

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
(Direktor: Professor Dr. med. M. D. Menger)

Molekularbiologische und zelltherapeutische Strategien zur Verbesserung der Vaskularisierung transplantierte Langerhans-Inseln

Dissertation

zur Erlangung des Grades einer *Doktorin der Naturwissenschaften*

Dr. rer. nat.

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2021

vorgelegt von

Lisa Katharina Nalbach

geb. am 05.12.1992 in Werne

Tag der Promotion: 15.04.2021

Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. M. W. Laschke

Prof. Dr. U. Boehm

Prof. Dr. S. R. Bornstein

Meiner Familie in größter Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1. Zusammenfassung	1
2. Summary	3
3. Einleitung	5
3.1 Epidemiologie und Therapie des Diabetes mellitus	5
3.2 Einfluss von <i>nerve/glial antigen</i> (NG) 2 auf die Revaskularisierung von Langerhans-Inseln	11
3.3 Einfluss der Inkorporation von mikrovaskulären Gefäßfragmenten (MVF) auf die Vaskularisierung von Inselorganoiden	13
4. Ziel der Arbeit	16
5. Material und Methoden	17
5.1 Materialien	17
5.1.1 Antikörper	17
5.1.2 Humane Langerhans-Inseln	17
5.1.3 Chemikalien und Enzyme	17
5.1.4 Geräte	19
5.1.5 Kulturmedien und Zusätze	19
5.1.6 Puffer und Lösungen	19
5.1.7 Verbrauchsmaterial	21
5.1.8 Software	21
5.2 Methoden	22
5.2.1 Versuchstiere	22
5.2.2 Tamoxifen-Injektion	22
5.2.3 Genotypisierungs-Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	22
5.2.4 Isolierung von Langerhans-Inseln aus dem Pankreas	23
5.2.5 Isolation humaner Langerhans-Inseln	24
5.2.6 Isolierung von MVF aus epididymalem Fettgewebe	24
5.2.7 Generierung der Inselorganoiden	24
5.2.8 HepatoQuick®-Matrix	25
5.2.9 Immunhistochemie	26
5.2.10 Proteinextraktion	26
5.2.11 SDS-Gelelektrophorese	26
5.2.12 Western Blot	27

Inhaltsverzeichnis

5.2.13	Durchflusszytometrie.....	27
5.2.13.1	Propidiumiodid- und Annexin V-Färbung	27
5.2.13.2	Bromdesoxyuridin (BrdU)-Färbung.....	28
5.2.14	Mitochondriale Messung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS).....	28
5.2.15	Insulin- und C-Peptid-Enzym-Immunoassay (ELISA)	29
5.2.16	Ribonukleinsäure (RNA)-Extraktion.....	29
5.2.17	Reverse Transkription.....	30
5.2.18	qRT-PCR.....	30
5.2.19	<i>Sprouting</i> -Assay	30
5.2.20	Modell der Rückenhautkammer und Transplantation von Langerhans-Inseln....	31
5.2.21	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie.....	32
5.2.21.1	Experimentelles Protokoll und Versuchsablauf.....	34
5.2.22	Diabetisches Mausmodell und Inseltransplantation unter die Nierenkapsel.....	35
5.2.22.1	Experimentelles Protokoll und Versuchsablauf.....	36
5.2.23	Statistische Analyse.....	37
6.	Ergebnisse	38
6.1	Einfluss von NG2 auf die Revaskularisierung von Langerhans-Inseln.....	38
6.1.1	Verifizierung des NG2 KO.....	38
6.1.2	Zelluläre Zusammensetzung der Langerhans-Inseln von NG2 ^{+/+} - und NG2 ^{-/-} - Mäusen	39
6.1.3	Zelluläre Zusammensetzung isolierter Langerhans-Inseln von NG2 ^{+/+} - und NG2 ^{-/-} -Mäusen	40
6.1.4	Insulin-Sekretion von NG2 ^{+/+} - und NG2 ^{-/-} -Langerhans-Inseln.....	41
6.1.5	Einfluss von NG2 auf die Revaskularisierung transplanterter Langerhans-Inseln.....	42
6.1.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	45
6.2	Einfluss der Inkorporation von MVF auf die Vaskularisierung von Inselorganoiden.....	46
6.2.1	Viabilität der FI, CI, PI und PI+MVF	46
6.2.2	Endokrine Funktion der Langerhans-Inseln und Inselorganoide	48
6.2.3	VEGF-A-Expression der Langerhans-Inseln und Inselorganoide	49
6.2.4	Einfluss von Insulin auf die Endothelzellen der MVF	50
6.2.5	Glukose-abhängige angiogene Aktivität der PI+MVF	51
6.2.6	Vaskularisierung transplanterter FI, CI, PI und PI+MVF.....	52
6.2.7	Endokrine Aktivität der Langerhans-Inseln und Inselorganoide.....	57
6.2.8	Fusion muriner MVF mit humanen, primären Inselzellen.....	61
6.2.9	Zusammenfassung der Ergebnisse	64

7. Diskussion	65
7.1 Einfluss von NG2 auf die Revaskularisierung von Langerhans-Inseln.....	65
7.1.1 Schlussfolgerung und Ausblick.....	70
7.2 Einfluss der Inkorporation von MVF auf die Vaskularisierung von Inselorganoiden.....	70
7.2.1 Schlussfolgerung und Ausblick.....	77
8. Literaturverzeichnis	80
9. Danksagung	97
10. Publikationen	98
10.1 Originalarbeiten aus dieser Dissertation	98
10.2 Weitere Originalarbeiten.....	98
10.3 Übersichtsarbeiten.....	99
10.4 Zitierfähige Abstracts	99
10.5 Nichtzitierfähige Abstracts.....	100
11. Lebenslauf	102

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines physiologischen Zuckerhaushalts sowie des Zuckerhaushalts bei T1D und T2D.....	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Inseltransplantation.....	7
Abbildung 3: Hürden der Inseltransplantation.....	8
Abbildung 4: Funktion von Perizyten und Aufbau von NG2.....	12
Abbildung 5: Generierung und Charakterisierung von PI+MVF.....	14
Abbildung 6: Isolierung von Langerhans-Inseln.....	23
Abbildung 7: Isolierung von MVF aus epididymalem Fettgewebe.....	24
Abbildung 8: Generierung von PI und PI+MVF.....	25
Abbildung 9: Implantation der Rückenhautkammer.....	31
Abbildung 10: Inseltransplantation unter die Nierenkapsel.....	35
Abbildung 11: Nachweis und schematische Darstellung des Tamoxifen-induzierten KO von NG2.....	39
Abbildung 12: Zelluläre Zusammensetzung der Langerhans-Inseln im Pankreas von NG2 ^{+/+} - und NG2 ^{-/-} -Mäusen.....	40
Abbildung 13: Zelluläre Zusammensetzung der isolierten Langerhans-Inseln von NG2 ^{+/+} - und NG2 ^{-/-} -Mäusen.....	41
Abbildung 14: Insulin-Sekretion von NG2 ^{+/+} - und NG2 ^{-/-} -Langerhans-Inseln.....	42
Abbildung 15: Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs der Analysen im Rückenhautkammer-Modell.....	42
Abbildung 16: Einfluss von NG2 auf die Revaskularisierung transplantierte Langerhans-Inseln.....	43
Abbildung 17: Zelluläre Zusammensetzung der Langerhans-Inseln von NG2 ^{+/+} - und NG2 ^{-/-} - Mäusen 14 Tage nach Transplantation.....	45
Abbildung 18: Propidiumiodid- und Annexin V-Färbung von FI, CI, PI, PI+MVF und H ₂ O ₂ -kultivierten CI.....	47
Abbildung 19: Mitochondriale H ₂ O ₂ -Level in FI, CI, PI und PI+MVF.....	47
Abbildung 20: HO-1-Expression der FI, CI, PI und PI+MVF.....	48
Abbildung 21: Insulin-Expression und -Sekretion der FI, CI, PI und PI+MVF.....	49
Abbildung 22: VEGF-A-Expression der FI, CI, PI und PI+MVF.....	49
Abbildung 23: Einfluss von Insulin auf die Proliferation von Endothelzellen in PI+MVF.....	50
Abbildung 24: Einfluss von Insulin auf die Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt in MVF.....	51
Abbildung 25: <i>Sprouting</i> -Analyse der PI+MVF in Abhängigkeit von Glukose.....	51

Abbildung 26: Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs der Analyse im Rückenhautkammer-Modell	52
Abbildung 27: Analyse der Vaskularisierung transplantierter FI, CI, PI und PI+MVF im Rückenhautkammer-Modell.....	53
Abbildung 28: Anwachsrate der FI, CI, PI und PI+MVF an Tag 14 nach Transplantation.....	54
Abbildung 29: Fenestrierung der Gefäße in transplantierten FI, CI, PI und PI+MVF.....	55
Abbildung 30: Mikrohämodynamische Parameter der transplantierten FI, CI, PI und PI+MVF.....	56
Abbildung 31: Zelluläre Zusammensetzung der FI, CI, PI und PI+MVF nach Transplantation.....	57
Abbildung 32: Bestimmung der kritischen Langerhans-Insel-Masse unter Verwendung des STZ-induzierten, diabetischen Mausmodells.....	58
Abbildung 33: Endokrine Funktion der FI und PI+MVF im STZ-induzierten, diabetischen Mausmodell.....	60
Abbildung 34: Zelluläre Zusammensetzung der FI und PI+MVF an Tag 28 nach Transplantation unter die Nierenkapsel.....	61
Abbildung 35: Generierung von hPI+MVF aus humanen Langerhans-Inseln und murinen MVF.....	62
Abbildung 36: Zelluläre Zusammensetzung der hFI, hCI, hPI und hPI+MVF.....	63
Abbildung 37: Angiogene und endokrine Aktivität der hFI, hCI, hPI und hPI+MVF.....	64
Abbildung 38: Zukunftsperspektive des Einsatzes von hPI+MVF.....	78
Tabelle 1: Mikrohämodynamische Parameter der Blutgefäße transplantierter Langerhans-Inseln von NG2 ^{+/+} - und NG2 ^{-/-} -Mäusen im Rückenhautkammer-Modell.....	44

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	-	Volumenprozent
% (w/v)	-	Gewichtsprozent
°C	-	Grad Celsius
µm	-	Mikrometer
3D	-	Dreidimensional
ADI	-	<i>Alberta Diabetes Institute</i>
ANOVA	-	Varianzanalyse
APS	-	Ammoniumpersulfat
ARE	-	<i>Amino acid response elements</i>
ATP	-	Adenosintriphosphat
AUC	-	Fläche unter der Kurve
bp	-	Basenpaare
BrdU	-	Bromdesoxyuridin
CaCl ₂	-	Calciumchlorid
CD31	-	<i>Cluster of differentiation 31</i>
cDNA	-	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CI	-	Kultivierte Langerhans-Insel
CITP	-	Inseltransplantationszentren
CO ₂	-	Kohlenstoffdioxid
CSPG4	-	Chondroitinsulfat-Proteoglykan 4
DMEM	-	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	-	Dimethylsulfoxid
ECL	-	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
ECM	-	Extrazelluläre Matrix
EPOR	-	Erythropoietin-Rezeptor
eEND	-	Endotheliomzelllinie der Maus
ELISA	-	Enzym-Immunoassay
ERK1/2	-	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
FACS	-	<i>Fluorescence-activated cell-sorting</i>
FCS	-	Fötale Kälberserum
FGF	-	<i>fibroblast growth factor</i>
FI	-	Frisch isolierte Langerhans-Insel
FITC	-	Fluoreszeinisothiocyanat
GLUT 2	-	Glukosetransporter Typ 2
GLUT 4	-	Glukosetransporter Typ 4
h	-	Stunde
H ₂ O	-	Wasser
H ₂ O ₂	-	Wasserstoffperoxid
HBSS	-	<i>Hanks' balanced salt solution</i>
hESC	-	Humane embryonale Stammzelle
HGF	-	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HPF	-	<i>High-power field</i>
HPSE	-	Heparanasen
HRP	-	Meerrettich-Peroxidase
i.p.	-	Intraperitoneal

Abkürzungsverzeichnis

i.v.	-	Intravenös
IDF	-	Internationaler Diabetes-Verband
IGFR	-	<i>Insulin-like growth factor receptor</i>
iPSC	-	Induzierte pluripotente Stammzellen
IR	-	Insulinrezeptor
kDa	-	Kilodalton
Kg	-	Kilogramm
KO	-	<i>Knockout</i>
KRB	-	Krebs-Ringer Puffer
M	-	Mol
min	-	Minute
mM	-	Millimol
MMP	-	Matrixmetalloproteinasen
MSC	-	Mesenchymale Stammzellen
MUPP	-	<i>Multi-PDZ domain protein</i>
MVF	-	Mikrovaskuläre Gefäßfragmente
MW	-	Mittelwert
NEM	-	N-Ethylmaleinimid
NG2	-	<i>Nerve/glia antigen 2</i>
NIH	-	Nationales Gesundheitsinstitut
Orp1	-	<i>Oxygen-regulated protein 1</i>
PAGE	-	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	-	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	-	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	-	Paraformaldehyd
PI	-	Pseudo-Insel
PI+MVF	-	Prävaskularisierte PI
PMSF	-	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPP	-	Thrombozyten-armes Plasma
PVDF	-	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	-	Quantitative Echtzeit-PCR
RBC	-	Rotes Blutkörperchen
RIPA	-	Radioimmunpräzipitationsassay
RNA	-	Ribonukleinsäure
roGFP	-	Redox-sensitives grün-fluoreszierendes Protein
ROS	-	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	-	Raumtemperatur
s	-	Sekunde
SD	-	Standardabweichung
SDS	-	Natriumdodecylsulfat
STZ	-	Streptozotocin
T1D	-	Diabetes mellitus Typ 1
T2D	-	Diabetes mellitus Typ 2
TBS	-	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	-	Tris-gepufferte Kochsalzlösung+Tween
TEMED	-	Tetramethylethylendiamin
TMB	-	Tetramethylbenzidin
U	-	Einheiten

Abkürzungsverzeichnis

u.a.	-	Unter anderem
VEGF	-	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
W	-	Watt
WHO	-	Weltgesundheitsorganisation

1. Zusammenfassung

Die Transplantation von Langerhans-Inseln als therapeutischer Ansatz für Typ I Diabetes-Patienten stellt eine vielversprechende Alternative zur täglichen Insulinapplikation dar. Da die transplantierten Langerhans-Inseln allerdings bisher unzureichend revaskularisiert werden und daher ihre endokrine Funktion und ihr Überleben oft nicht dauerhaft garantiert sind, konnte sich diese Therapiemethode bisher nicht in der klinischen Routine durchsetzen. Entsprechend wird bis heute an der Entwicklung neuer Ansätze geforscht, um die Vaskularisierung transplanteder Langerhans-Inseln zu verbessern.

Nerve/glial antigen (NG) 2 ist ein Proteoglykan, welches von Perizyten exprimiert wird und an der Regulation der Angiogenese beteiligt ist. Der Einfluss von NG2 auf die Inseltransplantation ist jedoch bis heute nicht bekannt. Daher wurde im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit untersucht, ob NG2 die Revaskularisierung transplanteder Inseln fördert.

Dazu wurden die Langerhans-Inseln von NG2^{+/+}-Wildtyp- und NG2^{-/-}-*Knockout*-Mäusen zunächst mittels Immunhistochemie auf ihre zelluläre Zusammensetzung untersucht. Anschließend konnte die endokrine Funktion der isolierten Inseln mittels eines Insulin-Enzym-Immunoassays analysiert werden. Zuletzt wurden die NG2^{+/+}- und NG2^{-/-}-Inseln auf den quergestreiften Hautmuskel der Rückenhautkammer von NG2^{+/+}-Mäusen transplanted, um deren Revaskularisierung mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie sowie immunhistochemischen Methoden untersuchen zu können.

Im Rahmen dieser Analysen konnte gezeigt werden, dass sich NG2^{+/+}- und NG2^{-/-}-Langerhans-Inseln weder in ihrer zellulären Zusammensetzung noch in ihrer Insulin-Sekretion unterscheiden. NG2^{-/-}-Inseln wiesen jedoch im Vergleich zu NG2^{+/+}-Kontrollen eine signifikant reduzierte funktionelle Gefäßdichte sowie eine verringerte Anzahl CD31-positiver Blutgefäße an Tag 10 nach Transplantation auf.

Folglich konnte gezeigt werden, dass der Verlust von NG2 die Revaskularisierung transplanteder Langerhans-Inseln beeinträchtigt. Dies verdeutlicht die Bedeutung dieses perizytären Oberflächenproteins für die Inseltransplantation.

Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Inkorporation von mikrovaskulären Fragmenten (MVF) in Inselorganoide deren Vaskularisierung verbessert. MVF werden aus Fettgewebe gewonnen und wurden bereits als potente Vaskularisierungseinheiten zur Prävasikularisierung von verschiedenen Geweben beschrieben. Bisher fanden sie allerdings noch keine Anwendung in der Inseltransplantation.

Um prävasikularisierte Inselorganoide (PI+MVf) zu generieren, wurden Inselzellen und MVf aus C57BL/6N-Spendermäusen isoliert und über 5 Tage mithilfe der *Liquid-Overlay*-Technik co-kultiviert. Frisch isolierte Langerhans-Inseln, kultivierte Langerhans-Inseln und nicht prävasikularisierte Inselorganoide dienten als Kontrollen. Die Viabilität der Langerhans-Inseln und Inselorganoide wurde anhand von durchflusszytometrischen Analysen und der Verwendung von Spendermäusen, die einen endogenen Wasserstoffperoxid-Sensor exprimieren, bestimmt. Mithilfe von immunhistochemischen Untersuchungen und Western Blot-Analysen wurde die Interaktion zwischen den β - und Endothelzellen innerhalb der PI+MVf verifiziert. Die angiogene Aktivität der PI+MVf wurde *in vivo* unter Verwendung des murinen Rückenhautkammer-Modells und der repetitiven intravitralen Fluoreszenzmikroskopie sowie immunhistochemischer Methoden analysiert. Abschließend wurden PI+MVf in diabetische Empfängermause transplantiert, um die endokrine Funktion der Inselorganoide *in vivo* nachzuweisen.

Im Rahmen dieser Analysen konnte gezeigt werden, dass die parakrine Signalübertragung zwischen β -Zellen und MVf die Viabilität und angiogene Aktivität der PI+MVf verbessert. *In vivo* wiesen die PI+MVf innerhalb der ersten Tage nach Transplantation eine beschleunigte Vaskularisierung auf, was anhand einer gesteigerten funktionellen Gefäßdichte und einem erhöhten Anteil an CD31-positiven Endothelzellen innerhalb der PI+MVf gezeigt werden konnte. Zudem induzierte die Transplantation von 250 Inselorganoiden in diabetische Mäuse innerhalb von 4 Tagen physiologische Blutglukosespiegel, während die identische Zahl frisch isolierter Langerhans-Inseln über den gesamten Beobachtungszeitraum von 28 Tagen nicht zu einer Normoglykämie führte.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Inkorporation von MVf die Vaskularisierung von PI+MVf deutlich verbessert und die Wiederherstellung einer Normoglykämie in diabetischen Mäusen beschleunigt. Der hier vorgestellte Prävasikularisierungsansatz könnte damit eine vielversprechende Strategie sein, um in Zukunft die Erfolgsraten der klinischen Inselzelltransplantation zu erhöhen.

2. Summary

Pancreatic islet transplantation is a promising therapeutic approach for the treatment of type 1 diabetic patients. However, this method is not yet established in clinical routine, because it is still limited by failed islet survival and endocrine function due to insufficient islet vascularization. To overcome this problem, current research focuses on strategies to improve the vascularization of transplanted islets.

Nerve/glial antigen (NG) 2 is a proteoglycan, which is expressed on pericytes and a crucial regulator of angiogenesis. However, the influence of this proteoglycan on islet transplantation is still unknown. Accordingly, the aim of the first study section of the present thesis was to clarify whether NG2 promotes the revascularization of transplanted pancreatic islets.

For this purpose, islets were isolated from NG2^{+/+} wild-type and NG2^{-/-} knockout mice and analyzed by immunohistochemistry to examine their cellular composition. Their endocrine function was assessed by an insulin-enzyme-linked immunosorbent assay. Moreover, NG2^{+/+} and NG2^{-/-} islets were transplanted into the dorsal skinfold chamber of NG2^{+/+} mice to study their revascularization by intravital fluorescence microscopy and immunohistochemistry.

It could be shown that NG2^{+/+} and NG2^{-/-} islets do neither differ in their cellular composition nor in their insulin secretion. However, NG2^{-/-} islets exhibited a significantly reduced functional microvessel density and a lower number of CD31-positive blood vessels on day 10 after transplantation when compared to NG2^{+/+} controls.

These results demonstrate that the loss of NG2 impairs the revascularization of transplanted islets, indicating the importance of this surface protein for successful islet transplantation.

In the second study section of the present thesis, it was examined whether the incorporation of microvascular fragments (MVF) in islet organoids improves their vascularization after transplantation. MVF can be isolated from adipose tissue and have already been described as potent vascularization units for the prevascularization of various tissues. However, their impact on the engraftment of transplanted islets has not been analyzed, yet.

For the generation of prevascularized islet organoids (PI+MVF), islet cells and MVF were isolated from C57BL/6N donor mice and co-cultured for 5 days by means of the liquid overlay technique. Freshly isolated islets, cultured islets and non-prevascularized islet organoids served as controls. The islets' and islet organoids' viability was determined by flow cytometric analysis and donor mice expressing an endogenous hydrogen peroxide sensor. Immunohistochemical studies and Western blot analysis were used to investigate the interaction between β -cells and endothelial cells within PI+MVF. The angiogenic potential of

PI+MVF was determined by means of the mouse dorsal skinfold chamber model in combination with repetitive intravital fluorescence microscopy and immunohistochemical methods. Finally, PI+MVF were transplanted into diabetic recipient mice to verify their endocrine function *in vivo*.

It could be shown that the paracrine signal transduction between β -cells and MVF improves the viability and angiogenic activity of PI+MVF. *In vivo*, PI+MVF exhibited an accelerated vascularization, as demonstrated by an increased functional microvessel density during the entire observation period and an increased fraction of endothelial cells 14 days after transplantation. Moreover, the transplantation of 250 PI+MVF into diabetic mice resulted in physiological blood glucose levels within 4 days, while the identical number of freshly isolated islets did not restore normoglycemia during the entire observation period of 28 days.

Taken together, these results demonstrate that the incorporation of MVF significantly improves the vascularization of transplanted PI+MVF and accelerates the restoration of normoglycemia in diabetic mice. Thus, this prevascularization approach may be a promising strategy to increase the success of clinical islet cell transplantation in the future.

3. Einleitung

3.1 Epidemiologie und Therapie des Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselerkrankung, von der weltweit mehr als 463 Millionen Menschen betroffen sind [Thomas *et al.*, 2019]. Diese Zahl soll laut des internationalen Diabetes-Verbands (IDF) im Jahr 2045 voraussichtlich auf 700 Millionen Menschen ansteigen [Cho *et al.*, 2018], was eine weltweite Herausforderung für das Gesundheitssystem darstellen wird. Das Krankheitsbild zeichnet sich durch einen erhöhten Blutglukosespiegel (Hyperglykämie) aus, welcher aus Defekten in der Insulin-Sekretion, der Insulinwirkung oder einer Kombination aus beidem resultiert. Das Schlüsselprotein Insulin ist ein Peptidhormon, das in den β -Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas produziert und abhängig vom Blutglukosespiegel sekretiert wird. Über den Blutkreislauf gelangt das Insulin zu peripheren Geweben, wo es durch die Bindung an spezifische Insulinrezeptoren (IR) auf der Zelloberfläche die Aufnahme von Glukose durch den Glukosetransporter Typ (GLUT) 4 ermöglicht (*Abbildung 1*) [Leto & Saltiel, 2012]. Dieser Mechanismus sichert die Energiegewinnung in den peripheren Zellen sowie die Glukosehomöostase im Körper.

