Zellen und in den von menschlichen Inseln stammenden 1.2B4-Zellen, die Inkubationen wurden bei 37°C bei verschiedenen Glucose-Konzentrationen ausgeführt, die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (n = 3), $\Delta\Delta p < 0,01$, $\Delta\Delta\Delta p < 0,001$ im Vergleich zu derselben Glucose-Konzentration bei Abwesenheit von 5-Thiogluco-
se, **p < 0,01, ***p < 0,001 im Vergleich zu 1,1 mM Glucose bei Abwesenheit von 5-Thiogluco-
se.

[0073] [Abb. 41](#) veranschaulicht die Glucoseverwertung von D-[5-³H]-Glucose in Hup-T₃-Zellen und in den von menschlichen Inseln stammenden 1.2B4-Zellen bei An- oder Abwesenheit von 5-Thiogluco-
se, die Inkubationen wurden bei 37°C bei verschiedenen Glucose-Konzentrationen ausgeführt, die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (n = 3), ***p < 0,001 im Vergleich zu 1,1 mM Glucose bei Abwesenheit von 5-Thiogluco-
se, $\Delta\Delta\Delta p < 0,001$ im Vergleich zu derselben Glucose-Konzentration bei Abwesenheit von 5-Thiogluco-
se.

[0074] [Abb. 42](#) zeigt die immunzytochemische Färbung für zelluläre Glucokinase (400-fache Vergrößerung).

[0075] [Abb. 43](#) zeigt die immunzytochemische Färbung für zelluläres Insulin (400-fache Vergrößerung).

[0076] [Abb. 44](#) zeigt die immunzytochemische Färbung für zelluläres Insel-Amyloid-Polypeptid (IAPP) (400-fache Vergrößerung).

[0077] [Abb. 45](#) zeigt die immunzytochemische Färbung für zelluläres Glucagon (400-fache Vergrößerung).

[0078] [Abb. 46](#) zeigt die immunzytochemische Färbung für zelluläres Somatostatin (400-fache Vergrößerung).

[0079] [Abb. 47](#) – Tabelle 1: Details zu den menschlichen Insel-Präparaten.

[0080] [Abb. 48](#) – Tabelle 2: Kinetische Daten der Aufnahme von 3-O-Methyl-D-[1-³H]-Glucose von PANC-1, Hup-T₃ und der von menschlichen Inseln stammenden, Insulin absondernden Zell-Linien.

[0081] [Abb. 49](#) – Tabelle 3: Halb-maximale Gleichgewichtszeit der Aufnahme von 3-O-Methyl-D-[1-³H]-Glucose der Kinetik in PANC-1, Hup-T₃ und in den von menschlichen Inseln stammenden, Insulin absondernden Zell-Linien.

[0082] [Abb. 50](#) – Tabelle 4: Relativer metabolischer Fluss durch den Glucoseoxidations-Metabolismus in Hup-T₃, PANC-1 und in den von menschlichen Inseln stammenden, Insulin absondernden Zell-Linien, die in 1,1 oder 16,7 mmol/l Glucose bei Ab- und Anwesenheit von 5-Thiogluco-
se (2 mmol/l) inkubiert wurden.

[0083] [Abb. 51](#) – Tabelle 5: Zusammenfassung der immunzytochemischen Untersuchung der funktionellen Proteine in parentalen und neuen menschlichen Inselzell-Linien.

[0084] [Abb. 52](#) – Tabelle 6: Zusammenfassung der funktionellen Charakteristiken von parentalen und neuen menschlichen Inselzell-Linien.

[0085] [Abb. 53](#) – Tabelle 7: Ergebnisse des Erkennungsprofils von 1.4E7.

[0086] [Abb. 54](#) – Tabelle 8: Ergebnisse des Erkennungsprofils von 1.1E7.

[0087] [Abb. 55](#) – Tabelle 9: Ergebnisse des Erkennungsprofils von 1.1B4.

[0088] [Abb. 56](#) – Tabelle 10: Ergebnisse des Erkennungsprofils von 1.2B4.

[0089] Die folgenden erfindungsgemäßen Ausführungsformen beschreiben die Anwendung von optimierten Elektrofusionsparametern für die Generation der neuen menschlichen, Insulin absondernden Zell-Linien. In detaillierten Studien wird über die Charakteristiken und funktionellen Eigenschaften der erstellten menschlichen pankreatischen B-Zell-Klone berichtet. Menschliche Inseln wurden von Prof. R. Gomis (Barcelona, Spanien) isoliert und in Gewebekulturmedium durch einen Nachtkurier nach Coleraine gesendet. Drei Pankreas von Spendern wurden unter örtlicher ethischer Genehmigung verwendet. Die erste Charge von 400 Inseln von einem 25 Jahre alten, männlichen Spender wurden am 13.6.1997 erhalten. Die zweite Charge von 400 Inseln von einem 30 Jahre alten, männlichen Spender wurden am 17.10.1997 erhalten. Die dritte Charge von 300 Inseln von einem 28 Jahre alten Mann wurden am 3.12.1997 erhalten (Tabelle 1). Die Inseln wurden in einzelne Zellen zerlegt und über Nacht im RPMI-1640-Kulturmedium vor den Elektrofusionsstudien gezüchtet.

[0090] Unsterbliche PANC-1- und Hup-T₃-Zell-Linien wurden vom ACECC am Abschnitt 60 bzw. 52 erhalten. PANC-1 ist eine epitheliale Zell-Linie, die von einem pankreatischen Karzinom duktales Herkunt von einem 56 Jahre alten Mann weißer Abstammung stammt (Lieber et al., 1975). Die Hup-T₃-Zell-Linie ist eine epitheliale Zell-Linie, die von Aszites stammt und einem 66 Jahre alten Mann japanischer Abstammung entnommen wurde (Nishimura et al., 1993). Die unsterblichen, von Inseln stammenden, menschlichen Zellfusionspartner TRM-1, HAP5 und B6 wurden von Prof. Hayek (Kalifornien, USA) zur Verfügung gestellt und haben eine Abschnittsnummer von 8, 15 bzw. 10.

[0091] Die Lebensfähigkeit der Zellen, die aus den drei Präparaten menschlicher Inselzellen hergestellt wurden, wurde durch Trypan-Blau-Ausschluss nach Übernachtskultur bewertet und betrug 67%, 39% bzw. 71% (Tabelle 1). Die Inselzellen wurden dann im Fusionsmedium bei einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml resuspendiert. Die menschlichen pankreatischen Zell-Linien (PANC-1, Hup-T₃, TRM-1, B6 oder HAP6) wurden geerntet, zweimal mit Fusionsmedium gewaschen und im Fusionsmedium bei einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml resuspendiert. Beide Zell-Typen wurden in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und 300 µl der Zellmischung wurden in die Helixkammer pipettiert (Biojet, B. Braun Biotech., Deutschland). Diese Helixkammer wurde so entwickelt, dass sie geradezu identisch mit der Gehäusekammer war, aber unter sterilen Bedingungen arbeitet. Die Helixkammer wurde an das Stromnetz angeschlossen und dann in 7 V, 2 MHz eines Wechselstromfelds für 30 Sekunden exponiert, gefolgt von 60 V, Dreifachpulsen eines Gleichstromfelds von 15 Sekunden Dauer. Die Zellen wurden dann in 7 V, 2 MHz eines Wechselstromfelds für 30 Sekunden als Post-Fusionseinstellung exponiert.

[0092] Die Fusionsmischung wurde dann aus der Helixkammer mit RPMI-1640-Kulturmedium gespült und gleichmäßig in einer 24-Well-Platte verteilt. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. RPMI-1640-Kulturmedium, das mit HAT (0,1 mmol/l Hypoxanthin, 0,4 µmol/l Aminopterin und 16,0 µmol/l Thymidin) ergänzt wurde, wurde nach 24 Stunden Züchtung ausgetauscht und die Zellen wurden in diesem selektiven Medium für eine Dauer von 10 Tagen aufbewahrt. Die Zellfusionsmischung wurde dann im RPMI-1640-Kulturmedium, das mit HT (0,1 mmol/l Hypoxanthin und 16,0 µmol/l Thymidin) ergänzt wurde, gezüchtet und die Zellen wurden in diesem Medium, bis Kolonien von Hybriden unter dem Mikroskop beobachtet wurden, aufbewahrt.

[0093] Kolonien von Hybridzellen traten normalerweise 10 bis 20 Tage nach der Fusion auf, wie unter einem umgekehrten Mikroskop beobachtet wurde. Die Kolonien wurden für weitere 10–20 Tage aufbewahrt bevor das Medium für 24 Stunden vor dem Screening ausgetauscht wurde. Eine einzige Screening-Methode wurde zur Selektion von Insulin absondernden Hybridzellen aus der Fusionsmischung verwendet. Um die Insulin-Konzentration in den Proben genau zu bestimmen, wurden Kontrollen aus Kulturmedien allein oder Medien von der 24 Stunden-Kultur der parentalen Zellen angefertigt. Dieser Ansatz ermöglichte die automatische Korrektur für die mögliche Anwesenheit von Insulin oder störenden Substanzen im Kulturmedium.

[0094] Aliquoten von 200 µl Kulturmedium wurden in doppelter Ausführung entfernt und die Insulin-Konzent-

ration, die in dem Kulturmedium freigesetzt wurde, wurde durch den nachstehend beschriebenen Radioimmunassay gemessen. Wells, die Insulin absondernde Hybridzellen enthielten, wurden selektiert und die Zellen von jedem Well wurden geerntet und für den nächsten Screening-Schritt in einer 24-Well-Platte aufgeteilt.

[0095] Die neuen menschlichen, Insulin absondernden Zell-Linien wurden im RPMI-1640-Kulturmedium, das mit 10% (v/v) fetalem Kälberserum und Antibiotika (100 µg/ml Penicillin und 0,1 g/l Streptomycin) ergänzt wurde, gezüchtet. Die Zellen wurden unter Kulturbedingungen (37°C, 5% CO₂ und 95% Luft) aufbewahrt bevor die Zellen für Experimente verwendet wurden. Wo es angebracht war, wurden Zellen kryopreserviert und aufbewahrt.

[0096] Die Zellen wurden mit Hilfe von Trypsin geerntet und dann im Gewebekulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden bei einer Dichte von 5×10^5 Zellen pro Well in einer 6-Well-Platte ausgelegt und es wurde das Anlagern über Nacht in dem Inkubator bei 37°C ermöglicht. Nach dem Entfernen des Gewebekulturmediums wurden die Monoschichten der wachsenden Zellen unter Verwendung eines Phasenkontrastmikroskops (Zeiss, Deutschland) betrachtet und es wurden Bilder mit dem Softwarepaket Imagedok Version 2.0 (Kinetic Imaging Ltd, GB) aufgenommen.

[0097] Die intensiven, statischen Inkubationen bei 37°C wurden unter Verwendung von Monoschichten der Insulin absondernden Zellen ausgeführt. Vierundzwanzig Stunden vor dem Experimentieren wurden die Zellen geerntet und dann im RPMI-1640-Gewebekulturmedium resuspendiert. Ungefähr $2,5 \times 10^5$ Zellen wurden dann in jedes Well der 24-Well-Platten (Iwaki Glass, Japan) ausgelegt. Nach der Züchtung bei 37°C und der Anlagerung der Zellen über Nacht wurde das Kulturmedium entfernt und 1 ml KRBB-Puffer (pH 7,4), der mit 1% (w/v) Rinderserumalbumin (BSA) und 1,1 mmol/l Glucose ergänzt wurde, wurde vorsichtig zu jedem Well gegeben. Die Zellen wurden bei 37°C für 40 Minuten inkubiert, worauf der Puffer entfernt und durch 0,5 ml KRBB-Test-Puffer ersetzt wurde. Der KRBB-Test-Puffer wurde mit 0,5 g/l (w/v) Rinderserumalbumin (BSA) und 1,1 mmol/l Glucose zusammen mit den etablierten Modulatoren der pankreatischen B-Zell-Funktion ergänzt. Nach 60 Minuten Inkubation bei 37°C wurde ein 450 µl-Aliquot des KRBB-Test-Puffers aus jedem Well entnommen, jedes in ein 2 ml-Polypropylen-Reaktionsgefäß (Lip Plastics, England) gegeben und bei 900 U/min für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann von jedem Reaktionsgefäß gesammelt und 200 µl-Aliquote wurden dann bei -20°C für die anschließende Insulin-Bestimmung durch den Radioimmunassay aufbewahrt.

[0098] Nach dem Ernten wurden die Zellen im Gewebekulturmedium resuspendiert, in einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Well ausgelegt und über Nacht wurde die Anlagerung zur Bildung von Monoschichten in den 24-Well-Platten (Iwaki Glass, Japan) ermöglicht. Das Kulturmedium wurde dann vollständig entfernt und es wurden 500 µl Säure-Ethanol-Lösung (1,5% (v/v) HCl, 75% (v/v) Ethanol, 23,5% (v/v) H₂O) zugegeben. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Pasteur-Pipette gespalten und über Nacht bei 4°C inkubiert, worauf sie 5 Minuten bei 900 U/min zentrifugiert wurden. Die Überstände wurden bei -20°C für die anschließende Bestimmung von zellulärem Insulin-Gehalt durch den Radioimmunassay aufbewahrt.

[0099] Das Insulin wurde durch den von Flatt und Bailay (1981) beschriebenen, modifizierten Dextran-Aktivkohle-Radioimmunassay (Albano et al., 1972) gemessen. Ein wirksamer Radioimmunassay-Phosphat-Puffer (40 mmol/l Natriumphosphat-Puffer, pH 7,4, durch 0,5% (w/v) Rinderserumalbumin ergänzt) wurde dazu verwendet, Standards von menschlichem Insulin, den Insulin-Antikörper, ¹²⁵I-markiertes Insulin und die Proben, soweit erforderlich, zu verdünnen. Standards von menschlichem Insulin wurden als 2-fache Serien über einen Bereich von 5,0 ng/ml bis 0,009 ng/ml als Verdünnungen unter Verwendung von „Human Insulin Standard“ (Sigma Chemical, GB) hergestellt. 200 µl des Standards (in dreifacher Ausführung pipettiert) oder die unbekannte Probe (in zweifacher Ausführung pipettiert) wurden/wurde mit 100 µl des Anti-Rinderinsulin-Antiserum vom Meerschweinchen bei einer ungefähren Verdünnung von 1:100 000 gemischt und für 24 Stunden bei 4°C vor der Zugabe von 100 µl ¹²⁵I-Insulin (ungefähr 100 pg) inkubiert. Dieses Antiserum wurde spezifisch wegen seiner großen Affinität zum Standard des menschlichen Insulins ausgewählt.

[0100] Nach weiteren 24 Stunden Inkubation bei 4°C wurde 1 ml einer 5% (w/v)-igen Aktivkohle, die mit 1:10 Dextran T-70 in Natriumphosphat-Puffer (40 mmol/l, pH 7,4) beschichtet war, zu jedem Reaktionsgefäß gegeben. Nach 20 Minuten Inkubation (4°C) wurde jedes Reaktionsgefäß bei 2500 U/min für 20 Minuten (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Radioaktivität des an Aktivkohle gebundenen ¹²⁵I-Insulins wurde unter Verwendung eines Gamma-Zählers (1261 Multigamma Counter, LKB Wallac, Turku, Finnland), der mit einem Computer (Olivetti PCS 286) verbunden war, gemessen. Die zum Antikörper gehörende Zählung (durchschnittliche Gesamtzählung abzüglich der zur Aktivkohle gehörenden Zählung) ist zur Konzentration des Insulins im Standard oder in der unbekannten Probe umgekehrt proportional. Die unbekannte Konzentration

wurde mit Hilfe der Standard-Kurve, die aus dem bekannten Insulin-Standard der Ratte unter Verwendung eines einer Spline-Kurve angepassten Algorithmus ermittelt wurde, bestimmt. Der Assay liefert für den Abfall der zugehörigen Zählung von 10%, 50% und 90% einen Aufschlag von 19 pg/ml, 250 pg/ml bzw. 2,5 pg/ml an menschlichem Insulin.

[0101] Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte unter Verwendung einer modifizierten Version des Verfahrens, das von Bradford (1979) beschrieben wurde. Der Bio-Rad-Proteinassay ist ein Bindungsassay, angezeigt durch Färbung, der auf der differentiellen Absorptionsverschiebung von Coomassie Brilliant Blue G250 unter sauren Bedingungen beruht, die durch verschiedene Konzentrationen an Protein hervorgerufen wird. Das Reagenz des Bio-Rad-Proteinassays wurde mit destilliertem Wasser und Eisessig in einem Verhältnis von jeweils 4:5:1 verdünnt. Vor der Verwendung wurde diese Mischung dann durch einen Filter (Whatman, Sorte Nr. 1) filtriert. Bekannte Standards wurden im Bereich von 1–20 µg/µl Rinderserumalbumin in destilliertem Wasser zubereitet. Das Reagenz (200 µl) und die 25 µl-Probe (Standardprotein- oder unbekannte Probe) wurden dann durch behutsames Bewegen der Mikrotiterplatte mehrere Male gemischt. Nach einer Dauer von 30 Minuten wurde die Absorption bei 595 nm an einem Analysengerät für Mikrotiterplatten (Thermo, GB) gemessen. Bei jeder Ausführung des Assays wurde eine Standardkurve aus dem BSA-Standard ermittelt und die Proteinkonzentration der Probe bestimmt.

[0102] Die Zell-Linien (parentale und klonierte) wurden geerntet (ungefähr 5×10^7 Zellen pro Ansatz) und in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4, resuspendiert. Nach 6 Behandlungen mit Ultraschall (10 Sekunden/Behandlung) unter Verwendung von Soniprep 150 (MSE, GB) wurden die Zelllysate für 10 Minuten bei 10 000 U/min (Beckman Ultrazentrifuge, USA) zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und eine weitere Stunde bei 45 000 U/min zentrifugiert. Die erhaltenen Membranpellets wurden in PBS resuspendiert und die Membranprotein-Konzentration mit Hilfe des vorstehend beschriebenen Bio-Rad-Assays gemessen.

[0103] Die Insulin absondernden Zellen wurden geerntet (ungefähr 4×10^7 Zellen pro Ansatz) und in eiskaltem Ultraschallmedium (20 mmol/l Hepes, 210 mmol/l Mannitol, 70 mmol/l Saccharose, auf pH 7,4 unter Verwendung von KOH eingestellt, ergänzt durch 1 mmol/l Dithiothreitol und 5% Glycerol) resuspendiert. Die Zellen wurden dann für 30 Sekunden bei 4°C mit Ultraschall (Soniprep 150, MSE, GB) behandelt. Eine lösliche Zytoplasma-Fraktion wurde durch drei aufeinanderfolgende Zentrifugierungsschritte bei 5000 U/min, 10 000 U/min bzw. 45 000 U/min bei 4°C erhalten (Lenzen et al., 1985). Die Glucokinase-Proteinkonzentration wurde durch den vorstehend beschriebenen Bio-Rad-Assay gemessen. Die Enzymaktivität für die Glucosephosphorylierung wurde unter Verwendung des UV/VIS-Spektrophotometers Varian Cary 1 (Philips, GB) durch die Erfassung der Bildung von NADPH gemessen. Die Glucosephosphorylierungsraten in den durch 45 000 U/min erhaltenen, löslichen Zytoplasma-Fraktionen wurden bei 37°C (pH 7,4) durch die Erfassung der Erhöhung der Absorption bei 340 nm in einer 500 µl-Mischung, die 20 mmol/l Hepes (mit KOH auf pH 7,4 eingestellt), 125 mmol/l KCl, 7,5 mmol/l MgCl₂, 5 mmol/l ATP, 0,5 mmol/l NADP, 700 U/l Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, 10 U/l 6-P-Gluconat-Dehydrogenase zuzüglich dem zytoplasmatischen Überstand (50 µl) aus jedem Aliquot der Zellen enthält, bestimmt. Die Hexokinaseaktivität wurde in Anwesenheit von 1 mmol/l D-Glucose gemessen und von der Gesamtaktivität, die bei 100 mmol/l D-Glucose erfasst wurde, abgezogen, um die Glucokinaseaktivität zu erhalten (Lenzen et al., 1985). Eine Einheit der Enzymaktivität wurde als 1 µmol Glucose-6-phosphat, das aus Glucose und ATP pro Minute bei 37°C gebildet wurde, definiert. Die Proteinbestimmung des zytoplasmatischen Überstands wurde unter Anwendung des vorstehend beschriebenen Bio-Rad-Assays ausgeführt.

[0104] Insulin absondernde Zellen wurden bei einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/Well in 35 mm² Gewebekulturplatten (Nunc, Dänemark) ausgelegt und für 24 Stunden bei 37°C gezüchtet. Die Zellen wurden zweimal schnell in Phosphatgepufferter Kochsalzlösung gewaschen und dann für 30 Minuten bei 37°C in KRBB, das durch 1,1 mmol/l Glucose und 0,1% BSA ergänzt wurde, vorinkubiert. Die Zellen wurden dann mit 0,5 ml KRBB, das durch 3-O-Methyl-D-[1-³H]-Glucose (Amersham Pharmacia, USA) ergänzt wurde, für 0, 5, 10, 20, 60, 120, 240 und 360 Sekunden bei 37°C inkubiert. Es wurden getestete Konzentrationen von 1 µCi/ml 3-O-Methyl-D-[1-³H]-Glucose in KRBB, das 1,1 und 16,7 mmol/l D-Glucose enthält, verwendet. Während der Inkubation wurden die Platten auf einer Heizplatte auf 37°C erwärmt. Die Aufnahme von Tritium durch 3-O-Methyl-D-[1-³H]-Glucose wurde durch 3 schnelle Waschungen unter Verwendung von 0,5 ml eiskaltem KRBB, der 100 mmol/l Glucose enthielt, beendet. Die Zellen wurden dann mit 1 ml 0,5% Natriumdodecylsulfat (SDS) gespült und 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Szintillationsflüssigkeit (3 ml) (HiSafe, BDH) wurde zum Lysat gegeben und es wurde gut gemischt. Die Gefäße wurden 3 Stunden im Dunkeln stehen gelassen, um zu ermöglichen, dass Bläschen zur Oberfläche steigen. Die Zählung der Radioaktivität im Lysat erfolgte durch Flüssigkeitsszintillationszählung (Wallac 1409 Flüssigkeitsszintillationszähler, Finnland).

[0105] Eine abgewandelte Version des Verfahrens, das von Keen et al. (1963) entwickelt wurde, wurde zur Bestimmung des Metabolismus der Glucoseoxidation zu CO₂ verwendet. Grundsätzlich schließt die Methode die Inkubation von Zellen in speziell vorgesehenen Glasbechern, die in den zur Zählung bestimmten Standardgefäßen mit einem luftdichten Gummi-Stopfen aufgehängt werden, ein. Ein Plättchen Filterpapier (Whatman Nr. 1) wurde auf den Boden der zur Zählung bestimmten Gefäße gelegt. Für jede Probe wurden $2,0 \times 10^5$ Zellen in Anwesenheit von 1,1, 5,6, 11,1, 16,7 mmol/l Glucose sowie D-[U-¹⁴C]-Glucose, um eine Endkonzentration von 0,25 µCi (40 µl Gesamtvolumen) zu erreichen, inkubiert. Die Wirkungen von 2 mmol/l 5-Thiogluucose wurden ebenfalls in 1,1 und 16,7 mmol/l Glucose getestet. In den verwendeten Blindproben wurden die Zellen durch KRBB zur Erreichung einer Endkonzentration von entweder 1,1 oder 16,7 mmol/l Glucose ersetzt. Die Standards bestanden aus ¹⁴C-markierter Glucose (0,5 µCi), die zum Filterpapier auf dem Boden der zur Zählung bestimmten Gefäße gegeben wurde. Die Glasgefäße wurden mit Gummi-Kappen verschlossen und für eine Stunde bei 37°C stehen gelassen. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 0,2 M HCl (50 µl) durch direktes Einspritzen mit einer Hamilton-Spritze durch die Gummi-Kappe in den zentralen Behälter abgebrochen. Phenylethylamin (PEA) (100 µl) wurde durch den geschlossenen Deckel auf das Filterpapier am Boden des Gefäßes gegeben. Vorsichtig wurde vermieden, den zentralen Behälter mit PEA zu kontaminieren. Die Gefäße wurden eine Stunde bei 37°C stehen gelassen. Die Gummi-Kappen wurden abgenommen, die zentralen Behälter herausgenommen und 5 ml flüssige Szintillationsflüssigkeit (BDH) wurden zu jedem Gefäß oben auf das Filterpapier gegeben. Die Gefäße wurden mit Kappen verschlossen und die Radioaktivität der ¹⁴C-markierten Glucose durch den Szintillationszähler bestimmt.

[0106] Die Experimente wurden in speziell vorgesehenen Glasbechern, die in den zur Zählung bestimmten Standardgefäßen mit einem luftdichten Gummi-Stopfen aufgehängt wurden, ausgeführt. Für jede Probe wurden $2,0 \times 10^5$ Zellen in Anwesenheit von entweder 1,1, 5,6, 11,1 oder 16,7 mmol/l Glucose sowie D-[5-³H]-Glucose, um eine Endkonzentration von 0,25 µCi (40 µl Gesamtvolumen) zu erreichen, inkubiert. Die Wirkungen von 2 mmol/l 5-Thiogluucose wurden ebenfalls in 1,1 und 16,7 mmol/l Glucose getestet. In den verwendeten Blindproben wurden die Zellen durch KRBB zur Erreichung einer Endkonzentration von entweder 1,1 oder 16,7 mmol/l Glucose ersetzt. Die Standards bestanden aus D-[5-³H]-Glucose (0,5 µCi), die auf den Boden der zur Zählung bestimmten Gefäße gegeben wurde. Die Glasgefäße wurden mit den Gummi-Kappen verschlossen und für eine Stunde bei 37°C stehen gelassen. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 0,2 M HCl (50 µl) durch direktes Einspritzen mit einer Hamilton-Spritze durch die Gummi-Kappe in den zentralen Behälter abgebrochen. Steriles, deionisiertes Wasser (500 µl) wurde durch den verschlossenen Deckel auf den Boden des Gefäßes gegeben. Die Gefäße wurden für eine 15 Stunde [sic] bei 37°C stehen gelassen. Die Gummi-Kappen wurden abgenommen, die zentralen Behälter herausgenommen und 5 ml flüssige Szintillationsflüssigkeit (BDH) wurden zu jedem Gefäß oben auf das Filterpapier gegeben. Die Gefäße wurden mit Kappen verschlossen und die Radioaktivität der ³H-markierten Glucose durch den Szintillationszähler bestimmt.

Herstellung des SDS-PAGE-Gels

[0107] Die folgenden Reagenzien und Puffer wurden bereitgestellt.

Trenngelpuffer	1,5 mmol/l Tris-HCl, pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 mmol/l Tris-HCl, pH 6,8
Elektrodenpuffer	25 mmol/l Tris, 192 mmol/l Glycin und 0,1% (w/v) SDS
Probenpuffer	125 mmol/l Tris-HCl, pH 6,8 enthaltend 4,6% (w/v) Natrium-dodecylsulfat (SDS), 30% (v/v) Glycerol, 0,002% (w/v) Bromphenol-Blau und 10% (v/v) 2β-Mercaptoethanol.
Acrylamid	30% (w/v) Acrylamid

[0108] Eine Mini-Gel-Apparatur mit vertikalen Platten (Bio-Rad) wurde für diese Analyse verwendet. Das Gel wurde in einer Glas-Kassette, die durch eine Acrylglas-Führung in der Gel-Apparatur zusammen gehalten wurde, gegossen. Die Abmessungen des Gels waren 80 mm × 73 mm × 1 mm. Die Vorder- und Rückseiten der Glasplatten wurden mit dem Detergenz Decon gewaschen, mit Leitungswasser und dann mit destilliertem Wasser gespült und schließlich mit Aceton gereinigt und an der Luft getrocknet. Die Kassette wurde zusammengesetzt und in vertikaler Position arretiert.