Fehlregulationen des Zuckerhaushalts resultieren in der Ausbildung eines Diabetes mellitus, was auf unterschiedliche pathologische Prozesse zurückgeführt werden kann. Grundsätzlich wird zwischen Diabetes mellitus Typ 1 (T1D) und Diabetes mellitus Typ 2 (T2D) unterschieden. T1D-Patienten leiden an einer Autoimmunerkrankung, bei der die β -Zellen der Langerhans-Inseln zerstört und folglich kein Insulin mehr produziert werden kann. Durch diesen absoluten Insulinmangel kann der Blutglukosespiegel nicht mehr reguliert werden, was in einer chronischen Hyperglykämie resultiert. Dieses Krankheitsbild manifestiert sich bereits im frühen Kindesalter und stellt die schwerwiegendere Form des Diabetes mellitus dar [Warshauer *et al.*, 2020]. Im Gegensatz dazu entwickelt sich der T2D oftmals erst ab dem 40. Lebensjahr und ist durch einen relativen Insulinmangel charakterisiert, der durch eine Insulinresistenz des Zielgewebes oder durch eine unzureichende Sekretion von Insulin hervorgerufen wird. Eine chronische Hyperglykämie führt jedoch sowohl im Falle des T1D als auch des T2D zu Schädigungen und Funktionsstörungen von Organen wie den Augen, Nieren und dem Herz sowie des Nervensystems oder der Blutgefäße. Diese pathologischen und funktionellen Veränderungen sind allerdings bei T2D meist weniger stark ausgeprägt als bei T1D [American Diabetes, 2013; Wu, 2015]. Durch diese schwerwiegenden Schädigungen ist Diabetes mellitus oftmals mit weiteren Erkrankungen wie Adipositas, Schlaganfall, kardiovaskulären Erkrankungen, Neuropathien und Amputationen der Gliedmaßen assoziiert und zählt laut dem

internationalen Diabetes-Verband mit mehr als 4,2 Millionen Todesfällen im Jahr 2018 zu einer der häufigsten Todesursachen weltweit [Cho *et al.*, 2018].

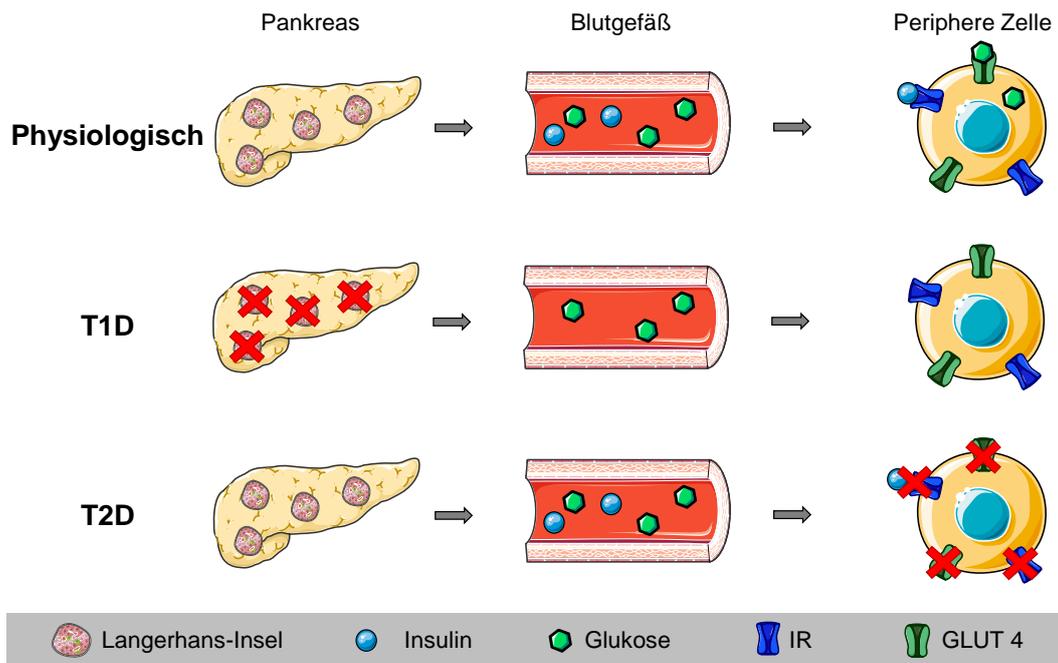


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines physiologischen Zuckerhaushalts sowie des Zuckerhaushalts bei T1D und T2D. Bei einem physiologischen Zuckerhaushalt wird abhängig von der Blutglukosekonzentration Insulin ins Blut sekretiert. Insulin gelangt über das Blut an periphere Zellen und bindet dort an den entsprechenden IR der Zielzelle. Die Aktivierung des Rezeptors induziert anschließend über GLUT 4 die Aufnahme von Glukose. Bei T1D wird jedoch trotz hoher Blutglukosekonzentration kein Insulin mehr gebildet und sekretiert, wodurch keine Glukose in die peripheren Zellen aufgenommen werden kann. Im Fall des T2D wird hingegen noch Insulin sekretiert. Allerdings sind die IR und GLUT 4 der Zielzelle nicht in der Lage, die Glukoseaufnahme zu induzieren.

Um den schwerwiegenden Folgen von Diabetes mellitus entgegen zu wirken, lässt sich T2D in den meisten Fällen bereits durch Gewichtsreduktion, Bewegung und eine Ernährungsumstellung therapieren. Im Gegensatz dazu ist die tägliche Applikation von Insulin für T1D-Patienten obligatorisch. Da der Blutglukosespiegel der Patienten allerdings im Tages- und Krankheitsverlauf wesentlich schwanken und sich dadurch unterschiedlich auf den Körper auswirken kann, muss jede Applikation präzise auf die Blutglukose-Werte angepasst sein. Werte über 250 mg/dl werden als hyperglykäm bezeichnet. Ab Blutglukosespiegeln von 400 mg/dl führt der verstärkte Abbau von Fetten zur Anreicherung von Ketonkörpern im Blut, woraus eine diabetische Ketoazidose mit Übelkeit und Erbrechen folgt. Blutglukosespiegel von 600-1000 mg/dl resultieren in den meisten Fällen im lebensbedrohlichen, hyperosmolaren Koma [Schumann & Faust, 2018]. Um schnell auf die Schwankungen des Blutglukosespiegels zu reagieren, sind mehrfach tägliche Blutglukosemessungen und eine darauf abgestimmte Insulinapplikation unerlässlich. Allerdings können durch diese Applikationen weitere Nebenwirkungen, wie Retinopathien oder Nephropathien, auftreten [Usuelli & La Rocca, 2015]. Eine engmaschige Behandlungskontrolle ist dementsprechend sowohl für T1D- als

auch für T2D-Patienten zwingend erforderlich [Elk & Iwuchukwu, 2017; Gamble *et al.*, 2018; Warshauer *et al.*, 2020].

Eine Alternative zur täglichen Insulinapplikation stellt vor allem für T1D-Patienten die Transplantation des Pankreas dar [Dean *et al.*, 2017]. Durch diesen chirurgischen Eingriff kann eine dauerhafte Senkung des Blutglukosespiegels erzielt und damit die Überlebenschancen der Patienten verbessert werden. Allerdings handelt es sich hierbei um einen komplexen chirurgischen Eingriff, der mit schweren Komplikationen, wie einer Pankreatitis oder der chronischen Abstoßungsreaktion des Organs, einhergehen kann. Entsprechend wird dieser Eingriff nur in seltenen Fällen, wie z.B. bei einem juvenilen T1D mit (prä-)terminaler Niereninsuffizienz, durchgeführt [Chinnakotla *et al.*, 2015].

Neben der Pankreastransplantation ist die Transplantation von isolierten Langerhans-Inseln eine ebenso effektive aber mit deutlich weniger Risiken verbundene Methode zur Therapie von T1D-Patienten [Jin & Kim, 2017; Pepper *et al.*, 2018]. Bei diesem Ansatz werden die Langerhans-Inseln des Organspenders nach der Pankreasentnahme zunächst enzymatisch isoliert und anschließend über einen Katheter in das Portalvenensystem des Empfängers injiziert (*Abbildung 2*) [Ricordi *et al.*, 1988; Shapiro *et al.*, 2017].

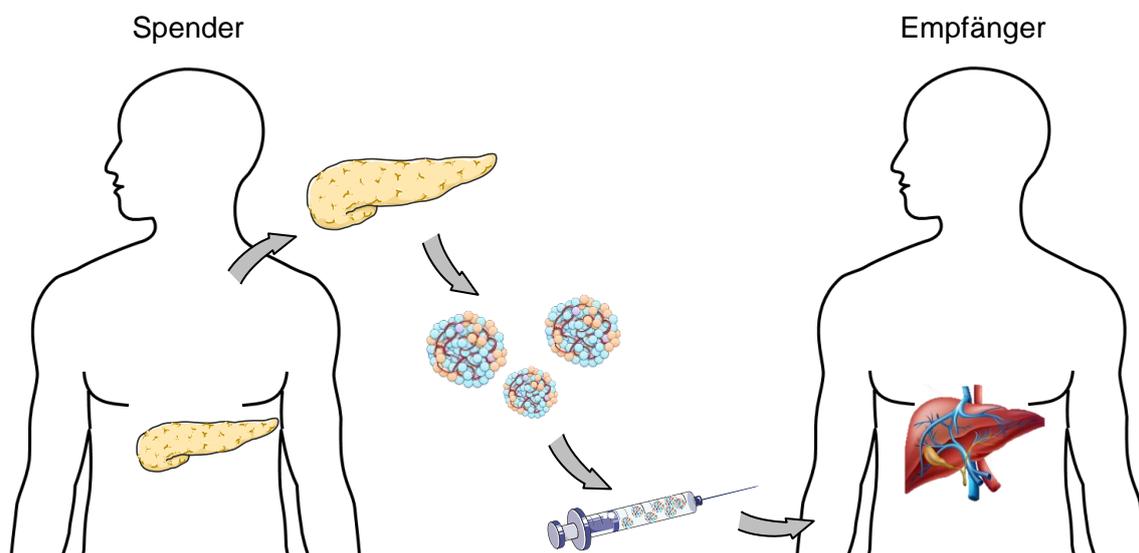


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Inseltransplantation. Dem Organspender wird das Pankreas entnommen und daraus die Langerhans-Inseln isoliert. Anschließend werden diese in das Pfortadersystem des Patienten injiziert, sodass sie in den portalen Venolen der Leber anwachsen können. (Modifiziert nach Servier Medical Art)

Die Langerhans-Inseln verteilen sich anschließend über das Blutgefäßnetzwerk in der Leber, wachsen dort in den portalen Venolen an und werden innerhalb der ersten 14 Tage nach der Transplantation durch neu gebildete Blutgefäße mit dem Blutgefäßnetzwerk des Patienten verbunden. Von dort aus sekretieren die transplantierten Inseln abhängig vom Blutzuckerspiegel Insulin ins Blut und sichern damit die Glukosehomöostase des Patienten.

Dieser Eingriff ist im Vergleich zu einer Pankreastransplantation minimal-invasiv und kann innerhalb von einer Stunde (h) ambulant durchgeführt werden [Lehmann *et al.*, 2005].

Trotz dieser Vorteile hat sich die Inseltransplantation bisher nicht als weltweite Standardtherapie für T1D-Patienten durchgesetzt. Dies ist auf drei wesentliche Probleme zurückzuführen: 1.) Die Notwendigkeit einer lebenslangen Immunsuppression, um Abstoßungsreaktionen zu vermeiden, 2.) die limitierte Organspenderzahl und 3.) die unzureichende Revaskularisierung der transplantierten Inseln (*Abbildung 3*) [Gamble *et al.*, 2018]. In den letzten Jahrzehnten wurden daher viele Studien durchgeführt, um diese Probleme zu lösen und dadurch die Lebensqualität der Diabetespatienten durch die Transplantation von Langerhans-Inseln zu verbessern.

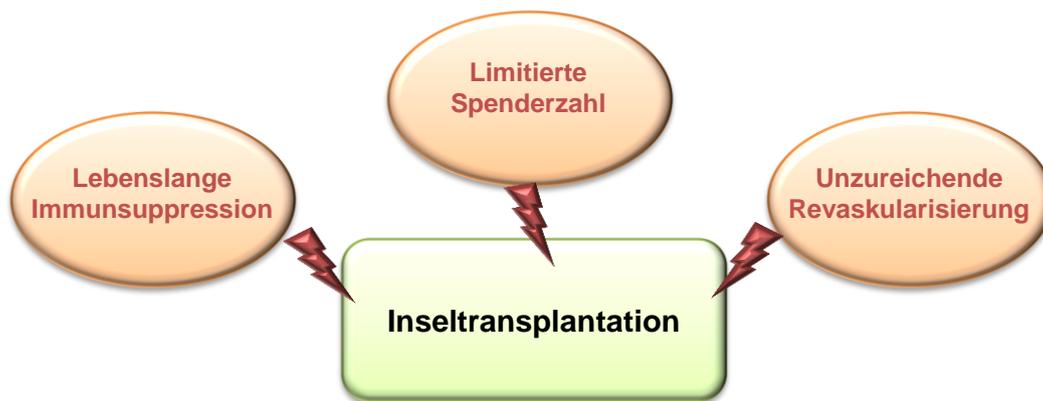


Abbildung 3: Hürden der Inseltransplantation. Die Transplantation von Langerhans-Inseln ist durch die Notwendigkeit einer lebenslangen Immunsuppressionstherapie, ein geringes Angebot an Spendern und eine unzureichende Revaskularisierung der Transplantate limitiert.

Eine lebenslange immunsuppressive Therapie ist mit großen Risiken, wie einem erhöhten Infektionsrisiko und möglichen Schädigungen der Nieren, Leber und Nerven, verbunden [Kanak *et al.*, 2014]. Um diese Risiken zu vermeiden, wurde bereits 1990 das Prinzip der Einkapselung einzelner oder mehrerer Langerhans-Inseln mit Alginat, Hydrogelen oder Silikon etabliert, wodurch die Langerhans-Inseln vor einer Immunreaktion des Empfängers geschützt werden und das Immunsystem folglich weniger stark supprimiert werden muss [Scharp & Marchetti, 2014; Desai & Shea, 2017a; Desai & Shea, 2017b; Vaithilingam *et al.*, 2017]. Ein weiterer Meilenstein in Bezug auf die immunsuppressive Therapie wurde im Jahr 2000 in einer Studie durch die Entwicklung des Edmonton-Protokolls erzielt [Shapiro *et al.*, 2000]. Diese Studie beschreibt eine langfristig erfolgreiche Therapie von T1D-Patienten durch die Transplantation einer adäquaten Zahl von Langerhans-Inseln in Kombination mit einer Glukokortikoid-freien Immunsuppression. Seitdem konnten mehr als 1500 T1D-Patienten in 30 internationalen Transplantationszentren erfolgreich durch eine Inseltransplantation therapiert werden [Shapiro *et al.*, 2006; Pepper *et al.*, 2018].

Für eine erfolgreiche Inseltransplantation werden mehr als 5000 Langerhans-Inseln pro kg Körpergewicht des Patienten benötigt, was einem Spender-zu-Empfänger-Verhältnis von 2-4:1 entspricht [Yamamoto *et al.*, 2009; Plesner & Verchere, 2011]. Die Verfügbarkeit von Spenderorganen ist allerdings weltweit begrenzt, weshalb innerhalb der letzten Jahre vermehrt alternative Quellen analysiert wurden, die der knappen Anzahl an Spenderorganen entgegen wirken sollen [Rackham & Jones, 2018]. Hierzu wurde zunächst die Xenotransplantation von Langerhans-Inseln optimiert [Dhanasekaran *et al.*, 2017; Iuamoto *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017]. Dabei konnte gezeigt werden, dass durch eine adäquate Immunsuppression die Transplantation von porcinen Langerhans-Inseln in Primaten ein großes Potential für die Therapie des Diabetes mellitus hat [Cooper *et al.*, 2016]. Bevor dieser Ansatz jedoch Anwendung in der Klinik finden kann, muss die Kompatibilität zwischen porcinen Spender- und humanem Empfängergewebe noch weiter verbessert werden [Dufrane & Gianello, 2012]. Als Alternative dazu wurden auch zelltherapeutische Strategien entwickelt, bei denen pluripotente Stammzellen eines Patienten zu β -Zellen differenziert werden, um diese anschließend zu retransplantieren [Voltarelli *et al.*, 2007; Couri *et al.*, 2009]. Zudem wurde nach alternativen Transplantationsstellen gesucht, welche für die Transplantation von Langerhans-Inseln leichter zugänglich sind und einen positiven Einfluss auf ihr Anwachsen haben könnten. Hierbei erwiesen sich die Nierenkapsel [Szot *et al.*, 2007; Karakose *et al.*, 2016], die Muskulatur [Weber *et al.*, 1978; Bertuzzi *et al.*, 2018], das Knochenmark [Maffi *et al.*, 2019; Pellegrini *et al.*, 2019] sowie das Subkutangewebe [Pathak *et al.*, 2017; Kuwabara *et al.*, 2019] in verschiedenen präklinischen Modellen als geeignet.

Trotz einer Glukokortikoid-freien Immunsuppression, alternativer Transplantationsstellen und dem Einsatz von Stammzellen ist die erfolgreiche Transplantation von Langerhans-Inseln maßgeblich durch eine zu langsame und unzureichende Revaskularisierung und der daraus resultierenden geringen Überlebensrate der Transplantate von unter 40 % limitiert [Shapiro *et al.*, 2001; Brissova *et al.*, 2004]. Der Revaskularisierungsprozess ist von besonderer Bedeutung, da das enge Kapillarnetzwerk innerhalb der Langerhans-Inseln während der Inselisolierung teilweise zerstört wird, sodass es nach der Inseltransplantation durch das Einwachsen neuer Blutgefäße ersetzt werden muss [Del Toro-Arreola *et al.*, 2016]. Je mehr Zeit dieser Prozess in Anspruch nimmt, desto geringer ist die Überlebensrate der transplantierten Inseln. In den letzten Jahren wurden daher verschiedene Ansätze verfolgt, um die Revaskularisierung transplantierten Langerhans-Inseln zu beschleunigen. Dabei konnte beispielsweise gezeigt werden, dass durch die Stimulierung verschiedener Rezeptoren, wie Erythropoietin-Rezeptor (EPOR), *vascular endothelial growth factor*-Rezeptor (VEGFR) oder *hepatocyte growth factor*-Rezeptor (HGFR), eine Blutgefäßneubildung innerhalb der Langerhans-Inseln und des umliegenden Gewebes induziert werden kann [Cheng *et al.*, 2004;

Golocheikine *et al.*, 2010; Menger *et al.*, 2020a]. Des Weiteren berichteten mehrere Studien, dass die Co-Transplantation von Endothelzellen oder Fibroblasten die Revaskularisierung transplantiert Langerhans-Inseln fördert [Coppens *et al.*, 2013; Perez-Basterrechea *et al.*, 2017; Augsornworawat *et al.*, 2019]. Allerdings führten diese Ansätze bis heute nicht zu einer adäquaten Revaskularisierung, die langfristig das Überleben und die Funktion der transplantierten Inseln sichern könnte.

Bei der Revaskularisierung werden über angiogene Prozesse neue Blutgefäße gebildet, die in hypoxisches Gewebe einwachsen und ausreifen, um die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung der umliegenden Zellen wieder herzustellen [Persson & Buschmann, 2011]. Initiiert wird dieser Vorgang über die Ausschüttung eines pro-angiogenen Faktors, wie z.B. *vascular endothelial growth factor* (VEGF), von hypoxischem Gewebe in die Umgebung [Carmeliet, 2000]. Dieser Stimulus induziert im nächsten Schritt den proteolytischen Abbau der Basalmembran von Gefäßen und der umliegenden extrazellulären Matrix (ECM) durch die verstärkte Freisetzung von verschiedenen Matrixmetalloproteinasen (MMP) und Heparanasen (HPSE) von Endothelzellen [Matzner *et al.*, 1985; Shapiro, 1998; Nelson *et al.*, 2000]. Der Verlust der ECM und der Basalmembran führt anschließend zum Ablösen von Perizyten von der Gefäßwand. Durch diese Destabilisierung der Gefäßstruktur können einzelne Endothelzellen in Richtung des initialen pro-angiogenen Stimulus migrieren [Conway *et al.*, 2001]. Die Endothelzelle, die in diesem Fall die Richtung angibt, wird als *Tip*-Zelle bezeichnet, während die restlichen Endothelzellen, die die Basis der Aussprossung bilden und durch Proliferation und Migration der *Tip*-Zelle folgen, *Stalk*-Zellen genannt werden [Chen *et al.*, 2019]. Diese *Stalk*-Zellen bilden im weiteren Verlauf der Angiogenese ein Lumen aus und werden abschließend durch die Ausbildung von ECM und der Rekrutierung von Perizyten stabilisiert. Im letzten Schritt der Angiogenese reift das neu gebildete Gefäß durch die Ausbildung gewebespezifischer Merkmale, wie beispielsweise die Fenestrierung des Endothels oder die Ausbildung von Muskelschichten, aus [Risau, 1997; Carmeliet, 2000; Fischer *et al.*, 2006]. Die vollständige Revaskularisierung von transplantierten Langerhans-Inseln kann insgesamt bis zu 14 Tage in Anspruch nehmen, was jedoch zu lang ist, um die endokrine Funktion und das Überleben der Transplantate dauerhaft zu garantieren [Jansson & Carlsson, 2002; Persson & Buschmann, 2011; Pellegrini *et al.*, 2019]. Entsprechend wird noch heute an Ansätzen geforscht, um die Vaskularisierung transplantiert Langerhans-Inseln zu verbessern.

3.2 Einfluss von *nerve/glia antigen* (NG) 2 auf die Revaskularisierung von Langerhans-Inseln

Perizyten sind auf der abluminalen Seite von Blutgefäßen lokalisiert und stehen im direkten Kontakt mit den Endothelzellen und der ECM (*Abbildung 4A*) [Armulik *et al.*, 2005]. Durch diesen engen Kontakt haben sie sowohl einen Einfluss auf die Stabilität als auch auf den Durchmesser von Kapillaren [Bergers & Song, 2005]. Auch im Zusammenhang mit Langerhans-Inseln sind Perizyten von besonderer Bedeutung, da sie 40 % des dichten Netzwerks der Inselkapillaren bedecken [Almaça *et al.*, 2018]. Durch ihre kontraktile Eigenschaften und der Interaktion mit den Inselzellen haben sie zudem eine entscheidende Funktion bei der Regulation des Blutflusses innerhalb der Insel. Interessanterweise konnte in T2D-Patienten eine Reduktion der Perizyten-Population nachgewiesen werden [Almaça *et al.*, 2018]. Dies wurde damit begründet, dass die Langerhans-Inseln durch eine verminderte Ausschüttung von Insulin und Adenosintriphosphat (ATP) in Kombination mit einem hohen Blutzuckerspiegel die Dysfunktion und den Verlust von Perizyten begünstigen [Almaça *et al.*, 2018].

Auch in Bezug auf die Inseltransplantation wurden bereits erste Studien zum Einfluss von Perizyten auf die Funktion transplanteder Langerhans-Inseln und deren Revaskularisierung durchgeführt. Die Arbeitsgruppe um Sasson [Sasson *et al.*, 2016] konnte zeigen, dass Perizyten zum Erhalt der β -Zellmasse in transplantierten Langerhans-Inseln beitragen. Zudem konnte von Juang *et al.* [2015] nachgewiesen werden, dass die Perizyten innerhalb der Langerhans-Inseln maßgeblich an der Revaskularisierung der Transplantate beteiligt sind, indem sie pro-angiogene Faktoren ausschütten und über die Interaktion mit der ECM und Endothelzellen das neu gebildete Gefäßnetzwerk stabilisieren. Diese Interaktionen werden durch die Expression von verschiedenen Oberflächenproteinen, wie NG 2 oder Integrinen, vermittelt [Slepian *et al.*, 1998; Cabric *et al.*, 2010]. Inwieweit die Funktion der Perizyten während der Inseltransplantation jedoch durch die Expression dieser Proteine beeinflusst wird, wurde bisher noch nicht untersucht.

NG2 ist ein Proteoglykan, das vor allem durch die Bindung an die ECM eine besondere Rolle während der Angiogenese spielt (*Abbildung 4B*) [Stallcup, 2018]. Dieses Oberflächenprotein wird auch als Chondroitinsulfat-Proteoglykan (CSPG)4 bezeichnet und besitzt als Typ-1-Transmembranprotein eine Größe von 300 kDa. Im extrazellulären, N-terminalen Bereich (2225 Aminosäuren) kann NG2 durch Disulfidbrücken und Glykosylierungen post-translational modifiziert werden, um extrazelluläre Proteine zu binden [Yadavilli *et al.*, 2016]. Der intrazelluläre C-Terminus (25 Aminosäuren) des Proteins ermöglicht es, extrazelluläre Signale an zytoplasmatische Proteine und Enzyme, wie *multi-PDZ domain protein* (MUPP) oder *extracellular signal-regulated kinases* (ERK)1/2, weiterzugeben [Barritt *et al.*, 2000;

Makagiansar *et al.*, 2007]. Durch diesen Vorgang werden zelluläre Funktionen, wie die Proliferation und Migration der Perizyten, initiiert [Stallcup, 2018]. Über die Bindung von NG2 an ECM-Proteine, wie z.B. Kollagen VI, werden die Perizyten zudem in der ECM stabilisiert [Stallcup, 2018].