[0109] Das Trenngel wurde durch Mischen der folgenden Reagenzien in einem 25 ml-Universalgefäß zubereitet: Trenngelpuffer (2,5 ml), destilliertes Wasser (4,2 ml), SDS 10% (w/v) (100 µl), Acrylamid (3,3 ml) und Ammoniumpersulfat 10% (w/v) (50 µl). Die Polymerisation wurde durch die Zugabe von 5 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) ausgelöst. Die Lösung wurde bis zu einer Höhe von 10 cm in die Kassette gegossen. Eine kleine Schicht destilliertes Wasser wurde oben auf die Gellösung gegeben, um eine glatte Grenzfläche zwischen dem Trenn- und dem Sammelgel zu garantieren. Die Polymerisation des Trenngels war nach 60–90 Minuten beendet, worauf die Wasserschicht entfernt wurde.

[0110] Dann wurde das Sammelgel durch Mischen der folgenden Reagenzien in einem 25 ml-Universalgefäß zubereitet: Sammelgelpuffer (1,25 ml), destilliertes Wasser (3,05 ml), SDS 10% (w/v) (50 µl), Acrylamid (670 µl) und Ammoniumpersulfat 10% (w/v) (25 µl). Die Polymerisation wurde durch die Zugabe von 5 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) ausgelöst und das aufzuschichtende Sammelgel in die Kassette auf das Trenngel gegossen. Ein Acrylglas-Kamm wurde in das Sammelgel zur Bildung von Probestaschen eingesetzt und nach ungefähr 30 Minuten war das Gel polymerisiert. Der Gehalt an Protein wurde unter Verwendung des zuvor beschriebenen Bradford-Verfahrens bestimmt. Die Proben (GLUT-1- und Glucokinase-Protein-Zubereitungen) wurden dann zur Denaturierung des Proteins vor dem Laden in die Probestaschen 5 Minuten in einem Wasserbad gekocht. Der Kamm wurde anschließend entfernt, wodurch Probestaschen gebildet wurden, in die die Proteinprobe (100 µg Protein enthaltend) und der biotinylierte Protein-Molekulargewichtsstandard (Amersham, GB) geladen wurden. Die Kassette wurde dann in den Elektrophorese-Tank eingehängt. Der Tank wurde dann zusammengesetzt und der Elektrodenpuffer wurde in das obere und das untere Reservoir gegeben.

[0111] Die Elektrophorese wurde sofort nach dem Laden der Proben bei einem konstanten Strom von 40 mA, 120 V unter Verwendung eines Pharmacia EPS500/400-Netzanschlussgerätes (Pharmacia, USA) ausgeführt bis die Linie vom Bromphenol-Blau zum unteren Rand des unteren Laufgels (Trenngel) gewandert ist, der Strom wurde dann ausgeschaltet. Die Kassette wurde dann aus dem Elektrophorese-Tank herausgenommen und die Glasplatten wurden auseinandergenommen, das Trenngel wurde vom Sammelgel getrennt und für die Übertragung der Proteine auf Nitrozellulose für die Western-Blot-Analyse verwendet.

[0112] Die folgenden Puffer wurden für den Western-Blot und die Detektion zubereitet. Der Transfer-Puffer umfasste Tris (20 mmol/l), Glycin (150 mmol/l) und 15% (v/v) Methanol. Der Wasch-Puffer umfasste Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS), die durch 0,2% (v/v) Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween-20) ergänzt wurde. Der Blocking-Puffer umfasste PBS, die durch Magermilchpulver 2,5% (w/v) ergänzt wurde.

[0113] Für den Western-Blot wurde das Trenngel aus der Kassette entnommen und 30 Minuten in Transfer-Puffer (30 ml) gelegt, um zu ermöglichen, dass der Puffer in das Gel eindringt und den Elektrodenpuffer ersetzt. In dieser Zeit schrumpfte das Gel während es im Transfer-Puffer equilibrierte. Nach der Equilibrierung wurde das Gel entnommen und in die Kassette zum Transfer gelegt. Die Kassette wurde unter Transfer-Puffer vorbereitet und alle Luftblasen wurden durch Rollen eines Reagenzglas aus Glas entfernt.

[0114] Sobald die Kassette vorbereitet war, wurde sie so in den Transfer-Tank eingesetzt, dass sich das Nitrozellulose-Blatt am nächsten zur positiven Elektrode befand. Der Transfer wurde bei einem konstanten Strom von 350 mA, 100 V für 90 Minuten unter Verwendung eines Transblot-Systems von Bio-Rad (Richmond, Kalifornien, USA) nach dem Verfahren von Towbin et al. (1979) ausgeführt. Die Kassette wurde geöffnet und die Nitrozellulose-Membran in 25 ml Blocking-Puffer gelegt und für eine Stunde bewegt, worauf eine Inkubation über Nacht bei 4°C folgte.

[0115] Die Nitrozellulose wurde in PBS-T-Lösung fünfmal für jeweils fünf Minuten gewaschen, worauf die Inkubation für 1 Stunde mit dem primären GLUT-1-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA) oder dem Glucokinase-Antikörper (S. Lenzen, Hannover, Deutschland), verdünnt (1:1000) in PBS, folgte. Die Waschschriffe wurden vor einer einstündigen Inkubation der Membran mit dem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Antikörper (Amersham, GB), verdünnt (1:1000) in PBS, wiederholt. Dann wurden die Membranen gewaschen und für eine Stunde im Streptavidin-HRP (horse radish peroxidase: Meerrettich-Peroxidase)-Konjugat, verdünnt (1:1500) in PBS, inkubiert. Nach letzten Waschschriffen (bestehend aus 3 Waschungen für eine Dauer von 5 Minuten in Wasch-Puffer, gefolgt von 2 Waschungen in PBS allein) wurde das Signal für die Proteinexprimierung unter Verwendung des Detektionssystems der verstärkten Chemilumineszenz (ECL) von Amersham sichtbar gemacht. Im Wesentlichen verwendet dieses System die HRP/H₂O₂-katalysierte Oxidation von Luminol unter basischen Bedingungen in Anwesenheit von chemischen Verstärkern wie z.B. Phenol. Das durch diese verstärkte chemilumineszente Reaktion erzeugte Licht kann durch die kurze Belichtung (30 Sekunden) von Blaulicht-empfindlichem Autoradiographie-Film, Hyperfilm ECL (Amersham, GB) erfasst werden.

[0116] Vor den immunhistochemischen Studien wurde jede Zell-Linie auf „Supercell“-Inkubationsplatten, die 8 getrennte Kunststoff-Kammern pro Platte (BDH/Merck, GB) enthalten, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert, um zu ermöglichen, dass sich die Zellen auf den Platten anlagern. Die Kunststoff-Kammern, die das Gewebekulturmedium enthalten, wurden vorsichtig entfernt und die Platten wurden kurz in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS, Oxoid), vor der Fixierung in eiskaltem 4% Paraformaldehyd (BDH/Merck)/PBS für 20 Minuten, gewaschen. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen in einer Lösung von 0,3% Triton X-100 (Sigma Chemicals) für 15 min permeabilisiert. Nach weiteren Waschungen folgte die Blockierung der Zellen mit 2% normalem Ziegerserum (Vector Laboratories, Kalifornien, USA)/1% BSA/PBS für 90 min bei Raumtemperatur. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (Insulin- und Glucagon-Anti-Porcine-Antisera aus Meerschweinchen von Prof. PR. Flatt, verwendet in einer Verdünnung von 1:1000; Affinitäts-aufgereinigter, polyklonaler Glut-1-Antikörper aus Ziege von Santa Cruz Biotechnology Kalifornien, USA, verwendet in einer Verdünnung von 1:100; menschliche Somatostatin- und Amylin-Antisera aus Kanninchen von Peninsula Laboratories Inc, Belmont, Kalifornien, USA, alle in einer Verdünnung von 1:200 verwendet; polyklonale Glucokinase-Antisera aus Ratte, Geschenk von Prof. Sigurd Lenzen (Hannover, Deutschland), verwendet in einer Verdünnung von 1:1000) wurde 1 Stunde bei 37°C durchgeführt, alle Verdünnungen wurden in 0,2% normalem Ziegerserum/0,1% BSA/PBS hergestellt. Nach gründlichem Waschen in PBS wurden die Zellen mit Fluorescein-Anti-Kanninchen-IgG (H + L), hergestellt in Ziege (Vector Laboratories, Kalifornien, USA), in einer Verdünnung von 1:40 in PBS, für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden 5-mal für jeweils 5 Minuten in PBS gewaschen und unter einem Deckglas aus Glas in einer Lösung von 50% Glycerol (Sigma Chemicals)/50% PBS aufgestellt. Die immunhistochemische Färbung wurde unter Verwendung eines Nikon-OP-S-Mikroskops sichtbar gemacht und es wurden Bilder unter Verwendung des PC Imagedok-Programms aufgenommen.

[0117] Der Ablauf für das Screening ist in [Abb. 1](#) zusammengefasst. Die Hybridzellen, die durch Elektrofusion erzeugt wurden, wurden durch eine Screening-Methode, die auf einem hohen Grad des Insulin-Ausstoßes basiert, selektiert. Grundsätzlich wurde die Zellfusionsmischung für ein Elektrofusionsexperiment in 24 Wells aufgeteilt und die Messung des Insulin-Ausstoßes erfolgte über die letzten 24 Stunden der 30 bis 35 Tage langen Züchtungsdauer. Anfängliche Experimente wurden unter Verwendung der unsterblichen, von Inseln stammenden, menschlichen Zellfusionspartner, TRM-1, HAP5 und B6, von Professor Hayek (Kalifornien, USA) bereitgestellt, ausgeführt. Die Ergebnisse von 2 Fusionsexperimenten zwischen HAT-empfindlichen TRM-1-Zellen und menschlichen Inselzellen sind in [Abb. 2](#) zusammengefasst. Die Post-Fusionsselektion ergab überlebende Zellhybride in 24 Wells, wobei 13 Wells Hybride enthielten, die bei 40 Tagen Insulin absonderten. Die Versuche, die Insulin freisetzenden Hybride zu klonieren, wurden durch die schnell sinkende Wachstumsrate vereitelt, was darauf hindeutet, dass die TRM-1-Zell-Linie nicht völlig unsterblich war. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Verwendung von HAP5- und B6-Zellen erhalten (Daten sind nicht gezeigt), mindestens eine erwartete Ausbeute von ca. 10 menschlichen Hybridzellen pro Fusion darstellend. Zwei Fusionen mit HAP5-Zellen ergaben 12 und 11 Hybride, von denen 4 und 6 bei 12 Tagen Insulin produzierten. Die zwei B6-Zellfusionen ergaben 15 und 13 Hybride, wobei 5 und 3 bei 6 Tagen Insulin freisetzen.

[0118] Im Hinblick auf das Problem mit den anfänglich eingesetzten Fusionspartnern (TRM-1, HAP5 und B6) wurde die Aufmerksamkeit auf die Verwendung von menschlichen pankreatischen Adenokarzinom-Zellen, PANC-1 und Hup-T₃, die von der Europäischen Sammlung von Zellkulturen (ECACC) erhalten wurden, gerichtet. Es wurden HAT-empfindliche Klone und Elektrofusionsparameter für diese Zell-Linien erstellt. Die Screening-Methode, die die Fusion zwischen PANC-1-Zellen und menschlichen Inselzellen einschloss, ergab 5 positive Hybridkolonie-Hybride aus einer Gesamtmenge von 25 Hybridkolonien ([Abb. 1](#), 3A, 4A). Die Zellen aus Well A und B wurden zur weiteren Auswertung ausgewählt. Nach einer Reihe von Klonierungsschritten wurden die Klone 1.1B4, 1.1E7 und 1.4E7 isoliert ([Abb. 3B–4B](#)). Die anderen 16 Insulin freisetzenden Klone wurden kryopreserviert, doch nicht weiter untersucht.

[0119] Die Erzeugung der Zell-Linie 1.1E7 erfolgte durch Fusion der menschlichen Inselzellen mit einer erstellten Zell-Linie PANC-1, 1.1E7, P27, 07052001.

[0120] Die Erzeugung der Zell-Linie 1.4E7 erfolgte durch Fusion der menschlichen Inselzellen mit einer erstellten Zell-Linie PANC-1, 1.4E7 P29, 07112001.

[0121] Ähnliche Screening-Methoden wurden für die Fusion zwischen Hup-T₃-Zell-Linien und menschlichen Inselzellen eingesetzt ([Abb. 1](#)). Das erste Screening nach 30 Tagen zeigte, dass 13 Wells von insgesamt 48 Wells Hybridkolonien enthielten, von denen 4 Insulin-positive Hybride darstellten ([Abb. 5A](#)). Hybridzellen aus dem Well C wurden für eine Reihe von Klonierungsschritten ausgewählt, nach denen der Insulin freisetzende Klon 1.2B4 isoliert wurde ([Abb. 5B](#)). Die anderen 7 Insulin freisetzenden Klone wurden kryopreserviert.

[0122] Die Erzeugung der Zell-Linie 1.2B4 erfolgte durch Fusion der menschlichen Inselzellen mit einer erstellten Zell-Linie Hup-T₃, 1.2B4, P27, 07102001.

[0123] Wie in [Abb. 6–Abb. 8](#) gezeigt wird, wuchsen die parentalen PANC-1-, Hup-T₃- und die abstammenden menschlichen Inselzell-Klone als Monoschichten in der Gewebekultur. Bei Konfluenz zeigte jede Zell-Linie ein „Kopfsteinpflaster“(Pavement)-Muster wie es routinemäßig bei Epitheloidzell-Linien beobachtet wird. Die menschlichen, hybriden Inselzell-Linien zeigten einheitliche Wachstumsmuster mit ungefähren Verdopplungszeiten von $23 \pm 1,7$ Stunden für 1.1B4-Zellen, $23 \pm 1,9$ Stunden für 1.1E7-Zellen, $26 \pm 1,5$ Stunden für 1.4E7-Zellen und $36 \pm 2,1$ Stunden für 1.2B4-Zellen ($n = 4$). Alle die von Inseln stammenden Zell-Linien behielten ihr grobes morphologisches Aussehen und die Verdopplungszeiten am Abschnitt 40 bei. Die ungefähren Verdopplungszeiten von nicht-fusioniertem PANC-1 und Hup-T₃ betrugen $21 \pm 1,6$ bzw. $30 \pm 2,3$ Stunden ($n = 4$).

[0124] Wie in [Abb. 9](#) gezeigt wird, betrug der zelluläre Insulin-Gehalt (Durchschnitt $\pm$ Standardfehler, $n = 12$) der 1.1B4-, 1.1E7-, 1.4E7- und 1.2B4-Zellen am Abschnitt 17 $0,394 \pm 0,019$, $0,354 \pm 0,021$, $0,351 \pm 0,023$ bzw. $0,363 \pm 0,017$ ng/ 10^6 Zellen. Am Abschnitt 40 lag keine signifikante Veränderung im zellulären Insulin-Gehalt jeder Zell-Linie vor. Es wurden Insulin-Gehalte von $0,408 \pm 0,024$, $0,314 \pm 0,018$, $0,361 \pm 0,02$ und $0,306 \pm 0,02$ ng/ 10^6 Zellen für 1.1B4-, 1.1E7-, 1.4E7- bzw. 1.2B4-Zellen beobachtet. PANC-1- und Hup-T₃-Zellen enthielten kein immunreaktives Insulin.

[0125] Die Wirkungen von Glucose auf die Absonderung von Insulin aus jeder der 4 neuen, menschlichen Inselzell-Linien-Zellen sind in [Abb. 10](#) gezeigt. Jede Zell-Linie zeigte ein anderes Muster und Ausmaß der Empfindlichkeit für die Aussetzung gegenüber plötzlich auftretenden Glucose-Konzentrationen. 1.1B4-Zellen zeigten eine schrittweise 2,3-fache Insulin absondernde Reaktion auf die sich erhöhende Glucose-Konzentration über den Bereich von 0 mmol/l bis 16,7 mmol/l Glucose, wobei der Schwellwert für die Freisetzung von Insulin 5,6 mmol/l Glucose betrug. Die beiden 1.1E7- und 1.4E7-Zellen zeigten eine maximale 1,6- und 1,5-fache Insulin-absondernde Reaktion auf Glucose bei 11,1 mmol/l bzw. 5,6 mmol/l Glucose. Im Gegensatz dazu, zeigten die von Hup-T₃ stammenden 1.2B4-Zellen keine signifikante Insulin-Reaktion auf Glucose über den Bereich von 0 mmol/l bis 16,7 mmol/l Glucose.

[0126] Die Freisetzung von Insulin aus menschlichen, von Inseln stammenden Klonen in 1,1 mmol/l Glucose wurde in [Abb. 11](#) als % des zellulären Insulin-Gehalts gezeigt. Die basale Absonderung von Insulin aus jedem der menschlichen, von Inseln stammenden Klone repräsentierte zwischen 9%–11% des zellulären Insulin-Gehalts.

[0127] Die [Abb. 12](#) zeigt die Insulin absondernde Reaktion auf Glucose jeder der vier Zell-Linien in Anwesenheit von Isobutylmethylxanthin (IBMX). Die Einschließung von 200 μ mol/l IBMX im Test-Puffer mit verschiedenen Glucose-Konzentrationen von 0 mmol/l bis 16,7 mmol/l erhöhte die stimulierende Wirkung von Glucose auf die 1.1B4-, 1.1E7- und 1.4E7-Zellen außerordentlich. Wie in [Abb. 13–Abb. 15](#) gezeigt wird, wurde die absondernde Reaktion signifikant um 20 bis 100% auf eine 1,3–2-fache Stimulation ($p < 0,001$) der 1.1B4-, 1.1E7- und 1.4E7-Zellen erhöht. Jedoch wurde die Freisetzung von Insulin aus 1.2B4 durch die Einschließung von IBMX nicht besonders beeinflusst ([Abb. 16](#)).

[0128] Die Wirkungen von 5-Thioglucose auf die akute Glucose-Empfindlichkeit der menschlichen Zell-Linien sind in [Abb. 17](#) gezeigt. Die Empfindlichkeit aller vier Zell-Typen für eine Erhöhung der Glucose-Konzentration wurde durch die Einschließung von 5-Thioglucose im Inkubationspuffer verbessert. Obwohl 5-Thioglucose die stimulierende Wirkung von Glucose nicht zu erhöhen schien, reduzierte sie die basale Freisetzung von Insulin und verursachte eine verallgemeinerte Verschiebung nach rechts in der Glucose-Empfindlichkeit der 1.1B4-, 1.1E7- und 1.2B4-Zell-Linien in Richtung physiologischerer Konzentrationen. Der Vergleich der absoluten Raten der Freisetzung von Insulin deutete an, dass die Einschließung von 5-Thioglucose die Ausstoßung von Insulin aus 1.1B4, 1.1E7 und 1.2B4 um 20–50% ($p < 0,05$ bis $p < 0,001$; [Abb. 18](#), [Abb. 19](#), [Abb. 21](#)) bedeutend erniedrigte. Von den getesteten Zell-Linien wurden die 1.4E7-Zellen am wenigsten von der Einschließung von 5-Thioglucose in den Inkubationen beeinflusst ([Abb. 19](#)).

[0129] Wie in den [Abb. 22–Abb. 25](#) gezeigt wird, wurden die Wirkungen einer Reihe von Nährstoff- und pharmazeutischen Sekretagoga bei zwei verschiedenen Glucose-Konzentrationen (5,6 mmol/l und 11,1 mmol/l) getestet. Jede Zell-Linie zeigte Unterschiede sowohl im Ausmaß als auch im Muster der Empfindlichkeit.

[0130] Die absondernden Reaktionen von 1.1B4-Zellen auf eine Reihe von Modulatoren, die bei 5,6 mmol/l Glucose getestet wurden, sind in [Abb. 22A](#) gezeigt. Alle Stimulatoren, einschließlich Glyceraldehyd, Leucin,

KIC, Arginin, Alanin, Tolbutamid und eine depolarisierende Konzentration von KCl, verursachten eine bedeutende ($p < 0,05$ bis $p < 0,001$) Zunahme der Absonderung von Insulin um das 1,2–2-fache. Wie in der **Abb. 22B** gezeigt wird, verursachte die Erhöhung der Glucose-Konzentration von 5,6 mmol/l auf 11,1 mmol/l eine bedeutende Zunahme ($p < 0,01$ bis $p < 0,001$) der Wirkungen von Leucin, Arginin und Tolbutamid um 30, 17 bzw. 20%.

[0131] Die Insulin absondernden Reaktionen der 1.1E7-Zellen auf die selbe Reihe von Stimulatoren werden in **Abb. 23** gezeigt. Bei 5,6 mmol/l Glucose riefen Glyceraldehyd, Arginin und KCl signifikante 1,2–1,8-fache Insulin absondernde Reaktionen hervor ($p < 0,05$ bis $p < 0,001$; **Abb. 23A**). Jedoch bei der Testung bei der höheren Glucose-Konzentration von 11,1 mmol/l Glucose lösten alle Stimulatoren eine signifikante Erhöhung des Ausstoßes an Insulin aus ($p < 0,05$ bis $p < 0,001$; **Abb. 23B**). Die Reaktionen auf Leucin, KIC, Alanin und Arginin waren bei 11,1 mmol/l bedeutend größer im Vergleich zu ihren Wirkungen bei 5,6 mmol/l Glucose ($p < 0,05$ bis $p < 0,001$).

[0132] Die Insulin absondernden Reaktionen der 1.4E7- und 1.2B4-Zellen auf eine Reihe von Agenzien waren ähnlich (**Abb. 24** und **Abb. 25**). Somit zeigten beide Zell-Linien bei 5,6 mmol/l Glucose signifikante 1,2–1,7-fache Insulin-Reaktionen ($p < 0,05$ bis $p < 0,001$) bei der Testung mit Glyceraldehyd, Arginin, Tolbutamid oder KCl. In Anwesenheit von 11,1 mmol/l Glucose waren die stimulierenden Wirkungen aller getesteten Agenzien bedeutend erhöht ($p < 0,05$ bis $p < 0,001$; **Abb. 24B** und **25B**). Darüber hinaus induzierten die einzelnen Agenzien Leucin, KIC und Alanin die Absonderung von Insulin aus den 1.4E7- und 1.2B4-Zellen bei der Testung der höheren Glucose-Konzentration ($p < 0,05$ bis $p < 0,01$).

[0133] Die Wirkungen des K^+ -ATP-Kanal-Öffners Diazoxid auf die Freisetzung von Insulin aus 1.1B4-, 1.1E7-, 1.4E7- und 1.2B4-Zellen bei 16,7 mmol/l Glucose sind in **Abb. 26** gezeigt. Diazoxid (400 μ mol/l) verursachte eine signifikante Inhibierung von 20–50% der Freisetzung von Insulin aus den Zell-Linien ($p < 0,01$ bis $p < 0,001$).

[0134] Die Einschließung des spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanal(VDCC)-Blockers, Verapamil, inhibierte die Freisetzung von Insulin aus jeder der Zell-Linien auf ähnliche Weise um 20–40% ($p < 0,05$ bis $p < 0,001$) (**Abb. 26**). Zur Bewertung der Bedeutung von extrazellulärem Ca^{2+} für die durch Glucose induzierte Freisetzung von Insulin wurde ein Ca^{2+} -freier Puffer eingesetzt, der durch den Ca^{2+} -Chelatbildner EGTA ergänzt wurde. Wie in der **Abb. 26** gezeigt wird, verursachte die Depletion von Ca^{2+} eine signifikante Erniedrigung der Absonderung von Insulin um 20–40% ($p < 0,01$ bis $p < 0,001$).

[0135] Wie in der **Abb. 27** gezeigt wird, wurden keine bedeutenden Unterschiede zwischen den Abschnitten 17 und 40 in Bezug auf die basale Freisetzung von Insulin und die absondernde Empfindlichkeit für Glucose und KCl erfasst. Alle vier menschlichen, von Inseln stammenden Zell-Linien waren somit fähig, die Empfindlichkeit ($p < 0,05$ bis $p < 0,001$) gegenüber Glucose oder KCl am Abschnitt 40 aufrechtzuerhalten. Wie zuvor gezeigt wurde (**Abb. 9**), war der zelluläre Insulin-Gehalt bei ansteigenden Abschnitts-Nummern stabil.

[0136] In Studien zur Charakterisierung der Absonderung von Insulin wurde eindeutig festgestellt, dass die vier, von der Elektrofusion stammenden, menschlichen Inselzell-Linien viele der bedeutenden funktionellen Merkmale der parentalen B-Zelle exprimieren. Die folgenden Studien liefern eine grundlegende molekulare Charakterisierung der mit der stimulierten Absonderung gekoppelten Pfade in diesen neuen Zell-Linien.

[0137] Die Glucosetransporter-Aktivität wird im Allgemeinen als die erste Voraussetzung für die Wahrnehmung von Glucose in der pankreatischen B-Zelle betrachtet (Tiedge et al., 1993). Die Anwesenheit eines Glucosetransporters (GLUT-1) wurde durch Western-Blot-Analyse bestätigt. Membranpräparate der parentalen Zellen (PANC-1 und Hup-T₃) und der 1.1B4-, 1.1E7-, 1.4E7- und 1.2B4-Zellen wurden der SDS-PAGE-Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines gegen das GLUT-1-Protein empfindlichen Antikörpers unterzogen. Wie in **Abb. 28** gezeigt wird, erfasste der Antikörper ein Protein von ungefähr 48 kDa in jeder Zell-Linie. Jedoch während 1.1B4-, 1.1E7-, 1.4E7- und 1.2B4-Zellen signifikante Mengen an Protein (insbesondere 1.1B4) exprimierten, war der GLUT-1-Transporter nicht in den parentalen PANC-1-Zellen noch in den Hup-T₃-Zellen nachweisbar.

[0138] Nach dem Glucosetransport umfasst der nächste Schritt des Glucose wahrnehmenden Mechanismus in den B-Zellen die Aktivität des Glucose phosphorylierenden Enzyms Glucokinase (Lenzen und Tiedge, 1994). Die Auswertung der Expressierung des Glucokinase-Proteins in den parentalen Zellen und den Hybridzellen unter Verwendung der Western-Blot-Analyse wird in **Abb. 29** gezeigt. Durch die Verwendung eines spezifischen Antikörpers, der sich gegen die Glucokinase richtet, wurde ein Protein von 50 kDa in jeder Zell-Linie

nachgewiesen. Es war keine Expressierung von Glucokinase in den parentalen PANC-1- und Hup-T₃-Zellen nachweisbar.

[0139] Bei der weiteren Analyse des Glucose-empfindlichen Systems wurde versucht, molekulare und funktionelle Aspekte dieser neuen Insulin-absondernden Zell-Linien in Verbindung zu bringen. Der erste Schritt umfasste die Charakterisierung der Glucose-Transport-Kapazität der parentalen Zellen und jeder der Zell-Linien.

[0140] Übereinstimmend mit der Anwesenheit von funktionellem, Membrangebundenem GLUT-1, zeigten die 1.1B4-, 1.1E7- und 1.4E7-Zellen, im Vergleich zu den parentalen Zellen (PANC-1), unterschiedliche Profile des Transports von 3-O-Methyl-D-[1-³H]-Glucose (3-O-MG) bei 1,1 und 16,7 mmol/l ([Abb. 30–Abb. 32](#)). Wie in [Abb. 30–Abb. 32](#) gezeigt wird, war die Glucose-Aufnahme-Kapazität bei 16,7 mmol/l Glucose, im Vergleich zu den parentalen Zellen (PANC-1), bedeutend größer ($p < 0,05$ bis $p < 0,001$). Bei der Testung der Glucose-Aufnahme bei 1,1 mmol/l Glucose wurde, im Vergleich zu PANC-1-Zellen, lediglich für die 1.1B4-Zellen eine bedeutend größere ($p < 0,05$) Glucose-Aufnahme-Kapazität nachgewiesen ([Abb. 30](#)).

[0141] Ein allgemein ähnliches Muster der Profile der Glucose-Aufnahme wurde für die 1.2B4-Zellen erfasst ([Abb. 33](#)). Diese Zell-Linie zeigte, im Vergleich zu den parentalen Zellen (Hup-T₃), unterschiedliche Profile des Transports von 3-O-Methyl-D-[1-³H]-Glucose (3-O-MG). Bei 16,7 mmol/l war die Kapazität der Glucose-Aufnahme in 1.2B4-Zellen bedeutend größer im Vergleich zu den parentalen Zellen (Hup-T₃). Jedoch wurden bei der Testung der Zellen in 1,1 mmol/l 3-O-MG keine bedeutenden Unterschiede festgestellt.

[0142] Die Eigenschaften des Glucose-Transports jeder neuen menschlichen Inselzell-Linie und der parentalen Zellen wurden anhand ihrer Anfangsgeschwindigkeit der Aufnahme von 3-O-MG verglichen. Wie in Tabelle 2 gezeigt wird, zeigte die 1.2B4-Zell-Linie 6,5-fache Zunahmen bei der Anfangsgeschwindigkeit bei 16,7 mmol/l Glucose im Vergleich zu 1,1 mmol/l Glucose. Die parentalen Zellen (Hup-T₃) zeigten eine 5,2-fache Zunahme bei der Geschwindigkeit. In Anwesenheit von 16,7 mmol/l Glucose zeigten die 1.2B4-Zellen eine signifikant ($p < 0,05$) höhere Anfangsgeschwindigkeit bei der Aufnahme im Vergleich zu Hup-T₃-Zell-Linien. Jedoch bei der Betrachtung der Aufnahme von 3-O-MG über 360 Sekunden wurden keine bedeutenden Unterschiede bei der halb-maximalen Gleichgewichtszeit weder in 1,1 noch 16,6 mmol/l 3-O-MG nachgewiesen (Tabelle 2).

[0143] Die Anfangsgeschwindigkeit der Aufnahme von 3-O-MG durch die 1.1B4-, 1.1E7- und 1.4E7-Zellen war bei 16,7 mmol/l 5,1-, 6,1- bzw. 5,4-fach höher als bei 1,1 mmol/l (Tabelle 2). Im Vergleich dazu zeigten PANC-1-Zellen bei 16,7 mmol/l Glucose eine 4,6-fache Zunahme der Anfangsgeschwindigkeit. Sowohl bei 1,1 mmol/l als auch bei 16,7 mmol/l wurden bedeutende Unterschiede bei der Aufnahme von 3-O-MG zwischen PANC-1- und 1.1B4-Zellen innerhalb der ersten 10 Sekunden nachgewiesen. Bei den 1.1E7- und 1.4E7-Zellen wurden lediglich bei 16,7 mmol/l 3-O-MG bedeutende Unterschiede ($p < 0,05$) nachgewiesen. In Bezug auf die halb-maximale Gleichgewichtszeit innerhalb von 360 Sekunden der Messungen zeigte lediglich 1.1B4 einen bedeutenden Unterschied ($p < 0,05$) (Tabelle 3).

[0144] Wie in [Abb. 34](#) und [Abb. 35](#) gezeigt wird, zeigten die parentalen unsterblichen Partner und die menschlichen, hybriden Inselzell-Linien beträchtliche Unterschiede bei der relativen Beteiligung der Glucokinase und Hexokinase an der gesamten Glucosephosphorylierungsaktivität. [Abb. 34](#) zeigt die prozentualen Anteile der Hexokinaseaktivität, die (Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler, $n = 3$) $98,5 \pm 9,3$, $57,4 \pm 4,6$, $57,4 \pm 14,5$ und $72,6 \pm 5,3\%$ der gesamten Aktivität, die von PANC-1-, 1.1 B4-, 1.1 E7- bzw. 1.4E7-Zellen erhalten wurde, darstellen. Für die Hup-T₃- und 1.2B4-Zellen stellte der prozentuale Anteil der Hexokinaseaktivität (Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler, $n = 6$) $45,2 \pm 5,5$ bzw. $63,8 \pm 9,9\%$ dar ([Abb. 35](#)). Die prozentualen Anteile der auf die Glucokinaseaktivität zurückzuführenden Glucosephosphorylierungsaktivitäten von PANC-1-, 1.1B4-, 1.1E7- und 1.4E7-Zellen betrugen $1,5 \pm 0,8$, $42,6 \pm 9,6$, $42,6 \pm 11,3$ bzw. $27,4 \pm 7,0\%$. Für die Hup-T₃-Zellen und die abstammenden klonierten 1.2B4-Zellen betrugen die prozentualen Anteile der Glucokinaseaktivitäten $54,7 \pm 7,4$ bzw. $36,1 \pm 6,4\%$. Alle neuen Zell-Linien, ausgenommen die 1.2B4-Zellen, zeigten eine bedeutend höhere ($p < 0,01$ – $0,001$) Glucokinase und niedrigere ($p < 0,01$ bis $p < 0,001$) Hexokinase (in Prozenten dargestellt) im Vergleich zu PANC-1-Zellen.

[0145] Die Experimente, die zur Bestimmung der Glucose-Menge, die bei Anwesenheit variierender Konzentrationen von Glucose und 5-Thioglucose oxidiert und verwertet wird, durchgeführt wurden, zeigten interessante Unterschiede zwischen den parentalen Zellen und den abstammenden menschlichen Inselzell-Linien.

[0146] Die Zell-Linie 1.1B4 zeigte die höchsten Werte für die Oxidation von Glucose, wobei der Höchstwert bei $95,4 \pm 4,5$ pmol/1000 Zellen/h bei 11,1 mmol/l Glucose lag ([Abb. 36](#)). Bei 16,7 mmol/l ähnelten die Werte der Oxidation von Glucose sehr denen bei 5,6 mmol/l. Die Einschließung von 5-Thioglucose ermöglichte die

Inhibierung der Oxidation von Glucose sowohl bei 1,1 mmol/l als auch bei 16,7 mmol/l Glucose ([Abb. 37](#)). Die Verwertung von Glucose durch diese Zell-Linie entsprach einem etwas anderen Muster, wobei die höchsten Werte für die Verwertung bei $136,5 \pm 1,7$ pmol/1000 Zellen/h für 16,7 mmol/l Glucose nachgewiesen wurden ([Abb. 38](#)). 5-Thioglucose beeinträchtigte die Verwertung bei 1,1 mmol/l Glucose nicht, doch es wurde gezeigt, dass es die Verwertung bei 16,7 mmol/l Glucose verringerte ([Abb. 38](#)).

[0147] Die Oxidation von Glucose durch die Zell-Linie 1.1E7 war bei 16,7 mmol/l Glucose mit einem Wert von $60,4 \pm 5,4$ pmol/1000 Zellen/h maximal ([Abb. 36](#)). Im Gegensatz zu 1.1E7-Zellen inhibierte 5-Thioglucose die Glucoseoxidation in 1.1B4-Zellen nur geringfügig ([Abb. 37](#)). Jedoch wurden die höchsten Werte für die Verwertung von Glucose in dieser Zell-Linie nachgewiesen, $181,9 \pm 15,3$ pmol/1000 Zellen/h bei 16,7 mmol/l Glucose, und wieder wurde die Verwertung durch 5-Thioglucose nur bei 16,7 mmol/l beeinflusst ([Abb. 38](#)).

[0148] Die Zell-Linie 1.4E7 ähnelte 1.1B4, sie zeigte höchste Oxidationswerte bei 11,1 mmol/l Glucose, wobei 5-Thioglucose die Oxidation eindeutig sowohl bei 1,1 als auch bei 16,7 mmol/l Glucose inhibierte ([Abb. 36](#) und [Abb. 37](#)). Die Verwertung von Glucose durch diese Zell-Linie hatte ihre höchsten Werte bei 16,7 mmol/l Glucose und wurde nicht durch die Einschließung von 5-Thioglucose beeinträchtigt ([Abb. 38](#)).

[0149] Die Zell-Linie 1.2B4, die aus parentalem Hup-T₃ kloniert wurde, zeigte eine schlechte Oxidation von Glucose bei allen getesteten Konzentrationen und erreichte lediglich $7,0 \pm 0,9$ pmol/1000 Zellen/h bei 16,7 mmol/l ([Abb. 37](#)). 5-Thioglucose inhibierte die Oxidation bei 16,7 mmol/l ([Abb. 40](#)). Überraschenderweise ähnelten die Glucoseverwertungsraten von 1.2B4 sehr denen der anderen Zell-Linien und erreichten einen Wert von $127,5 \pm 12,8$ pmol/1000 Zellen/h bei 16,7 mmol/l Glucose ([Abb. 41](#)). 5-Thioglucose hatte keinen Einfluss auf die Verwertung von Glucose durch diese Zell-Linie.

[0150] Von den parentalen Zell-Linien waren die Werte der Glucoseoxidation für PANC-1 weit höher als für Hup-T₃. PANC-1-Zellen zeigten bei 11,1 mmol/l Glucose die höchsten Oxidationswerte und signifikante Inhibierung der Oxidation sowohl bei 1,1 als auch bei 16,7 mmol/l. Wie bei den klonierten Abkömmlingszell-Linien war die Glucoseverwertung durch PANC-1 bei 16,7 mmol/l am höchsten – $163,7 \pm 23,5$ pmol/1000 Zellen/h. 5-Thio-D-Glucose war ebenfalls fähig, die Verwertung nur bei dieser Konzentration zu inhibieren. Im Gegensatz dazu ähnelten die Oxidationswerte für Hup-T₃ sehr denen für die Abkömmlingszell-Linie 1.2B4, wobei der höchste Oxidationswert $12,6 \pm 7,2$ pmol/1000 Zellen/h bei 11,1 mmol/l Glucose betrug. In einem gesonderten Experiment war 5-Thioglucose fähig, die Oxidation sowohl bei 1,1 als auch bei 16,7 mmol/l Glucose zu inhibieren. Wieder ähnlich zu 1.2B4 ähnelten die Werte für die Glucoseverwertung denen der anderen Zell-Linien und erreichten einen Höchstwert von $131,2 \pm 13,2$ pmol/1000 Zellen/h bei 16,7 mmol/l Glucose. 5-Thioglucose inhibierte die Verwertung von Glucose in Hup-T₃-Zellen nicht.

[0151] Tabelle 3 zeigt den relativen Fluss des Metabolismus durch den oxidativen Glucose-Metabolismus für die parentalen und jede der abstammenden, menschlichen Inselzell-Linien. Die Bedeutung dieser Tabelle (Verhältnis von Glucoseoxidation:Glucoseverwertung) ist, dass der Glucose-Metabolismus über den oxidativen Weg sehr eng mit der Absonderung von Insulin verbunden ist (Malaisse, 1992). Die Verhältnisse aller Inselzell-Linien waren bedeutend höher als die der parentalen Hup-T₃- oder PANC-1-Zellen (Tabelle 4). Die 1.1B4-, 1.1E7- und 1.4E7-Zellen zeigten eine bedeutende Erhöhung des Verhältnisses bei der Zugabe von 5-Thioglucose.

[0152] Das Glucokinase-Protein wurde in allen 6 untersuchten Zell-Linien nachgewiesen und im Gegensatz zu Insulin, erschien es als punktförmige Fluoreszenzflecke, die im gesamten Zytoplasma verstreut waren ([Abb. 42](#)). Die Anfärbung mit dem Antikörper für dieses Enzym schien zwischen den Zell-Linien in der Intensität zu differieren. Positives Anfärben für Insulin wurde bei einem hohen Grad an Intensität in den Zell-Linien 1.1B4, 1.4E7 und durch eine schwächere Intensität in 1.1E7 und 1.2B4 nachgewiesen ([Abb. 43](#)). Aus den Bildern ist ersichtlich, dass das Insulin-Protein an verschiedenen Stellen überall im Zytoplasma lokalisiert ist und durch Fluoreszenz als diffuse, helle Flecke erscheint. In den parentalen Zell-Linien (PANC-1 und Hup-T₃) zeigten die Zellen des gesamten Bereiches überhaupt keine Färbung für Insulin. Ähnlich der Insulin-Anfärbung erschien das Insel-Amyloid-Polypeptid (IAPP) als helle, im Zytoplasma lokalisierte Flecke. Wieder zeigten alle vier Zell-Linien ein positives Signal für IAPP, wobei in 1.1B4, 1.1E7 und 1.4E7 ein höherer Grad an Färbung beobachtet wurde ([Abb. 44](#)). Es wurde weder eine positive Färbung stärker als der Hintergrund für Glucagon noch für Somatostatin in irgendeiner der getesteten Zell-Linien beobachtet ([Abb. 45](#) und [Abb. 46](#)). Die Charakteristiken der Immunfärbung sind für alle 6 Zell-Linien in Tabelle 5 zusammengefasst.

[0153] Jede beschriebene Ausführungsform beschreibt die Herstellung und Charakterisierung der hybriden, menschlichen, Insulin absondernden Zell-Linien, die durch die Elektrofusionsmethode hergestellt wurden. Die

Fusionen wurden unter Verwendung der unsterblichen PANC-1- oder Hup-T₃-Partnerzellen durchgeführt und resultierten in der Herstellung von 38 Hybriden ([Abb. 1](#)). Von den 27 hergestellten, Insulin absondernden Klonen wurden die ersten vier durch eine Reihe von morphologischen Untersuchungen und Studien zur Absonderung charakterisiert, wobei die Fähigkeit jeder neuen Zell-Linie, auf Glucose und andere Regulatoren der B-Zell-Funktion zu reagieren, analysiert wurde. Die vier neuen, durch Elektrofusion hergestellten und in diesem Abschnitt charakterisierten Zell-Linien werden vorläufig als 1.1B4-, 1.1E7-, 1.4E7- und 1.2B4-Zellen bezeichnet. Versuche, Hybride unter Verwendung von TRM-1, HAP-5 oder B6 als unsterbliche Partnerzellen herzustellen, wurden durch die Unfähigkeit dieser Zellen, die Proliferation in Gewebekultur fortzusetzen, vereitelt.

[0154] Die drei aus PANC-1 gebildeten Zell-Linien (1.1B4, 1.1E7 und 1.4E7) und die durch Elektrofusion mit Hup-T₃-Zellen hergestellte Zell-Linie (1.2B4) wuchsen alle als Monoschichten in Gewebekultur und zeigten bei Konfluenz ein „Kopfsteinpflaster“(Pavement)-Muster, das für epitheliale Zellen charakteristisch ist. Die jeweiligen Verdopplungszeiten betrugen ungefähr $23 \pm 1,7$ Stunden für 1.1B4-Zellen, $23 \pm 1,9$ für 1.1E7-Zellen, $26 \pm 1,5$ Stunden für 1.4E7-Zellen und $36 \pm 2,1$ Stunden für 1.2B4-Zellen ($n = 4$). Diese inhärenten Unterschiede im Wachstumsverhalten bestätigen die Ansicht, dass jede eine einzigartige und neue klonierte Zell-Linie darstellt. Es wurde durch Immunzytochemie gezeigt, dass die vier Zell-Linien Insulin, Glucokinase und IAPP exprimieren. Für Glucagon und Somatostatin wurde keine sichtbare Färbung nachgewiesen.

[0155] Glucose ist ein Hauptregulator für die Absonderung von Insulin aus der pankreatischen B-Zelle (Meglasson und Matschinsky, 1986). Die statische Inkubation der verschiedenen neuen, menschlichen Inselzell-Linien für 60 min mit einer Serie von ansteigenden Glucose-Konzentrationen offenbarte beträchtliche Unterschiede bei der die Absonderung von Insulin betreffenden Empfindlichkeit jeder Zell-Linie. Die 1.1B4-Zellen zeigten ein entsprechenderes schrittweises Muster bei dem Ausstoß von Insulin im Vergleich zu anderen Zell-Linien, wobei der Schwellwert bei 5,6 mmol/l Glucose lag. Die 1E7- und 1.4E7-Zell-Linien zeigten maximale Reaktionen bei 11,1 bzw. 5,6 mmol/l Glucose. Der Abfall des Ausstoßes von Insulin bei höherer Glucose-Konzentration reflektiert möglicherweise die doppelte Wirkung von Glucose, der Erhöhung der Ausstoßung und des Einstroms von Ca^{2+} , wie es für die in den normalen B-Zellen nachweisliche, anfängliche, vorübergehende Inhibitionsphase impliziert wurde (Hellman et al., 1992). Dieses Phänomen wird auch in anderen von Tieren stammenden, Insulin absondernden Zell-Linien, einschließlich HIT-T15, BRIN-BGS und BRIN-BG7 beobachtet (Poitout et al., 1996; McClenaghan et al., 1996b). Im Gegensatz zu den anderen drei, aus der Elektrofusion stammenden, menschlichen Inselzell-Linien wurde unter Standardbedingungen bei der Inkubation in den 1.2B4-Zellen keine signifikante Insulin absondernde Reaktion auf Glucose beobachtet.

[0156] Die Ausstoßung von Insulin durch 1.1B4-, 1.1E7- und 1.4E7-Zellen als Reaktion auf Glucose war in Anwesenheit von 200 $\mu\text{mol/l}$ IBMX bedeutend erhöht. Der Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX erhöhte die Absonderung von Insulin um 20 bis 60% und verschob in 1.1E7-Zellen den Schwellwert auf 5,6 mmol/l Glucose. Die durch IBMX vermittelte Einwirkung weist darauf hin, dass die Zellen IBMX verwerten, um cAMP zu erhöhen und die durch Ca^{2+} vermittelte Freisetzung von Insulin wie in normalen pankreatischen B-Zellen zu ermöglichen (Hellman et al., 1992). Auf gemäßigte Weise erhöhte IBMX auch die Absonderung von Insulin aus den 1.1B4- und 1.4E7-Zellen in Abwesenheit von Glucose. Diese stimulierende Wirkung reflektiert höchstwahrscheinlich die Fähigkeit höherer Konzentrationen von zyklischem AMP zur Stimulierung der Absonderung durch die Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} und die Förderung des Ca^{2+} -Einstroms, wie es auch für die normale pankreatische B-Zelle beobachtet wurde (Hellman et al., 1992). Von Hup-T₃ stammende 1.2B4-Zellen waren gegen IBMX unempfindlich.

[0157] Die Einschließung von 2 mmol/l 5-Thioglucose, einem Glucose-Analogon, das ein wirksamer Inhibitor der Hexokinase ist, verursachte eine Veränderung bei der Reaktion in Bezug auf die Glucose-Insulin-Dosis für jede Zell-Linie. In den 1.1B4-, 1.1E7- und 1.2B4-Zellen waren die Wirkungen signifikant ($p < 0,01$ bis $p < 0,001$) und bestanden aus einer 20 bis 50%igen Verringerung der Absonderung von Insulin bei 0 mmol/l bis 11,1 mmol/l Glucose. Außerdem verursachte die Einschließung von 5-Thioglucose eine Veränderung bei der Empfindlichkeit der 1.1E7-Zellen für Glucose, wobei der Schwellwert der Konzentration für die Stimulierung der Freisetzung von Insulin bei 5,6 mmol/l Glucose lag. In Anwesenheit von 5-Thioglucose wurde die durch Glucose stimulierte Freisetzung von Insulin auch in den von Hup-T₃ stammenden 1.2B4-Zellen offensichtlich. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die vorteilhaften Wirkungen von 5-Thioglucose auf die Absonderung durch die Inhibierung von Hexokinase verursacht werden, wobei ein größerer Anteil des Glucose-Flusses vorliegt, der durch Glucokinase so katalysiert wird, dass die signalisierende Stärke des Glucose-Metabolismus erhöht ist (Hohmeier et al., 1997). Der Ausstoß von Insulin und die Empfindlichkeit gegenüber Glucose wurden in den 1.4E7-Zellen nicht durch 5-Thioglucose beeinflusst.

[0158] Die weitere Charakterisierung jeder Zell-Linie umfasste die Bewertung der insulinotropen Aktivität ei-

ner Anzahl von Aminosäuren, einschließlich der elektrisch neutralen Aminosäuren (L-Alanin, L-Leucin) und der kationischen Aminosäuren (L-Arginin). Obgleich viele Studien zur Aufklärung des Mechanismus der durch Aminosäuren induzierten Absonderung von Insulin (Henquin und Meissner, 1981; Malaisse et al., 1991) durchgeführt wurden, werden die Wirkungen vieler Aminosäuren, einschließlich L-Alanin und Glycin, unzureichend verstanden. Bei der Testung bei einer nicht-stimulierenden (5,6 mmol/l) Glucose-Konzentration stimulierte L-Arginin die Absonderung von Insulin in jeder der menschlichen, von Inseln stammenden Zell-Linien maßgeblich. Signifikante Wirkungen von L-Leucin und L-Alanin auf die Absonderung von Insulin bei 5,6 mmol/l wurden lediglich in den 1.1B4-Zellen beobachtet, was möglicherweise widerspiegelt, dass diese Aminosäuren menschlichen Inselzellen eher als Verstärker als als wirkungsvolle Initiatoren der Freisetzung von Insulin dienen (Yada, 1994).

[0159] Bei der Testung bei 11,1 mmol/l Glucose verursachte jede getestete Aminosäure, Leucin, KIC, Arginin und Alanin, signifikante Steigerungen bei der Freisetzung von Insulin. Dies deutet darauf hin, dass die neuen Zellen jedes der verschiedenen Aminosäure-Transport-Systeme und die zugehörigen Signalerkennungswege besitzen, wie sie für normale pankreatische B-Zellen beschrieben wurden (Hellman et al., 1971; Yada, 1994). Zusätzlich zeigen diese Ergebnisse, dass die getesteten Aminosäuren von stimulierender Glucose für ihre insulinotropen Einwirkungen auf diese neuen menschlichen Inselzellen Gebrauch machen können. Dies bestätigt neuere Beobachtungen, dass Aminosäuren in einer Glucose-abhängigen Weise agieren können und zwar, dass Glucose als ein Treibstoff durch seinen Metabolismus agiert, was die Aufnahme und Verwertung von bestimmten Aminosäuren ermöglichen kann (McClenaghan und Flatt, 1999). Es ist ebenfalls interessant zu bemerken, dass Glyceraldehyd, ein Triose-Zucker, fähig war, die Absonderung von Insulin aus jeder der neuen Zell-Linien wesentlich zu stimulieren. Wie Glucose stimuliert Glyceraldehyd die Freisetzung von Insulin durch seinen glycolytischen Metabolismus und die nachfolgende Bildung von ATP (Halban und Wollheim, 1980). Die Depolarisierung der Plasmamembran durch eine hohe KCl-Konzentration oder die Blockierung des ATP-empfindlichen Kalium(K^+ -ATP)-Kanals mit Glibenclamid oder Tolbutamid verursachten ebenfalls die Freisetzung von Insulin aus den neuen Zell-Linien, wie zuvor bei normalen B-Zellen festgestellt wurde (Kramen et al., 1996).

[0160] Um die Rolle der Glycolyse und von K^+ -ATP-Kanälen bei der Glucose-induzierten Absonderung von Insulin weiter zu untersuchen, wurden die Wirkungen von Diazoxid bewertet. Es ist bekannt, dass dieses Agens K^+ -ATP-Kanäle öffnet und somit zur Repolarisierung der B-Zellmembran und Inhibierung der Freisetzung von Insulin fungiert (Henquin et al., 1992). Wie erwartet reduzierte dieses Agens die Ausstoßung von Insulin aus allen vier Zell-Linien bei 16,7 mmol/l Glucose, was die Bedeutung des K^+ -ATP-Kanals bei der Regulierung der Absonderung von Insulin aus jeder der klonierten B-Zell-Linien aufzeigt.

[0161] Es ist seit vielen Jahren bekannt, dass Ca^{2+} eine bedeutende Rolle bei der durch Nährstoffe induzierten Absonderung von Insulin spielt (Hellman, 1975). Die Bedeutung des Ca^{2+} -Einstroms bei der durch Glucose induzierten Absonderung von Insulin wurde durch ausgeführte Inkubationen bei Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} und mit dem Ca^{2+} -Chelatbildner EGTA aufgezeigt. Die Depletion von Ca^{2+} inhibierte die Absonderung von Insulin aus jeder der vier Zell-Linien bei 16,7 mmol/l Glucose maßgeblich. Die Blockierung der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle (VDCC) unter Verwendung von Verapamil reduzierte die durch Glucose induzierte Absonderung von Insulin in ähnlicher Weise. Diese Ergebnisse zeigen deutlich die Bedeutung von Ca^{2+} und spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen bei der Regulierung der Absonderung von Insulin aus den neuen Hybridzell-Linien. Es ist daher möglich, aus diesen Funktionsstudien zu folgern, dass die Zellen K^+ -ATP-Kanäle, SUR, Kir und VDCC exprimieren.

[0162] Ebenso wichtig ist, dass gezeigt wurde, dass der Insulin-Gehalt und die Absonderungsreaktionen aller vier menschlichen B-Inselzell-Linien bei niedrigen und hohen Abschnittsnummern stabil blieben. So waren der zelluläre Insulin-Gehalt, die basale Freisetzung von Insulin und die Absonderungswirkungen von Glucose und KCl an den Abschnitten 17 und 40 ähnlich. Eine solche funktionelle Stabilität scheint ein bedeutendes Merkmal der aus der Elektrofusion stammenden, im Vergleich zu transfizierten, pankreatischen B-Zell-Linien zu sein.

[0163] Die Verfügbarkeit von molekularen Sonden ermöglichte die Western-Blot-Analyse aller vier neuen, menschlichen Inselzell-Linien und der parentalen Zell-Linien unter Verwendung spezifischer Antikörper, die sich gegen das GLUT-1-Transporterprotein und gegen Glucokinase richteten. Es wurden jeweils Proteine von ungefähr 48 kDa und 50 kDa in allen vier Zell-Linien nachgewiesen, doch nicht in den parentalen PANC-1- noch in den Hup-T₃-Zellen. Es ist bekannt, dass der GLUT-1-Transporter eine bedeutende Rolle bei der Aufnahme von Glucose spielt, wobei er in Verbindung mit Glucokinase zur Bildung des sogenannten Glucose-empfindlichen B-Zell-Mechanismus in pankreatischen B-Zellen führt (Shibasaki et al., 1990).

[0164] Die Messungen von GLUT-1- und Glucokinase-Protein gingen mit funktionellen Messungen der Aktivität einher, die durch die Bewertung des Glucose-Transports und des Beitrags von Glucokinase/Hexokinase zu den gesamten Glucosephosphorylierungsaktivitäten der verschiedenen Zell-Linien ermittelt wurden. Diese Studien ergaben, dass die neuen menschlichen Insel-Klone wirksame Charakteristiken des Glucose-Transports aufweisen, die, im Gegensatz zu parentalen Zellen, nicht durch die Erhöhung der extrazellulären Glucose-Konzentration von 1,1 auf 16,7 mmol/l unterdrückt wurden. Dieses Charakteristikum wurde bisher als ein kennzeichnendes Merkmal der pankreatischen B-Zelle definiert (Hellman et al., 1974). Neuere molekulare Untersuchungen betrachten den Glucose-Transport in normalen pankreatischen B-Zellen nicht als geschwindigkeitsbestimmend, außer in extremsten Umständen (Ohneda et al., 1994).