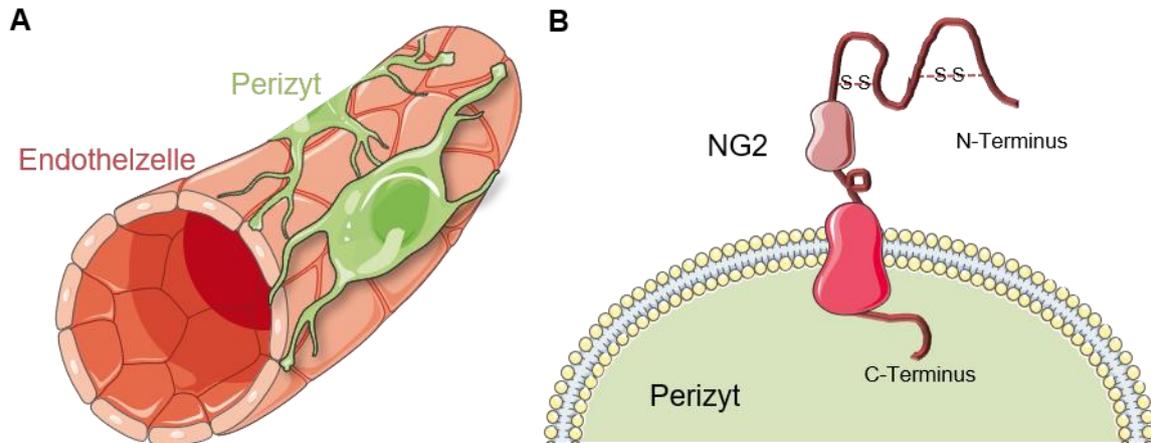


Abbildung 4: Funktion von Perizyten und Aufbau von NG2. (A) Perizyten (grün) sind perivaskuläre Zellen, welche auf der abluminalen Seite der Endothelzellen (rot) lokalisiert sind und die Blutgefäße stabilisieren. (B) NG2 ist ein transmembranäres Protein, das von Perizyten exprimiert wird. Es besteht aus einer extrazellulären Domäne (2225 Aminosäuren), die Signalmoleküle anderer Zellen binden kann. Diese Signale werden über den transmembranen Teil von NG2 (25 Aminosäuren) in den Perizyten zum C-Terminus (76 Aminosäuren) weitergeleitet, um intrazelluläre Signalkaskaden (wie z.B. PI3K- oder MEK/ERK-Signalwege) zu initiieren. (Modifiziert nach Servier Medical Art)

Die Verbindung zwischen Perizyten und der ECM spielt während der Angiogenese und der anschließenden Reifung neu gebildeter Blutgefäße eine entscheidende Rolle [Armulik *et al.*, 2011]. Vor allem die Expression und Präsentation verschiedener Oberflächenproteine, wie NG2, auf Perizyten sind während dieser Prozesse essentiell [Schlingemann *et al.*, 1990; Ribatti *et al.*, 2011]. In diesem Zusammenhang konnte beispielsweise eine erhöhte Expression von NG2 auf Perizyten, die an der Angiogenese im Herz, Auge und Gehirn von Mäusen beteiligt waren, nachgewiesen werden [Ozderdem *et al.*, 2001]. Die Autoren hypothetisierten daraufhin, dass NG2 während der Bildung und Stabilisierung von Blutgefäßen von besonderer Bedeutung ist. Zudem konnte anhand von immunhistochemischen Analysen des Mesenteriums von Ratten eine verstärkte Expression von NG2 während des mikrovaskulären *Remodellings* von Venolen nachgewiesen werden [Murfee *et al.*, 2006]. Der Verlust von NG2 führte hingegen zu einer signifikant reduzierten Bildung neuer Blutgefäße [Ozderdem & Stallcup, 2004; You *et al.*, 2014]. Dies konnte durch eine verringerte Proliferation und Migration sowie eine reduzierte ECM-Interaktion von Perizyten nach NG2-Verlust erklärt werden [Stallcup, 2018].

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit der Einfluss von NG2 auf die Revaskularisierung transplantiert Langerhans-Inseln untersucht. Hierzu wurden Inseln von homozygoten NG2^{-/-}-*Knockout* (KO) und NG2^{+/+}-Wildtyp-Mäusen

isoliert und in Hinblick auf ihre zelluläre Zusammensetzung und Glukose-abhängige Insulin-Sekretion *in vitro* untersucht. Zudem wurde die Revaskularisierung der Langerhans-Inseln nach Transplantation in die Rückenhautkammer von Mäusen mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie sowie immunhistochemischer Methoden analysiert.

3.3 Einfluss der Inkorporation von mikrovaskulären Gefäßfragmenten (MVF) auf die Vaskularisierung von Inselorganoiden

Neben der Applikation von pro-angiogenen Substanzen und der Co-Transplantation von vaskulären Zellen [Coppens *et al.*, 2013; Perez-Basterrechea *et al.*, 2017] wurde in den vergangenen Jahren auch die Bildung von Inselorganoiden etabliert, um die Revaskularisierung transplanteder Inselzellen zu verbessern [Wolf-Jochim *et al.*, 1995; Kojima, 2014]. Inselorganoiden setzen sich aus dissoziierten Zellen der Langerhans-Inseln zusammen, die anschließend wieder zu kugelförmigen Zellaggregaten reaggregiert werden, und werden auch als Pseudo-Inseln (PI) bezeichnet. Die Bildung von PI ermöglicht es, neben Inselzellen auch vaskuläre Zellen wie Endothelzellen in das Innere der Organoiden einzubringen, um durch diese inkorporierten Zellen die Vaskularisierung der Inselorganoiden zu beschleunigen [Penko *et al.*, 2011]. Allerdings nimmt die Bildung von Blutgefäßen aus einzelnen Endothelzellen ~ 10 Tage in Anspruch [Laschke & Menger, 2016]. Diese Zeitspanne ist zu lang, um die Inselzellen in der frühen post-Transplantationsphase vor Sauerstoff- und Nährstoffmangel zu schützen und damit die Viabilität der Inselzellen nach der Transplantation zu gewährleisten [Menger *et al.*, 2001].

Eine neue Strategie, die Vaskularisierung von transplanteden Langerhans-Inseln zu beschleunigen, könnte die Inkorporation von MVF in Inselorganoiden sein. MVF sind eine Mischung aus reifen, funktionellen Arteriolen, Kapillaren und Venolen, die enzymatisch in großen Mengen aus Fettgewebe isoliert werden können [Hoying *et al.*, 1996; Laschke & Menger, 2015]. Sie besitzen eine Länge von ca. 20-120 µm und weisen die physiologische Morphologie nativer Mikrogefäße auf [Laschke & Menger, 2015]. Zudem sekretieren sie zahlreiche angiogene Wachstumsfaktoren, wie VEGF oder *fibroblast growth factor* (FGF), welche die Angiogenese im umliegenden Gewebe stimulieren [Laschke & Menger, 2015]. Nach Transplantation verbinden sich MVF sowohl untereinander als auch mit dem umliegenden Blutgefäßnetzwerk und bilden innerhalb weniger Tage Blut-perfundierte mikrovaskuläre Netzwerke aus [Frueh *et al.*, 2017a]. Zudem konnte gezeigt werden, dass MVF neben Endothelzellen, Perizyten und Fibroblasten auch mesenchymale Stammzellen (MSC) enthalten [McDaniel *et al.*, 2014]. Diese tragen durch die Sekretion unterschiedlicher

Wachstumsfaktoren [Burlacu *et al.*, 2013] und der Möglichkeit zur Differenzierung in angiogene, neuronale, adipogene oder osteogene Zellen [Almalki & Agrawal, 2016] maßgeblich zu der hohen angiogenen Aktivität und dem regenerativen Potential der MVF bei. Durch diese vielversprechenden Eigenschaften wurden MVF bereits in zahlreichen Studien im Bereich des *Tissue Engineerings* und der regenerativen Medizin als potente Vaskularisierungseinheiten eingesetzt [Pilia *et al.*, 2014; Stone & Rathbone, 2016; Frueh *et al.*, 2017b; Später *et al.*, 2017a; Später *et al.*, 2017b].

Im Rahmen einer vorangehenden Masterarbeit [Nalbach, 2017] ist es bereits gelungen, MVF mit Inselzellen zu kombinieren, um auf diese Weise prävasikularisierte Inselorganoide (PI+MVF) zu generieren (*Abbildung 5A*). Hierzu wurden die Langerhans-Inseln zunächst in Einzelzellen dissoziiert und anschließend 2000 Inselzellen mit 200 MVF co-kultiviert. Die Kultivierung erfolgte über 5 Tage mithilfe der *Liquid Overlay*-Technik, bei der die Zellen in einer Agarose-beschichteten 96-Well-Platte zu je einem Organoid pro Well aggregierten. Frisch isolierte Langerhans-Inseln (FI), kultivierte Langerhans-Inseln (CI) und reine PI ohne zusätzlich inkorporierte Zellen dienten hierbei als Kontrollen.

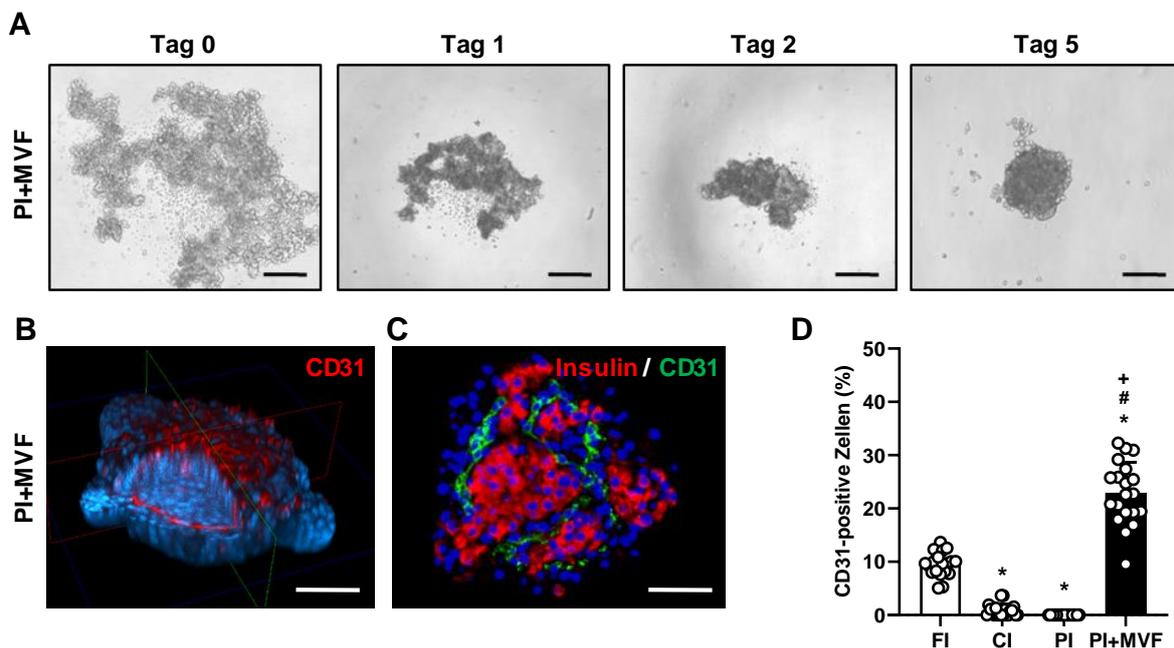


Abbildung 5: Generierung und Charakterisierung von PI+MVF. (A) Durchlichtmikroskopische Aufnahmen der Generierung von PI+MVF in der Liquid Overlay-Kultur an Tag 0, 1, 2 und 5. Maßstab: 100 μ m. (B) Dreidimensionale (3D), konfokalmikroskopische Aufnahme einer PI+MVF nach immunohistochemischer Färbung mit anti-CD31 Antikörpern. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 visualisiert. Maßstab: 50 μ m. (C) Immunhistochemische Färbung der PI+MVF. Insulin und CD31 wurden mit den entsprechenden spezifischen Antikörpern angefärbt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 visualisiert. Maßstab: 60 μ m. (D) Quantitative Analyse der CD31-positiven Zellen innerhalb der FI, CI, PI und PI+MVF (in % aller Inselzellen) ($n=20$). Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD). * $P < 0,05$ vs. FI; # $P < 0,05$ vs. CI; * $P < 0,05$ vs. PI. [Nalbach, 2017].

Im Rahmen erster Analysen konnte gezeigt werden, dass die inkorporierten MVF sowohl im Inneren der PI+MVF als auch an deren Oberfläche ein Netzwerk aus Endothelzellen ausbilden

(Abbildung 5B und C). Zudem zeigte die Untersuchung der zellulären Zusammensetzung der Organoiden, dass der Anteil *cluster of differentiation* (CD)31-positiver Endothelzellen innerhalb der PI+MVF im Vergleich zu allen Kontrollgruppen signifikant erhöht war (Abbildung 5D).

Basierend auf diesen vielversprechenden Vorergebnissen wurde im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit untersucht, ob durch die Inkorporation von MVF die Vaskularisierung transplanteder Inselorganoiden beschleunigt werden kann. Zudem wurde die endokrine Funktion der PI+MVF sowohl *in vitro* als auch nach Transplantation in diabetische Mäuse überprüft. Abschließend erfolgte die Translation dieses Prävasikularisierungsansatzes von murinen auf humane Inselorganoiden.

4. Ziel der Arbeit

Die Transplantation von Langerhans-Inseln ist ein vielversprechender therapeutischer Ansatz für T1D-Patienten. Da die transplantierten Langerhans-Inseln allerdings unzureichend revaskularisiert werden und daher ihre endokrine Funktion und ihr Überleben oft nicht dauerhaft garantiert sind, konnte sich diese Therapiemethode bisher nicht in der klinischen Routine durchsetzen. Entsprechend wird an neuen Ansätzen geforscht, um die Vaskularisierung transplantierte Langerhans-Inseln zu verbessern.

Im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von NG2 auf die Revaskularisierung transplantierte Langerhans-Inseln untersucht werden. Dabei wurden durch den Einsatz von homozygoten NG2^{-/-} und NG2^{+/+}-Mäusen, die als Spender für die Langerhans-Inseln dienten, folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Hat der Verlust von NG2 einen negativen Einfluss auf die zelluläre Zusammensetzung der Langerhans-Inseln vor und nach Isolierung?
2. Wirkt sich der Verlust von NG2 auf die Glukose-abhängige Insulin-Sekretion der Langerhans-Inseln aus?
3. Führt der Verlust von NG2 zu einer verzögerten Revaskularisierung der Langerhans-Inseln nach Transplantation?

Im zweiten Studienabschnitt wurden die endokrine Funktion und das angiogene Potential von PI+MVF *in vivo* und *in vitro* untersucht. Ausgehend von den Daten, die in einer vorbereitenden Masterarbeit zu diesem Thema generiert wurden, sollten in der vorliegenden Arbeit die folgenden weiterführenden Fragestellungen untersucht werden:

1. Hat die Inkorporation von MVF einen negativen Einfluss auf die endokrine Funktion der PI+MVF?
2. Findet eine Interaktion zwischen Inselzellen und den inkorporierten Endothelzellen der MVF statt?
3. Kann der Vaskularisierungsprozess der transplantierte Inselorganoide durch die Inkorporation der MVF beschleunigt werden?
4. Führt die Transplantation von PI+MVF in Vergleich zu FI zu einer schnelleren Wiederherstellung einer Normoglykämie in diabetischen Tieren?
5. Lässt sich dieser neue Prävasikularisierungsansatz auch auf humane Inselorganoide transferieren?

5. Material und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Antikörper

Beschreibung	Hersteller
anti-Akt (4685S)	Cell Signaling Technology, USA
anti-BrdU-FITC (11-5071-42)	eBioscience, USA
anti-CD31 (DIA310)	Dianova, Deutschland
anti-CD31 (Sc-4669)	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti-ERK1/2 (ab115799)	Abcam, England
anti-GAPDH (sc-25778)	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti-Glucagon (Ab92587)	Abcam, England
anti-HO-1 (sc-1796)	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti-Insulin (Ab7842)	Abcam, England
anti-Insulin (sc-9168)	Santa Cruz Biotechnology, USA
anti-Ki67 (12202)	Cell Signaling Technology, USA
anti-Mouse IgG (H+L)-Cy3	Jackson ImmunoResearch, USA
anti-pAkt (4060S)	Cell Signaling Technology, USA
anti-pERK1/2 (ab50011)	Abcam, England
anti-Rabbit IgG (H+L)-Cy3	Jackson ImmunoResearch, USA
anti-Rat IgG (H+L)-Alexa Fluor 555	Life Technologies, USA
anti-Rat IgG (H+L)-Cy3	Jackson ImmunoResearch, USA
anti-Somatostatin (Ab30788)	Abcam, England
anti- β -Aktin (AC-74)	Sigma-Aldrich, Deutschland

5.1.2 Humane Langerhans-Inseln

Inselisolationsnr.	Spenderalter (Jahre)	Kultivierungszeit (h)	Medium
R319	69	19	CMRL
R321	24	16	CMRL
R326	26	35	CMRL
R330	39	33	CMRL

5.1.3 Chemikalien und Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
30 % Acrylamid-Lösung	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
Accutase®	BioLegend GmbH, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat	Serva, Deutschland
Blotting-Grade Blocker	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
Bradford Reagenz	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
Complete™, Proteaseinhibitor Cocktail	Roche, Deutschland
C-Peptid ELISA Kit	Thermo Fisher Scientific, Deutschland

Material und Methoden

Cytofix/Cytoperm™	Becton Dickinson, Deutschland
deionisiertes H ₂ O	UdS Homburg, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck, Deutschland
ECL Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare Europe GmbH, Deutschland
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Zentr. Chemikalienlager, UdS, Deutschland
Ethanol 100 %	Carl Roth GmbH, Deutschland
Ethidiumbromidlösung 1 %	Carl Roth GmbH, Deutschland
FITC-Dextran (150.000)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Folin & Ciocalteu-phenol Reagenz	Sigma-Aldrich, Deutschland
Formaldehyd 37 %	Merck, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH, Deutschland
Hoechst 33342	Roche, Deutschland
Insulin ELISA Kit	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Deutschland
Laemmli 6x Puffer	Sigma-Aldrich, Deutschland
Linsitinib	Sellechem, Deutschland
Magnesiumchlorid Hexahydrat	VWR, Deutschland
Magnesiumsulfat Heptahydrat	VWR, Deutschland
Maisöl	Merck, Deutschland
Methylcellulose viscosity 4000 cPS	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
TEMED	Sigma-Aldrich, Deutschland
N ₂ flüssig	Air Liquide, Deutschland
Natriumchlorid	VWR, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Deutschland
Natriumhydroxid	Zentr. Chemikalienlager UdS, Deutschland
Oil Red O	Sigma-Aldrich, Deutschland
ORA qPCR Green ROX L Mix	HighQu GmbH, Deutschland
Perm/Wash™	Becton Dickinson, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Deutschland
PBS 10x	PAN Biotech GmbH, Deutschland
Prestained Protein Marker IV und VII	PeqLab, Deutschland
Propidiumiodid- und Annexin V-Kit	Becton Dickinson, Deutschland
QIAzol lysis reagent	Qiagen, Niederlande
QuantiNova Reverse Transcription Kit	Qiagen, Niederlande
Rhodamin 6G	Sigma-Aldrich, Deutschland
Salzsäure 37 %	Carl Roth GmbH, Deutschland
SDS	Carl Roth GmbH, Deutschland
Streptavidin	New England Biolabs, USA
Streptozotocin	Carl Roth GmbH, Deutschland
Tamoxifen	Sigma-Aldrich, Deutschland
TEMED	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
Tris Base	Carl Roth GmbH, Deutschland
Tris HCl	Carl Roth GmbH, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deutschland
Tween20	Sigma-Aldrich, Deutschland

5.1.4 Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Blutzuckermessgerät GL50	Beurer, Deutschland
CO ₂ Inkubator	Binder GmbH, Deutschland
Digitalkamera DP73	Olympus Deutschland GmbH, Deutschland
DVD-System DVD-HR775	Samsung, Korea
ECL Chemocam Imager	Intas GmbH, Deutschland
FACScan	Becton Dickinson, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop DM4000 B LED	Leica Microsystems, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axio 2	Zeiss, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop BX 60	Olympus Deutschland GmbH, Deutschland
Gel Doc	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
Mikrozentrifuge Heraeus Fresco21	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
MiniOpticon Real-Time PCR System	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
NanoDrop DS-11	DeNovix, Deutschland
pH-Meter	HANNA Instruments, England
Photometer	GeneQuant pro, Deutschland
Plattenlesegerät PHOmo	Anthos, USA
Reagenzglasschüttler Reax top	Heidolph Instruments, Deutschland
Sterilbank (Mars safety Class 2)	SCANLAF, Deutschland
Techne Heizblock DB2A	Bibby Scientific Limited, England
Trans-Blot Turbo	Bio-Rad Laboratories GmbH, Deutschland
Videokamera FK6990	Pieper, Deutschland
Zentrifuge CR 412	Thermo Fisher Scientific, Deutschland

5.1.5 Kulturmedien und Zusätze

Kulturmedium	Hersteller
DMEM <i>high Glucose</i> (4,5 g/l)	PAN Laboratories GmbH, Österreich
DMEM <i>low Glucose</i> (1,0 g/l)	PAN Laboratories GmbH, Österreich
FCS	Biochrom GmbH, Deutschland
HBSS	PAN Laboratories GmbH, Österreich
Pen/Strep	PAN Laboratories GmbH, Österreich

5.1.6 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
1 x TBST-Puffer pH 7,5	100 ml/l 10x TBS-Puffer (100 mM Tris HCl und 1,5 mM NaCl) 0,1 % Tween 20
Elektrophorese-Puffer pH 8,3 (10 x)	250 mM Tris HCl 1,92 M Glycin 1 % SDS

Material und Methoden

Kollagenase-Lösung (Inselisolierung)	10 mg Kollagenase NB 8 (1 U/mg) 10 ml HBSS 150 µl Neutralrot
Kollagenase-Lösung (MVF-Isolierung)	0,1 mg Kollagenase NB 4G (5 U/mg) 1 ml PBS
Kollagen-Lösung	160 µl Kollagen-Extrakt 20 µl 10x M199 20 µl 0.2M NaOH 200 µl DMEM
Kreb's Ringer Bicarbonat Puffer	115 mmol/l NaCl 4,7 mmol/l KCl 1,28 mmol/l CaCl ₂ 6H ₂ O 1,2 mmol/l MgSO ₄ 7H ₂ O 0,1 % BSA
Methylcellulose-Stocklösung 1,2 % (w/v)	1,2 g Methylcellulose in 100 ml DMEM
Narkoselösung	Ketaminhydrochlorid (75 mg/kg Körpergewicht) Xylazinhydrochlorid (15 mg/kg Körpergewicht)
Oil Red O-Arbeitslösung	3 ml Oil Red O-Stock-Lösung 2 ml deionisiertes H ₂ O
RIPA-Puffer	50 mM Tris HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 0,5 % Natriumdesoxycholat 1 % Triton-X 100 0,1 % SDS 25 % Complete 1 % NP40
Sammelgel-Puffer pH 6,8	1 M Tris HCl 0,4 % SDS
SDS-Sammelgel (4 %)	3 ml H ₂ O 660 µl 30 % Acrylamid 1,26 ml 1 M Tris pH 6,8 50 µl 10 % SDS 25 µl 10 % APS 10 µl TEMED

Material und Methoden

SDS-Trenngel (10 %)	4,85 ml H ₂ O 2,5 ml 30 % Acrylamid 2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8 100 µl 10 % SDS 50 µl 10 % APS 20 µl TEMED
STZ-Lösung (180 mg/kg Körpergewicht)	100 µl Citratpuffer (1,9 g/l PBS (1x), pH 6,0) 4 mg STZ
Transfer-Puffer pH 9,2	39 mM Glycin 48 mM Tris HCl 10 % Methanol
Trenngel-Puffer pH 8,8	1,5 M Tris HCl 0,4 % SDS

5.1.7 Verbrauchsmaterial

Produktbezeichnung	Hersteller
1 µ-Slide 4 Well Objektträger	Ibidi GmbH, Deutschland
1,5 ml/2,0 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, Deutschland
15 ml/50 ml Reaktionsgefäß	Greiner Bio-One, Deutschland
5 ml Falcon, Polystyrol	Corning GmbH, Deutschland
6 cm/10 cm Kulturschalen	Greiner Bio-One, Deutschland
96 Well-Platten	Greiner Bio-One, Deutschland
Cytofix/Cytoperm	BD Pharmigen™, Deutschland
FACS Clean	BD Pharmigen™, Deutschland
FACS Flow	BD Pharmigen™, Deutschland
FACS Rinse	BD Pharmigen™, Deutschland
Filterpapier 3MM	Whatman, England
Objektträger 76x26 mm	Carl Roth GmbH, Deutschland
Parafilm	Pechiney, Menasha, USA
Pasteur-Pipette	Carl Roth GmbH, Deutschland
Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µl)	Greiner Bio-One, Deutschland
PVDF-Membran	Roche, Deutschland
H ₂ O	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Standard Pellet-Futter	Altromin, Deutschland

5.1.8 Software

Produktbezeichnung	Hersteller
CapImage	Zeintl, Deutschland
Cellquest®	Becton Dickinson, Deutschland
ChemoStar	Intas GmbH, Deutschland
FIJI	GitHub, USA
Microsoft Office Excel	Microsoft Corporation, USA
Prism 8	GraphPad, USA

5.2 Methoden

5.2.1 Versuchstiere

Die in dieser Arbeit verwendeten Versuchstiere wurden unter einem 12h/12h-Tag/Nacht-Zyklus gehalten. Wasser und Standard-Pellet-Futter standen *ad libitum* zur Verfügung. Homozygote NG2-CreERT2 Mäuse (TgH(NG2-CreERT2)) [Huang *et al.*, 2014] wurden mit entsprechenden Reporterermäusen verpaart (B6;129S6-Gt(ROSA)26Sortm9(CAG-tdTomato)Hze/J (Ai14)), um durch einen *knock-in* der CreERT2-Kassette in das Exon 1 des NG2-Gens einen KO von NG2 zu induzieren. Dieser KO kann durch die Tamoxifen-induzierte Expression des Reportergens tdTomato visualisiert werden [Madisen *et al.*, 2010]. Homozygote NG2^{-/-}-CreERT2xRosa26-tdTomato-Mäuse [Huang *et al.*, 2014] sowie C57BL/6N Wildtyp-Mäuse und transgene Mito-roGFP2-Orp1-Mäuse [Fujikawa *et al.*, 2016] im Alter von 8-10 Wochen und einem Körpergewicht von 25-30 g dienten als Spender für die Isolierung von Langerhans-Inseln. Für die Isolierung der MVF wurden männliche C57BL/6N Wildtyp-Mäuse im Alter von 20-30 Wochen mit einem Körpergewicht von 30-35 g als Spender verwendet. Männliche C57BL/6N Wildtyp-Mäuse in einem Alter von 6-8 Wochen und einem Gewicht von 25-29 g dienten als Empfängertiere für das diabetische Mausmodell.