[0165] Es wird im Allgemeinen geglaubt, dass Glucokinase einer der wichtigsten bestimmenden Faktoren der Glucose-Empfindlichkeit in der pankreatischen B-Zelle ist (Lenzen und Tuedge, 1994). Insbesondere ist ein hoher Beitrag der Glucokinase zur gesamten Phosphorylierungsaktivität (im Gegensatz zu Hexokinase) ein charakteristisches Merkmal von normal funktionierenden, Insulin absondernden Zellen. In der vorliegenden Untersuchung trug Glucokinase < 2% zur Glucosephosphorylierungsaktivität der parentalen PANC-1-Zellen bei. Im Einklang mit den Daten des Western-Blots lagen die Beiträge der Glucokinase von abstammenden 1.1B4, 1.1E7, 1.4E7 im Bereich zwischen 27–43%. Die andere Zell-Linie, 1.2B4, war durch einen Beitrag der Glucokinase zur gesamten Phosphorylierungsaktivität von 36% gekennzeichnet. Die Maße sind ziemlich positiv mit dem Wert von 50% vergleichbar, von dem bei den normalen B-Zellen berichtet wurde (Lenzen, 1990), und zeigen deutlich einen wirksamen Transport und Metabolismus von Glucose in den menschlichen Partner-B-Zellen.

[0166] Der Glucose-Metabolismus durch die B-Zelle stellt einen Höchststand des Glucose-Transports und der Phosphorylierungsaktivitäten dar. Die Bewertung der metabolischen Reaktion in parentalen und abstammenden Zell-Linien deutete mit ansteigender Glucose-Konzentration auf eine schrittweise Steigerung der Glucoseoxidation/-verwertung. Die Inhibierung der Hexokinaseaktivität unter Verwendung von 5-Thioglucose zeigte auch Inhibierungswirkungen, wie an anderer Stelle berichtet wurde (Hohmeier et al., 1997). Da die Stimulierung der Absonderung von Insulin durch Glucose eng mit der Bildung von ATP verbunden ist, wurde der relative Fluss des Glucose-Metabolismus durch oxidative Wege als ein besonders bemerkenswerter Indikator für die funktionelle Intaktheit der pankreatischen B-Zelle angesehen (Malaisse, 1992). Die Berechnung der Verhältnisse von Glucoseoxidation:Glucoseverwertung ergab höhere Werte in jeder der Hybridzellen im Vergleich zu den parentalen PANC-1- oder Hup-T₃-Zellen. Solche Effekte wurden allgemein mit den relativen Glucokinaseaktivitäten der verschiedenen Zell-Linien in Verbindung gebracht.

[0167] Obgleich die Ergebnisse aus der Immunhistochemie nur Teil früher Untersuchungen zur Exprimierung von B-Zell-Markern waren, ist es versichernd, dass eine positive Anfärbung für Insulin durch das Insulin-Antiserum in allen der klonierten Hybridzell-Linien nachgewiesen wurde. Wie aus den FITC-Bildern ersichtlich ist, scheinen die Zellen keine einheitliche Insulin-Anfärbung aufzuweisen. Dies spiegelt wahrscheinlich das Unvermögen dieses bestimmten Ansatzes wider, die in einigen der Zellen vorhandenen, niedrigen Insulin-Spiegel nachzuweisen. Die Färbung für Insulin unter Verwendung desselben Antikörpers im Pankreas der Ratte zeigte starke, fluoreszierende Signale (Ergebnisse sind nicht gezeigt), doch die Monoschichten der B-Zellen enthielten weit niedrigere Insulin-Spiegel, die auf weniger als 5% der normalen pankreatischen Inselzellen geschätzt wurden.

[0168] Das Glucokinase-Protein wurde durch Immunzytochemie in allen Zell-Linien als kleine, körnige Fluoreszenzflecken, die überall im Zytoplasma verstreut waren, nachgewiesen. Wie bei dem Insulin war es schwierig, die Spiegel von Glucokinase aus diesen Experimenten visuell zu quantifizieren, jedoch sorgfältiges Experimentieren mit jeder Zell-Linie zeigte, dass die Grade der positiven Anfärbung wieder in den hybriden Inselzellen, im Vergleich zu den parentalen Zell-Linien, erhöht waren. IAPP wurde in allen Zell-Linien gefunden und erschien ebenfalls als kleine Flecke positiver Färbung überall im Zytoplasma und war weniger stark als die Färbung, die für Glucokinase beobachtet wurde. Es wurde weder für Glucagon noch für Somatostatin in irgendeiner der getesteten Zell-Linien eine positive Färbung beobachtet, was die Ansicht unterstützt, dass die Hybride eine reine Population von klonierten pankreatischen B-Zellen darstellen.

[0169] Es wird erfindungsgemäß über die Generation und Charakterisierung der vier neuen, aus der Elektrofusion stammenden, menschlichen, Insulin absondernden, pankreatischen B-Zell-Linien berichtet. Die funktionelle Beurteilung dieser einzigartigen Zellen zeigt, dass die Hybridzellen viele der Merkmale der normalen menschlichen, pankreatischen B-Zelle von den menschlichen Donoren erbten (Tabelle 6).

[0170] Die Aufstellung der DNA-Erkennungsprofile der vier, aus der Elektrofusion stammenden, menschi-

chen, Insulin absondernden, pankreatischen B-Zellen zeigt, dass die Zell-Linien 1.1E7, 1.4E7 und 1.1B4 ähnliche DNA-Profile aufweisen während 1.2B4 ein anderes Profil besitzt.

[0171] Die Tabellen 7, 8, 9 und 10 zeigen die Ergebnisse der Erkennungsprofile von 1.1E7, 1.4E7, 1.1B4 bzw. 1.2B4.

[0172] Diese Profile zeigen, dass die durch das Elektrofusionsverfahren hergestellten Zell-Linien, die Merkmale von normalen pankreatischen B-Zellen aufweisen, es nicht erforderlich machen, eine identische genetische Identität gemein zu haben.

[0173] Die hergestellten Zell-Linien scheinen bessere funktionelle Eigenschaften als viele existierende, tierische Zell-Linien zu besitzen, die auf die Anwesenheit der Hauptbestandteile des gekoppelten Reiz-Absonderungs-Weges der normalen pankreatischen B-Zelle zurückgeführt werden können. Diese verschiedenen Beobachtungen, in Kombination mit der funktionellen Stabilität, zeigen, dass aus Elektrofusion stammende, menschliche pankreatische B-Zell-Klone von beträchtlichem Vorteil für die Diabetes-Forschung sein werden. Außerdem werden diese Zell-Linien den Einsatz von „Cellular Engineering“ unter Verwendung der aus der Elektrofusion stammenden, pankreatischen B-Zellen zur Bereitstellung einer Therapie für Typ-1-Diabetes ermöglichen.

Patentansprüche

1. Eine menschliche Pankreaszell-Linie, die durch Elektrofusion normaler menschlicher Inselzellen mit Zellen von mindestens einer unsterblichen menschlichen Zell-Linie erzeugt wird, wobei die menschliche Pankreaszell-Linie Insulin absondern kann.

2. Menschliche Pankreaszell-Linie, die Insulin absondern kann, die aus der Gruppe von Zell-Linien ausgewählt ist, welche aus der Zell-Linie, die unter der Zugangsnummer 00112811 bei der Europäischen Sammlung von Zellkulturen (ECACC), CAMR, Salisbury, Wiltshire am 28. November 2000 hinterlegt wurde, und den Zell-Linien, die unter den Zugangsnummern PTA 3523, PTA 3524 und PTA 3525 bei der American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20100-2209, USA am 17. Juli 2001 hinterlegt wurden, besteht.

3. Ein Verfahren zur Erzeugung von menschlichen Pankreaszell-Linien, die Insulin absondern können, wobei das Verfahren die Schritte des Elektrofusionierens einer Mischung normaler menschlicher Inselzellen mit Zellen von mindestens einer unsterblichen menschlichen Zell-Linie und des Inkubierens der Mischung, um Hybridzellen herzustellen, umfasst.

4. Verfahren gemäß Anspruch 3, wobei die menschlichen Inselzellen und die unsterblichen menschlichen Zellen in einem Verhältnis von 1:1 gemischt werden.

5. Verfahren gemäß Anspruch 3 oder 4, wobei die Elektrofusion in einer Helixkammer geschieht.

6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3 bis 5, wobei der Schritt des Elektrofusionierens das Exponieren der Zellen gegenüber einer ersten Pulsphase eines Wechselstromfelds, einer zweiten Pulsphase eines Direktstromfelds und einer dritten Pulsphase eines Wechselstromfelds umfasst.

7. Verfahren gemäß Anspruch 6, wobei die erste Pulsphase 7 V, 2 MHz eines Wechselstromfelds für 30 Sekunden beinhaltet.

8. Verfahren gemäß Anspruch 6 oder 7, wobei die zweite Pulsphase 60 V, Dreifachpulse eines Direktstromfelds beinhaltet, wobei jeder der Dreifachpulse 15 Sekunden dauert.

9. Verfahren gemäß Anspruch 6, 7 oder 8, wobei die dritte Pulsphase 7 V, 2 MHz eines Wechselstromfelds für 30 Sekunden beinhaltet.

10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3 bis 9, wobei die Medien, in denen die Zellen inkubiert werden, Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin beinhalten.

11. Verfahren gemäß Anspruch 10, wobei Hypoxanthin in den Inkubationsmedien in einer Konzentration von zwischen 0,05 mmol/l und 0,5 mmol/l vorhanden ist.

12. Verfahren gemäß Anspruch 10 oder 11, wobei Aminopterin in den Inkubationsmedien in einer Konzentration von zwischen 0,2 mmol/l und 0,6 mmol/l vorhanden ist.
13. Verfahren gemäß Anspruch 10, 11 oder 12, wobei Thymidin in den Inkubationsmedien in einer Konzentration von zwischen 10 mmol/l und 20 mmol/l vorhanden ist.
14. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3 bis 13, wobei die Inkubation in der Gegenwart von mindestens einem Sekretagogum, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die Glucose, Glycerinaldehyd, Arginin, Leucin und Alanin beinhaltet, durchgeführt wird.
15. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3 bis 14, wobei die Inkubation in der Gegenwart von mindestens einer Substanz, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die KCl, IBMX, Thioglucose, Tolbutamid, Diazoxid und Verapamil beinhaltet, durchgeführt wird.
16. Eine Zell-Linie, die durch ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3 bis 15 erzeugt wird, die Glucosetransportcharakteristiken, die so wirksam wie normale pankreatische B-Zellen sind, vorzeigt.
17. Zell-Linie, die durch ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3 bis 15 erzeugt wird, die eine Glucosephosphorylierungsaktivität, die normalen pankreatischen B-Zellen entspricht, vorzeigt.
18. Insulin erzeugende Zellen, die durch das Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3 bis 15 erzeugt werden, zur Verwendung in der Gentherapie für Typ-1-Diabetes.
19. Die Verwendung von Insulin erzeugenden Zellen, die durch das Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3 bis 15 erzeugt wurden, bei der Zubereitung eines Medikaments zur Behandlung von Diabetes.
20. Die Verwendung einer Zell-Linie gemäß einem der Ansprüche 1, 2, 16 oder 17 bei der Zubereitung eines Medikaments zur Behandlung von Diabetes.
21. Die Verwendung einer Zell-Linie gemäß einem der Ansprüche 1, 2, 16 oder 17 für die Erzeugung von Insulin.

Es folgen 56 Blatt Zeichnungen

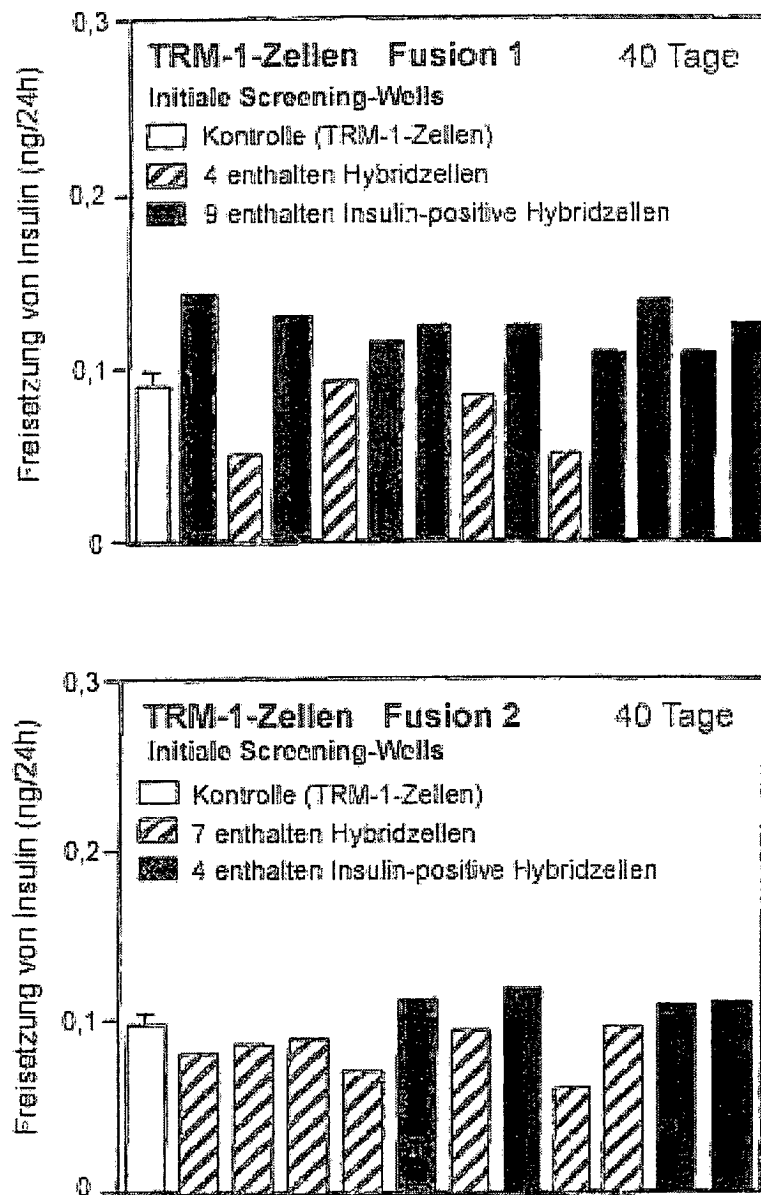
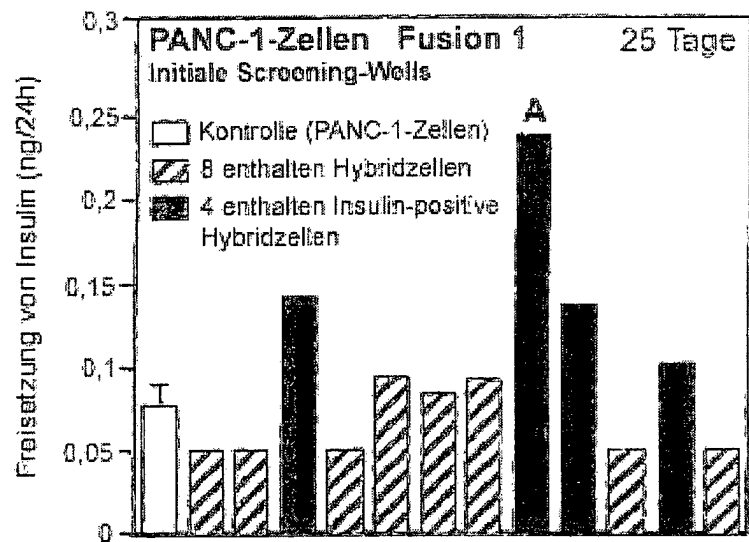


Abbildung 2

A.



B.

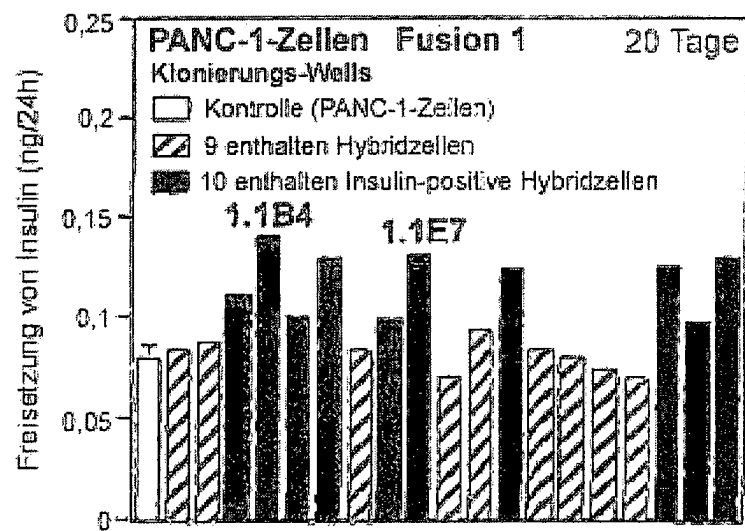


Abbildung 3

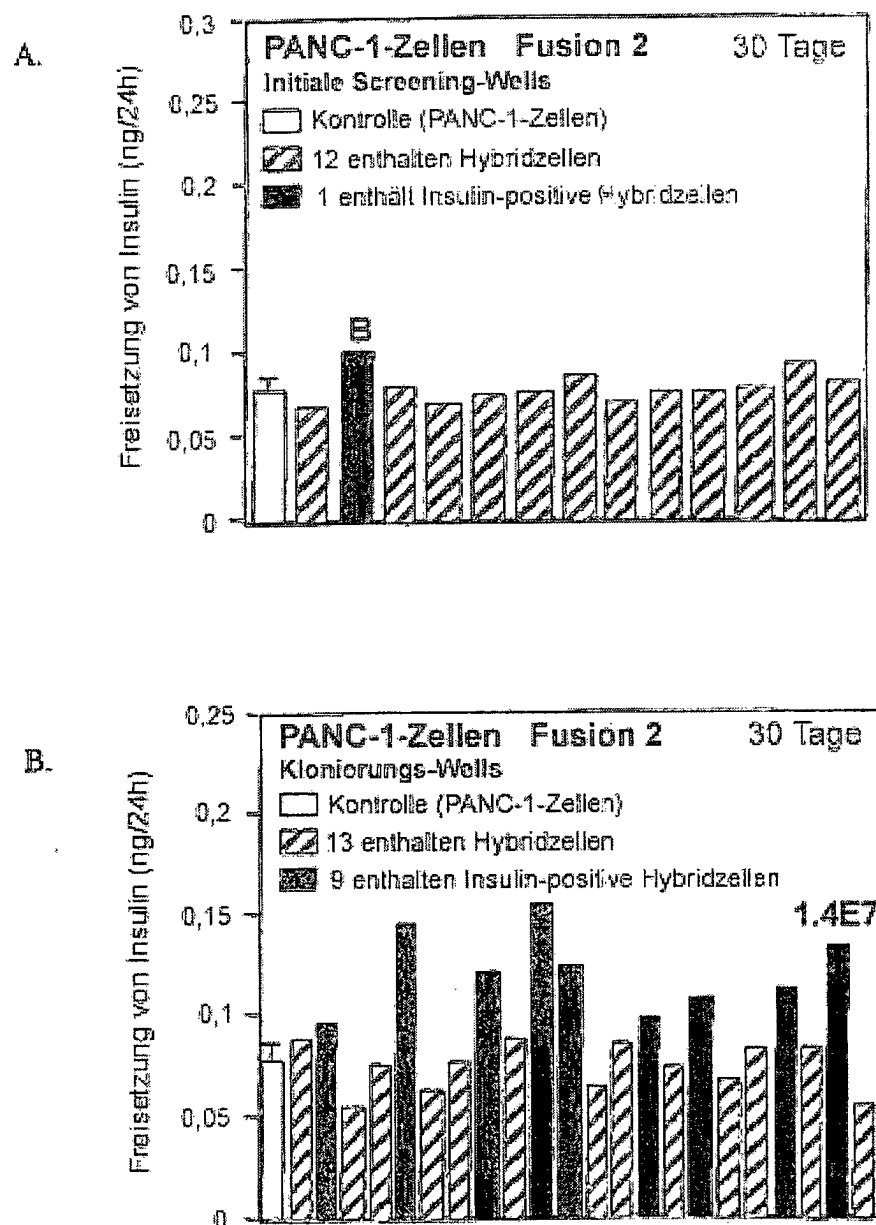
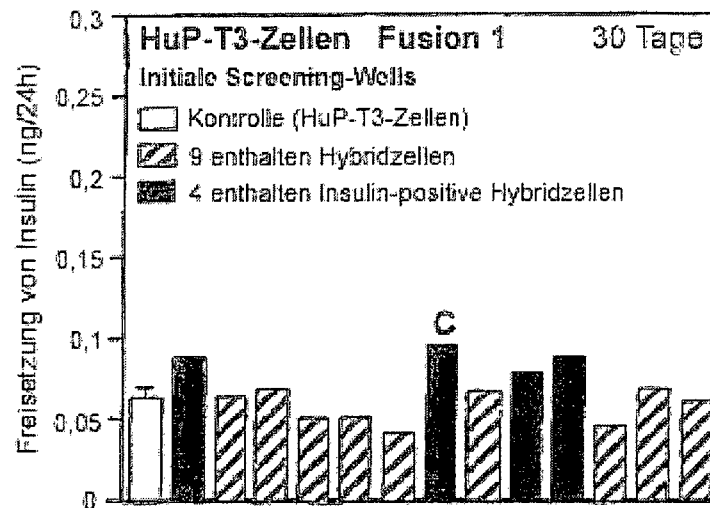


Abbildung 4

A.



B.

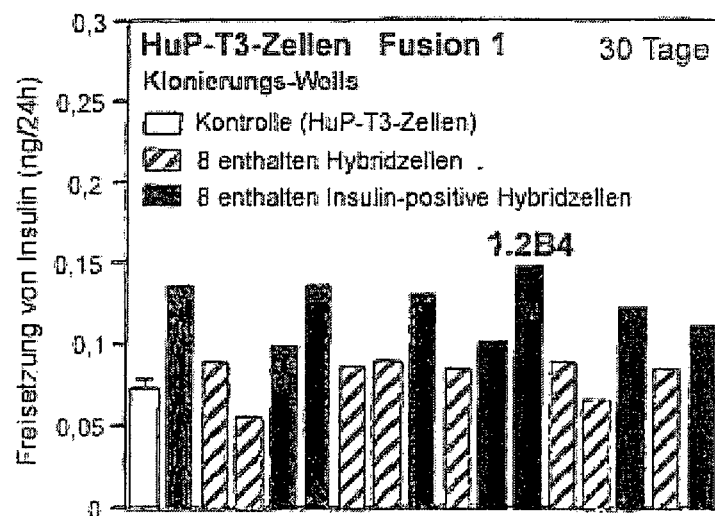


Abbildung 5

Abbildung 6

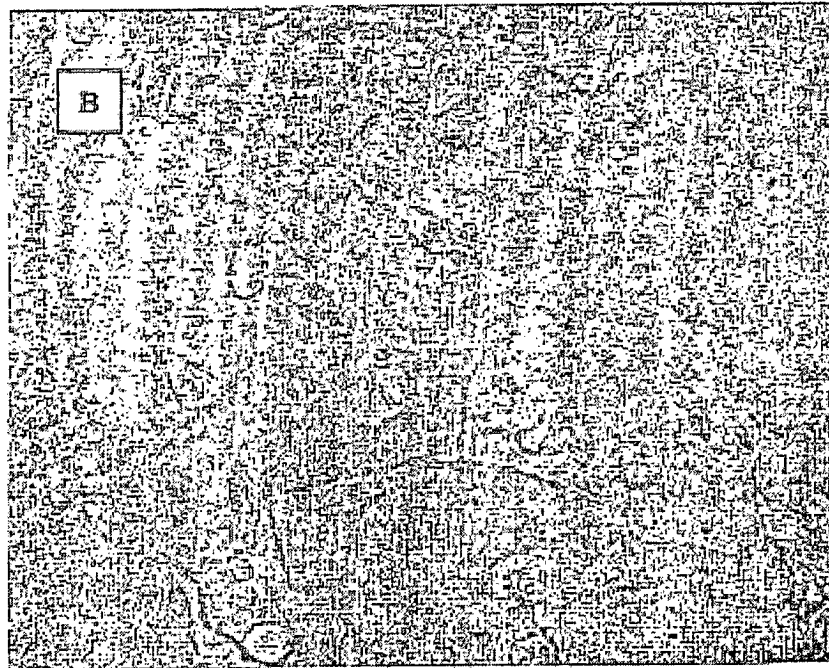
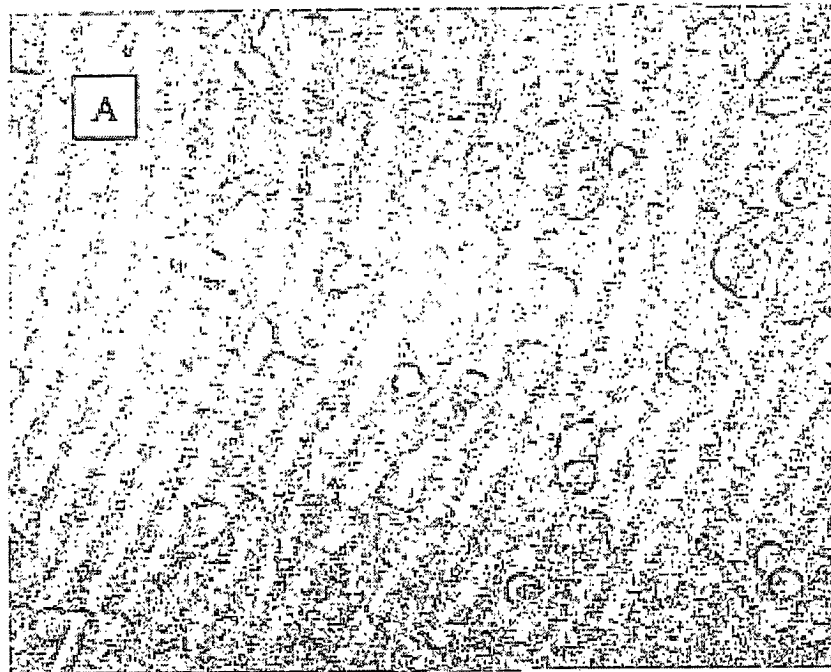


Abbildung 7

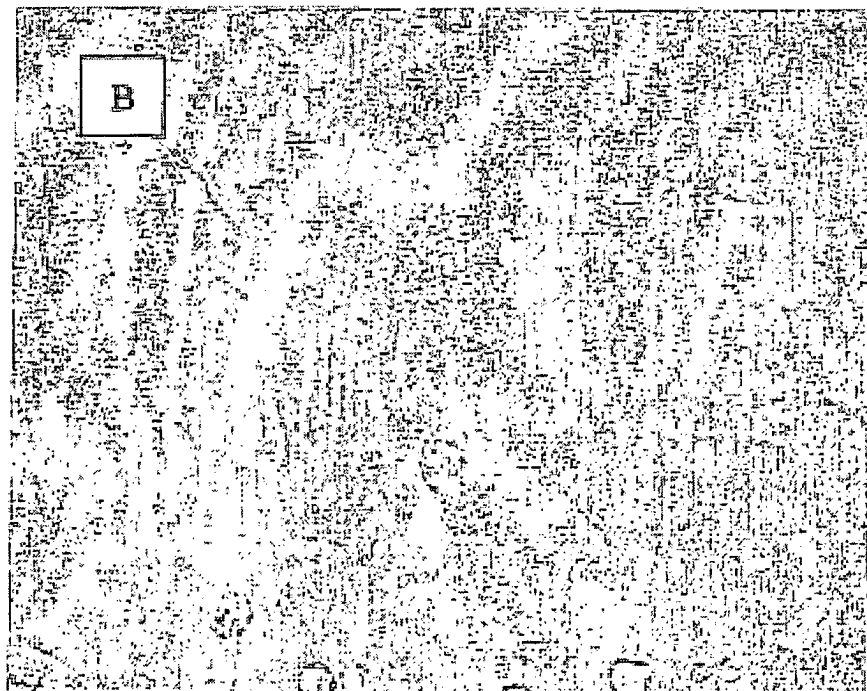
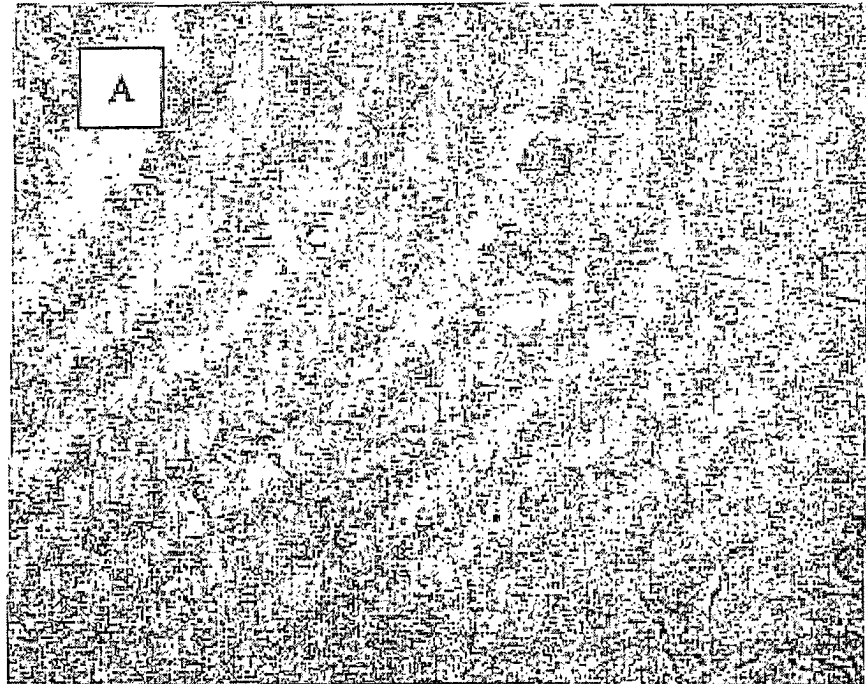


Abbildung 8

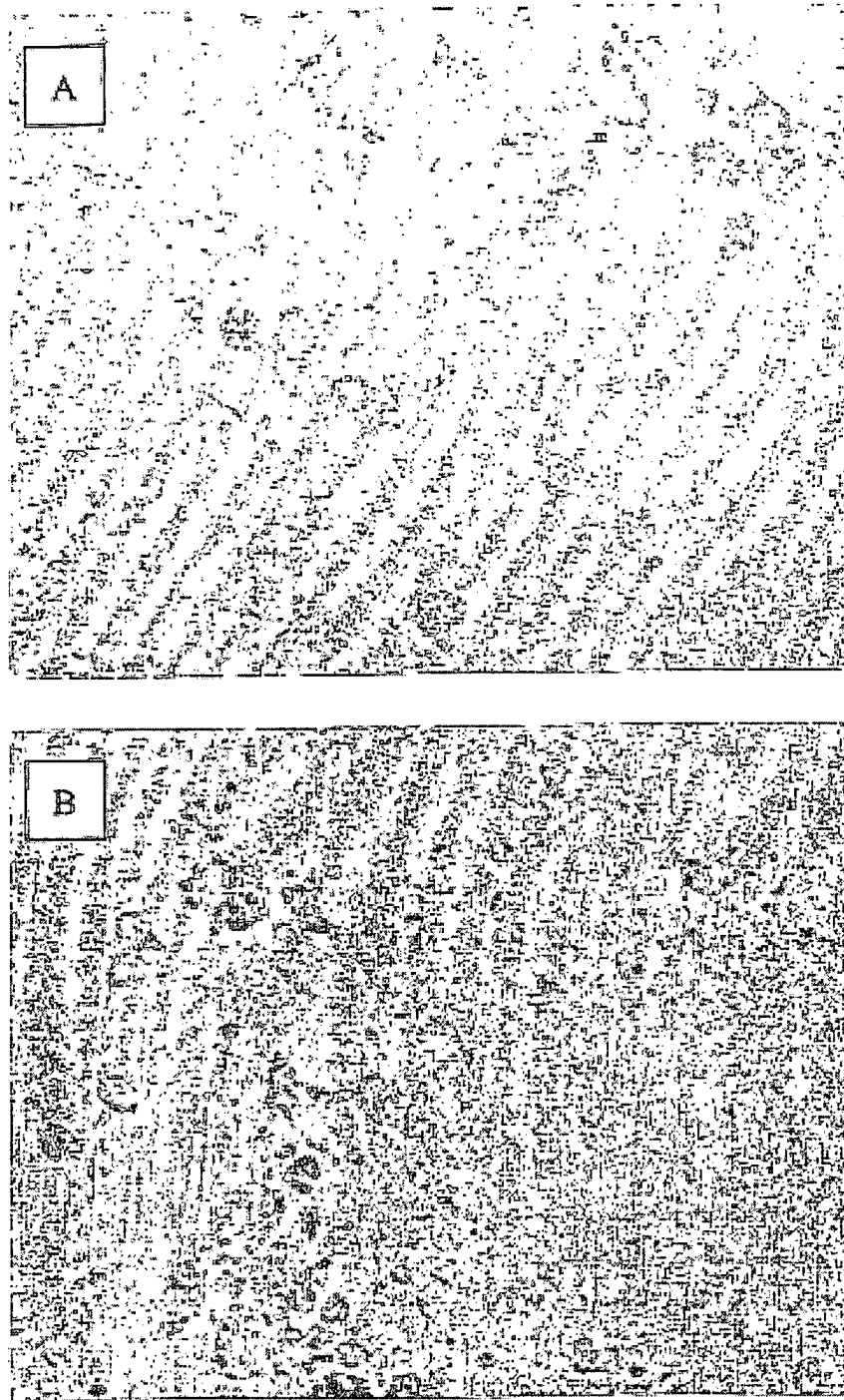


Abbildung 9

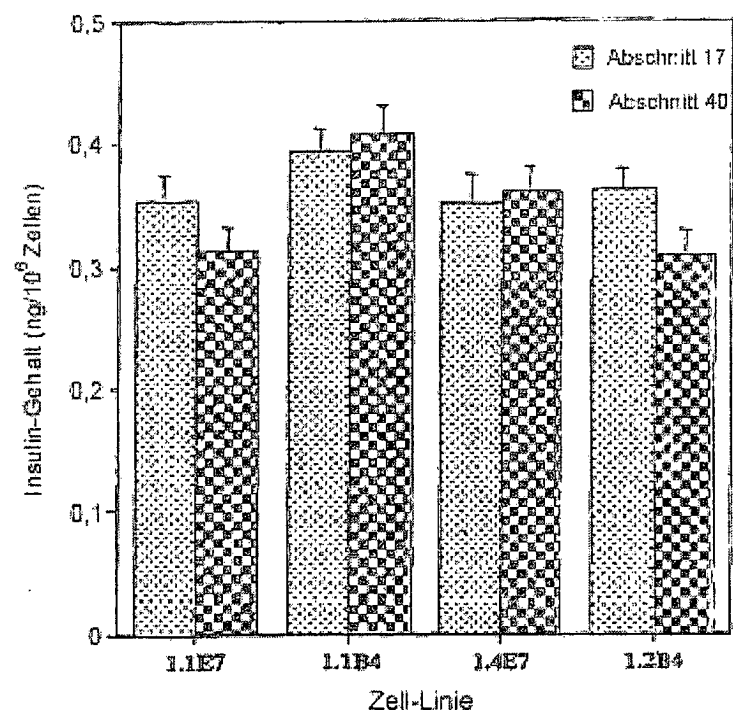


Abbildung 10

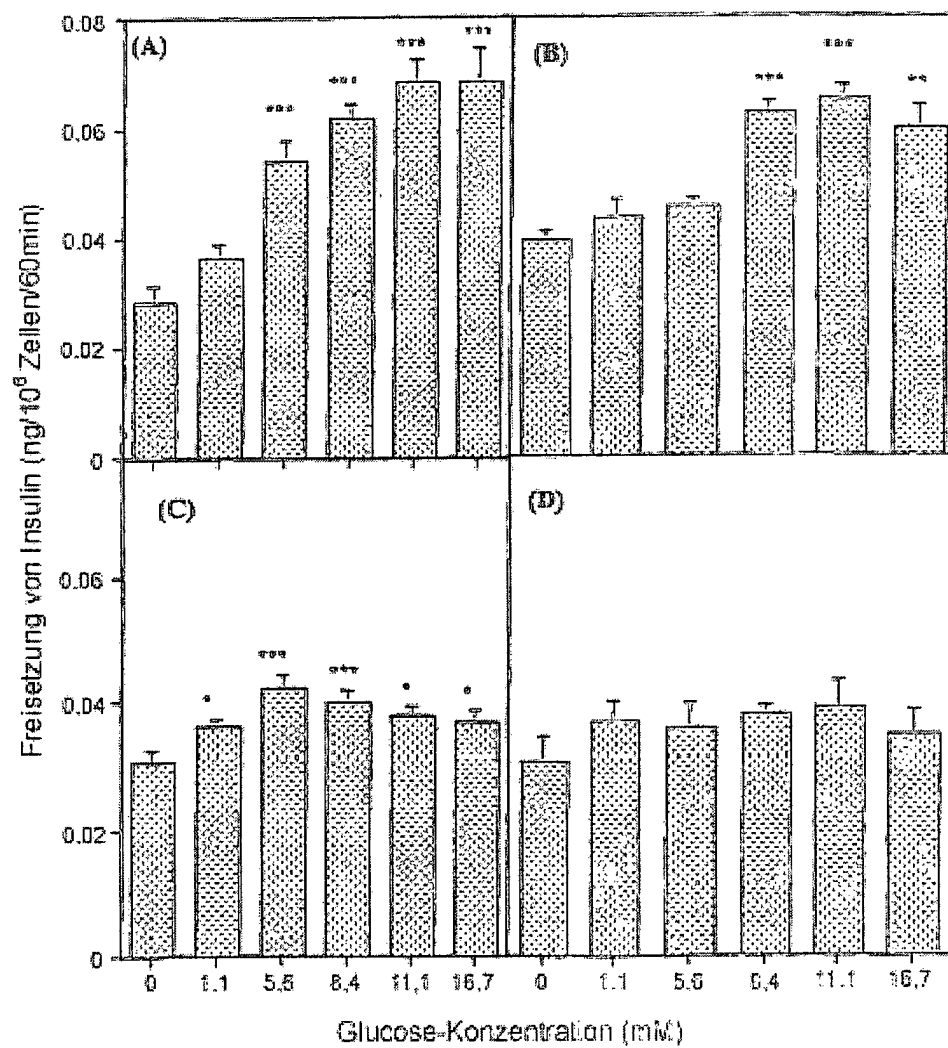


Abbildung 11

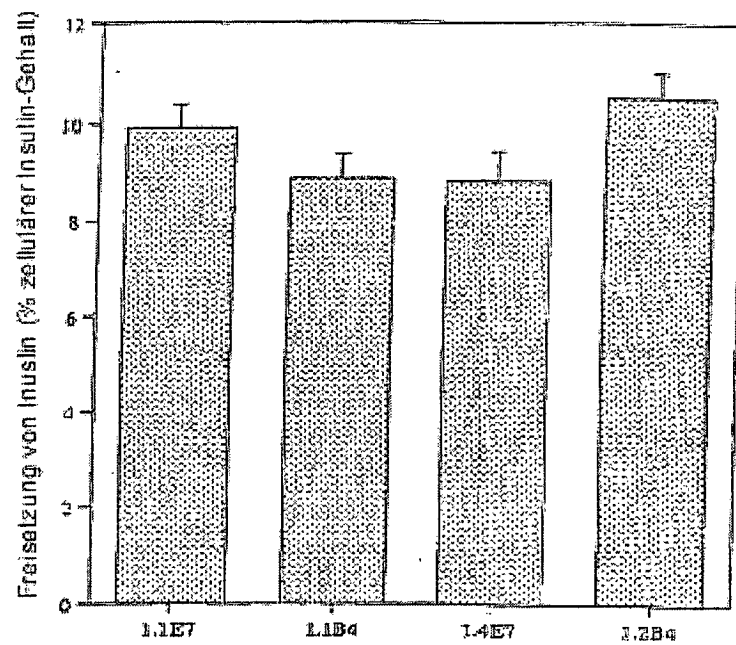


Abbildung 12

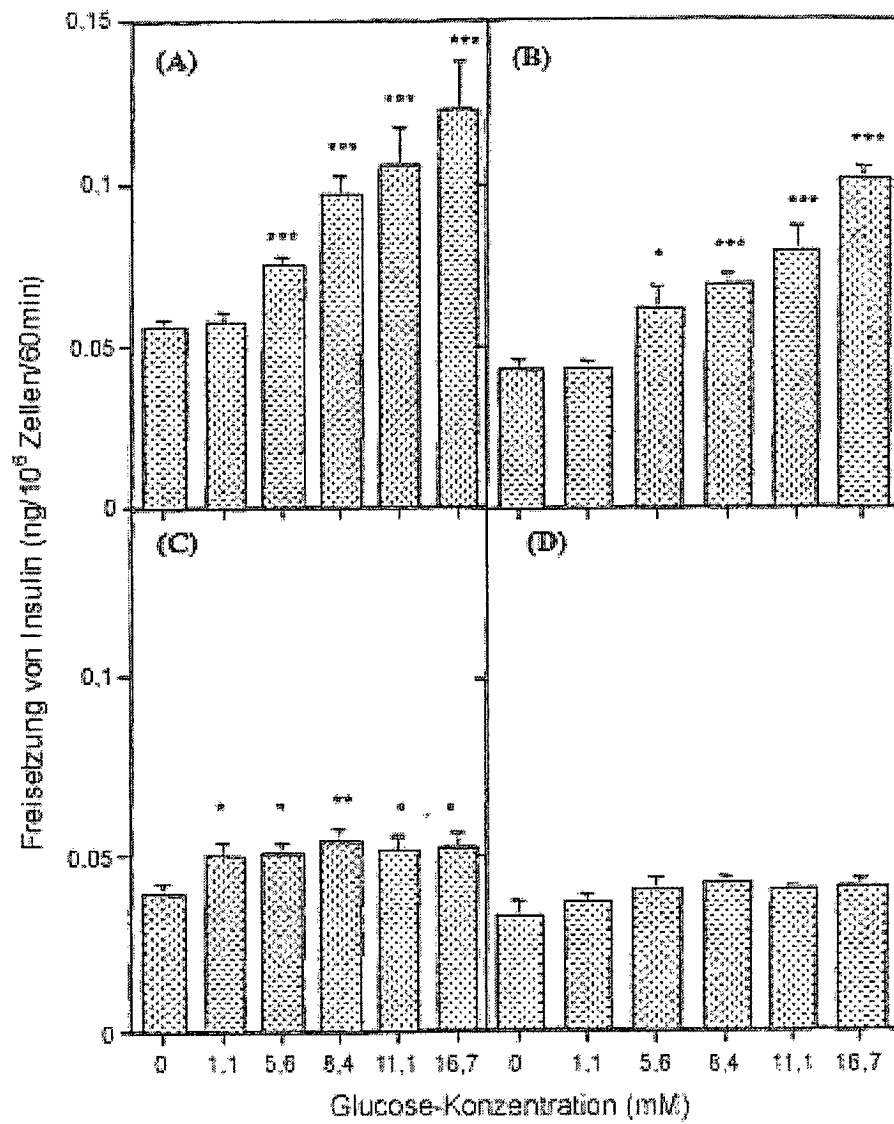


Abbildung 13

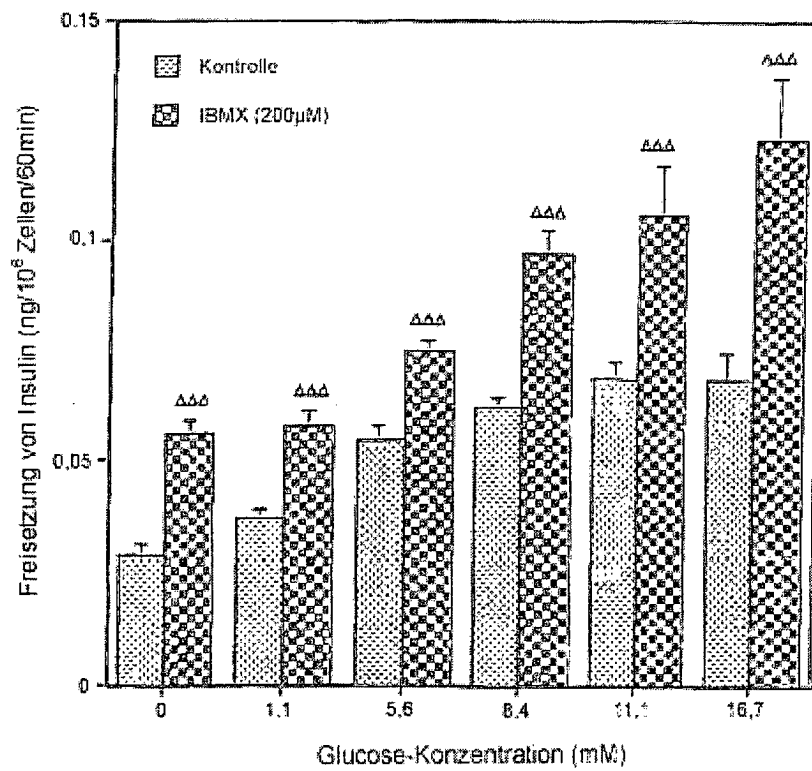


Abbildung 14

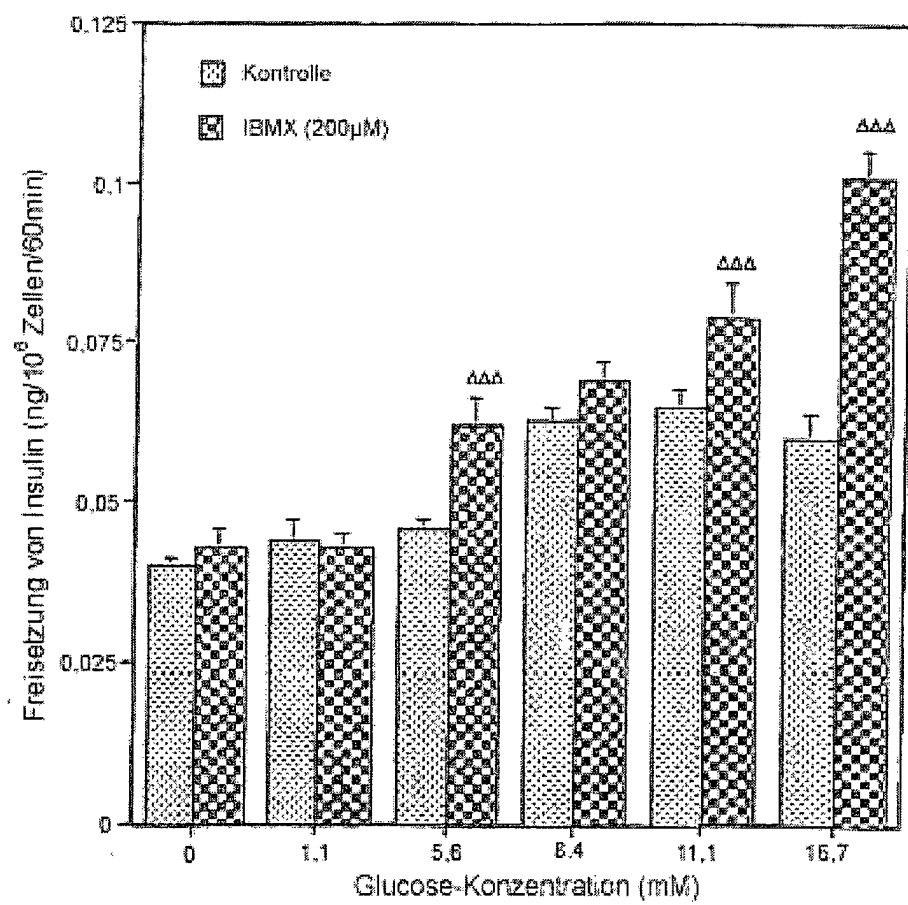


Abbildung 15

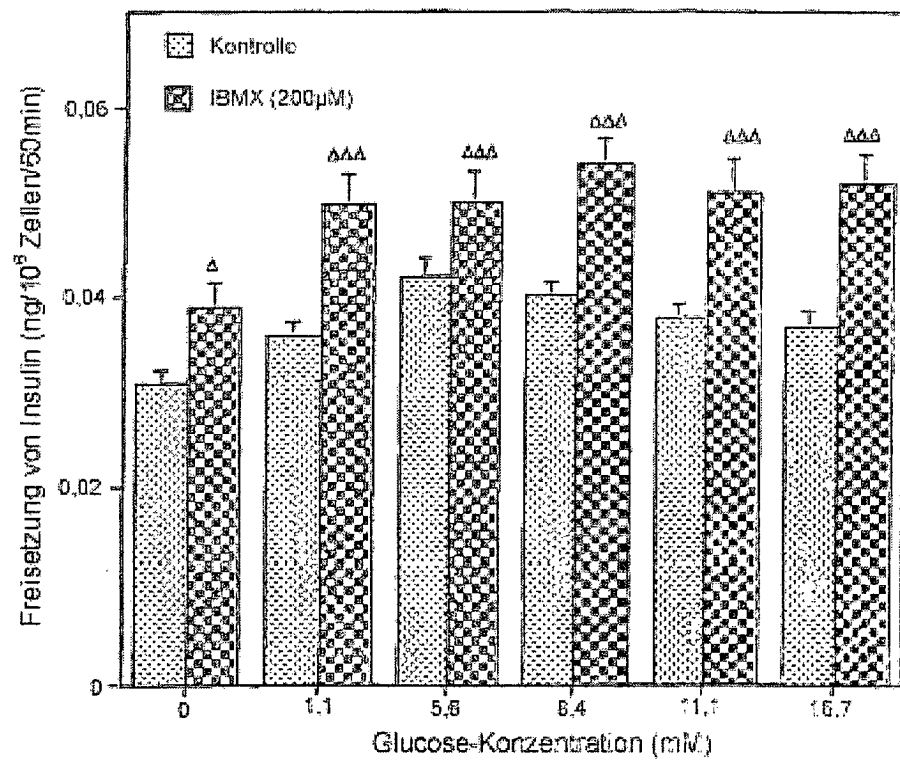


Abbildung 16

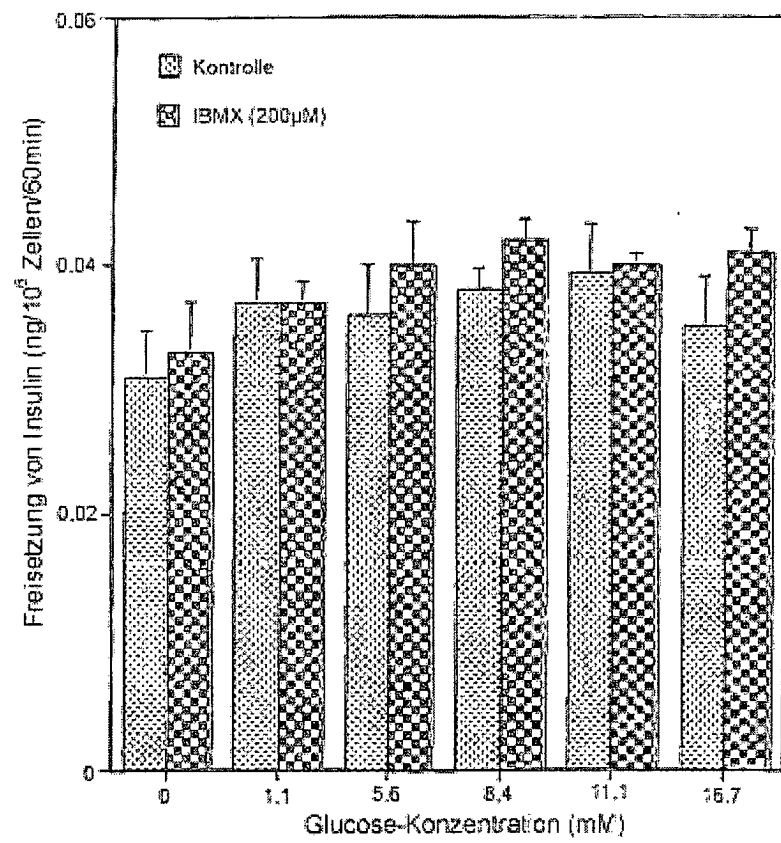


Abbildung 17

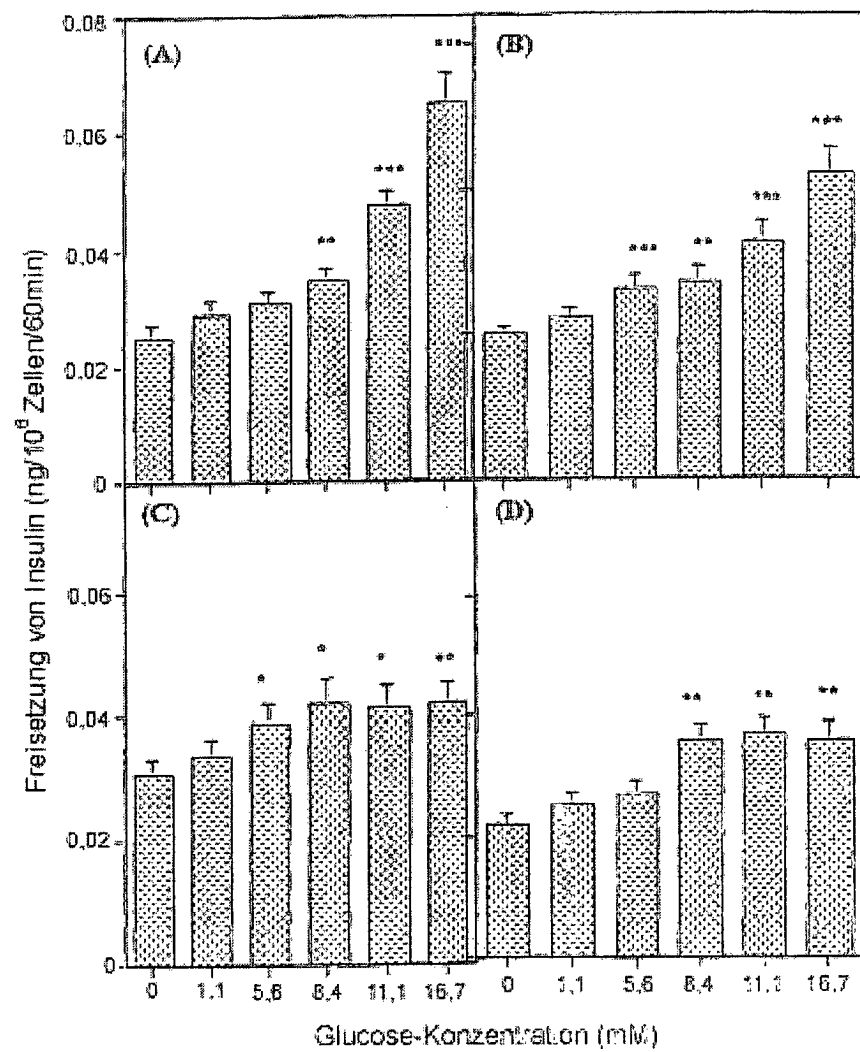


Abbildung 18

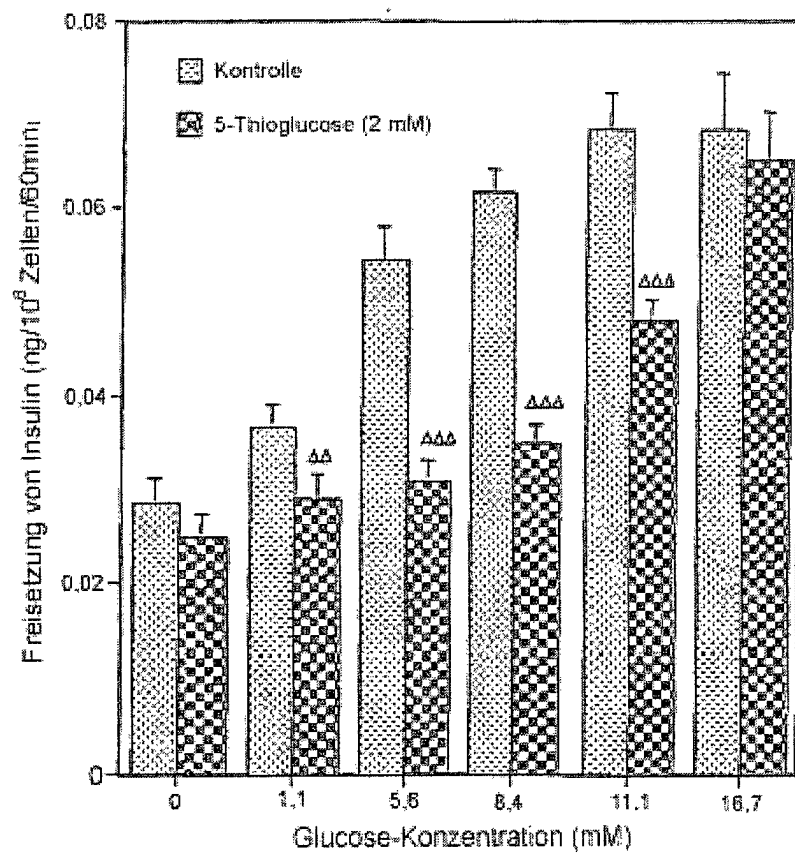


Abbildung 19