Alle Tierexperimente wurden von der örtlichen Tierschutzkommission und dem Landesamt für Verbraucherschutz (Abt. C „Amtstierärztlicher Dienst, Lebensmittelüberwachung“) genehmigt (Zulassungsnummer: 18/2017) und gemäß der deutschen Tierschutzgesetzgebung sowie dem Leitfaden der nationalen Gesundheitsinstitute (NIH) für die Pflege und Verwendung von Versuchstieren (Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, Washington, DC, USA) durchgeführt.

5.2.2 Tamoxifen-Injektion

Die Reporterexpression der induzierbaren CreERT2-Linie wurde durch die intraperitoneale (i.p.) Injektion von Tamoxifen (10 mg/ml in Maisöl gelöst) induziert. Die Applikation erfolgte sowohl bei NG2^{+/+}- als auch NG2^{-/-}-Spendermäusen in einer Konzentration von 100 mg/kg Körpergewicht an zwei aufeinanderfolgenden Tagen.

5.2.3 Genotypisierungs-Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Genotypisierung der NG2-Tiere erfolgte mithilfe des SampleIN™ Direct PCR Kit von highQ. Hierzu wurden Ohrstanzen der zu genotypisierenden Tiere nach Angaben des Herstellers in ein Reaktionsgefäß mit Extraktionspuffer gegeben. Das Gewebe wurde für

10 min bei 95 °C denaturiert, bei 14000 xg zentrifugiert und der Überstand der Lösung nach Angaben des Herstellers in eine PCR eingesetzt. Die PCR wurde mit folgenden Primern durchgeführt:

NG2 f: 5'-GGC AAA CCC AGA GCC CTG CC-3'

NG2 r: 5'-GCT GGA GCT GAC AGC GGG TG-3'

NG2CreERT r: 5'-GCC CGG ACC GAC GAT GAA GC-3'

Durch diese Primer-Kombination konnte abhängig vom Genotyp des Tieres ein NG2-Wildtyp-Allel mit 557 Basenpaaren (bp) oder ein mutiertes Allel mit 829 bp in der PCR amplifiziert werden. Die Amplifikate wurden abschließend in einem Ethidiumbromid-haltigen 1 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die daraus resultierenden Banden durch ein Gel Doc-Gerät (BioRad) visualisiert.

5.2.4 Isolierung von Langerhans-Inseln aus dem Pankreas

Für die Isolierung von Langerhans-Inseln wurden die Spendermäuse durch eine i.p. Injektion von Ketaminhydrochlorid (75 mg/kg Körpergewicht) und Xylazinhydrochlorid (15 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert und die Bauchhöhle durch eine mediane Laparotomie eröffnet (*Abbildung 6A*). Durch den *Ductus pancreaticus* wurde 1 ml einer Kollagenaselösung in das Pankreas injiziert (*Abbildung 6B*), sodass das Kollagenase-gefüllte Pankreasgewebe entnommen werden konnte (*Abbildung 6C*). Durch die Inkubation des Gewebes für 15 min bei 37 °C im Wasserbad erfolgte der enzymatische Verdau des exokrinen Gewebes. Die Langerhans-Inseln wurden anschließend mithilfe einer Pipette per Hand aufgenommen (*Abbildung 6D*) und bis zur weiteren Verwendung in Hochglukose (25,0 mmol/l)-*Dulbecco's modified eagle's medium* (DMEM), das mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FCS), 100 Einheiten/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin supplementiert wurde, bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

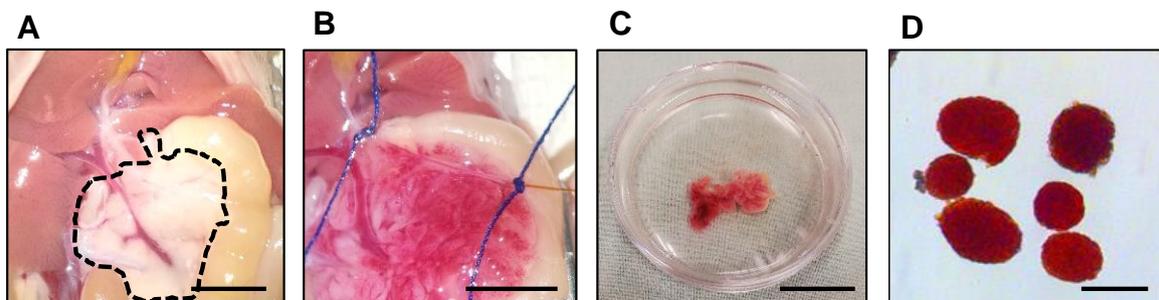


Abbildung 6: Isolierung von Langerhans-Inseln. (A) Das Pankreas (mit gestrichelter Linie umrandet) einer narkotisierten Maus wird freigelegt. Maßstab: 5 mm. (B) Über den Ductus pancreaticus wird eine mit Neutralrot gefärbte Kollagenaselösung in das Pankreas injiziert. Maßstab: 5 mm. (C) Das Pankreas wird anschließend entnommen und enzymatisch verdaut. Maßstab: 20 mm. (D) Die aufgereinigten, Neutralrot-gefärbten Langerhans-Inseln können für weitere Analysen verwendet werden. Maßstab: 200 µm.

5.2.5 Isolation humaner Langerhans-Inseln

Die verwendeten humanen Langerhans-Inseln wurden im *Alberta Diabetes Institute* (ADI) der Universität von Alberta (Edmonton, Alberta, Canada) bzw. dem klinischen Insellabor der Universität von Alberta isoliert. Nach einer 3-tägigen Lieferung bei Raumtemperatur (RT) wurden die humanen Langerhans-Inseln in Niedrigglukose (5,5 mmol/l)-DMEM, das mit 10 % (v/v) FCS, 100 Einheiten/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin supplementiert wurde, bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

5.2.6 Isolierung von MVF aus epididymalem Fettgewebe

Die Isolierung von MVF erfolgte nach Früh *et al.* [2017b]. Hierfür wurden die Spendermäuse durch eine i.p. Injektion von Ketaminhydrochlorid (75 mg/kg Körpergewicht) und Xylazinhydrochlorid (15 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert und die Bauchhöhle durch eine mediane Laparotomie eröffnet. Das Nebenhodenfettgewebe wurde oberhalb des Nebenhodens abgesetzt, in phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen (*Abbildung 7A*) und anschließend mechanisch und enzymatisch mithilfe einer Schere bzw. Kollagenaselösung (siehe Abschnitt 5.1.6) zerkleinert. Die daraus gewonnenen MVF wurden im Anschluss über einen Filter mit 500 µm großen Poren von den Kollagenfasern der ECM getrennt (*Abbildung 7B*), mit PBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung in DMEM, das mit 10 % (v/v) FCS, 100 Einheiten/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin supplementiert wurde, bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert (*Abbildung 7C*).

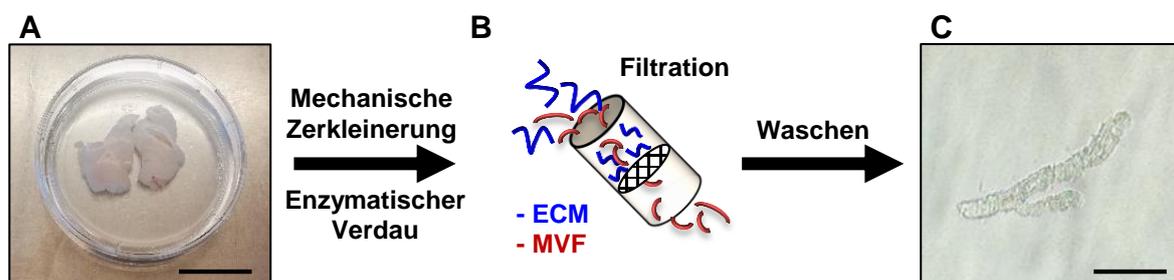


Abbildung 7: Isolierung von MVF aus epididymalem Fettgewebe. (A) Frisch entnommenes epididymales Fettgewebe der Maus, das anschließend mechanisch zerkleinert und enzymatisch verdaut wird. Maßstab: 20 mm. (B) Durch Filtration der Zellsuspension durch einen Filter mit 500 µm Poren werden die MVF von Kollagenfasern getrennt und anschließend gewaschen. (C) Die aufgereinigten MVF können für weiterführende Versuche verwendet werden. Maßstab: 25 µm.

5.2.7 Generierung der Inselorganoide

Die Generierung von PI und PI+MVF wurde nach einem bereits etablierten Protokoll durchgeführt [Nalbach, 2017]. Hierzu wurden die zuvor isolierten Langerhans-Inseln durch eine Inkubation mit 0,05 % (w/v) Trypsin unter ständigem Auf- und Abpipettieren in Einzelzellen

dissoziiert. Dieser Vorgang wurde durch die Zugabe von DMEM abgestoppt und die Anzahl der Inselzellen mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Reaggregation der Zellen erfolgte mithilfe der *Liquid Overlay*-Technik innerhalb von 5 Tagen (*Abbildung 8A*). Hierbei wurden die Wells einer 96-Well-Platte mit 40 µl 1 % Agarose beschichtet und pro Well 100 µl DMEM und 2000 Inselzellen zugegeben. Für die Generierung von PI+MVF wurden 2000 Inselzellen über den gleichen Zeitraum mit 200 frisch isolierten MVF co-kultiviert (*Abbildung 8B*). Das Kulturmedium wurde jeden 2. Tag gewechselt. 5 Tage nachdem die Zellen ausgesät wurden, konnten die Inselorganoide mit der Pipette aufgenommen und für weitere Versuche verwendet werden.

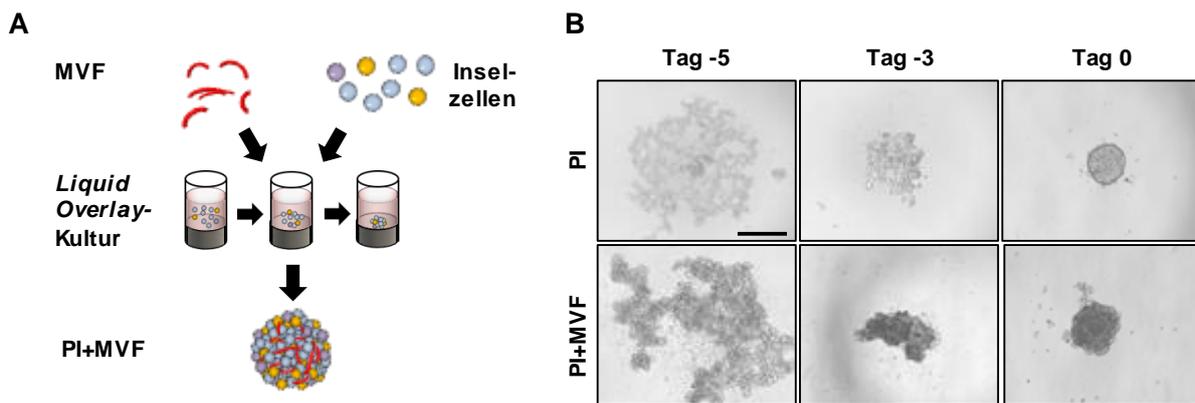


Abbildung 8: Generierung von PI und PI+MVF. (A) Schematische Darstellung der Co-Kultivierung von MVF und Inselzellen. Die Zellen bilden mithilfe der Liquid Overlay-Kultivierung innerhalb von 5 Tagen kompakte PI+MVF. (B) Repräsentative Bilder der Reaggregation von reinen Inselzellen zu PI bzw. Inselzellen und MVF zu PI+MVF an den Tagen -5, -3 und 0. Maßstab: 200 µm. (Modifiziert nach Nalbach [2017]).

5.2.8 HepatoQuick®-Matrix

Um immunhistochemische Färbungen durchführen zu können, mussten die Langerhans-Inseln bzw. Inselorganoide zunächst in einer HepatoQuick®-Matrix fixiert werden. Hierfür wurden HepatoQuick®, Thrombozyten-armes Plasma (PPP) und 10 % CaCl₂ (in deionisiertem H₂O) im Deckel eines Eppendorfgefäßes im Verhältnis 10:5:1 gemischt und für 30 min bei 37 °C ausgehärtet. Anschließend wurden pro Matrix 40 Langerhans-Inseln bzw. Inselorganoide in HepatoQuick® aufgenommen und mittig auf die ausgehärtete Fibrin-Matrix pipettiert. Nach Zugabe von PPP und CaCl₂ wurden die Langerhans-Inseln bzw. Inselorganoide in dem HepatoQuick®-Gemisch für 15 min bei 37 °C fixiert. Eine dritte Schicht aus HepatoQuick®, PPP und CaCl₂ wurde auf die Matrix pipettiert und für weitere 45 min bei 37 °C fixiert. Abschließend konnte die Matrix mithilfe einer Kanüle aus dem Deckel des Eppendorfgefäßes gelöst und direkt für immunhistochemische Untersuchungen weiterverwendet werden.

5.2.9 Immunhistochemie

Langerhans-Inseln bzw. Inselorganoide in der HepatoQuick®-Matrix, Pankreata sowie Rückenhautkammer- und Nierenkapsel-Gewebe wurden direkt nach der Probenentnahme für 24 h in 4 % Paraformaldehyd (PFA) bei 4 °C fixiert. Nachdem die Gewebe in einer Alkoholreihe entwässert wurden, erfolgte die Einbettung in Paraffin. Von den Geweben wurden 3 µm dünne Schnitte hergestellt, die mit Citrat-Puffer für 15 min bei 700 W permeabilisiert wurden. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch die Inkubation der Schnitte mit 3 % Ziegen-Serum für 30 min bei RT blockiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte mit dem entsprechenden Fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper für 45 min bei RT inkubiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt. Abschließend wurde die Färbung der Zellen mithilfe eines BX60 Fluoreszenz-Mikroskops von Olympus in 200-facher Vergrößerung visualisiert und positiv gefärbte Zellen mithilfe der FIJI-Software (GitHub) quantifiziert.

5.2.10 Proteinextraktion

Für anschließende Western Blot-Analysen wurden zunächst die Proteine der FI, CI, PI und PI+MVF extrahiert. Dafür wurden die Langerhans-Inseln bzw. Inselorganoide für 5 min bei 600 xg und 4 °C in PBS gewaschen und durch Zugabe von Radioimmunpräzipitations-assaypuffer (RIPA) mit 0,5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und Protease Inhibitor Cocktail (1:75 v/v) für 30 min auf Eis lysiert. Im Anschluss wurden die Zelltrümmer durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 14000 xg von der Proteinfraction separiert und die Proteinkonzentration der Proben mithilfe des Bradford Reagenz in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Die Proteinextrakte wurden abschließend bei -20 °C eingefroren oder direkt für die Natriumdodecylsulfat (SDS)-Gelelektrophorese weiterverwendet.

5.2.11 SDS-Gelelektrophorese

Mithilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden [Laemmli, 1970]. Die Proteinextrakte wurden dafür zunächst mit 6x Laemmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht, um die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufzubrechen und sie anhand ihrer Größe einheitlich negativ zu laden. Die Proteine wurden anschließend über ein 10 % SDS-Polyacrylamidgel bei 140 V, 30-40 mA und RT aufgetrennt. Die Proteinmarker IV und VII dienten in diesem Versuch als Größenstandards.

5.2.12 Western Blot

Um die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine mithilfe von Antikörpern zu visualisieren, wurden diese zunächst auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran transferiert. Dieser Transfer erfolgte in einer *Semi dry*-Kammer, die mit einem Sandwich aus Whatman-Papieren, PVDF-Membran (für 30 s in Methanol aktiviert), SDS-Gel und weiteren Whatman-Papieren von Katode zu Anode bestückt wurde. Durch das Anlegen einer Spannung von 25 V wurden die Proteine innerhalb von 25 min von dem Gel auf die Membran transferiert. Unspezifische Bindungsstellen der Membran wurden im Anschluss durch eine einstündige Inkubation in 5 % Milch und Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) mit 0,1 % Tween20 (TBST) bei RT blockiert. Die jeweiligen Primärantikörper wurden in 1 % Milch verdünnt und 2 h auf der Membran bei RT inkubiert. Nachdem die Membran 3-mal je 10 min in TBST gewaschen wurde, erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugierten Sekundärantikörpern (1:1000) für 1 h bei RT. Es folgten zwei weitere Waschschrte der Membran für 5 min in TBST, bevor die Proteinexpression durch Zugabe der *enhanced chemiluminescence* (ECL)-Lösung in einem Chemocam Gerät visualisiert werden konnte. Die Intensitäten der Antikörpersignale auf der Membran konnten mithilfe der ChemoStar-Software quantifiziert und mit dem entsprechenden Haushaltsgen (β -Aktin) normalisiert werden. Verwendete Membranen wurden in Methanol inaktiviert, getrocknet und bei 4 °C gelagert.

5.2.13 Durchflusszytometrie

5.2.13.1 Propidiumiodid- und Annexin V-Färbung

Die Viabilität der Zellen innerhalb der FI, CI, PI, PI+MVF und der für 24 h in 0,2 % Wasserstoffperoxid (H_2O_2) inkubierten CI konnte mithilfe der Propidiumiodid- und Annexin V-Färbung in Kombination mit einer darauffolgenden Durchflusszytometrie analysiert werden. Dafür wurden die Langerhans-Inseln und Inselorganoide zunächst aufgenommen und in PBS gewaschen. Anschließend wurden sie durch Zugabe von Accutase® (1:20 verdünnt in PBS) und ständigem Auf- und Abpipettieren in ihre Einzelzellen separiert. Die Zellen wurden nach Vorgaben des Herstellers für 15 min bei RT im Dunkeln mit Propidiumiodid und Annexin V (100 μ g/ml) inkubiert und im Anschluss durchflusszytometrisch im FACScan analysiert. Die Mengen an vitalen (nicht angefärbt), apoptotischen (Annexin V-positiv), nekrotischen (Propidiumiodid-positiv) und nekroptotischen (Annexin V- und Propidiumiodid-positiv) Zellen wurden mithilfe der Cellquest®-Software bestimmt und in Prozent aller gemessenen Zellen angegeben.

5.2.13.2 Bromdesoxyuridin (BrdU)-Färbung

Die BrdU-Färbung ermöglicht die Detektion von proliferierenden Zellen, wobei BrdU als Nukleosidanalogon in die Zelle eindringt und während der Proliferation an Stelle von Thymin in die Desoxyribonukleinsäure (DNA) eingebaut wird. Dieser Einbau kann anschließend mithilfe spezifischer Antikörper in der Durchflusszytometrie detektiert werden. Um die Proliferation der Zellen innerhalb der PI+MVF in Abhängigkeit von der Zugabe des IR-Blockers Linsitinib zu analysieren, wurden PI+MVF während der Generierung mit 10 μ M BrdU und 800 nM Linsitinib bzw. Dimethylsulfoxid (DMSO) kultiviert. Nach 5 Tagen wurden die PI+MVF durch die Inkubation mit Accutase® in ihre Einzelzellen dissoziiert, in 70 % Ethanol für 30 min auf Eis fixiert und anschließend permeabilisiert. Die DNA der Zellen wurde durch die Zugabe von 2 M HCl mit 0,5 % Triton X-100 für 30 min bei RT denaturiert und 2-mal mit PBS-0,05 % Tween 20 gewaschen. Abschließend wurde der Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-gekoppelte anti-BrdU Antikörper zugegeben, die Zellen in PBS gewaschen und die Menge der Antikörpergefärbten Zellen im FACScan durchflusszytometrisch bestimmt. Parallel dazu wurde ein weiterer Ansatz mit der IgG-Kontrolle als Epitopen-Kontrolle mitgeführt.

5.2.14 Mitochondriale Messung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Unter Verwendung von transgenen Mito-roGFP2-Orp1 C57BL/6J-Spendermäusen konnte eine ROS-Messung innerhalb der Mitochondrien der Inselzellen erfolgen. Diese Spendermäuse exprimieren ubiquitär ein Fusionsprotein aus dem Redox-sensitiven grün-fluoreszierenden Protein (roGFP)2 und dem *oxygen-regulated protein* (Orp)1, welches abhängig vom Redox-Status im Mitochondrium oxidiert oder reduziert werden kann. Die aus diesen Mäusen isolierten bzw. generierten FI, CI, PI und PI+MVF wurden nach der Isolierung bzw. der 5-tägigen Kultivierung zunächst in PBS gewaschen und anschließend mit 100 mM N-Ethylmaleinimid (NEM) für 20 min bei 4 °C inkubiert, um den Sensor zu fixieren. Anschließend wurden die FI, CI, PI und PI+MVF für 30 min in 4 % PFA bei 4 °C fixiert, bevor sie in eine HepatoQuick®-Matrix eingebettet wurden. Die Gewebe wurden dehydriert, in Paraffin eingebettet und 3 μ m dicke Schnitte angefertigt, welche auf Objektträgern eingedeckt wurden. Die mikroskopische Analyse der Schnitte erfolgte innerhalb der folgenden 24 h an einem DM4000 B LED Fluoreszenzmikroskop (Leica). Hierfür wurden Aufnahmen des gleichen Sichtfeldes, wie bereits von Fujikawa *et al.* [2016] beschrieben, bei einer Emission von 520-540 nm und einer Extinktion von 405 nm und 488 nm mit einer 200x Vergrößerung angefertigt. Diese Aufnahmen wurden für die finale Auswertung in die FIJI-Software (GitHub) exportiert und das Verhältnis beider Extinktionsintensitäten zueinander Pixel für Pixel bestimmt. Die erhobenen Daten wurden als normalisierte Fluoreszenzverhältnisse (405/488 nm) dargestellt.