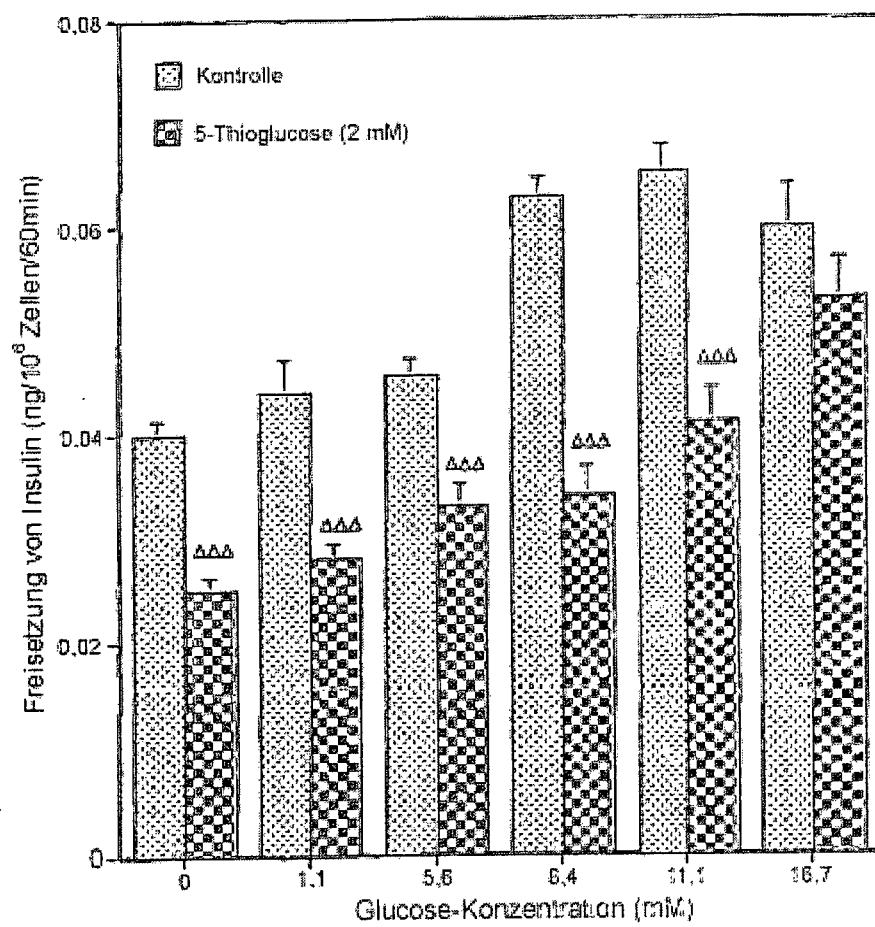


Abbildung 20

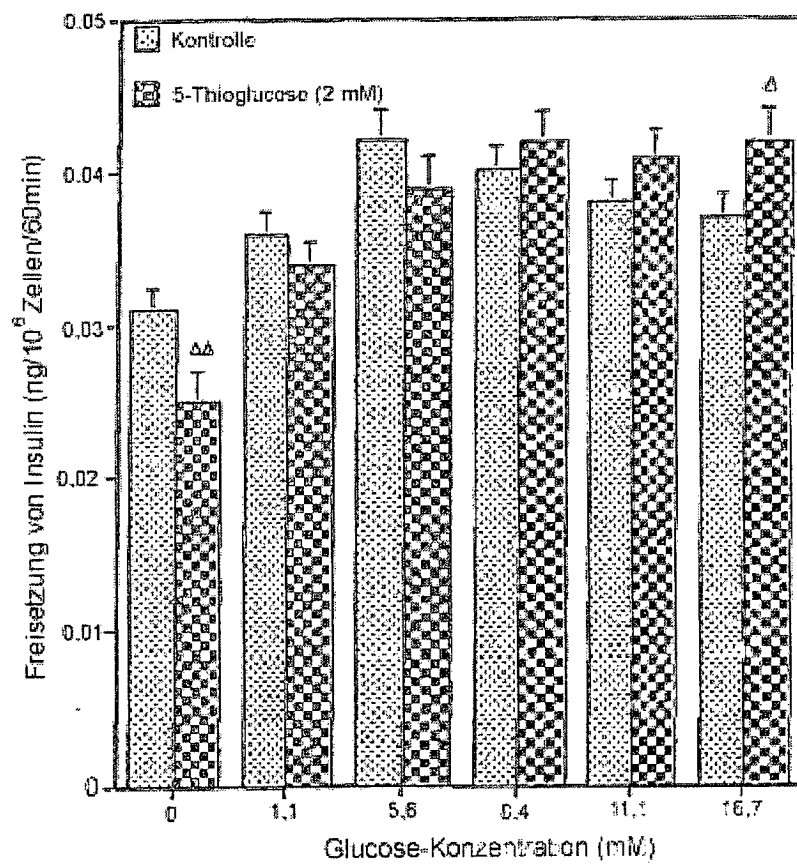


Abbildung 21

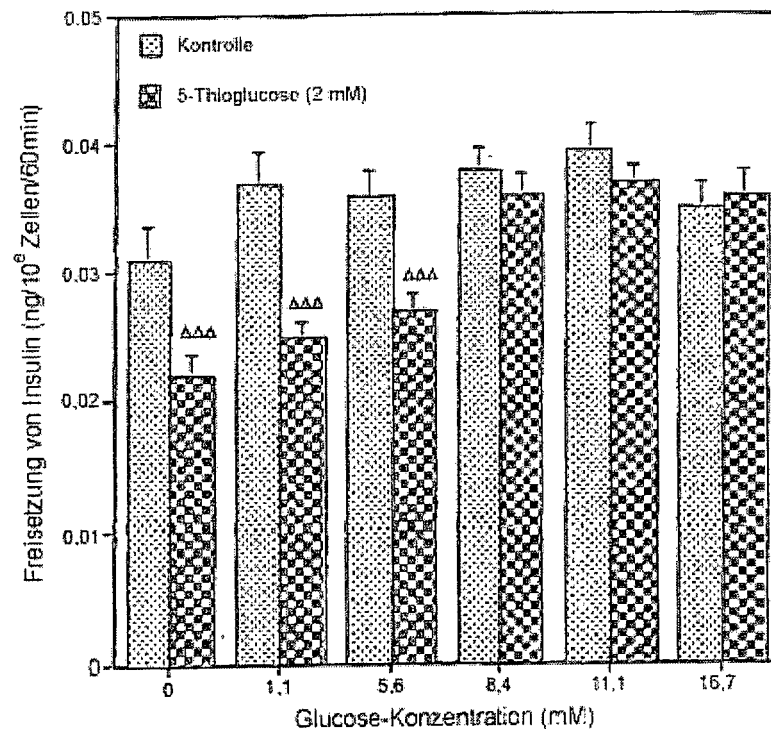


Abbildung 22

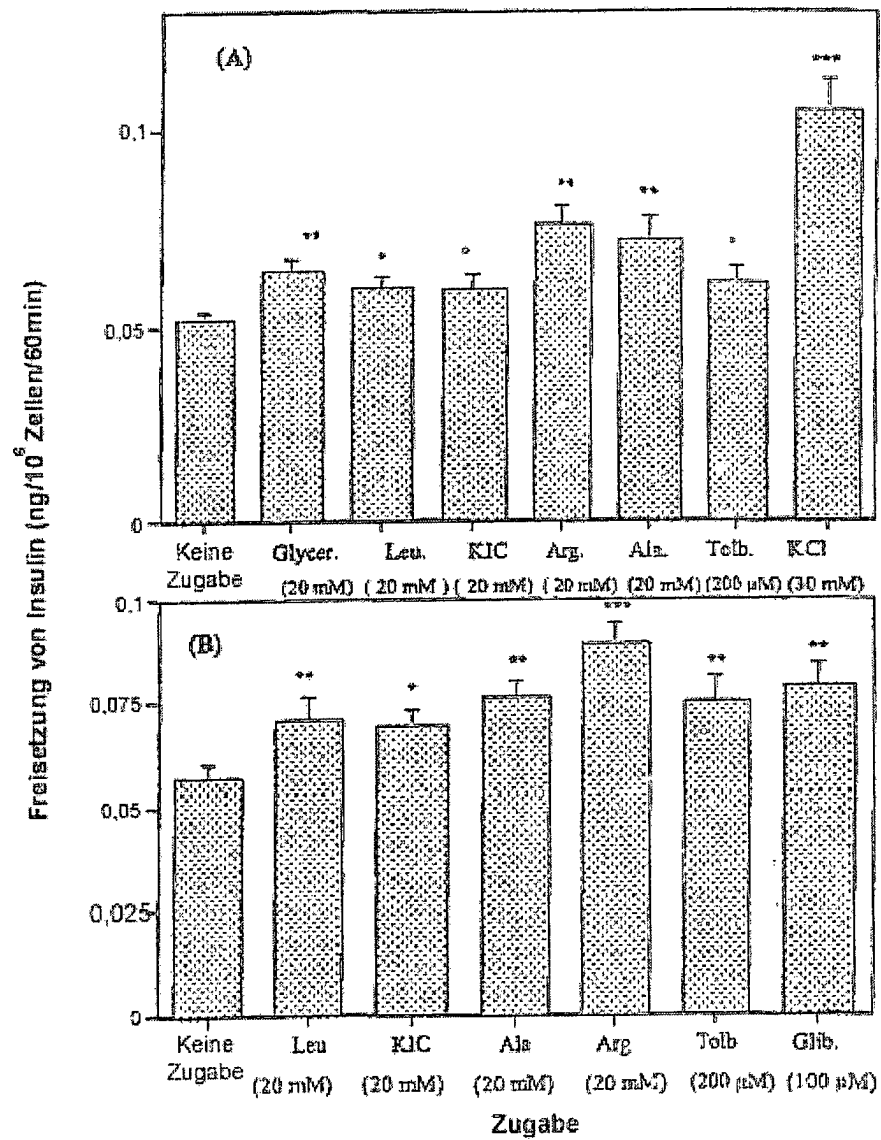


Abbildung 23

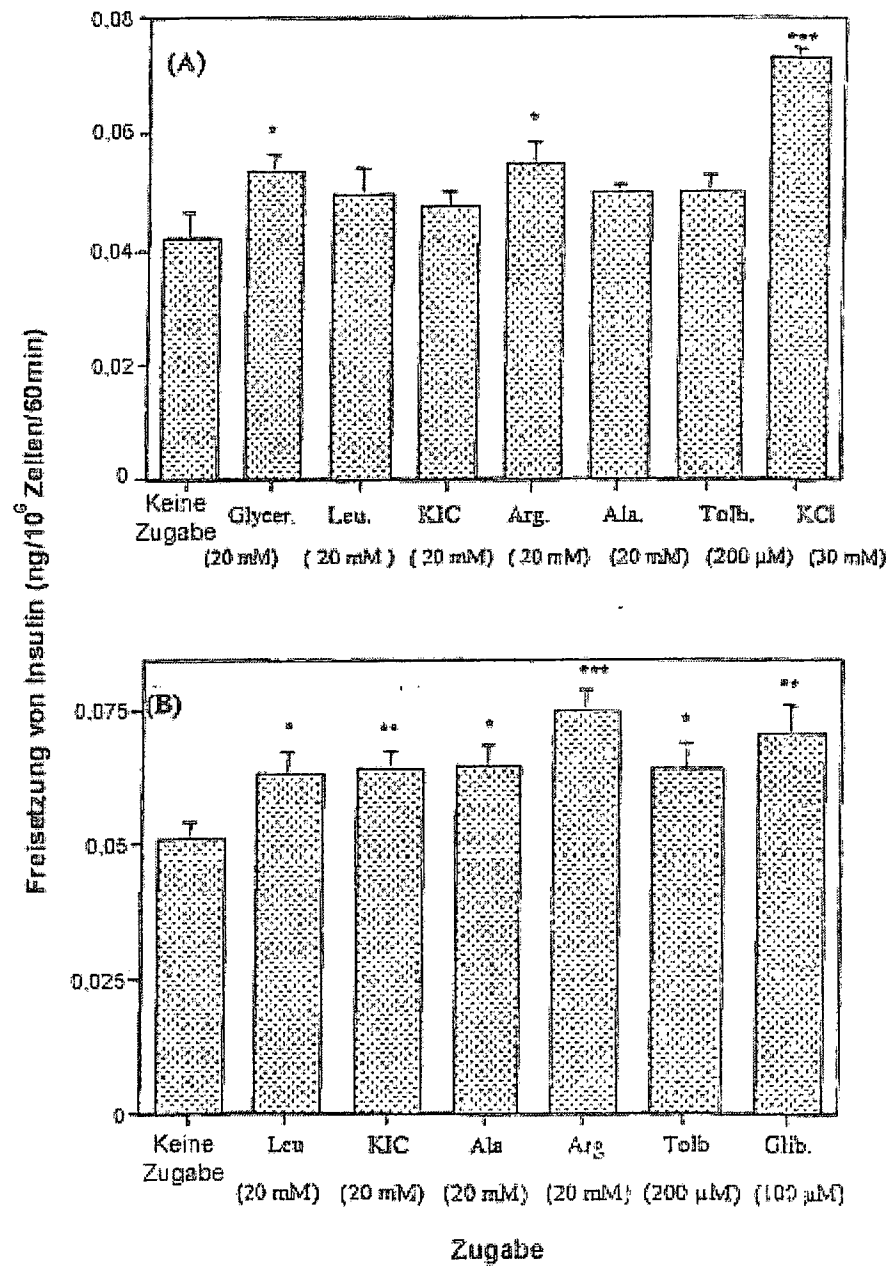


Abbildung 24

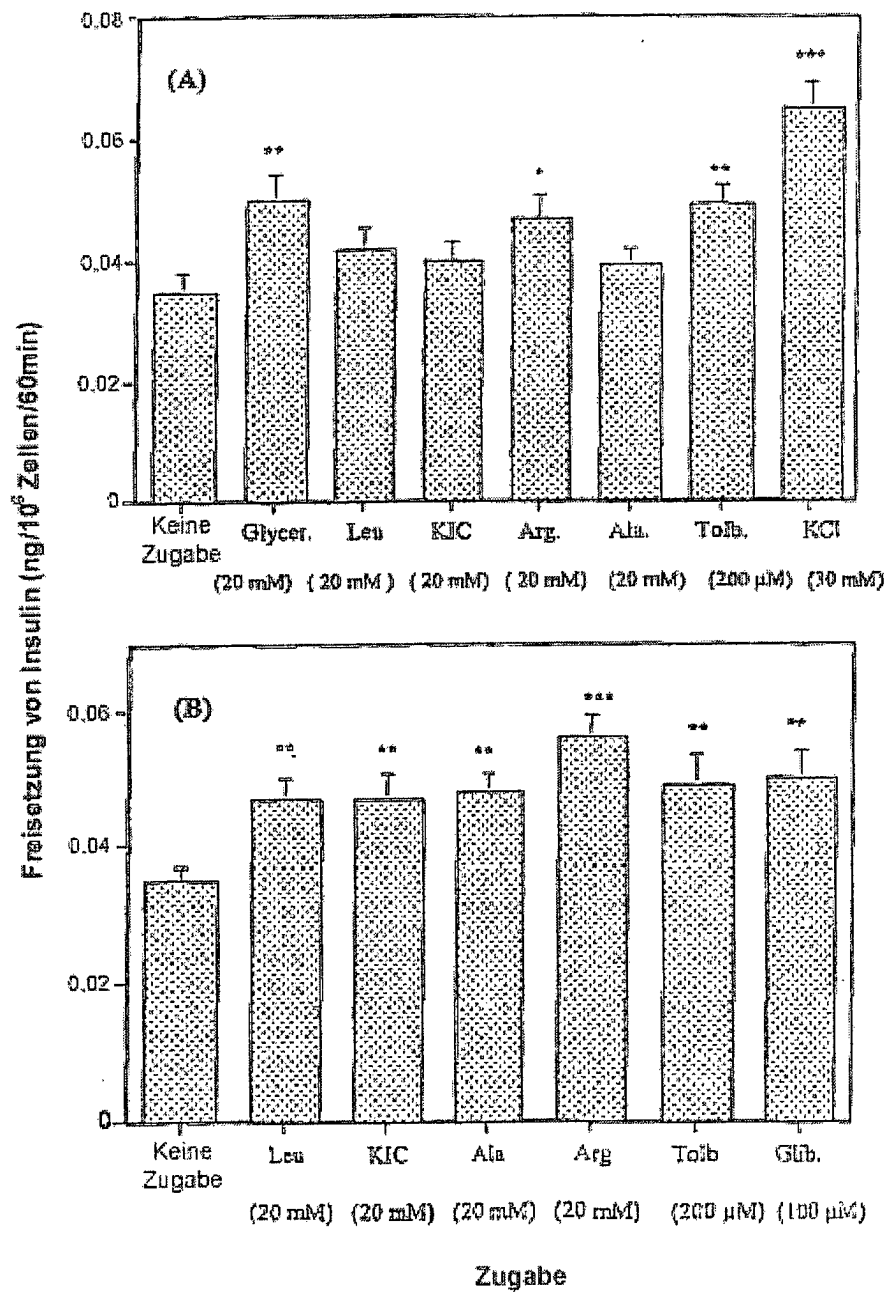


Abbildung 25

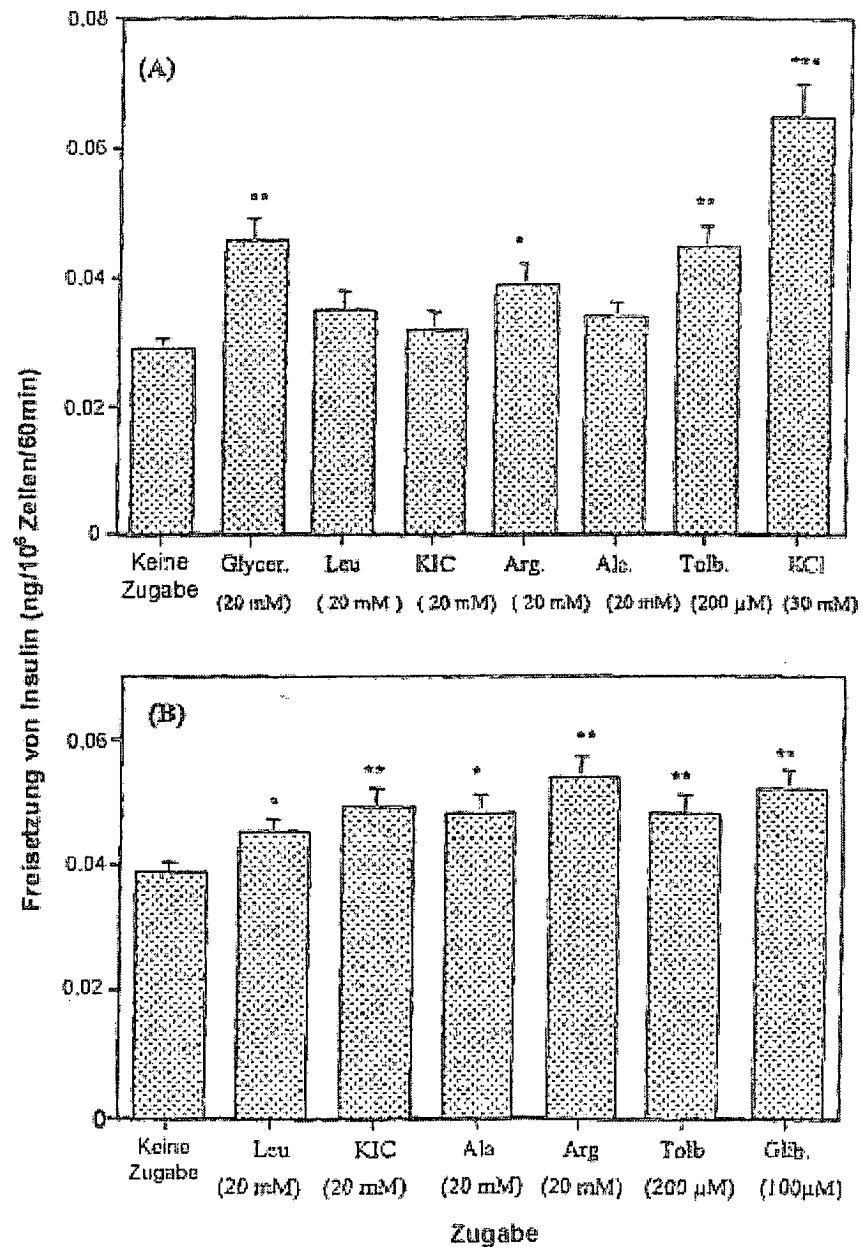


Abbildung 26

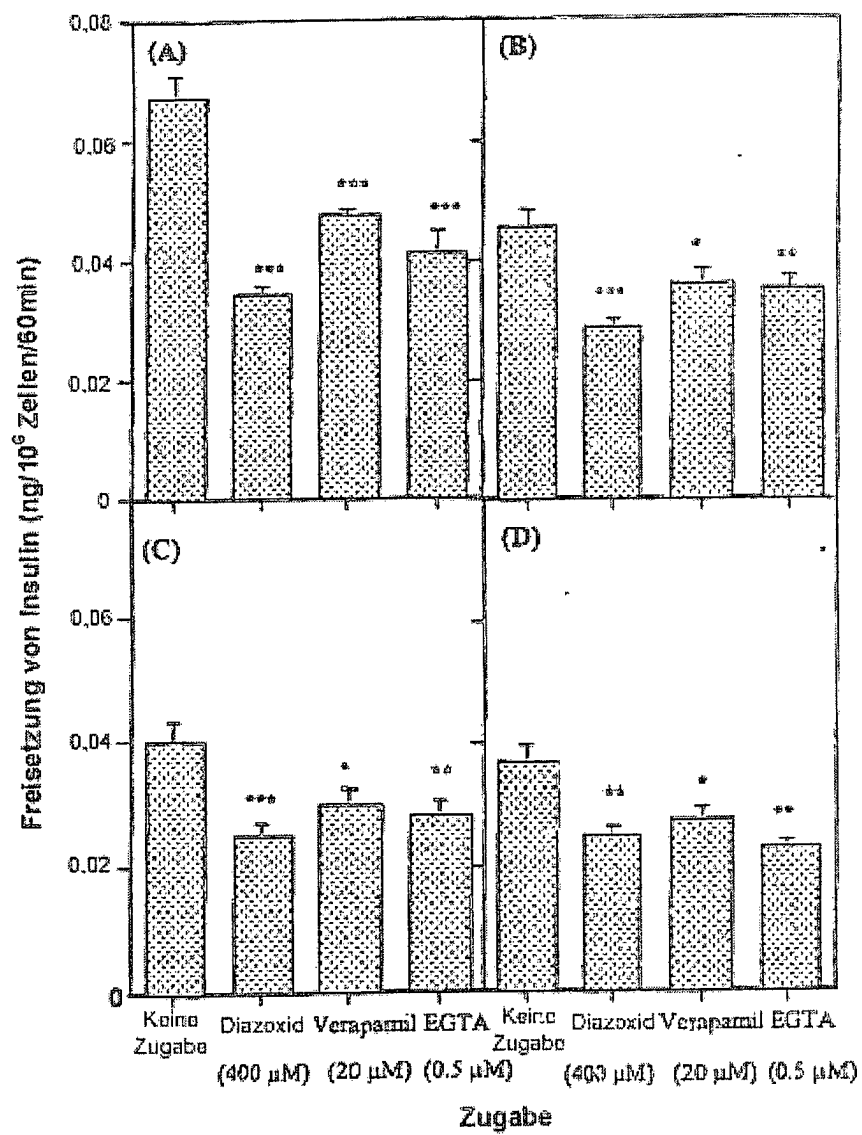


Abbildung 27

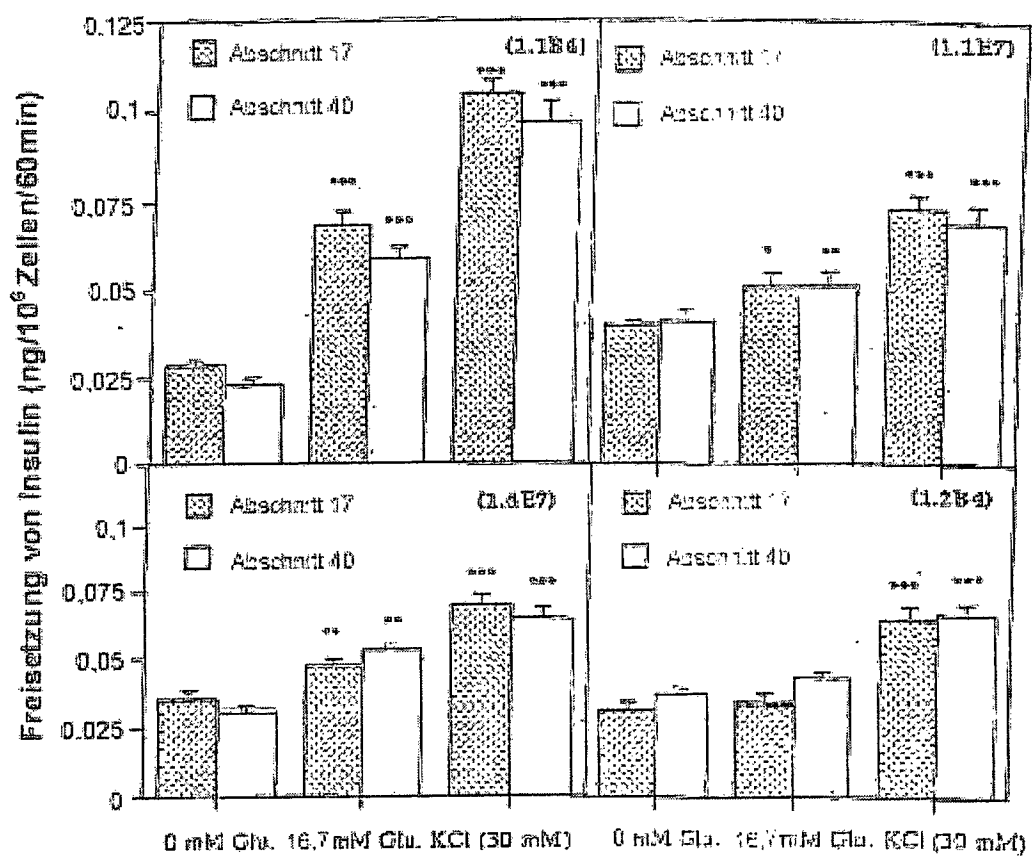


Abbildung 28

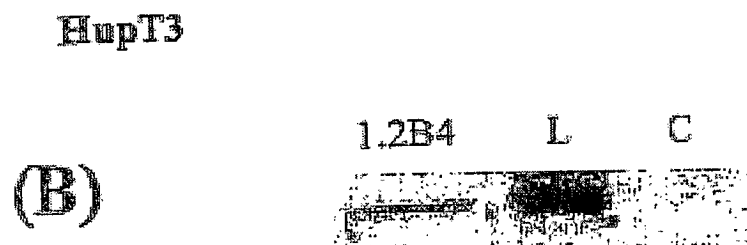
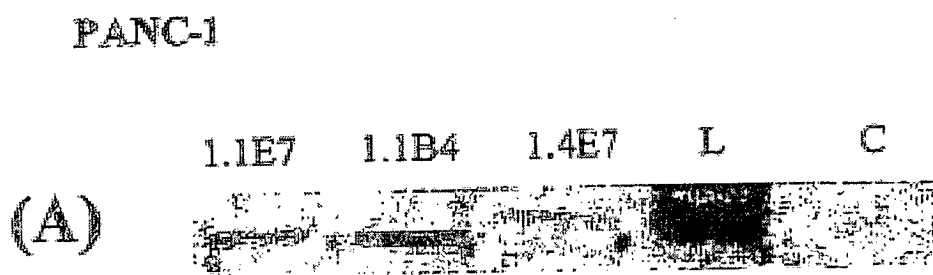
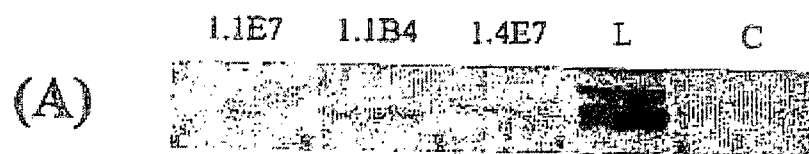