5.2.15 Insulin- und C-Peptid-Enzym-Immunoassay (ELISA)

Mithilfe eines ELISA kann die *in vitro* Sekretion von Insulin bzw. des C-Peptids der Langerhans-Inseln bzw. Inselorganoide quantifiziert werden. Dafür wurden 10 Langerhans-Inseln bzw. Inselorganoide in eine 24-Well Platte überführt und mit Krebs-Ringer Puffer (KRB) gewaschen. Anschließend wurden die FI, CI, PI und PI+MVF für 40 min bei 37 °C und 5 % CO₂ in KRB mit 1,1 mM Glukose inkubiert, um die Sekretion unter Niedrigglukose-Bedingungen messen zu können. Der Überstand wurde hierfür nach dieser Inkubationszeit in frische Eppendorfgefäße überführt und bei -20 °C für die darauffolgende ELISA-Messung eingefroren. Im Anschluss wurden die Langerhans-Inseln bzw. Inselorganoide für 20 min bei 37 °C und 5 % CO₂ in KRB mit 16,5 mM Glukose inkubiert, um die Sekretion unter Hochglukose-Bedingungen zu messen. Auch dieser Überstand wurde für die folgende ELISA-Messung eingefroren.

Die Menge an Insulin bzw. C-Peptid wurde anhand der Vorgaben des entsprechenden ELISA-Kits (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Hierzu wurden die Überstände für 2,5 h auf der ELISA-Platte inkubiert und die Platte anschließend mit dem spezifischen biotinylierten Antikörper für 1 h bei RT inkubiert. Die Platte wurde daraufhin für je 1 h mit HRP-gekoppeltem Streptavidin gefolgt vom Chromogen-Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe der Stopp-Lösung beendet und die Absorption bei 450 nm und 550 nm in dem Plattenlesegerät PHOMO (Anthos) gemessen. Die Menge an Insulin bzw. C-Peptid innerhalb der Proben wurde anhand einer Standardreihe quantifiziert und in µU/ml dargestellt.

5.2.16 Ribonukleinsäure (RNA)-Extraktion

Um die gesamte RNA aus FI, CI, PI und PI+MVF zu isolieren, wurden die Langerhans-Inseln bzw. Inselorganoide zunächst in PBS gewaschen und die Zellen durch die Zugabe von QIAzol lysis reagent für 5 min bei 30 °C aufgeschlossen. Nach der Zugabe von Chloroform wurden die Extrakte 40 s gemischt und anschließend für 20 min bei 9500 xg und 4 °C zentrifugiert, um die RNA-enthaltende wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführen zu können. Die RNA wurde durch die Zugabe von Isopropanol über Nacht bei -20 °C gefällt und am nächsten Tag durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 12000 xg und 4 °C pelletiert. Nach der Zugabe von Ethanol erfolgte eine weitere Zentrifugation für 5 min bei 7500 xg und 4 °C, bis der Überstand des RNA-Pellets abgenommen werden konnte. Das RNA-Pellet wurde abschließend in RNase-freiem H₂O aufgenommen, 30 min auf Eis gelöst und dessen Konzentration mithilfe eines NanoDrops (DeNovix) bestimmt. Die RNA-Proben wurden im Anschluss direkt für die reverse Transkription weiterverwendet oder bei -80 °C gelagert.

5.2.17 Reverse Transkription

Um quantitative Analysen von spezifischen RNAs in einer Zelle durchführen zu können, musste die RNA zunächst durch eine reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dies erfolgte mithilfe des QuantiNova Reverse Transcription Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Hierbei wurden pro Probe je 1 µg RNA für die PCR als Template eingesetzt. Die cDNA-Proben wurden anschließend direkt in der quantitativen Echtzeit-PCR (qRT-PCR) analysiert oder bei -20 °C gelagert.

5.2.18 qRT-PCR

Die qRT-PCR dient zur Quantifizierung der Genexpression bzw. dem spezifischen RNA-Gehalt einer Zelle. Hierzu wurde die zuvor im Abschnitt 5.2.17 synthetisierte cDNA mithilfe von spezifischen Primer-Paaren in einer PCR amplifiziert und durch die Zugabe von Fluorochromen gleichzeitig quantifiziert. Im Rahmen dieser Analyse wurden folgende Primer-Paare verwendet:

Insulin: f 5'-GGGGAGCGTGGCTTCTTCTA-3', r 5'-GGGGACAGAATTCAGTGGCA-3'

VEGF-A: f 5'-GCTGTACCTCCACCATGCCAAG-3', r 5'-CGCACTCCAGGGCTTCATCG-3'

β-Aktin: f 5'-CCTAGGCACCAGGGTGTGAT-3', r 5'-TCTCCATGTCGTCCCAGTTG-3'

Die qRT-PCR wurde in dieser Arbeit unter Verwendung des ORA qPCR Green ROX L Mix (highQ) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Datenerhebung erfolgte an einem MiniOpticon Real-Time PCR System (Bio-Rad Laboratories GmbH).

5.2.19 *Sprouting*-Assay

Die angiogene Aktivität der FI, CI, PI bzw. PI+MVF wurde *in vitro* mithilfe eines *Sprouting*-Assays analysiert. Hierzu wurden jeweils 20 FI, CI, PI bzw. PI+MVF aufgenommen und in einer 4 °C-kalten Kollagen-Lösung (siehe Abschnitt 5.1.6) resuspendiert. Die Lösung wurde im Anschluss in je ein Well einer 24-Well Platte überführt und im Brutschrank bei 37 °C für 45 min auspolymerisiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde vorsichtig DMEM, das mit 10 % (v/v) FCS, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin supplementiert wurde, auf die Kollagenschicht pipettiert und das *Sprouting*-Verhalten der Langerhans-Inseln bzw. Inselorganoide an Tag 0, 1, 2 und 3 mittels Hellfeldmikroskopie dokumentiert. Die *Sprouting*-Fläche wurde abschließend mithilfe der FIJI-Software (GitHub) bestimmt und die gewonnenen Daten in Prozent der initialen Insel- bzw. Organoid-Größe an Tag 0 dargestellt.

5.2.20 Modell der Rückenhautkammer und Transplantation von Langerhans-Inseln

Das Modell der Rückenhautkammer diente zur repetitiven *in vivo* Analyse der Revaskularisierung von transplantierten Langerhans-Inseln bzw. Inselorganoiden [Laschke *et al.*, 2011]. Die Rückenhautkammer setzt sich aus zwei symmetrischen Titanrahmen zusammen, die über drei Schrauben miteinander verbunden sind (*Abbildung 9A*). Durch ein zentrales Beobachtungsfenster, welches durch ein Deckglas und einen Sprengring verschlossen ist, ermöglicht der Aufbau der Kammer einen direkten mikroskopischen Zugang zur Mikrozirkulation des Rückenhautkammerngewebes und der darauf lokalisierten Transplantate.

Für die Implantation der Rückenhautkammer wurden die Empfängermäuse zunächst durch eine i.p. Injektion von Ketaminhydrochlorid (75 mg/kg Körpergewicht) und Xylazinhydrochlorid (15 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert und der Rücken mittels Elektrorasur und chemischer Depilation enthaart (*Abbildung 9B*). Unter Gegenlichtkontrolle wurde der rückwärtige Kammerrahmen am oberen Rand der aufgespannten Rückenhaut mithilfe von Einzelknopfnähten fixiert. Im nächsten Schritt wurden die vorderen Gewebeschichten der entstandenen Rückenhautfalte, einschließlich Haut, Unterhaut und Retraktormuskel, in einem kreisförmigen Bereich von 15 mm Durchmesser vollständig entfernt (*Abbildung 9C*). Das verbleibende Gewebe, bestehend aus dem quergestreiften Hautmuskel, Subkutis und Kutis der hinteren Seite der Rückenhautfalte, wurde anschließend mit steriler Kochsalzlösung gespült. Der zweite Titanrahmen wurde in einem Abstand von ~ 1,5 mm zur anderen Kammerhälfte aufgesetzt und das Beobachtungsfenster mit einem abnehmbaren Deckglas und Sprengring verschlossen (*Abbildung 9D*).

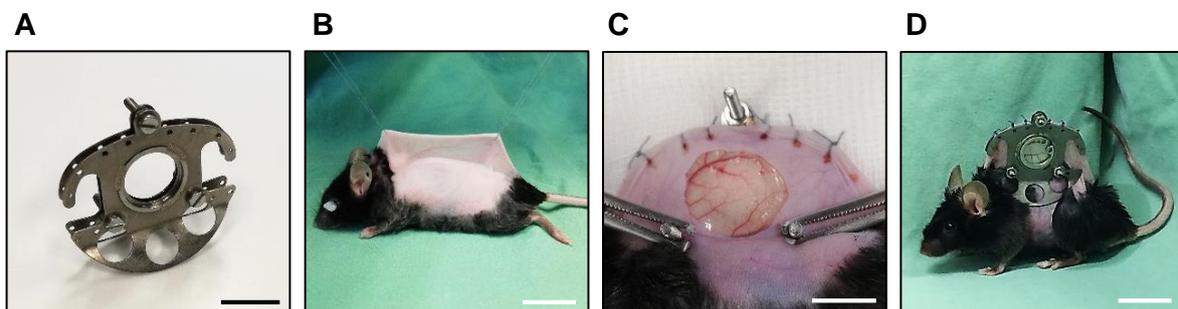


Abbildung 9: Implantation der Rückenhautkammer. (A) Die Rückenhautkammer setzt sich aus zwei symmetrischen Titanrahmen zusammen, die über drei Schrauben miteinander verbunden werden. Maßstab: 10 mm. (B) Um die Rückenhautkammer zu implantieren, wird die Maus zunächst narkotisiert, rasiert, enthaart und die Rückenhaut unter Gegenlichtkontrolle mithilfe von Fäden angehoben und fixiert. Maßstab: 20 mm. (C) Anschließend wird die Rückenhaut der Maus durch Einzelknopfnähte an der hinteren Rückenhautkammer-Seite fixiert und aus dem vorderen Anteil der Falte die Kutis, Subkutis mit Hautmuskel sowie beide Schichten des M. retractors im Bereich des Beobachtungsfensters mit einem Durchmesser von 15 mm entfernt. Maßstab: 10 mm. (D) Die Rückenhautkammer wird abschließend mit dem zweiten Titanrahmen, einem Deckglas und dem Sprengring verschlossen. Maßstab: 20 mm.

Nach 48 h Erholungszeit wurden die Tiere erneut narkotisiert und der Sprengring sowie das Deckglas der Rückenhautkammer entfernt. Das darunter liegende Gewebe wurde mit Kochsalzlösung gespült, bevor je 8 Langerhans-Inseln bzw. Inselorganoide auf das freiliegende quergestreifte Muskelgewebe transplantiert wurden. Die Kammer wurde abschließend für die folgende intravitale Fluoreszenzmikroskopie mit einem frischen Deckglas verschlossen.

5.2.21 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Mithilfe der intravitale Fluoreszenzmikroskopie konnten repetitiv die Langerhans-Inseln und Inselorganoide *in vivo* analysiert werden. Dafür wurden die Rückenhautkammer-Mäuse zunächst durch eine i.p. Injektion von Ketaminhydrochlorid (75 mg/kg Körpergewicht) und Xylazinhydrochlorid (15 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Anschließend erhielten sie eine retrobulbäre, intravenöse (i.v.) Injektion von 0,05 ml 5 % FITC-Dextran (150.000 Da) und 0,05 ml 0,1 % Rhodamin 6G. FITC-Dextran verbleibt aufgrund seines hohen Molekulargewichts größtenteils intravasal und dient damit zur Kontrastierung der Blutgefäße. Im Gegensatz dazu kann durch die Injektion von Rhodamin 6G die Fenestrierung von Blutgefäßen nachgewiesen werden. Dieser Fluoreszenzfarbstoff besitzt ein vergleichsweise geringes Molekulargewicht und kann daher die Poren von fenestriertem Endothel passieren und anschließend in umliegenden Zellen akkumulieren. Das Endothel innerhalb der Langerhans-Inseln ist aufgrund ihrer hohen Sekretionsleistung durch eine starke Fenestrierung charakterisiert [Olsson & Carlsson, 2006b; Kolka & Bergman, 2012], sodass Rhodamin 6G in den Zellen der Inseln und Inselorganoide akkumulieren kann. Durch diese Eigenschaft dient der Fluoreszenzfarbstoff nach Vajkoczy *et al.* [1995a] als Marker für die endokrine Revaskularisierung.

Die narkotisierten Mäuse wurden anschließend auf einer Plexiglasbühne in Seitenlage fixiert und unter einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) mit einer 100 W Quecksilberdampflampe positioniert. Das Mikroskop enthielt einen blauen (Anregungswellenlänge: 450-490 nm/Emissionswellenlänge: > 515 nm) und einen grünen (530-560 nm/> 585 nm) Filterblock, wodurch die Signale beider injizierten Fluoreszenzfarbstoffe separat detektiert werden konnten. Die mikroskopischen Bilder wurden mit einer Videokamera (Pieper) aufgezeichnet und zur Offline-Auswertung auf ein DVD-System (Samsung) übertragen. Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie erfolgte an den Tagen 0, 3, 6, 10 und 14 nach der Transplantation. An Tag 10 bzw. 14 wurde das Rückenhaut-Gewebe nach der letzten Intravitalmikroskopie entnommen und für weiterführende immunhistochemische Analysen fixiert.

Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mithilfe des Bildanalyse-Systems CapImage (Zeintl) ausgewertet. Dabei wurden die Inselgröße (mm²), die jeweilige Rhodamin 6G-positive Fläche (mm²) sowie die revaskularisierte Fläche der Langerhans-Inseln bzw. Inselorganoiden (mm²) im Videostandbild analysiert. Die revaskularisierte Fläche wurde als der Bereich des Gewebes definiert, in dem Anzeichen für Angiogenese, wie z.B. Gefäßaussprossungen oder die Ausbildung neuer Gefäßnetzwerke, nachweisbar waren. Die funktionelle Gefäßdichte (cm/cm²) wurde als die Gesamtlänge der perfundierten Gefäße pro Fläche einer Insel bzw. eines Inselorganoids definiert und spiegelt die Vaskularisierung der Transplantate wider. Zudem wurde auch der Gefäßdurchmesser (µm), die Zentralstromgeschwindigkeit der roten Blutkörperchen (RBC) (µm/s) (im weiteren Verlauf als Fließgeschwindigkeit bezeichnet) sowie der daraus resultierende Blutvolumenfluss (pl/s) von 6 bis 8 Mikrogefäßen innerhalb eines Transplantats bestimmt. Dabei wurden die Gefäßdurchmesser von 6 bis 8 perfundierten Gefäßen innerhalb jedes Transplantats im Videostandbild randomisiert über zwei gegenüberliegende Randpunkte der Gefäße in µm gemessen. Um die Fließgeschwindigkeit zu bestimmen, wurde zunächst eine zentrale Messlinie in diejenigen Gefäße gelegt, von denen bereits der Gefäßdurchmesser bestimmt wurde. Über die Computer-assistierte *Line-Shift-Diagram*-Methode [Klyscz *et al.*, 1997] konnte anschließend in Echtzeit die Fließgeschwindigkeit des Blutes in µm/s bestimmt werden. Der Blutvolumenfluss (Q) bezeichnet das Blutvolumen, das pro s durch ein Gefäß fließt. Dieser mikrohämodynamische Parameter wurde durch die Formel

$$Q = \pi * \left(\frac{d}{2}\right)^2 * \frac{v}{1,3}$$

berechnet, welche den Gefäßdurchmesser (d) und die Fließgeschwindigkeit (v) sowie den Baker-Wayland-Proportionalitätsfaktor von 1,3 [Lipowsky & Zweifach, 1978] berücksichtigt. Dieser Proportionalitätsfaktor wird aufgrund des parabolischen Geschwindigkeitsprofils von Blut innerhalb der Gefäße mit einem Durchmesser unter 20 µm verwendet und relativiert die gemessene Fließgeschwindigkeit im Zentralstrom jedes Gefäßes.

Zuletzt wurde die prozentuale Anwachsrate, die den Anteil der angewachsenen Langerhans-Inseln bzw. Inselorganoiden im Verhältnis zu allen transplantierten Langerhans-Inseln pro Gruppe an Tag 10 bzw. 14 widerspiegelt, berechnet. Das erfolgreiche Anwachsen einer Insel bzw. eines Inselorganoids wurde dabei durch den Nachweis von neu gebildeten Blutgefäßen an der Position des Transplantates an Tag 10 bzw. 14 definiert.

5.2.21.1 Experimentelles Protokoll und Versuchsablauf

Das Rückenhautkammer-Modell wurde in beiden Studienabschnitten angewandt. Dabei wurden insgesamt 6 unterschiedliche Gruppen analysiert. Im ersten Studienabschnitt wurden 9 Empfängertiere mit je 4 NG2^{+/+}-Inseln und 4 NG2^{-/-}-Inseln transplantiert. Jedes Empfängertier erhielt damit eine Transplantation von zwei Gruppen. Im zweiten Studienabschnitt wurden je 8 Transplantate einer Gruppe pro Empfängertier (n = 8 pro Gruppe) transplantiert. Insgesamt dienten in diesem Versuchsaufbau 41 C57BL/6N Wildtyp-Mäuse als Empfängertiere.

Studienabschnitt 1: Einfluss von NG2 auf die Revaskularisierung von Langerhans-Inseln

<i>Gruppe</i>	<i>Anzahl der Tiere</i>	<i>Transplantate</i>
1	n = 9	NG2 ^{+/+} -Inseln (n = 4 pro Tier)
2		NG2 ^{-/-} -Inseln (n = 4 pro Tier)

Studienabschnitt 2: Einfluss der Inkorporation von MVF auf die Vaskularisierung von Inselorganoiden

<i>Gruppe</i>	<i>Anzahl der Tiere</i>	<i>Transplantate</i>
1	n = 8	FI (n = 8 pro Tier)
2	n = 8	CI (n = 8 pro Tier)
3	n = 8	PI (n = 8 pro Tier)
4	n = 8	PI+MVF (n = 8 pro Tier)

Die Kammerpräparation erfolgte wie in Abschnitt 5.2.20 beschrieben. Zwei Tage nach Implantation der Rückenhautkammer wurden die Empfängertiere erneut narkotisiert, um die Langerhans-Inseln bzw. Inselorganoiden zu transplantieren. Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie erfolgte im ersten Studienabschnitt am Tag der Transplantation (Tag 0) und den Tagen 3, 6 und 10. Im zweiten Studienabschnitt wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie an den Tagen 0, 3, 6, 10 und 14 durchgeführt. Nach Abschluss der Untersuchungen wurden die Versuchstiere durch eine Überdosis der Narkoselösung euthanasiert und das Rückenhautkammerngewebe einschließlich der Transplantate exzidiert, sodass es für weiterführende immunhistochemische Analysen fixiert werden konnte.

5.2.22 Diabetisches Mausmodell und Inseltransplantation unter die Nierenkapsel

Das diabetische Mausmodell diente zur Analyse der endokrinen Funktion transplanteder Langerhans-Inseln bzw. Inselorganoide [Menger *et al.*, 2020a]. Hierzu wurde 8 Tage vor der Inseltransplantation ein T1D-Phänotyp durch eine einmalige i.p. Injektion von 180 mg/kg Streptozotocin (STZ) induziert. Während des gesamten Beobachtungszeitraums von 5 Wochen wurden 2-mal wöchentlich das Körpergewicht und der Blutzucker der Mäuse bestimmt. Die Blutproben wurden dabei über die Punktion der Schwanzvene entnommen und mit einem Blutzuckermessgerät (Beurer) analysiert. Mäuse mit einer Blutzucker-Konzentration von 350-450 mg/dl wurden als diabetisch angesehen und dienten als Empfänger für die Transplantation der Langerhans-Inseln bzw. Inselorganoide.

Am Transplantationstag wurden 400, 300, 250 oder 200 FI bzw. 250 PI+MVf unter die Nierenkapsel der diabetischen Mäuse injiziert. Dabei wurden die Tiere zunächst narkotisiert und an der rechten Flanke mittels Elektrorasur und chemischer Depilation enthaart (*Abbildung 10A*), um nach einem Hautschnitt und retroperitonealen Zugang die rechte Niere auszulagern (*Abbildung 10B*). Mithilfe einer 10 µl Hamilton-Spritze, deren Nadel vorsichtig unter die Kapsel der Niere geführt wurde, konnten die FI bzw. PI+MVf injiziert werden (*Abbildung 10C*). Abschließend wurden die Muskel- und Hautinzisionen mit einem resorbierbaren 5-0 Vicryl-Faden mit fortlaufender Naht verschlossen (*Abbildung 10D*). Das Körpergewicht sowie der Blutzuckerspiegel der Tiere wurde über die folgenden 28 Tage wie oben beschrieben überwacht und dokumentiert.

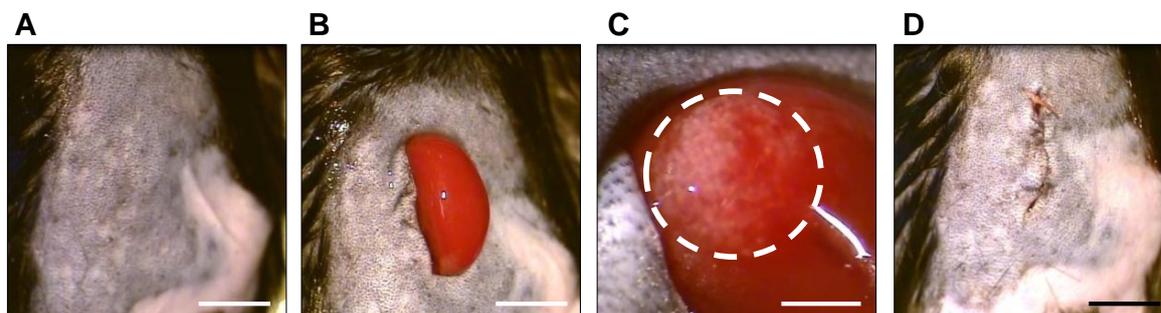


Abbildung 10: Inseltransplantation unter die Nierenkapsel. (A) Acht Tage nach einer i.p. STZ-Injektion (180 mg/kg Körpergewicht) werden die Langerhans-Inseln und Inselorganoide unter die Nierenkapsel der Maus transplantiert. Dafür wird die narkotisierte Maus zunächst dorsal rasiert und enthaart. Maßstab: 5 mm. (B) Anschließend wird die rechte Niere über einen dorsalen, retroperitonealen Zugang ausgelagert. Maßstab: 5 mm. (C) Daraufhin können die Langerhans-Inseln bzw. Inselorganoide mithilfe einer Hamilton-Spritze unter die Nierenkapsel appliziert werden. Maßstab: 1,3 mm. (D) Abschließend wird die Niere zurückverlagert und sowohl die Muskel- als auch die Hautschicht mit einem resorbierbaren 5-0 Vicryl-Faden verschlossen. Maßstab: 5 mm.

Normoglykämie wurde mit einem Blutzuckerspiegel zwischen 80-200 mg/dl erreicht. 28 Tage nach der Transplantation wurden die rechten Nieren mit den Transplantaten entnommen und für weiterführende immunhistochemische Analysen fixiert.

5.2.22.1 Experimentelles Protokoll und Versuchsablauf

Das diabetische Mausmodell wurde im zweiten Studienabschnitt dieser Arbeit angewandt. Dabei wurden 7 unterschiedliche Gruppen analysiert, die sich auf 4 Gruppen für die Etablierung des Modells und zur Bestimmung der kritischen Inselmasse (n = 3 Empfängertiere pro Gruppe) und 3 Gruppen im Hauptversuch (n = 7 Empfängertiere pro Gruppe) aufteilten. Pro Empfängertier wurden je 200-400 FI bzw. 250 PI+MVF unter die Nierenkapsel von insgesamt 26 C57BL/6N Wildtyp-Mäusen transplantiert. Sieben gesunde C57BL/6N Wildtyp-Mäuse, denen keine Inseln transplantiert wurden, dienten im Hauptversuch neben den FI als Kontrollgruppe.

Bestimmung der kritischen Inselmasse:

<i>Gruppe</i>	<i>Anzahl der Tiere</i>	<i>Transplantate</i>
1	n = 3	200 FI
2	n = 3	250 FI
3	n = 3	300 FI
4	n = 3	400 FI

Hauptversuch:

<i>Gruppe</i>	<i>Anzahl der Tiere</i>	<i>Transplantate</i>
1	n = 7	gesunde Tiere ohne Inseltransplantation
2	n = 7	250 FI
3	n = 7	300 PI+MVF

Die Durchführung des diabetischen Mausmodells erfolgte wie in Abschnitt 5.2.22 beschrieben. Acht Tage nach i.p. STZ-Injektion und der Manifestierung eines T1D-Phänotyps wurden die diabetischen Empfängertiere narkotisiert, um die Langerhans-Inseln bzw. Inselorganoide unter die Nierenkapsel zu transplantieren. Die Kontrolle des Körpergewichts und des Blutglukosespiegels erfolgte von Tag -7 bis 28 zweimal pro Woche. Nach Abschluss der Untersuchungen wurden die Versuchstiere durch eine Überdosis der Narkoselösung euthanasiert. Für weiterführende immunhistochemische Analysen wurde das Nierengewebe einschließlich der Transplantate exzidiert und fixiert.

5.2.23 Statistische Analyse

Die Statistische Auswertung der Daten erfolgte mithilfe der Prism 8-Software (GraphPad). Sämtliche Werte wurden als $MW \pm SD$ angegeben. Für die Überprüfung von signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen wurden die erhobenen Daten zunächst auf Normalverteilung überprüft. Unterschiede zwischen 2 Gruppen mit normalverteilten Daten wurden mittels eines ungepaarten Student's t-Test auf Signifikanzen überprüft. Nicht normalverteilte Datensätze zweier Gruppen wurden unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Test auf Signifikanzen überprüft. Unterschiede zwischen mehr als 2 Gruppen wurden durch die einseitige Varianzanalyse (ANOVA) bestimmt. Zum anschließenden Vergleich der einzelnen Gruppen folgte der Tukey-Post-hoc-Test, der die Korrektur des α -Fehlers nach Bonferroni berücksichtigt, um Mehrfachvergleiche auszugleichen. Ein P-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant definiert und entsprechend in den Abbildungen gekennzeichnet.

6. Ergebnisse

6.1 Einfluss von NG2 auf die Revaskularisierung von Langerhans-Inseln

Im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von NG2 auf die Revaskularisierung transplantierter Langerhans-Inseln untersucht. Hierzu wurde zunächst analysiert, ob der KO von NG2 eine Auswirkung auf die zelluläre Zusammensetzung und Funktion der Inseln hat. Weiterhin wurde die Revaskularisierung transplantierter Langerhans-Inseln aus NG2^{+/+}- und NG2^{-/-}-Mäusen unter Verwendung des Rückenhautkammer-Modells untersucht.

6.1.1 Verifizierung des NG2 KO

Durch einen gezielten *knock-in* der CreERT2-Kassette im Exon 1 des NG2-Gens in Folge zweier Tamoxifen-Injektionen kann NG2 in homozygoten NG2-CreERT2xRosa26-tdTomato-Mäusen nicht mehr fehlerfrei exprimiert werden, was zum Verlust von NG2 führt [Madisen *et al.*, 2010]. Dieser KO von NG2 konnte in der vorliegenden Arbeit mithilfe einer Genotypisierungs-PCR überprüft werden.

Durch den Einsatz entsprechender Primerpaare wies der homozygote KO von NG2 mit 829 bp ein größeres DNA-Amplifikat als das des Wildtyps mit 557 bp auf (*Abbildung 11A*). Daneben konnten die NG2^{-/-}-Zellen durch eine Tamoxifen-induzierte Expression des Fluoreszenzproteins tdTomato nachgewiesen werden. Hierfür wurde den NG2^{-/-}-Mäusen an den Tagen -16 und -14 Tamoxifen i.p. appliziert und das Pankreas an Tag 0 entnommen, um die Langerhans-Inseln zu isolieren (*Abbildung 11B*). Die Expression des Fluoreszenzproteins wurde anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht (*Abbildung 11C*). Hierbei markierte das tdTomato-Signal innerhalb der NG2^{-/-}-Inseln die Zellen, die durch den KO kein NG2 mehr exprimierten. Isolierte Langerhans-Inseln von NG2^{+/+}-Mäusen wiesen dagegen keine tdTomato-positiven Fluoreszenzsignale bei einer Wellenlänge von 555 nm auf.

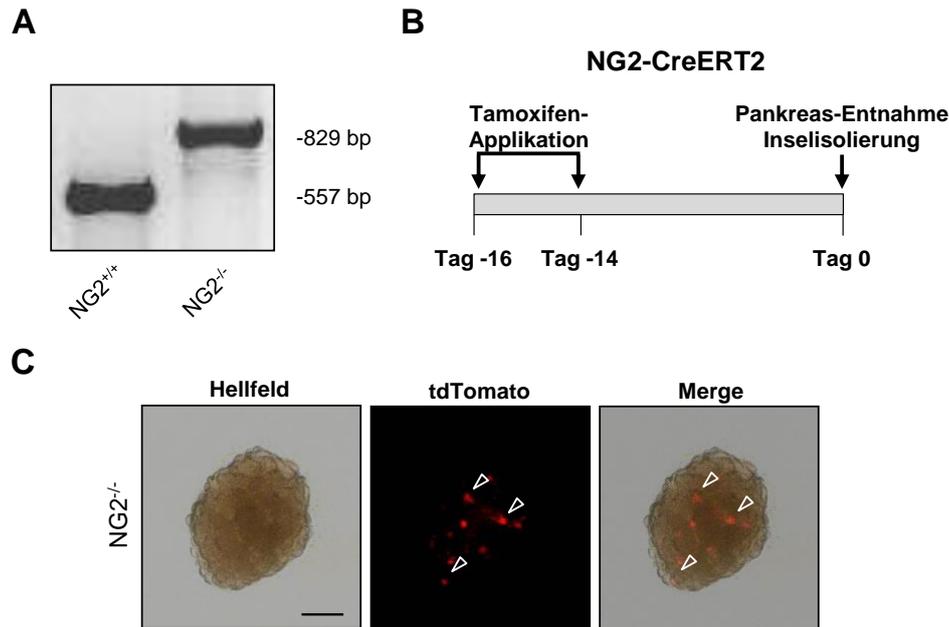


Abbildung 11: Nachweis und schematische Darstellung des Tamoxifen-induzierten KO von NG2. (A) Zur Genotypisierung transgener Mäuse wurde DNA aus Ohrstanzen von NG2^{+/+}- und NG2^{-/-}-Mäusen extrahiert. NG2 wurde mittels einer Genotypisierungs-PCR unter Verwendung von NG2-spezifischen Primerpaaren amplifiziert und die Amplifikate elektrophoretisch aufgetrennt. Das DNA-Amplifikat der NG2^{+/+}-Mäuse wies ein 557 bp großes Produkt auf, während das Amplifikat der NG2^{-/-}-Mäuse eine Größe von 829 bp besaß. (B) Zeitlicher Ablauf des Tamoxifen-induzierten NG2 KO in NG2^{-/-}-Mäusen. Durch zwei i.p. Injektionen von Tamoxifen an den Tagen -16 und -14 wurde die Expression des Fluoreszenzproteins tdTomato induziert. An Tag 0 wurde das Pankreas der Tiere für die nachfolgende Insel-Isolierung entnommen. (C) Repräsentative Hellfeld- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen sowie die Überlagerung (Merge) beider Aufnahmen einer isolierten NG2^{-/-}-Langerhans-Insel nach Tamoxifen-Induktion. Die Pfeilspitzen zeigen die tdTomato-gefärbten Perizyten. Maßstab: 40 µm.

6.1.2 Zelluläre Zusammensetzung der Langerhans-Inseln von NG2^{+/+}- und NG2^{-/-}-Mäusen

Um auszuschließen, dass sich der KO von NG2 auf die zelluläre Zusammensetzung der Langerhans-Inseln auswirkt, wurden Gewebeschnitte von Pankreata aus NG2^{+/+}- und NG2^{-/-}-Mäusen angefertigt und Insulin-, Glukagon-, Somatostatin- und CD31-exprimierende Zellen innerhalb der Inseln durch immunhistochemische Färbungen visualisiert (*Abbildung 12A*). Der Anteil der Insulin-positiven β -Zellen, Glukagon-positiven α -Zellen, Somatostatin-positiven δ -Zellen und CD31-positiven Endothelzellen wurde quantifiziert und in Prozent aller analysierten Inselzellen angegeben (*Abbildung 12B-E*). Hierbei zeigte sich, dass die Langerhans-Inseln im Pankreas der NG2^{+/+}- und NG2^{-/-}-Mäuse keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die zelluläre Zusammensetzung der endokrinen α -, β - und δ -Zellen aufwiesen (*Abbildung 12B-D*). Auch die Analyse der Anzahl der Endothelzellen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (*Abbildung 12E*).

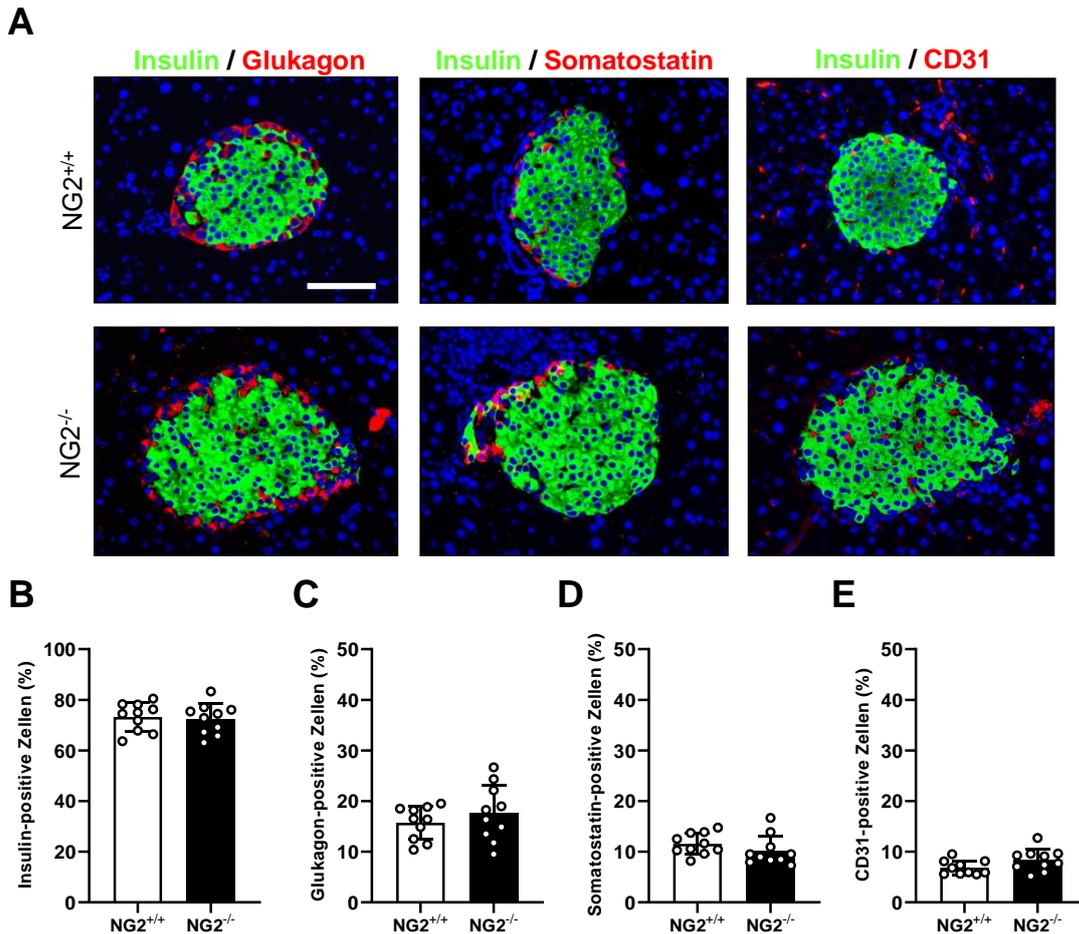


Abbildung 12: Zelluläre Zusammensetzung der Langerhans-Inseln im Pankreas von NG2^{+/+}- und NG2^{-/-}-Mäusen. (A) Immunhistochemische Färbung der Gewebeschnitte von NG2^{+/+}- und NG2^{-/-}-Pankreata. Insulin, Glukagon, Somatostatin und CD31 wurden mit den entsprechenden spezifischen Antikörpern detektiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 visualisiert. Maßstab: 50 μ m. (B-E) Quantitative Analyse der Insulin- (B), Glukagon- (C), Somatostatin- (D) und CD31-positiven Zellen (E) der Langerhans-Inseln von NG2^{+/+}- und NG2^{-/-}-Mäusen im Pankreas (in % aller Inselzellen) (n = 10). MW \pm SD.

6.1.3 Zelluläre Zusammensetzung isolierter Langerhans-Inseln von NG2^{+/+}- und NG2^{-/-}-Mäusen

Nachdem in Abschnitt 6.1.2 gezeigt werden konnte, dass sich der NG2 KO nicht auf die zelluläre Zusammensetzung der Langerhans-Inseln im Pankreas auswirkt, wurde in den folgenden Versuchen analysiert, inwieweit der Isolierungsprozess einen Einfluss auf die zelluläre Zusammensetzung von NG2^{+/+}- und NG2^{-/-}-Inseln hat. Die hier dargestellten immunhistochemischen Färbungen sowie die daraus resultierenden quantitativen Analysen zeigen, dass sich der Anteil der Insulin-, Glukagon- und Somatostatin-positiven Zellen innerhalb der isolierten NG2^{+/+}- und NG2^{-/-}-Langerhans-Inseln nicht signifikant unterschied (Abbildung 13A-D). Im Gegensatz dazu konnte jedoch eine signifikant geringere Anzahl an CD31-positiven Endothelzellen innerhalb der NG2^{-/-}-Langerhans-Inseln im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Abbildung 13E).

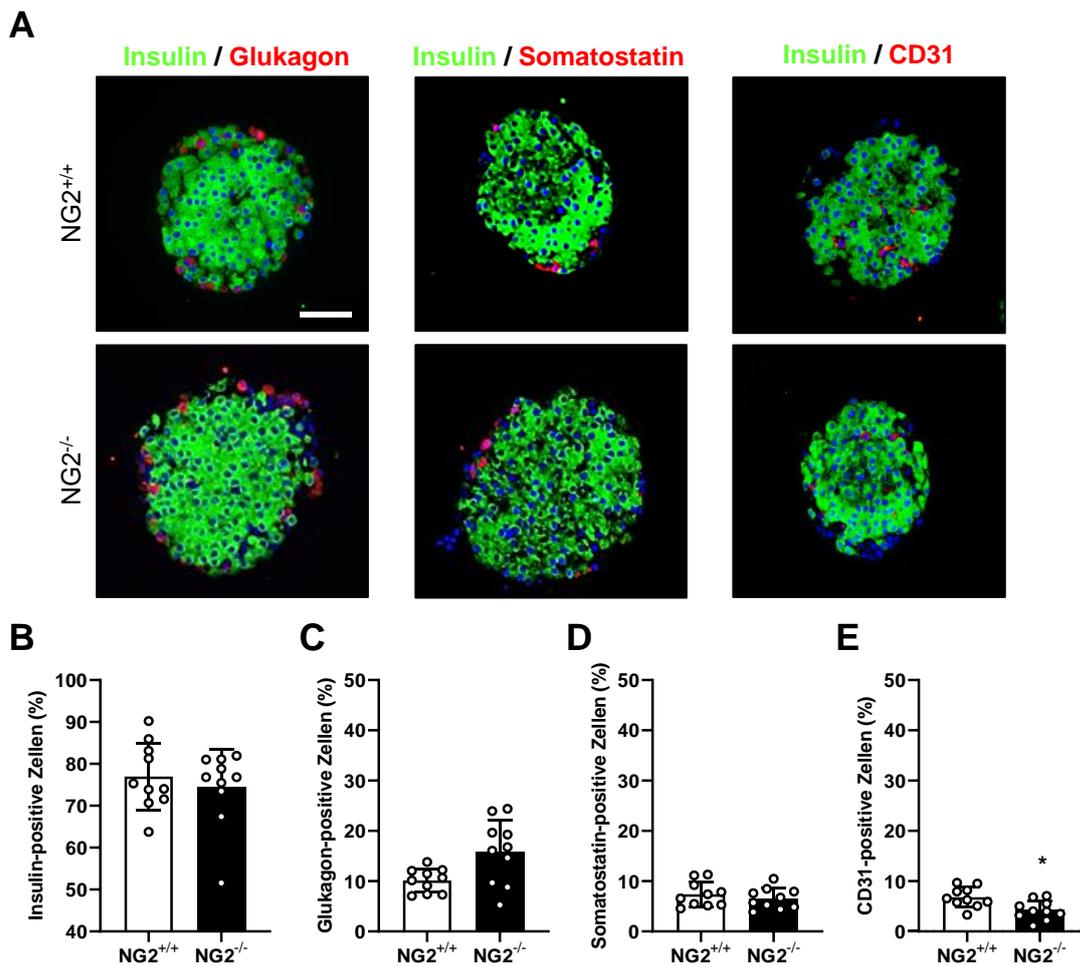


Abbildung 13: Zelluläre Zusammensetzung der isolierten Langerhans-Inseln von NG2^{+/+}- und NG2^{-/-}-Mäusen. (A) Immunhistochemische Färbung der isolierten Langerhans-Inseln von NG2^{+/+}- und NG2^{-/-}-Mäusen. Insulin, Glukagon, Somatostatin und CD31 wurden mit den entsprechenden spezifischen Antikörpern detektiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 visualisiert. Maßstab: 50 µm. (B-E) Quantitative Analyse von Insulin- (B), Glukagon- (C), Somatostatin- (D) und CD31-positiven Zellen (E) der isolierten Langerhans-Inseln von NG2^{+/+}- und NG2^{-/-}-Mäusen (in % aller Inselzellen) (n = 10). MW ± SD. *P < 0,05 vs. NG2^{+/+}.

6.1.4 Insulin-Sekretion von NG2^{+/+}- und NG2^{-/-}-Langerhans-Inseln

Die immunhistochemischen Analysen zeigten, dass der Verlust von NG2 keinen Einfluss auf die Anzahl endokriner Zellen in Langerhans-Inseln hat. Daher wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die Insulin-Sekretion durch den NG2 KO beeinträchtigt ist. Hierfür wurde die Glukose-abhängige Insulin-Sekretion der Langerhans-Inseln mit einem Insulin-ELISA analysiert. Dabei wurden die Langerhans-Inseln von NG2^{+/+}- und NG2^{-/-}-Mäusen nach deren Isolierung über einen Zeitraum von 45 min in einer Hochglukose-Lösung (25 mM Glukose) kultiviert und anschließend die Konzentration des sekretierten Insulins im Überstand bestimmt (Abbildung 14). Die Ergebnisse dieser Analyse wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Langerhans-Inseln aus NG2^{+/+}- und NG2^{-/-}-Mäusen auf.

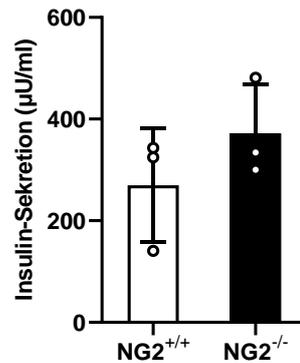


Abbildung 14: Insulin-Sekretion von NG2^{+/+}- und NG2^{-/-}-Langerhans-Inseln. Quantitative Analyse der Insulin-Sekretion in µU/ml von NG2^{+/+}- und NG2^{-/-}-Langerhans-Inseln nach einer 45-minütigen Inkubation mit 25 mM Glukose (n = 3). MW ± SD.

6.1.5 Einfluss von NG2 auf die Revaskularisierung transplantierter Langerhans-Inseln

Ozerdem & Stallcup [2004] zeigten bereits, dass sich NG2 positiv auf die Neovaskularisierung von ischämischem Retinagewebe auswirkt. Daher kann hypothetisiert werden, dass NG2 auch bei der Revaskularisierung transplantierter Langerhans-Inseln eine fördernde Wirkung hat. Um dies zu überprüfen, wurde das Rückenhautkammer-Modell der Maus verwendet. Pro Empfängertier wurden dabei je 4 Langerhans-Inseln beider Gruppen (NG2^{+/+} und NG2^{-/-}) in ausreichendem Abstand zueinander auf den quergestreiften Hautmuskel der Rückenhautkammer-Präparation transplantiert und die Revaskularisierung der Transplantate an den Tagen 0, 3, 6 und 10 mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Abbildung 15).

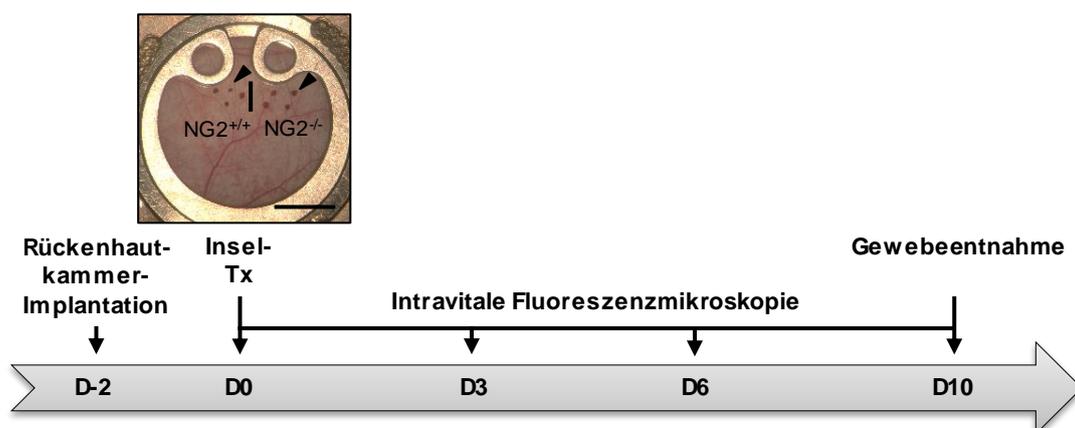


Abbildung 15: Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs der Analyse im Rückenhautkammer-Modell. Zwei Tage vor der Transplantation der Langerhans-Inseln wurde die Rückenhautkammer in Empfängertiere implantiert. Die Lichtbildaufnahme zeigt das Beobachtungsfenster der Rückenhautkammer an Tag 0 nach der Transplantation von je 4 Neutralrot-gefärbten NG2^{+/+}- und NG2^{-/-}-Langerhans-Inseln (durch Pfeilspitzen markiert). Maßstab: 2,5 mm. An Tag 0 sowie an den Tagen 3, 6 und 10 nach Transplantation erfolgte die intravitale Fluoreszenzmikroskopie der Transplantate. Abschließend wurde das quergestreifte Hautmuskeltgewebe für histologische Analysen der transplantierten Langerhans-Inseln entnommen.

Die Visualisierung der Mikrozirkulation des präparierten Gewebes erfolgte durch eine i.v. Applikation des Plasmamarkers FITC-Dextran (Abbildung 16A). Sowohl in der NG2^{+/+}- als auch der NG2^{-/-}-Gruppe konnten bereits 3 Tage nach Transplantation typische Merkmale der Angiogenese im Bereich der transplantierten Langerhans-Inseln nachgewiesen werden. Diese waren durch erste Gefäßwandsprossen und unregelmäßige Gefäßstrukturen charakterisiert (Abbildung 16A). Im Laufe der folgenden Tage formierten sich neugebildete Blutgefäße zu einem dichten Gefäßnetzwerk in den transplantierten Langerhans-Inseln.