Abbildung 29

PANC-1



HupT3

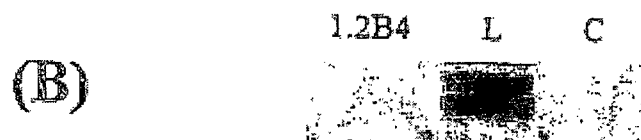


Abbildung 30

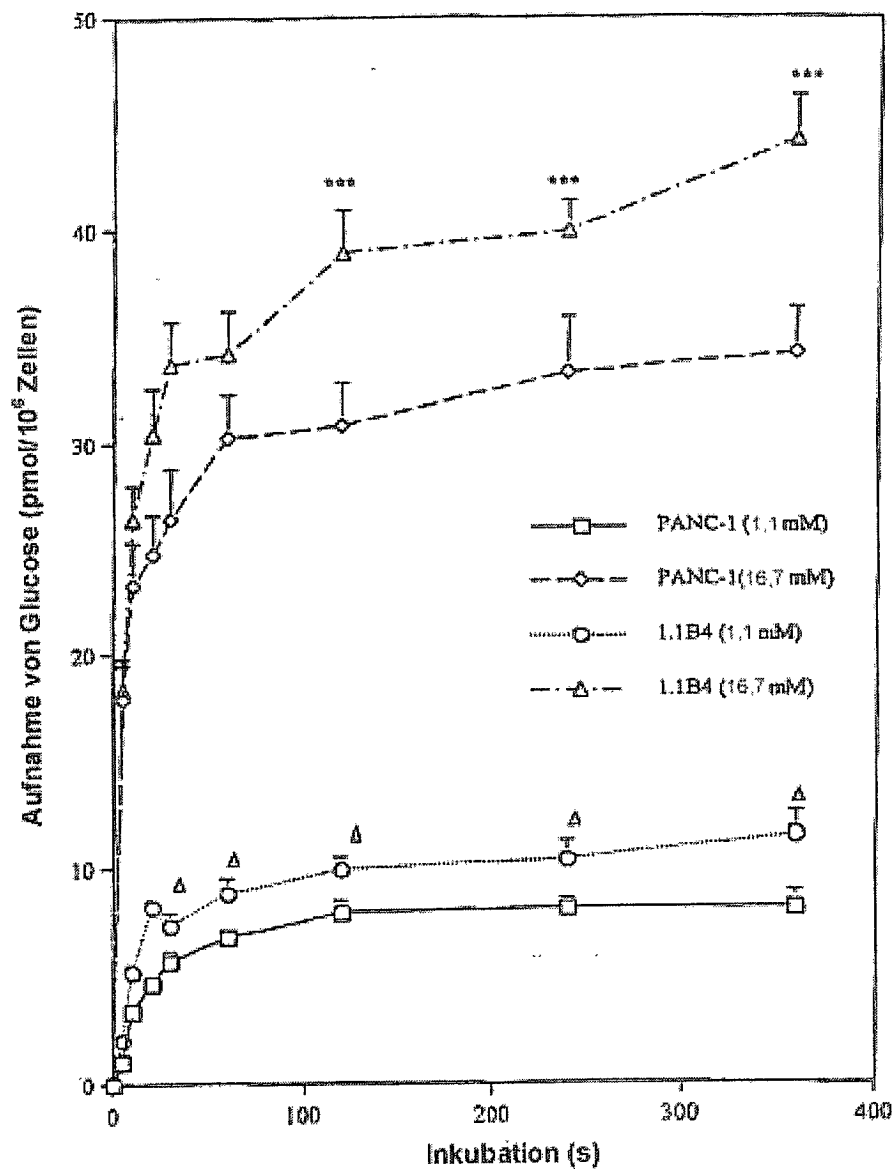


Abbildung 31

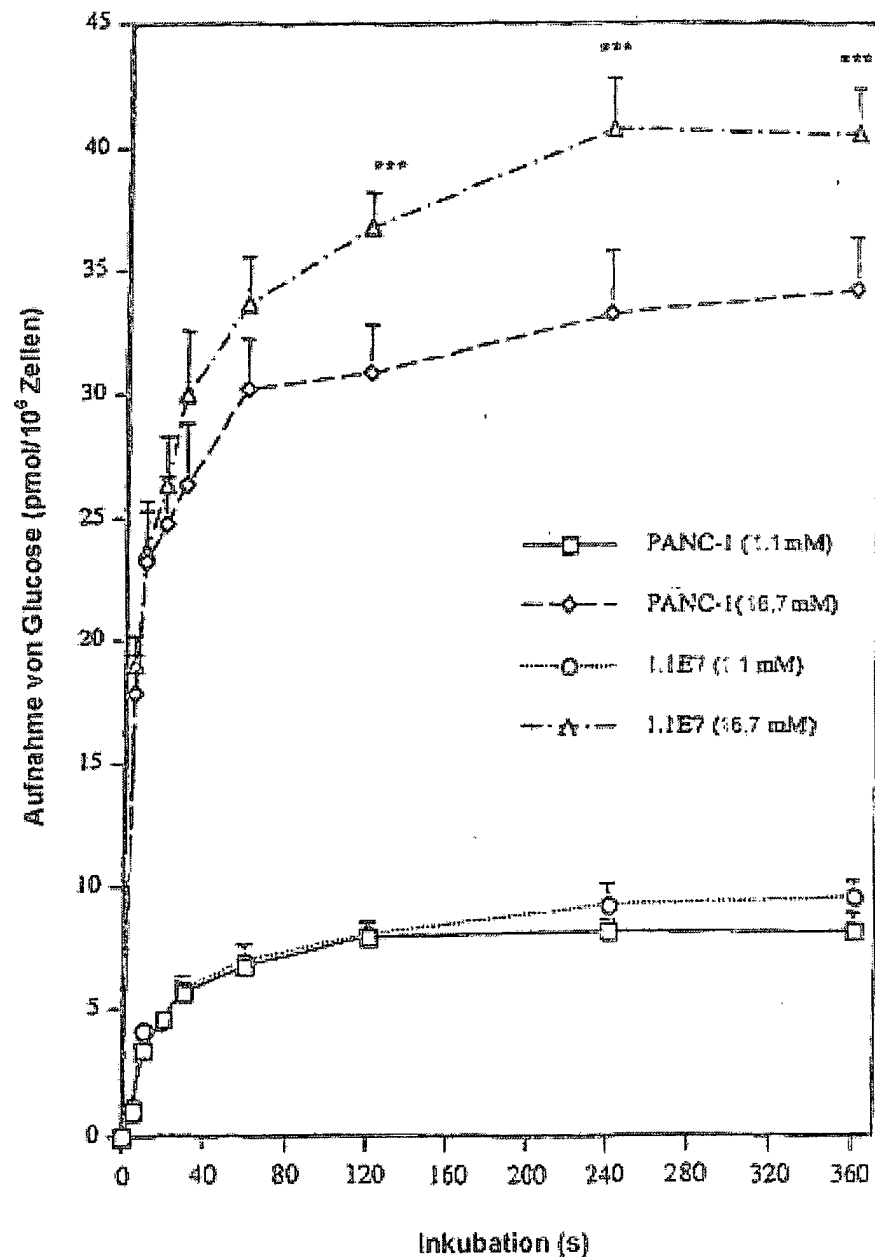


Abbildung 32

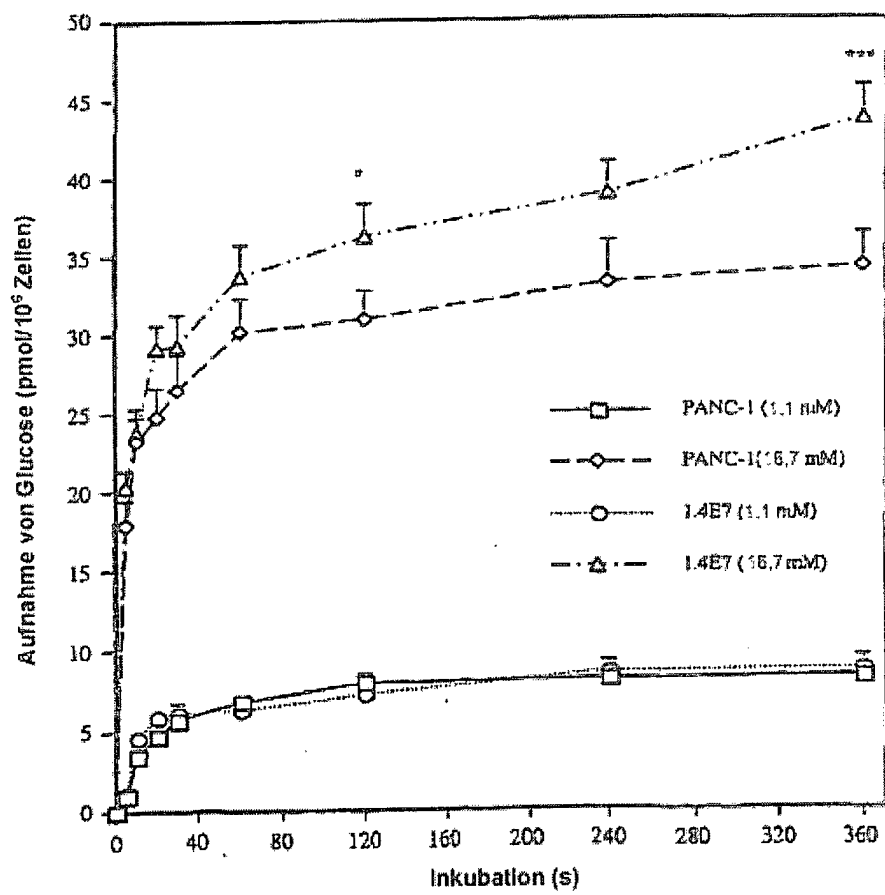


Abbildung 33

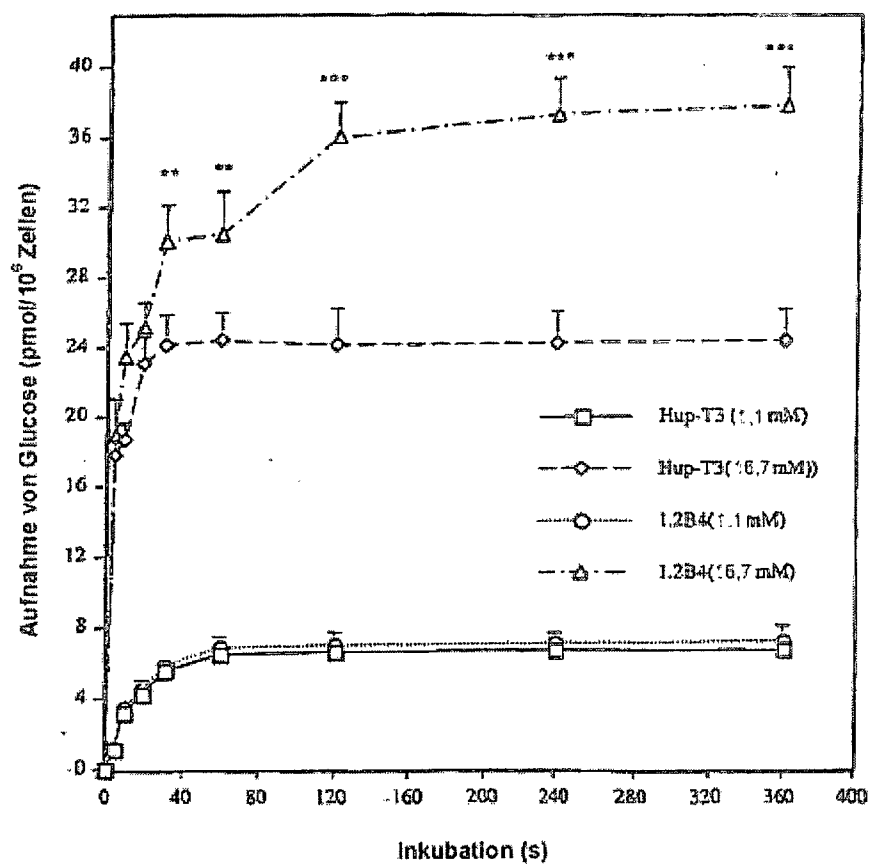


Abbildung 34

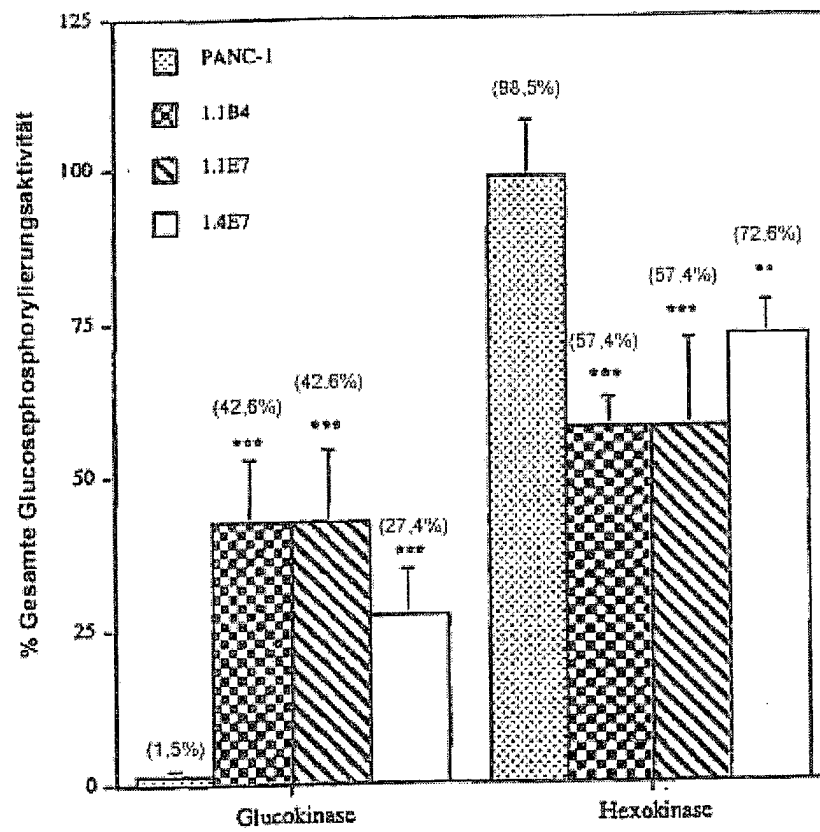


Abbildung 35

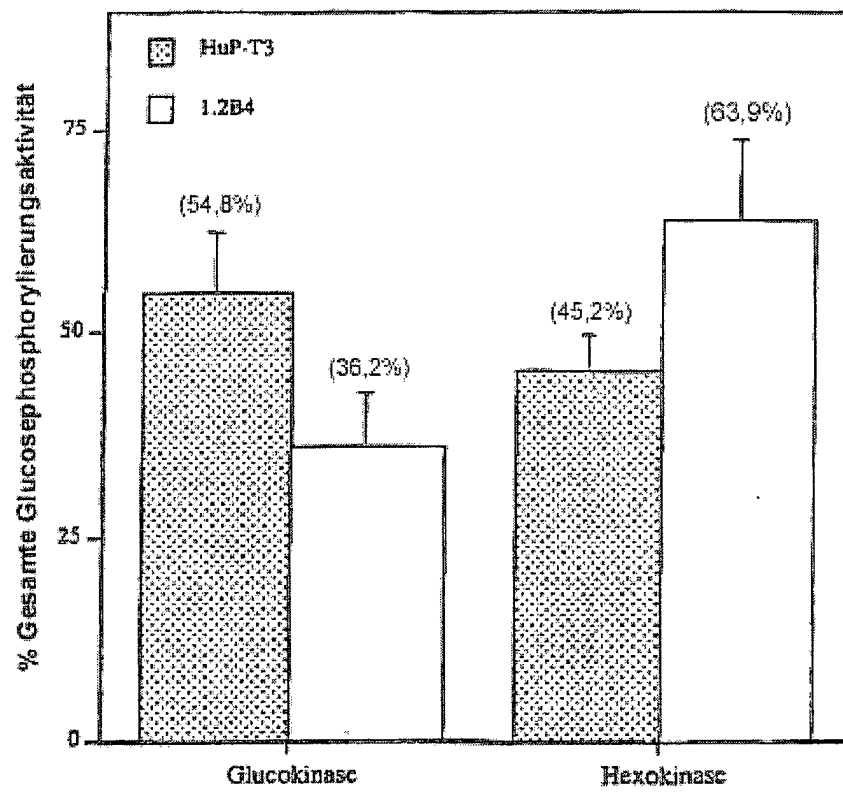


Abbildung 36

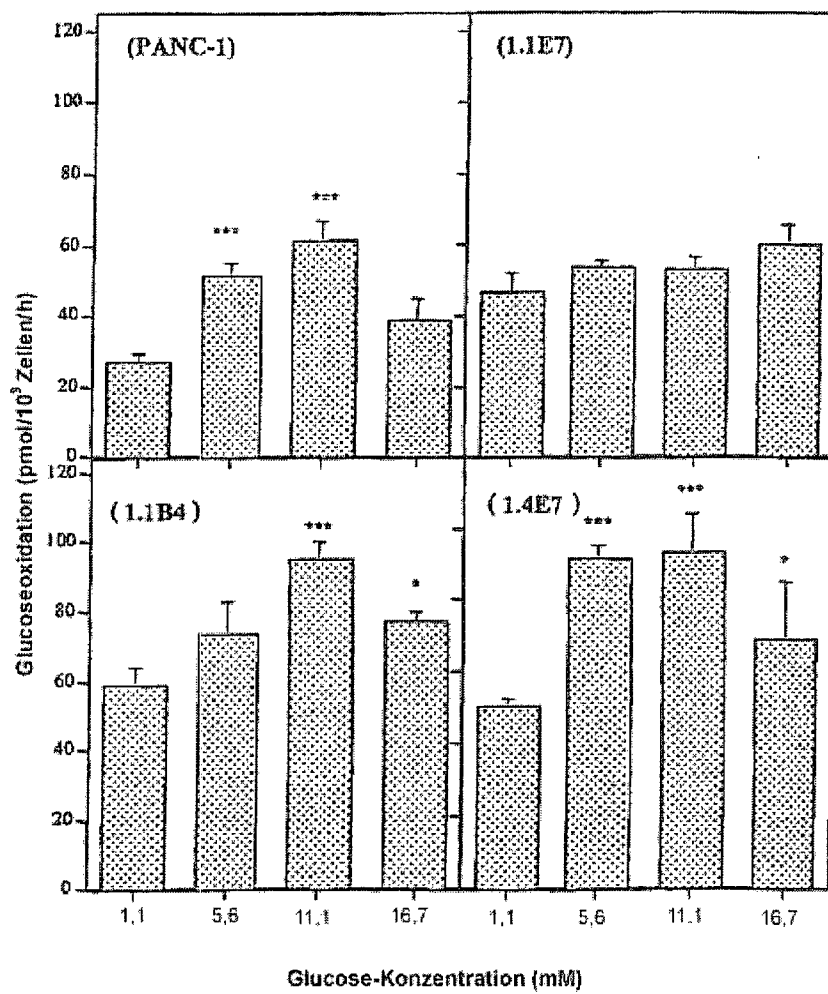


Abbildung 37

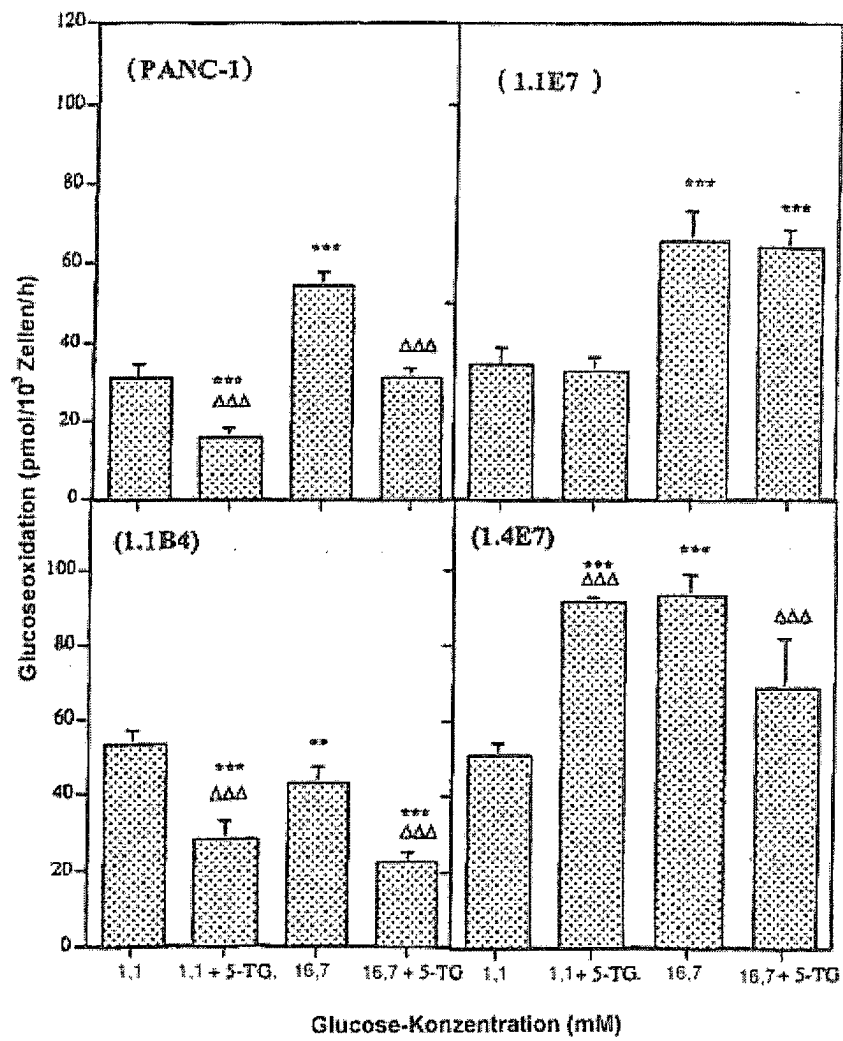


Abbildung 38

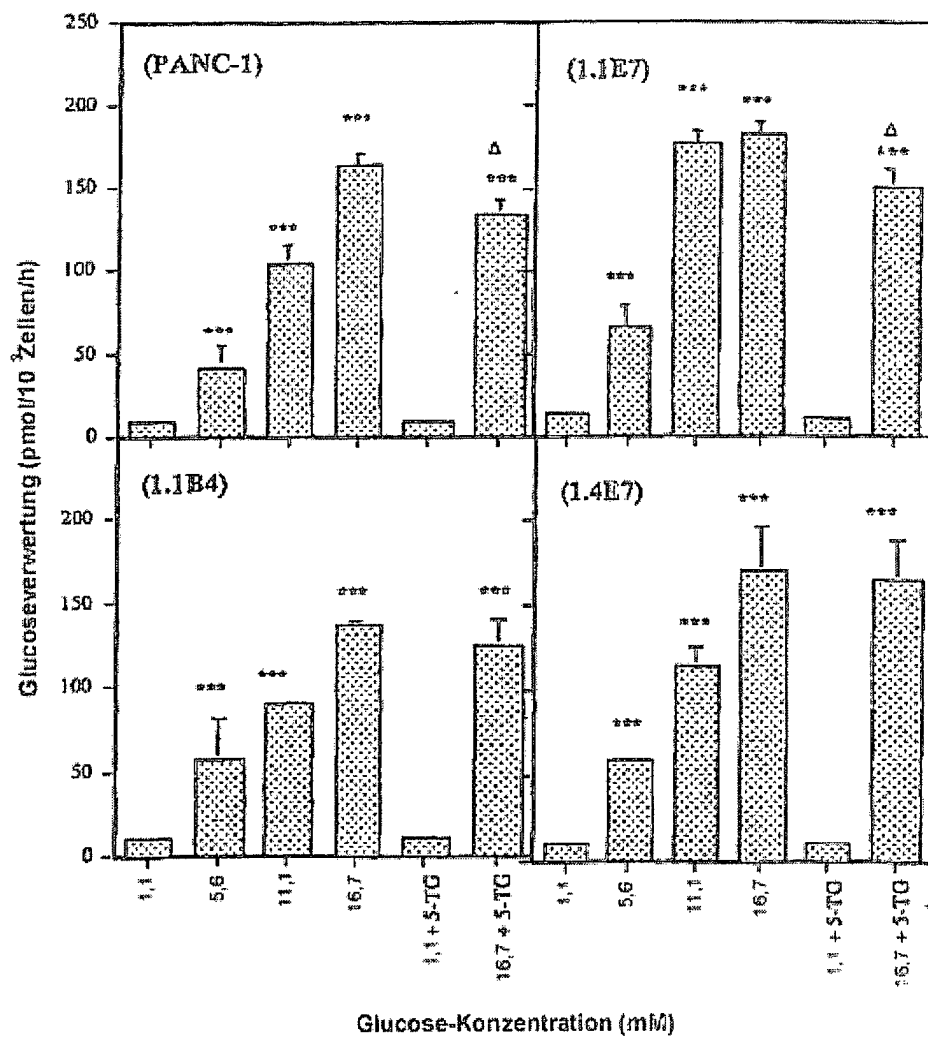


Abbildung 39

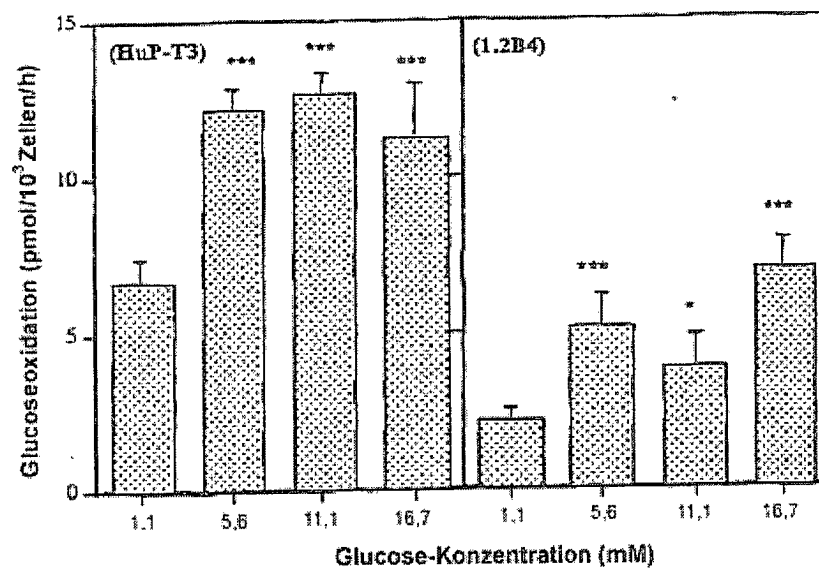


Abbildung 40

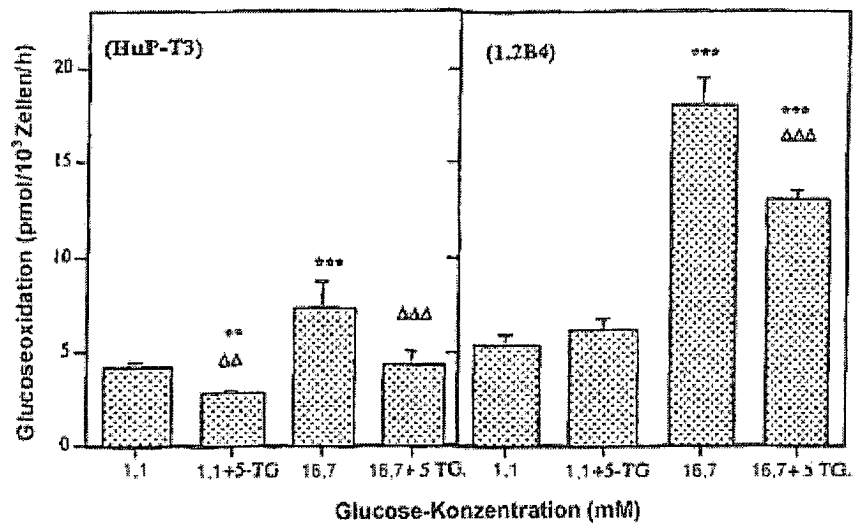


Abbildung 41

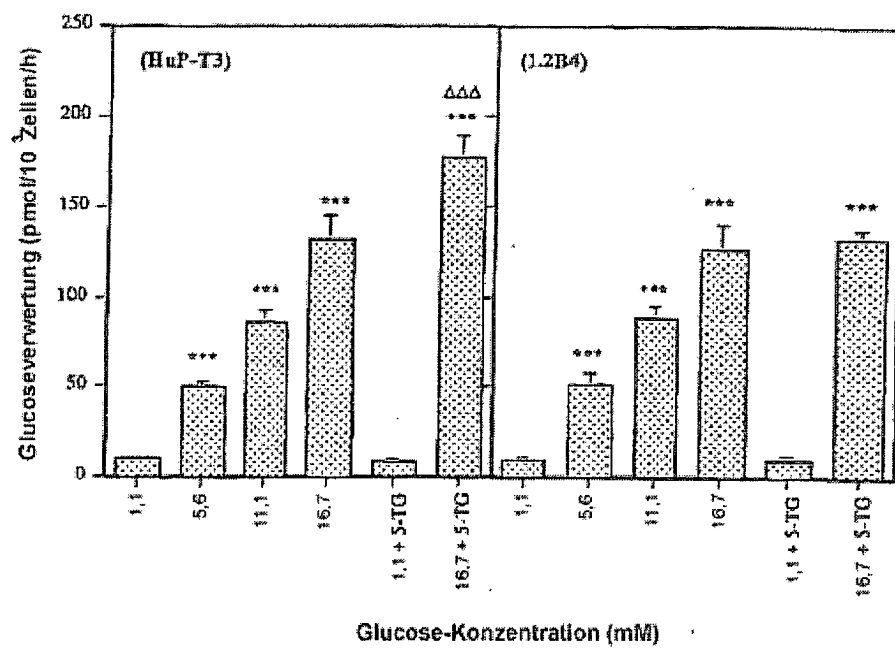


Abbildung 42

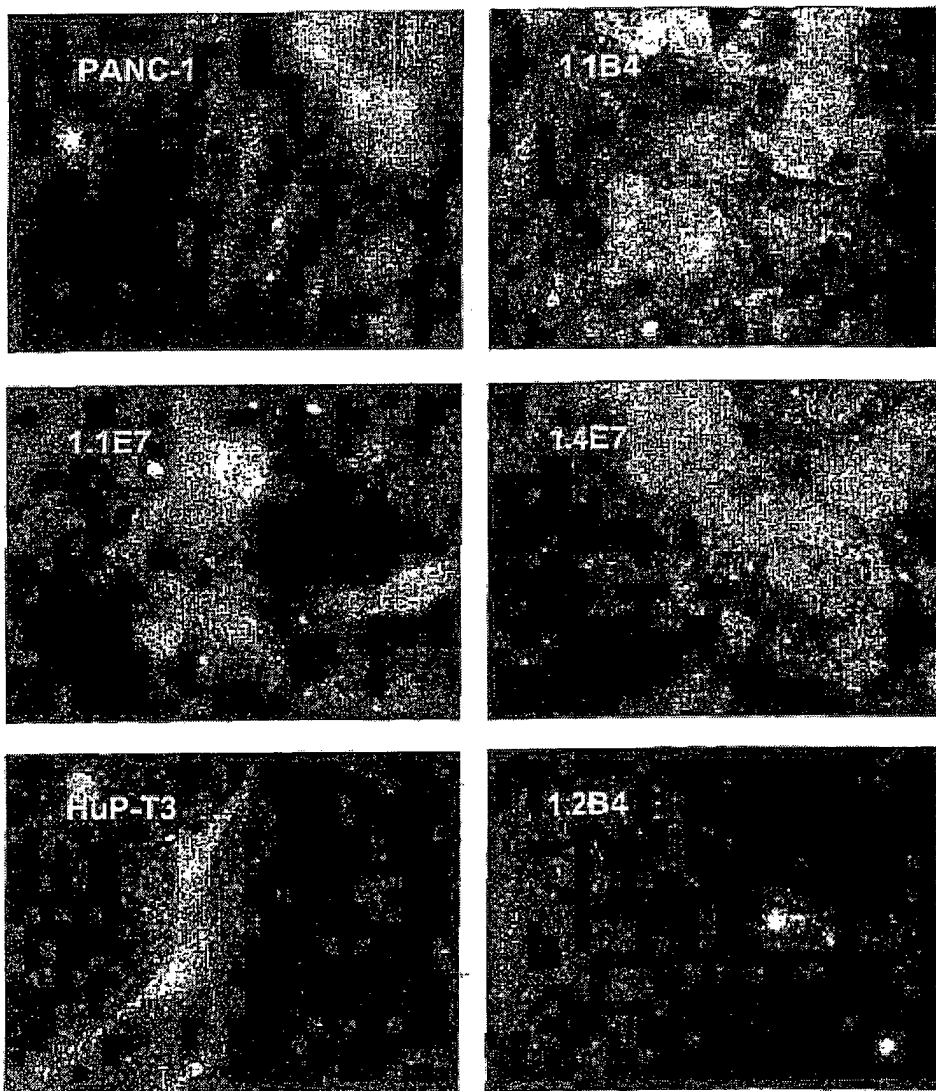


Abbildung 43

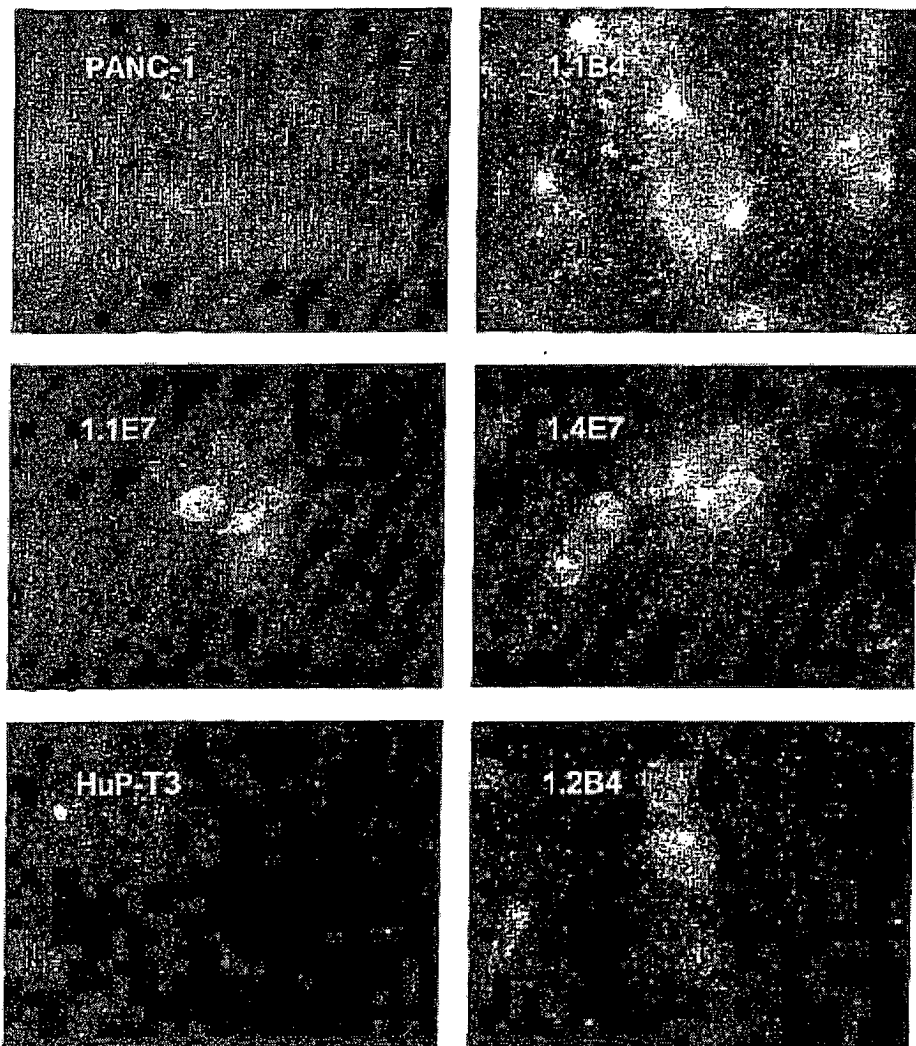


Abbildung 44

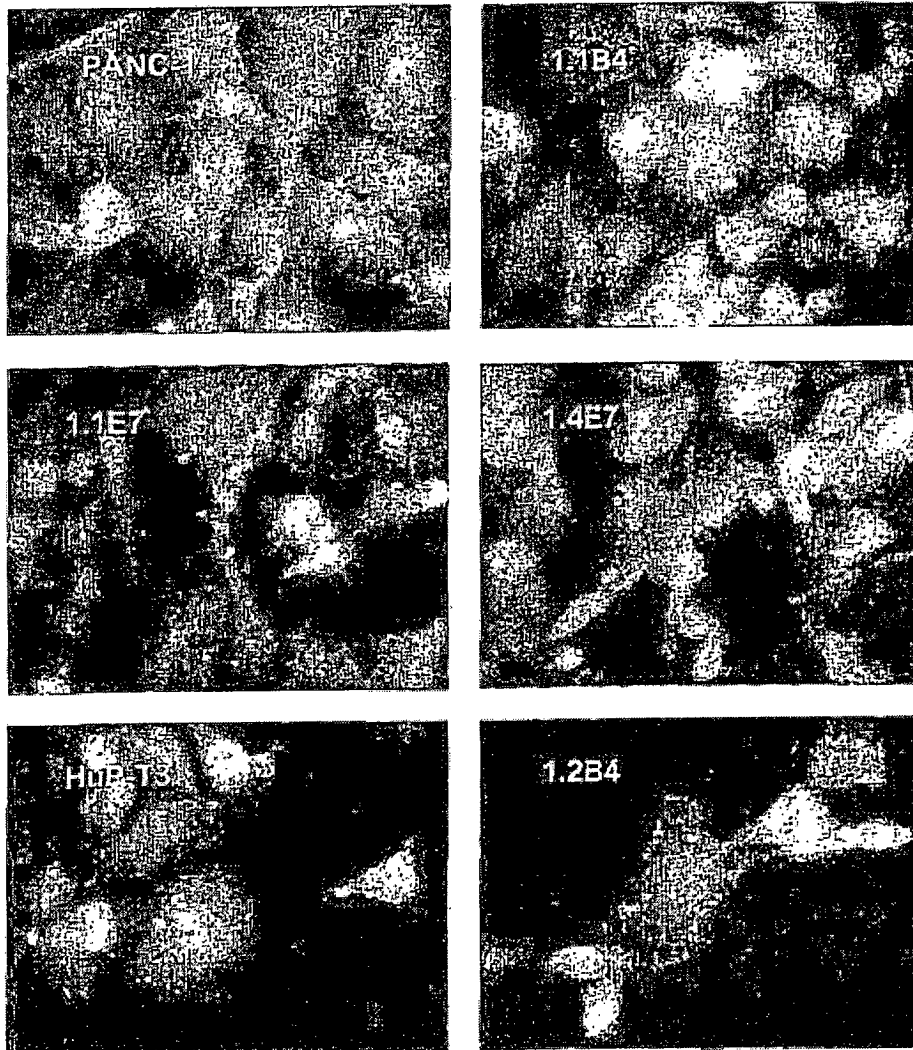


Abbildung 45

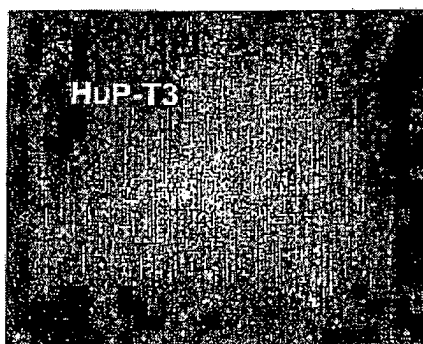
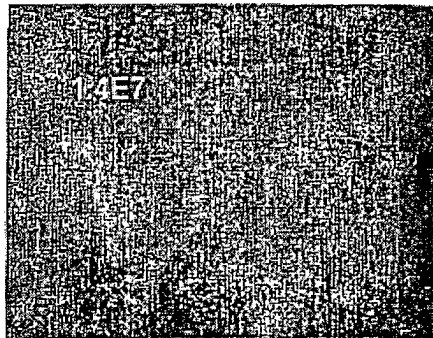
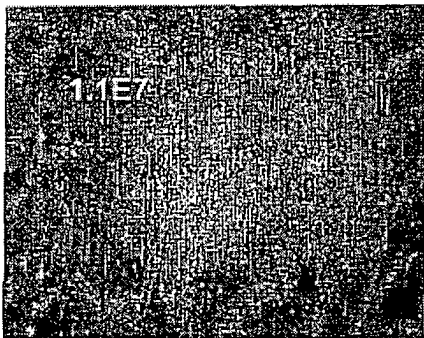
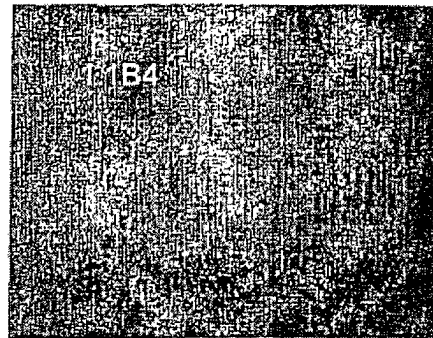
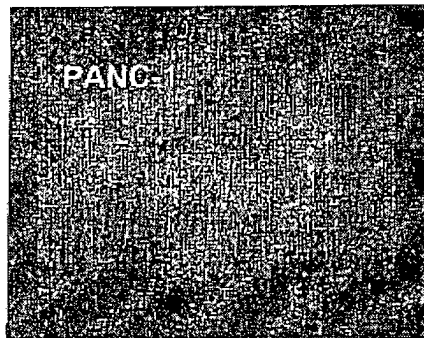


Abbildung 46

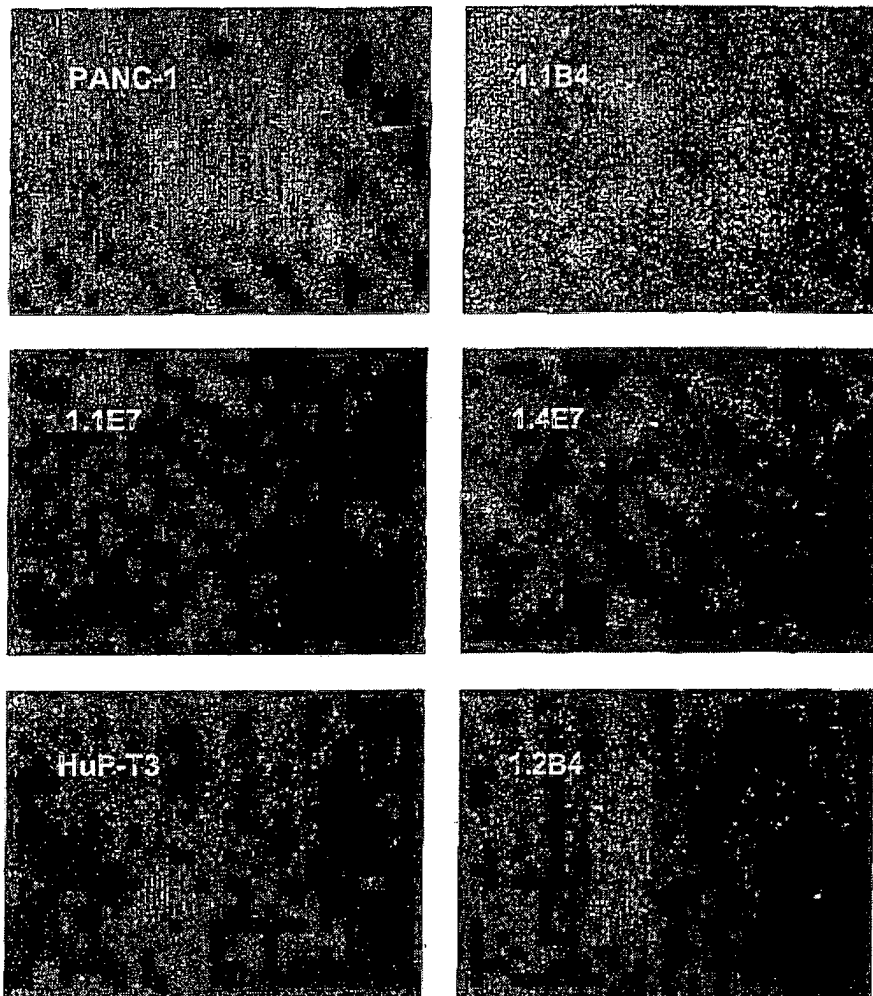


Abbildung 47

Tabelle 1: Details zu den menschlichen Insel-Präparaten

Insel- Präparate	Datum/ erhalten	Donor	Lebensfähigkeit in Kultur	Ausgeführte Fusionen
1	13.6.97	25 Jahre alt: männlich	67%	14.6.97
2	17.10.97	30 Jahre alt: männlich	39%	18.10.97
3	3.12.97	28 Jahre alt: männlich	71%	4.12.97

Abbildung 48

Tabelle 2: Kinetische Daten der Aufnahme von 3-O-Methyl-D-[1-³H]-Glucose von PANC-1, Hup-T₃ und der von menschlichen Inseln stammenden, Insulin absondernden Zell-Linien.

Zell-Typ	Anfangsgeschwindigkeit ($\mu\text{mol}/10^6$ Zellen/s)	
	1.1mM	16.7mM
HuP-T3	0,37 $\pm$ 0,03	1,95 $\pm$ 0,13
1.2B4	0,39 $\pm$ 0,03	2,54 $\pm$ 0,19*
PANC-1	0,45 $\pm$ 0,05	2,09 $\pm$ 0,21
1.1B4	0,60 $\pm$ 0,03*	3,05 $\pm$ 0,29*
1.1E7	0,47 $\pm$ 0,04	2,88 $\pm$ 0,24*
1.4E7	0,51 $\pm$ 0,04	2,70 $\pm$ 0,19*

Die Anfangsgeschwindigkeiten wurden aus der linearen Aufnahmephase zwischen 0 und 10 s berechnet. Die Werte sind Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler für 3-4 getrennte Experimente. Die Geschwindigkeitswerte waren einheitlich größer bei 16,7 im Vergleich zu 1,1 mM Glucose ($p < 0,001$).

Abbildung 49

Tabelle 3: Halb-maximale Gleichgewichtszeit der Aufnahme von 3-O-Methyl-D-[1-³H]-Glucose der Kinetik in PANC-1, HuP-T₃ und in den von menschlichen Inseln stammenden, Insulin absondernden Zell-Linien.

Zell-Typ	Halb-maximale Gleichgewichtszeit (s)	
	1.1mM	16.7mM
HuP-T3	13.75±1.70	6.00±0.52
1.2B4	10.60±2.13	4.95±0.45
PANC-1	11.05±1.52	5.50±0.37
1.1B4	9.15±0.72	4.13±0.36*
1.1E7	10.85±1.50	4.85±0.51
1.4E7	10.25±1.30	5.00±0.38

Abbildung 50

Tabelle 4: Relativer metabolischer Fluss durch den Glucoseoxidations-Mechanismus in HuP-T₃, PANC-1 und in den von menschlichen Inseln stammenden, Insulin absondernden Zell-Linien, die in 1,1 oder 16,7 mmol/l Glucose bei Ab- und Anwesenheit von 5-Thioglucoose (2 mmol/l) inkubiert wurden.

Zell-Typ	Glucoseoxidation/-verwertung(Verhältnis)			
	1.1 mM	16.7 mM	1.1 mM + TG	16.7 mM + TG
HuP-T ₃	0.39±0.04	0.06±0.01	0.31±0.02	0.03±0.01
1.2B4	0.56±0.04*	0.14±0.02**	0.62±0.03***	0.10±0.02*
PANC-1	3.00±0.12	0.33±0.02	1.66±0.15ΔΔΔ	0.23±0.01ΔΔ