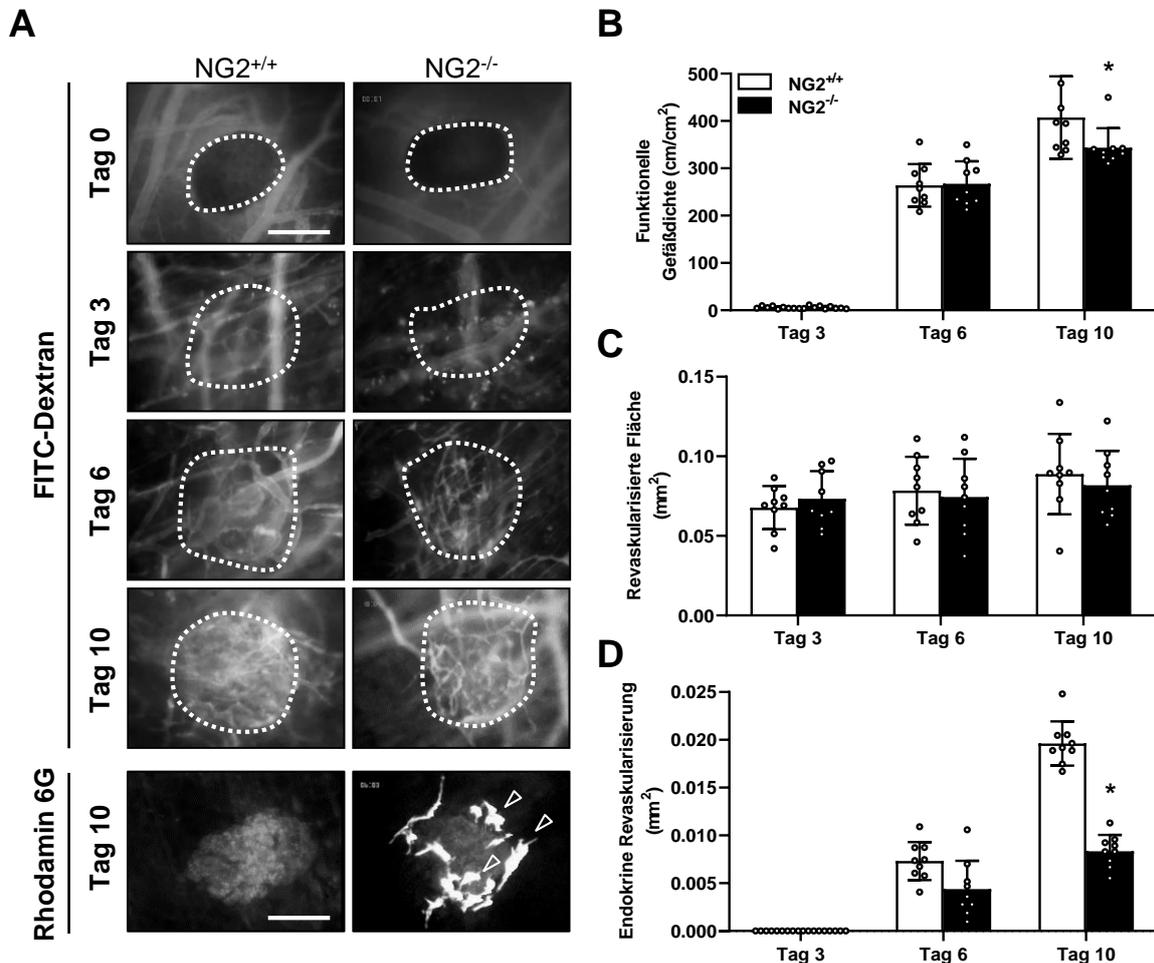


Abbildung 16: Einfluss von NG2 auf die Revaskularisierung transplanteder Langerhans-Inseln. (A) Intravitalmikroskopische Aufnahmen von NG2^{+/+}- und NG2^{-/-}-Langerhans-Inseln (gestrichelte Linie markiert den Rand der Inseln) an Tag 0 sowie an den Tagen 3, 6 und 10 nach Transplantation auf den quergestreiften Hautmuskel. Das Gefäßsystem wurde mittels FITC-Dextran kontrastiert und die Fenestrierung des Endothels anhand von Rhodamin 6G analysiert. Die Pfeile markieren tdTomato-positive Perizyten in den transplantierten NG2^{-/-}-Langerhans-Inseln. Maßstab: 100 μ m. (B-D) Quantitative Analyse der funktionellen Gefäßdichte (cm/cm²) (B), der revaskularisierten Fläche (mm²) (C) und der endokrinen Revaskularisierung (in % der Inselgröße) (D) an den Tagen 3, 6 und 10 nach Transplantation (n = 9 Tiere). MW \pm SD. *P < 0,05 vs. NG2^{+/+}.

Die funktionelle Gefäßdichte wies an den Tagen 3 und 6 keine signifikanten Unterschiede zwischen den NG2^{+/+}- und NG2^{-/-}-Inseln auf. Allerdings konnte an Tag 10 eine signifikant geringere funktionelle Gefäßdichte in NG2^{-/-}-Inseln im Vergleich zu NG2^{+/+}-Inseln

nachgewiesen werden (*Abbildung 16B*). Die revaskularisierte Fläche nahm in beiden Gruppen von Tag 3 bis Tag 10 von 0,07 mm² auf 0,08 mm² leicht zu, jedoch waren hierbei keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zu beobachten (*Abbildung 16C*). Zudem war auch die Anwachsrate der Langerhans-Inseln mit 74 ± 5 % in der NG2^{+/+}-Gruppe und 79 ± 6 % in der NG2^{-/-}-Gruppe vergleichbar.

Das Endothel der meisten endokrinen Organe einschließlich der Langerhans-Inseln ist aufgrund der hohen Sekretionsleistung typischerweise fenestriert [Olsson & Carlsson, 2006b; Kolka & Bergman, 2012]. Diese Fenestrierung kann unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs Rhodamin 6G visualisiert werden, welcher aufgrund seines geringen Molekulargewichts das fenestrierte Endothel passiert und anschließend in den umliegenden Zellen akkumuliert [Vajkoczy *et al.*, 1995a]. Die Analyse der Rhodamin 6G-positiven Fläche transplantiert NG2^{-/-}- und der NG2^{+/+}-Inseln zeigte, dass der Verlust von NG2 eine reduzierte Fenestrierung der Gefäße an Tag 10 nach Transplantation zur Folge hat (*Abbildung 16D*). Diese Ergebnisse stimmen mit den vorherigen Analysen überein, die eine verringerte, funktionelle Gefäßdichte an Tag 10 in der NG2^{-/-}-Gruppe im Vergleich zu den NG2^{+/+}-Langerhans-Inseln zeigten.

Die Ergebnisse der mikrohämodynamischen Analysen ergaben hingegen keine Unterschiede zwischen NG2^{-/-}- und NG2^{+/+}-Inseln. Weder der Gefäßdurchmesser, noch die Fließgeschwindigkeit des Blutes oder der Blutvolumenfluss innerhalb der Gefäße wiesen signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen über den gesamten Beobachtungszeitraum auf (*Tabelle 1*). Alle Parameter waren erst an Tag 6 messbar, da an Tag 3 der Analyse lediglich minimale Aussprossungen der Blutgefäße nachzuweisen waren.

Tabelle 1: Mikrohämodynamische Parameter der Blutgefäße transplantiert Langerhans-Inseln von NG2^{+/+}- und NG2^{-/-}-Mäusen im Rückenhautkammer-Modell. Quantitative Analyse des Gefäßdurchmessers (µm), der Fließgeschwindigkeit (µm/s) und des Blutvolumenflusses (pl/s) innerhalb der NG2^{+/+}- und NG2^{-/-}-Langerhans-Inseln an Tag 0 sowie an den Tagen 3, 6 und 10 nach Transplantation auf den quergestreiften Hautmuskel (n = 9 Tiere pro Gruppe). MW ± SD.

	Tag 0	Tag 3	Tag 6	Tag 10
Gefäßdurchmesser (µm)				
NG2 ^{+/+}	-	-	14,9 ± 0,5	12,5 ± 0,8
NG2 ^{-/-}	-	-	14,6 ± 0,6	14,6 ± 1,5
Fließgeschwindigkeit (µm/s)				
NG2 ^{+/+}	-	-	395,0 ± 79,4	277,5 ± 32,7
NG2 ^{-/-}	-	-	336,9 ± 39,8	314,3 ± 51,8
Blutvolumenfluss (pl/s)				
NG2 ^{+/+}	-	-	51,3 ± 9,8	29,4 ± 5,2
NG2 ^{-/-}	-	-	50,4 ± 8,6	56,7 ± 19,0

Abschließend wurde das Gewebe der Rückenhautkammer mit den transplantierten NG2^{+/+}- und NG2^{-/-}-Inseln entnommen und der Anteil an Insulin-, Glukagon-, Somatostatin- und CD31-exprimierenden Zellen in den Transplantaten immunhistochemisch untersucht (Abbildung 17A). In Übereinstimmung mit den zuvor durchgeführten Analysen konnten keine signifikanten Unterschiede in den Fraktionen endokriner Zellen der transplantierten NG2^{+/+}- und NG2^{-/-}-Langerhans-Inseln festgestellt werden (Abbildung 17B-D). Die NG2^{-/-}-Langerhans-Inseln wiesen jedoch eine signifikant reduzierte Anzahl an Endothelzellen im Vergleich zu den NG2^{+/+}-Langerhans-Inseln auf (Abbildung 17E).

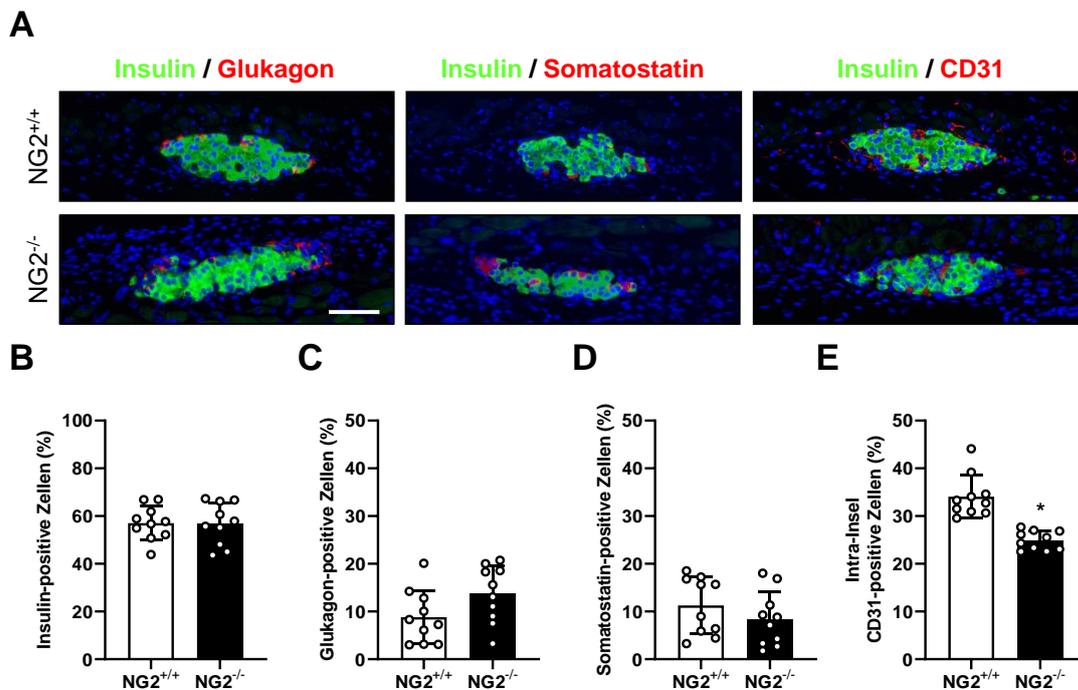


Abbildung 17: Zelluläre Zusammensetzung der Langerhans-Inseln von NG2^{+/+}- und NG2^{-/-}-Mäusen 10 Tage nach Transplantation. (A) Immunhistochemische Färbung transplanteder Langerhans-Inseln von NG2^{+/+}- und NG2^{-/-}-Mäusen auf die quergestreifte Hautmuskulatur der Rückenhautkammerpräparation. Insulin, Glukagon, Somatostatin und CD31 wurden mit den entsprechenden spezifischen Antikörpern detektiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 visualisiert. Maßstab: 40 µm. (B-E) Quantitative Analyse von Insulin- (B), Glukagon- (C), Somatostatin- (D) und CD31-positiven Zellen (E) der Langerhans-Inseln von NG2^{+/+}- und NG2^{-/-}-Mäusen 10 Tage nach Transplantation (in % aller Inselzellen) (n = 10). MW ± SD. *P < 0,05 vs. NG2^{+/+}.

6.1.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Untersuchungen des ersten Studienabschnitts der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der Verlust von NG2 unter physiologischen Bedingungen keinen Einfluss auf die endokrine und vaskuläre Zusammensetzung sowie die Insulin-Sekretion von Langerhans-Inseln hat. Im Gegensatz dazu spielt das Proteoglykan eine entscheidende Rolle während der Revaskularisierung transplanteder Langerhans-Inseln, da der Verlust von NG2 zu einer signifikant reduzierten Anzahl an Blutgefäßen innerhalb der Inseln 10 Tage nach Transplantation führt.

6.2 Einfluss der Inkorporation von MVF auf die Vaskularisierung von Inselorganoiden

Im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von MVF auf die Vaskularisierung transplanteder Inselorganoiden analysiert. Im Rahmen einer vorangegangenen Masterarbeit konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Co-Kultivierung von MVF und Inselzellen innerhalb von 5 Tagen PI+MVF mithilfe der *Liquid Overlay*-Technik generiert werden können [Nalbach, 2017]. Diese Inselorganoiden weisen eine kompakte kugelförmige Struktur mit einem Durchmesser von ~200 µm auf und besitzen mit ~20 % Endothelzellen eine signifikant erhöhte Fraktion vaskulärer Zellen im Vergleich zu FI, CI und PI. Zudem konnte im *Sprouting*-Assay die hohe angiogene Aktivität der PI+MVF *in vitro* nachgewiesen werden.

Aufbauend auf diesen Versuchsergebnissen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst der Einfluss der inkorporierten MVF auf die Viabilität und die endokrine Funktion der Inselorganoiden sowie der Einfluss von Insulin auf die MVF *in vitro* untersucht. Anschließend wurde die Vaskularisierung transplanteder PI+MVF unter Verwendung des Rückenhautkammer-Modells der Maus sowie die endokrine Funktion der PI+MVF im diabetischen Mausmodell analysiert. Abschließend erfolgten erste Versuche zur Translation dieses neuen Prävaskularisierungs-Ansatzes von murinen auf humanisierte Inselorganoiden. FI, CI und PI dienten für diese Experimente als Kontrollen.

6.2.1 Viabilität der FI, CI, PI und PI+MVF

Die Kultivierung von Langerhans-Inseln und Inselorganoiden über 5 Tage kann im Inneren der Zellagglomerate Hypoxie induzieren, was die Bildung von ROS begünstigt [Cantley *et al.*, 2010]. Dies kann sich wiederum negativ auf die zelluläre Viabilität auswirken [Giuliani *et al.*, 2005]. Daher wurden zunächst die Viabilität und mitochondriale H₂O₂-Produktion der Zellen in FI, CI, PI und PI+MVF untersucht.

Die Viabilität der Langerhans-Inseln und Inselorganoiden wurde auf Einzelzellniveau über Propidiumiodid- und Annexin V-Färbungen analysiert (*Abbildung 18A-C*). Hier zeigte sich, dass PI+MVF im Vergleich zu FI, CI, PI eine tendenziell höhere Anzahl vitaler Zellen aufweisen (*Abbildung 18C*). Als Positivkontrolle dienten CI, die für 24 h in 0,02 % H₂O₂ kultiviert wurden. Diese wiesen einen deutlich reduzierten Anteil von etwa 30 % vitalen Zellen im Vergleich zu den anderen Gruppen auf (*Abbildung 18C*).

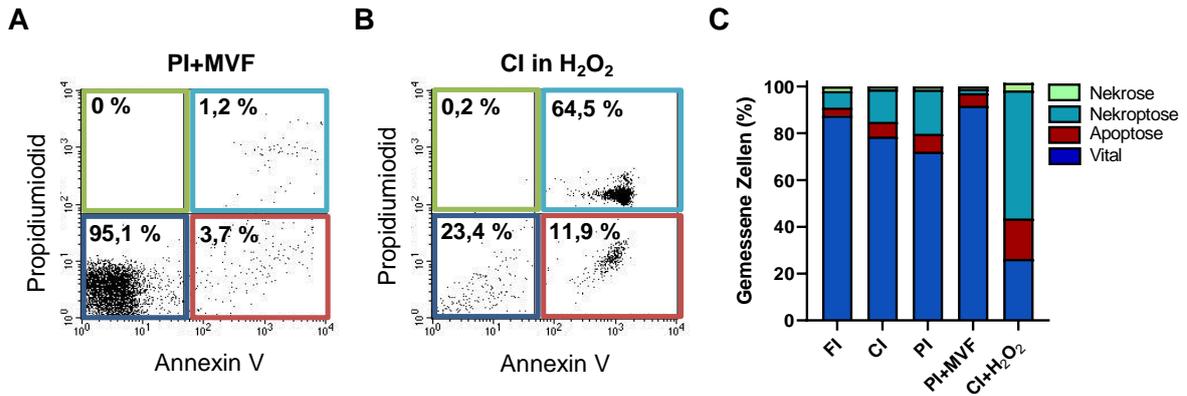


Abbildung 18: Propidiumiodid- und Annexin V-Färbung von FI, CI, PI, PI+MVF und H₂O₂ kultivierten CI. (A, B) Repräsentative Streudiagramme der durchflusszytometrischen Analyse von Zellen der PI+MVF (A) und in H₂O₂ kultivierten CI (B) nach Propidiumiodid- und Annexin V-Färbung. (C) Quantitative Analyse der Propidiumiodid- und Annexin V-Färbung von Zellen der FI, CI, PI, PI+MVF und in H₂O₂ kultivierten CI unterteilt in vitale (dunkelblau), apoptotische (rot), nekrotische (grün) und nekroptotische Zellen (hellblau) (in % aller gemessenen Zellen) (n = 3).

Die mitochondrialen H₂O₂-Level der Langerhans-Inseln und Inselorganoide wurden mittels mito-roGFP2-Orp1-Spendermäusen untersucht [Fujikawa *et al.*, 2016]. Die Zellen dieser Mäuse exprimieren ein im Mitochondrium lokalisiertes Fusionsprotein, bestehend aus roGFP2 und Orp1, welches abhängig von der mitochondrialen H₂O₂-Konzentration oxidiert oder reduziert wird.

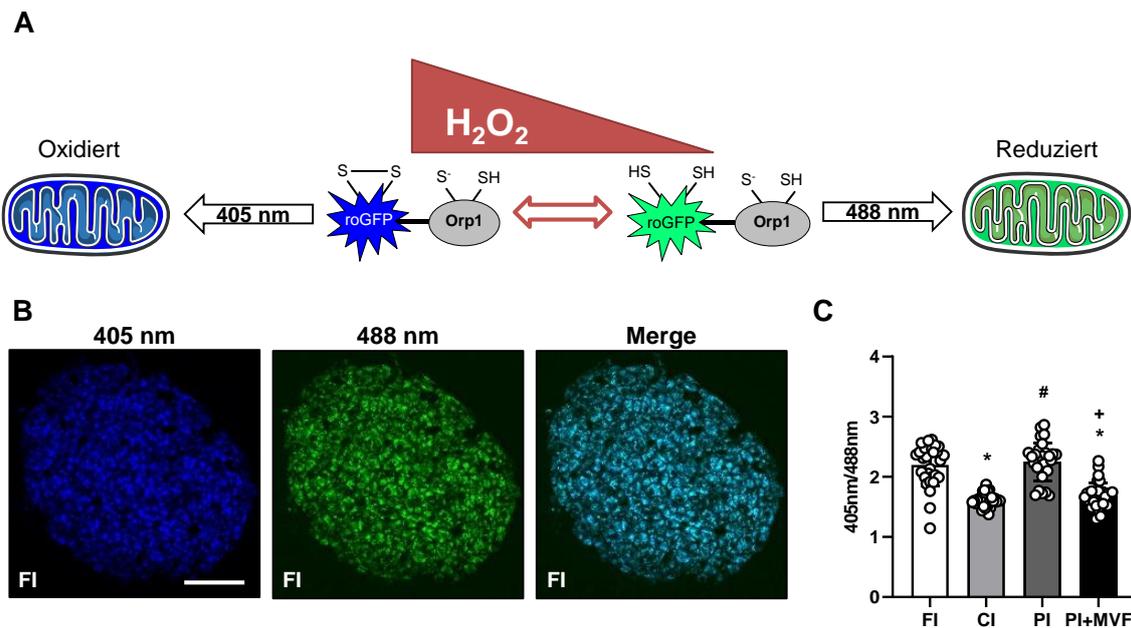


Abbildung 19: Mitochondriale H₂O₂-Level in FI, CI, PI und PI+MVF. (A) Schematische Darstellung des mitochondrialen H₂O₂-Sensors mito-roGFP2-Orp1. Dieser Sensor wird abhängig von der mitochondrialen H₂O₂-Konzentration oxidiert oder reduziert und ändert daraufhin sein Fluoreszenzmaximum von 488 nm (reduziert) auf 405 nm (oxidiert). (B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der FI von mito-roGFP2-Orp1-Spendermäusen bei 405 nm und 488 nm sowie der Überlagerung (merge) beider Kanäle. Maßstab: 50 µm. (C) Quantitative Analyse des mito-roGFP2-Orp1-Signalverhältnisses (405 nm/488 nm) innerhalb der Zellen der FI, CI, PI und PI+MVF (n = 25). MW ± SD. *P < 0,05 vs. FI; +P < 0,05 vs. PI; #P < 0,05 vs. CI.

Je nach Redox-Zustand bzw. ROS-Konzentration im Mitochondrium ändert roGFP2 seine Konformation. Daraufhin verschiebt sich dessen Fluoreszenz-Emission von 488 nm im reduzierten Zustand auf 405 nm im oxidierten Zustand (*Abbildung 19A und B*). Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass die mitochondrialen H_2O_2 -Level von FI und PI im Vergleich zu CI signifikant erhöht sind (*Abbildung 19C*). Interessanterweise führte die Inkorporation der MVF in den Inselorganoiden zu einer signifikanten Reduktion der erhöhten H_2O_2 -Level der PI.

Um den Effekt von ROS auf die Langerhans-Inseln und Inselorganoide näher zu untersuchen, wurde zusätzlich die Expression der Hämoxigenase (HO)-1 im Western Blot nachgewiesen (*Abbildung 20A*). Dieses Enzym spielt bei der Bildung von ROS eine zentrale Rolle. So konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden, dass HO-1 in β -Zellen als ROS-Fänger fungiert [Pileggi *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2010; Liu & Gao, 2019]. Die Quantifizierung des Western Blots zeigte eine durch die Inkorporation der MVF signifikant erhöhte Expression der HO-1 im Vergleich zu allen anderen Gruppen (*Abbildung 20B*). Folglich könnte die erhöhte Expression der HO-1 für die Reduktion der H_2O_2 -Level innerhalb der PI+MVF Gruppe verantwortlich sein.

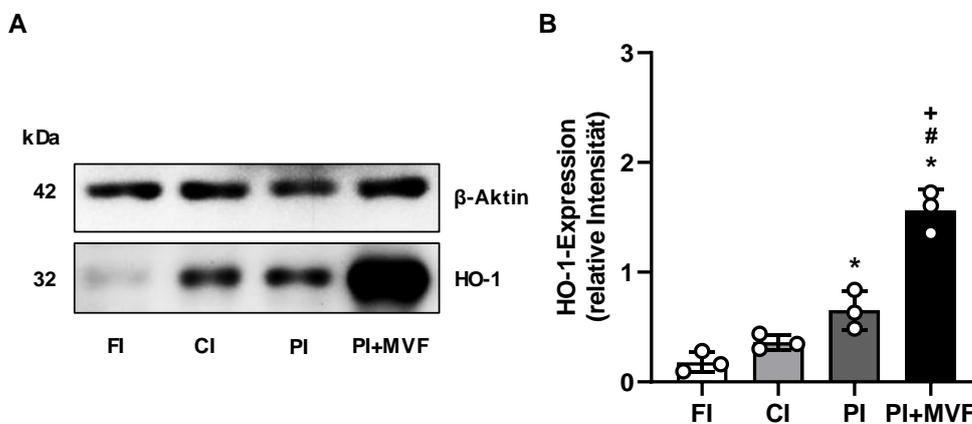


Abbildung 20: HO-1-Expression der FI, CI, PI und PI+MVF. (A) Zellextrakte der FI, CI, PI und PI+MVF wurden mittels Western Blot analysiert und die Expression der HO-1 (63 kDa) und von β -Aktin (36 kDa) unter Verwendung spezifischer Antikörper gemessen. (B) Quantitative Analyse der HO-1-Expression von (A) normiert auf β -Aktin. Die gewonnenen Daten sind als relative Intensitäten dargestellt ($n = 3$). MW \pm SD. * $P < 0,05$ vs. FI; * $P < 0,05$ vs. PI; # $P < 0,05$ vs. CI.

6.2.2 Endokrine Funktion der Langerhans-Inseln und Inselorganoide

Im Rahmen einer vorangegangenen Masterarbeit konnte bereits anhand immunhistochemischer Färbungen gezeigt werden, dass PI+MVF im Vergleich zu FI, CI und PI einen geringeren prozentualen Anteil an β -Zellen besitzen [Nalbach, 2017]. Aufbauend auf diesem Ergebnis wurde in der vorliegenden Arbeit nun die absolute Insulin-Expression sowie die Glukose-abhängige Insulin-Sekretion der FI, CI, PI und PI+MVF bestimmt. Hierbei zeigten die Ergebnisse der Western Blot-Analysen keine Unterschiede in der Insulin-Expression der FI, CI, PI und PI+MVF (*Abbildung 21A*). Auch die Analysen mittels ELISA wiesen keine

signifikanten Unterschiede in der Insulin-Sekretion zwischen den vier untersuchten Gruppen sowohl nach Exposition mit 1,1 mM als auch mit 16,5 mM Glukose auf (Abbildung 21B). Folglich beeinflusst die Inkorporation von MVF in Inselorganoide weder die Expression noch die Sekretion von Insulin.