1.1B4	5.34±0.17***	0.39±0.02*	2.94±0.21***ΔΔΔ	0.32±0.03*
1.1E7	3.96±0.26***	0.38±0.01*	3.04±0.19***Δ	0.28±0.02Δ
1.4E7	3.36±0.21**	0.38±0.01*	5.12±0.22***ΔΔ	0.30±0.02*

Die Werte sind Durchschnittswerte ± Standardfehler (n=4). *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 im Vergleich zu den parentalen Zellen (HuP-T₃ oder PANC-1). Δp < 0,05, ΔΔp < 0,01, ΔΔΔp,0,001 im Vergleich zu derselben Glucose-Konzentration bei Abwesenheit von 5-TG.

Abbildung 51**Tabelle 5: Zusammenfassung der immunzytochemischen Untersuchungen der funktionellen Proteine in parentalen und neuen menschlichen Inselzell-Linien.**

Zell-Linien	Glucokinase	Insulin	IAPP	Glucagon	Somatostatin
HuP-T3	+	-	++	-	-
1.2B4	++	+	++	-	-
PANC-1	+	-	++	-	-
1.1B4	+++	+++	+++	-	-
1.1E7	+++	+	+++	-	-
1.4E7	+++	++	+++	-	-

Intensität der Färbung: fehlend (-); schwach (+); moderat (++); stark (+++). Die Ausgangsdaten wurden in den Abbildungen 42 bis 46 dargestellt.

Abbildung 52

Zell-Linie	Insulin-Gehalt	Glucose-Reaktion	Reaktion auf andere Stimuli	GLUT-1-Exprimierung-Transport	Glucose-stimulierter Transport	GK-Exprimierung	% von GK	Verbesserung mit 5-Fluorogucose	Glucoseoxidation/-verwertung Verhältnis
HuP-T3	-	-	-	-	-	-	++	+	+
1.2B4	++	+	++	+	++	++	++	++	++
PANC-1	-	-	-	-	-	-	+	-	++
1.1B4	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++
1.1E7	++	++	++	++	++	++	+++	+	+++
1.4E7	++	++	++	++	++	++	++	++	+++

Tabelle 6: Zusammenfassung der funktionellen Charakteristiken von parentalen und neuen menschlichen Inselzell-Linien.

Die Stärke der Merkmale: fehlend(-); schwach, nur bestimmte Bedingung (+); moderat (++); stark (+++).

Die Ausgangsdaten sind in den Abbildungen 9 bis 41 dargestellt.

Abbildung 53

Tabelle 7: Ergebnisse des Erkennungsprofils von 1.4E7

LOKUS	CHROMOSOM- LOKALISIERUNG	PROBEN-Nr. 1.4E7, P15
D3S1358	3p	17,17
vWA	12p12-pter	15,15
FGA	4q28	21,21
Amelogenin	Xp22.1-22.3/Y:p11.2	X,X
D8S1179	8	14,15
D21S11	21	28,28
D18S51	18q21.3	12,12
D5S818	5q21-31	11,13
D13S317	13q22-31	11,11
D7S820	7q11.21-22	8,8
D16S539	16q24-qter	11,11
TH01	11p15.5	7,8
TPOX	2p23-2per	8,11
CSFIPO	5q33.3-34	10,12

Abbildung 54

Tabelle 8: Ergebnisse des Erkennungsprofils von 1.1E7

LOKUS	CHROMOSOM- LOKALISIERUNG	PROBEN-Nr. 1.1E7, P14
D3S1358	3p	17,17
vWA	12p12-pter	15,15
FGA	4q28	21,21
Amelogenin	X: p22.1-22.3/Y: p11.2	X,X
D8S1179	8	14,15
D21S11	21	28,28
D18S51	18q21.3	12,12
D5S818	5q21-31	11,13
D13S317	13q22-31	11,11
D7S820	7q11.21-22	8,8
D16S539	16q24-qter	11,11
TH01	11p15.5	7,8
TPOX	2p23-2per	8,11
CSF1PO	5q33.3-34	10,12

Abbildung 55

Tabelle 9: Ergebnisse des Erkennungsprofils von 1.1B4

LOKUS	CHROMOSOM- LOKALISIERUNG	PROBEN-Nr. 1.1B4 P24
D3S1358	3p	17,17
vWA	12p12-pter	15,15
FGA	4q28	21,21
Amelogenin	X: p22.1-22.3/Y: p11.2	X,X
D8S1179	8	14,15
D21S11	21	28,28
D18S51	18q21.3	12,12
D5S818	5q21-31	11,13
D13S317	13q22-31	11,11
D7S820	7q11.21-22	8,8
D16S539	16q24-qter	11,11
TH01	11p15.5	7,8
TPOX	2p23-2per	8,11
CSF1PO	5q33.3-34	10,12

Abbildung 56

Tabelle 10: Ergebnisse des Erkennungsprofils von 1.2B4

LOKUS	CHROMOSOM- LOKALISIERUNG	PROBEN-Nr. 1.2B4 P22
D3S1358	3p	15,16
vWA	12p12-pter	18,18
FGA	4q28	21,22
Amelogenin	X: p22.1-22.3/Y: p11.2	X,Y
D8S1179	8	15,15
D21S11	21	28,30
D18S51	18q21.3	16,17
D5S818	5q21-31	10,14
D13S317	13q22-31	9,11
D7S820	7q11.21-22	12,12
D16S539	16q24-qter	10,13
TH01	11p15.5	9,9
TPOX	2p23-2per	8,12
CSF1PO	5q33.3-34	10,10