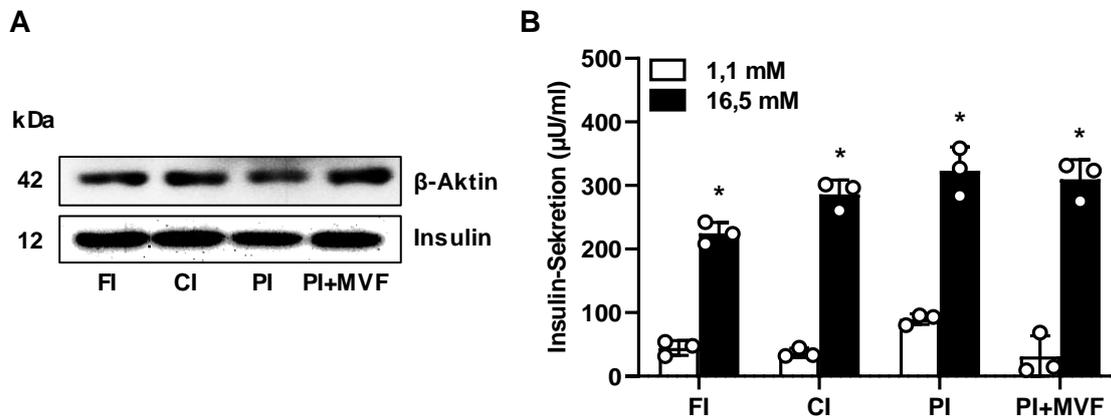


Abbildung 21: Insulin-Expression und -Sekretion der FI, CI, PI und PI+MVF. (A) Zellextrakte der FI, CI, PI und PI+MVF wurden mittels Western Blot analysiert. Insulin (12 kDa) und β -Aktin (36 kDa) wurden mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. (B) Auswertung des ELISAs zur quantitativen Analyse der Insulin-Sekretion von FI, CI, PI und PI+MVF nach Exposition mit 1,1 mM und 16,5 mM Glukose ($n = 3$). MW \pm SD. * $P < 0,05$ vs. Insulin-Sekretion bei 1,1 mM Glukose in den individuellen Gruppen.

6.2.3 VEGF-A-Expression der Langerhans-Inseln und Inselorganoide

VEGF-A ist ein essentieller Faktor für die Bildung und den Erhalt neuer Blutgefäße innerhalb von Langerhans-Inseln [Watada, 2010]. Im Rahmen der hier durchgeführten Analysen zur Expression von VEGF-A konnten durch quantitative RT-PCR-Analysen signifikant erhöhte mRNA-Level von VEGF-A in PI+MVF im Vergleich zu PI und FI nachgewiesen werden (Abbildung 22). Diese können eine fördernde Wirkung auf die Vaskularisierung der PI+MVF nach deren Transplantation haben.

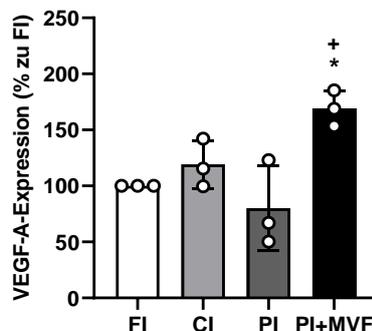


Abbildung 22: VEGF-A-Expression der FI, CI, PI und PI+MVF. Quantitative Analyse der VEGF-A-mRNA Expression in FI, CI, PI und PI+MVF durch qRT-PCR. Die erhobenen Daten wurden auf FI normiert ($n = 3$). MW \pm SD. * $P < 0,05$ vs. FI; + $P < 0,05$ vs. PI.

6.2.4 Einfluss von Insulin auf die Endothelzellen der MVF

Insulin bindet sowohl an den IR als auch an den *insulin-like growth factor receptor* (IGFR) und stimuliert dadurch die Proliferation von Endothelzellen [Straus, 1981; Shrader *et al.*, 2009]. Daher wurde in einem nächsten Schritt untersucht, inwieweit sich das sekretierte Insulin der β -Zellen stimulierend auf die Proliferation von Endothelzellen innerhalb der PI+MVF auswirkt. Um die proliferierenden Endothelzellen innerhalb der Inselorganoide darzustellen, wurden zunächst immunhistochemische Färbungen der PI+MVF mithilfe von CD31- und Ki67-Antikörpern durchgeführt (*Abbildung 23A*). Die quantitative Analyse dieser Färbung ergab, dass PI+MVF mit 67 % einen signifikant höheren Anteil proliferierender Endothelzellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen (FI, CI und PI) enthalten (*Abbildung 23B*).

Anschließend wurde untersucht, ob das von β -Zellen sekretierte Insulin für die gesteigerte Zahl proliferierender Endothelzellen innerhalb der PI+MVF verantwortlich ist. Dafür wurden PI+MVF für 5 Tage mit Linsitinib, einem spezifischen IR- und IGFR-Antagonist, inkubiert und die Zellproliferation anschließend mittels BrdU detektiert (*Abbildung 23C*). Interessanterweise führte die Linsitinib-Behandlung zu einer signifikanten Reduktion BrdU-positiver Zellen.

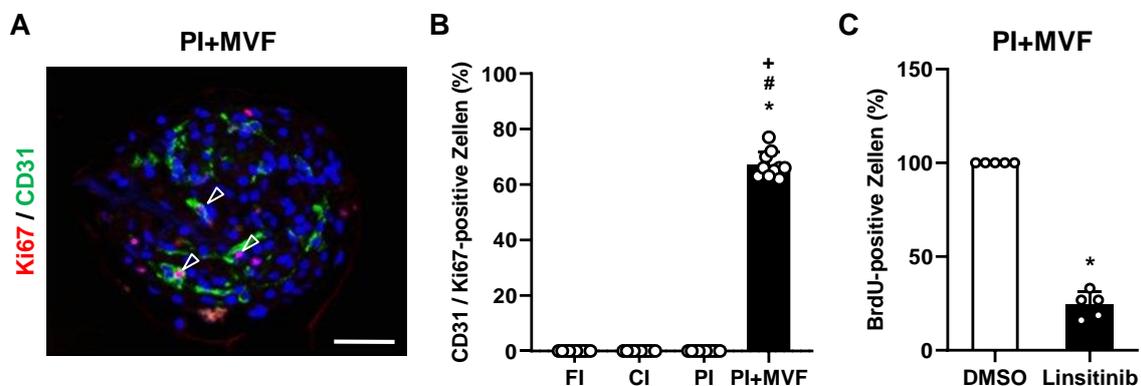


Abbildung 23: Einfluss von Insulin auf die Proliferation von Endothelzellen in PI+MVF. (A) Immunhistochemische Färbung einer PI+MVF. Ki67 und CD31 wurden mit den entsprechenden spezifischen Antikörpern detektiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 visualisiert. Die Pfeilspitzen markieren doppelt-positive Zellen. Maßstab: 70 μ m. (B) Quantitative Analyse der CD31/Ki67-positiven Zellen in FI, CI, PI und PI+MVF in % aller gezählten CD31-positiven Zellen (n = 10). MW \pm SD. *P < 0,05 vs. FI; #P < 0,05 vs. CI; *P < 0,05 vs. PI. (C) Quantitative Analyse BrdU-positiver Zellen in PI+MVF nach 5-tägiger DMSO- bzw. Linsitinib-Behandlung (n = 5). Die erhobenen Daten wurden auf DMSO normiert. MW \pm SD. *P < 0,05 vs. DMSO.

Um nachfolgend den zugrundeliegenden intrazellulären Signalweg der Insulin-induzierten Endothelzellproliferation näher zu untersuchen, wurden MVF über 3 h mit Insulin bzw. Vehikel behandelt und die Phosphorylierung der Kinasen Akt und ERK1/2 mittels Western Blot analysiert (*Abbildung 24A*). Hier zeigte sich, dass die Phosphorylierung beider Kinasen nach Insulin-Behandlung erhöht war (*Abbildung 24B und C*), was auf eine verstärkte Aktivierung dieser proliferativen Signalwege innerhalb der MVF hinweist.

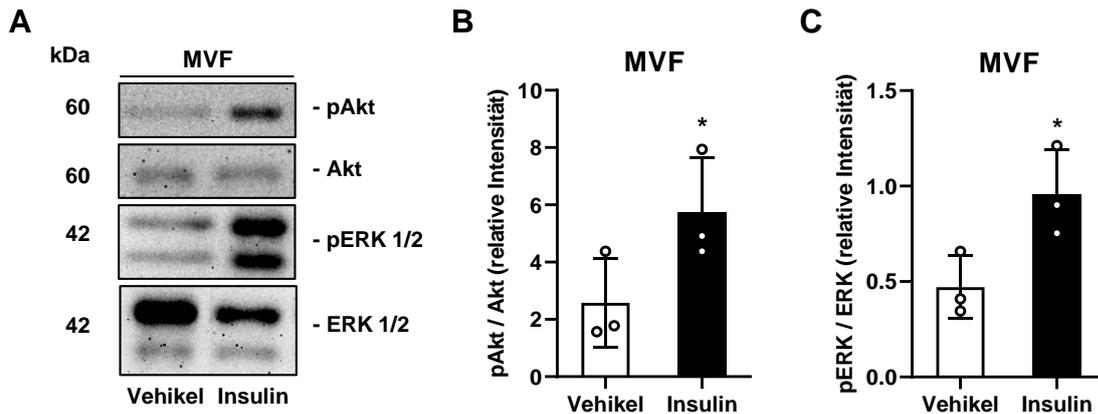


Abbildung 24: Einfluss von Insulin auf die Phosphorylierung von ERK1/2 und Akt in MVF. (A) MVF wurden über 3 h mit Insulin bzw. Vehikel behandelt und die Zellextrakte anschließend mittels Western Blot analysiert. Die Expression von pAkt (60 kDa), Akt (60 kDa), pERK1/2 (42 kDa) und ERK1/2 (42 kDa) wurde mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. (B und C) Quantitative Analyse der relativen Intensität von pAkt/Akt (B) und pERK1/2/ERK1/2 (C) der MVF. Die gewonnenen Daten sind als relative Intensitäten dargestellt (n = 3). MW ± SD. *P < 0,05 vs. Vehikel.

6.2.5 Glukose-abhängige angiogene Aktivität der PI+MVF

Die Proliferation von Endothelzellen ist ein essenzieller Schritt der Angiogenese [Form *et al.*, 1986]. Im Rahmen einer vorangegangenen Masterarbeit konnte bereits gezeigt werden, dass inkorporierte MVF die angiogene Aktivität von PI+MVF *in vitro* verbessern [Nalbach, 2017]. Zusätzlich konnte im Kapitel 4.2.4 gezeigt werden, dass sich Insulin positiv auf die Proliferation der Endothelzellen in MVF auswirkt. Daher wurde zusätzlich untersucht, ob eine erhöhte Glukose-Konzentration die angiogene Aktivität der PI+MVF verbessert.

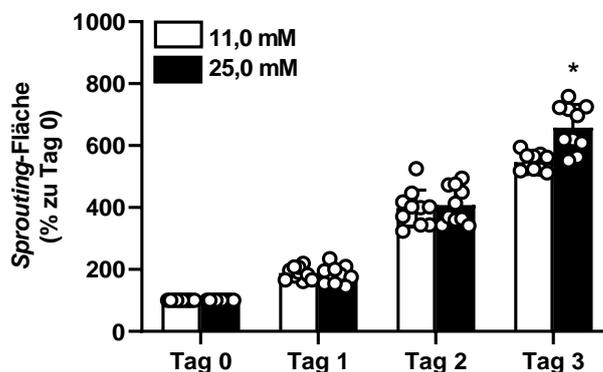


Abbildung 25: Sprouting-Analyse der PI+MVF in Abhängigkeit von Glukose. Quantitative Analyse der Sprouting-Fläche von PI+MVF bei 11 mM bzw. 25 mM Glukose normiert auf die Fläche an Tag 0 (n = 10). MW ± SD. *P < 0,05 vs. 11,0 mM Glukose.

Dafür wurden PI+MVF über 3 Tage mit 11 mM und 25 mM Glukose inkubiert und deren *Sprouting*-Verhalten untersucht. Die Quantifizierung der *Sprouting*-Flächen zeigte, dass PI+MVF bei einer Glukosekonzentration von 25 mM an Tag 3 eine signifikant größere

Sprouting-Fläche im Vergleich zu PI+MVF, die mit 11 mM Glukose kultiviert wurden, aufweisen (*Abbildung 25*).

6.2.6 Vaskularisierung transplantierter FI, CI, PI und PI+MVF

Die Vaskularisierung transplantierter FI, CI, PI und PI+MVF wurde im Rückenhautkammer-Modell untersucht. Hierfür wurden den Empfängertieren 2 Tage vor der Transplantation der Langerhans-Inseln bzw. Inselorganoide eine Rückenhautkammer implantiert. Am Tag 0 erfolgte die Transplantation der Langerhans-Inseln bzw. Inselorganoide (je 8 FI, CI, PI oder PI+MVF pro Tier) auf den quergestreiften Rückenhautmuskel. Mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurde anschließend der Prozess der Vaskularisierung an den Tagen 0, 3, 6, 10 und 14 untersucht. Abschließend wurde das Gewebe der Rückenhautkammer mit den Transplantaten für immunhistochemische Färbungen entnommen (*Abbildung 26*).

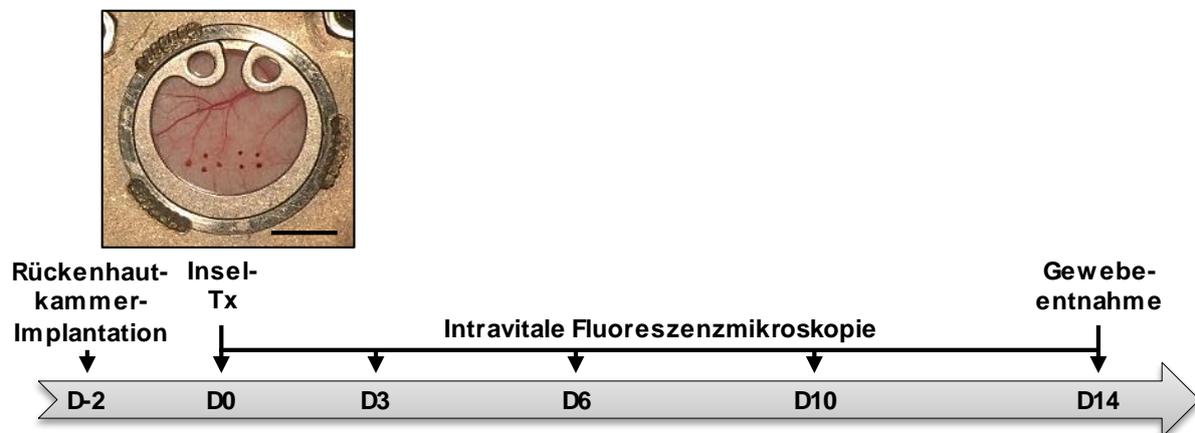


Abbildung 26: Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs der Analyse im Rückenhautkammer-Modell. Zwei Tage vor der Transplantation der Langerhans-Inseln bzw. Inselorganoide wurde den Empfängertieren eine Rückenhautkammer implantiert. An Tag 0 wurden pro Maus 8 Neutralrotgefärbte FI, CI, PI oder PI+MVF auf den quergestreiften Hautmuskel der Rückenhautkammer-Präparation transplantiert. Maßstab: 3 mm. An Tag 0 sowie an den Tagen 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation erfolgte eine intravitale Fluoreszenzmikroskopie der Langerhans-Inseln bzw. Inselorganoide. Abschließend wurde das Gewebe der Rückenhautkammer für histologische Analysen entnommen.

Durch die Injektion des Plasmamarkers FITC-Dextran konnte die Mikrozirkulation innerhalb der Rückenhautkammer und damit die Vaskularisierung der Langerhans-Inseln bzw. Inselorganoide innerhalb der Rückenhautkammern von Tag 0 bis 14 repetitiv analysiert werden (*Abbildung 27A*). Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass die funktionelle Gefäßdichte der PI+MVF im Vergleich zu allen Kontrollgruppen zu jedem gemessenen Zeitpunkt signifikant erhöht war (*Abbildung 27B*). FI wiesen im Vergleich zu CI und PI von Tag 6 bis Tag 14 eine signifikant höhere funktionelle Gefäßdichte auf. Des Weiteren zeigten PI+MVF eine deutlich größere vaskularisierte Inselfläche im Vergleich zu den CI und PI über den gesamten Beobachtungszeitraum (*Abbildung 27C*). An Tag 6 war die vaskularisierte

Fläche der PI+MVF auch gegenüber den FI signifikant erhöht. In der FI-Gruppe konnte eine erhöhte vaskularisierte Fläche im Vergleich zu den CI und PI an den Tagen 3 und 14 nachgewiesen werden (Abbildung 27C).

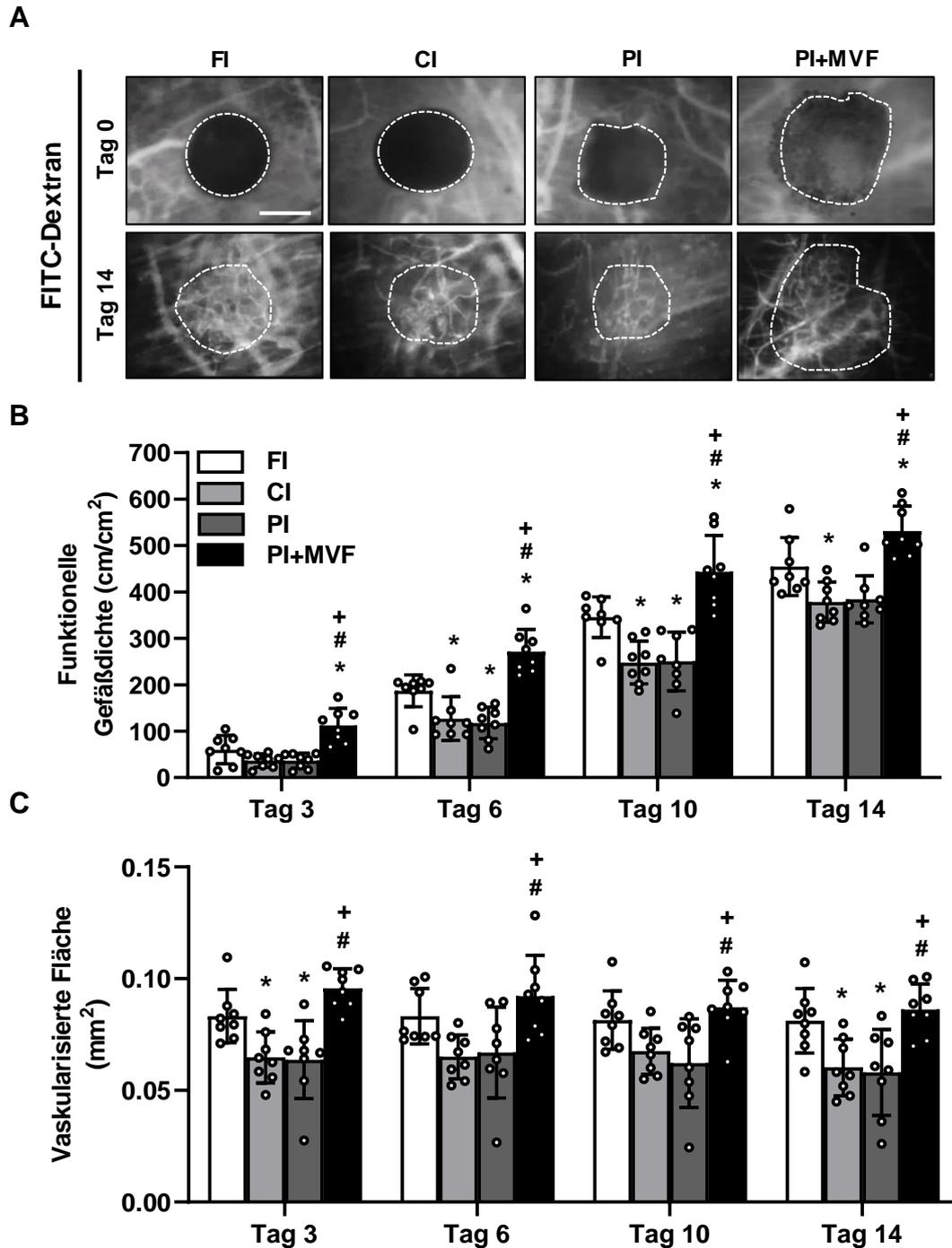


Abbildung 27: Analyse der Vaskularisierung transplantierter FI, CI, PI und PI+MVF im Rückenmarkskammer-Modell. (A) Intravitalmikroskopische Aufnahmen einer FI, CI, PI und PI+MVF an Tag 0 (umrandet mit gestrichelten Linien) sowie an Tag 14 nach Transplantation auf den quergestreiften Hautmuskel (die Blutgefäße sind durch die Injektion des Fluoreszenzfarbstoffs FITC-Dextran kontrastiert). Maßstab: 100 μ m. (B und C) Quantitative Analyse der funktionellen Gefäßdichte (cm/cm^2) (B) und vaskularisierten Fläche (mm^2) (C) der transplantierten FI, CI, PI und PI+MVF an den Tagen 3, 6, 10 und 14 ($n = 8$ Tiere pro Gruppe). MW \pm SD. * $P < 0,05$ vs. FI; # $P < 0,05$ vs. CI; + $P < 0,05$ vs. PI.

Die Anwachsrate der Langerhans-Inseln und Inselorganoide wurde an Tag 14 des Beobachtungszeitraums ermittelt und als prozentualer Anteil aller initial transplantierten Langerhans-Inseln bzw. Inselorganoide pro Tier dargestellt. Diese Untersuchung zeigte, dass PI+MVF eine tendenziell höhere Anwachsrate im Vergleich zu FI und CI und eine signifikant verbesserte Anwachsrate gegenüber PI 14 Tage nach der Transplantation aufweisen (Abbildung 28).

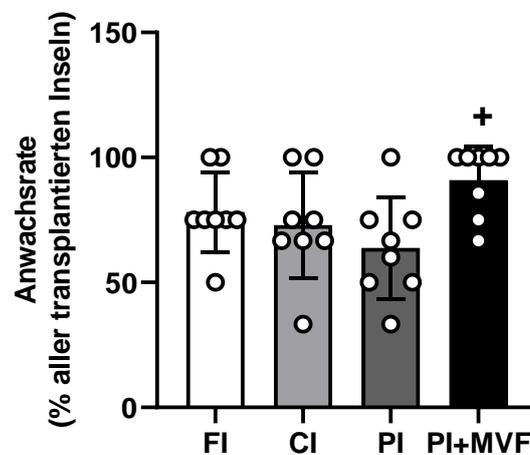


Abbildung 28: Anwachsrate der FI, CI, PI und PI+MVF an Tag 14 nach Transplantation. Die Anwachsrate der transplantierten FI, CI, PI und PI+MVF ist in % aller transplantierten Langerhans-Inseln bzw. Inselorganoide an Tag 14 nach Transplantation dargestellt ($n = 8$ Tiere pro Gruppe). $MW \pm SD$. $^+P < 0,05$ vs. PI.

Die Fenestrierung des Endothels innerhalb der Langerhans-Inseln und Inselorganoide wurde indirekt durch die i.v. Injektion des Fluoreszenzfarbstoffs Rhodamin 6G untersucht (Abbildung 29A). Dieser Farbstoff passiert aufgrund seines geringen Molekulargewichts poröse Gefäßwände und akkumuliert in den umliegenden Zellen, sodass die Rhodamin 6G-positive Fläche einen Rückschluss auf die Fenestrierung des jeweiligen Endothels geben kann und dadurch ein Marker für die endokrine Vaskularisierung darstellt [Vajkoczy *et al.*, 1995a]. Anhand der hier durchgeführten Analyse konnte gezeigt werden, dass die endokrine Vaskularisierung der PI+MVF über den gesamten Beobachtungszeitraum im Vergleich zu den anderen Transplantaten signifikant höher war, was auf eine verstärkte Fenestrierung des Endothels innerhalb der PI+MVF schließen lässt (Abbildung 29B). Zwischen den anderen Transplantaten konnten hingegen keine signifikanten Unterschiede der Rhodamin 6G-positiven Fläche ermittelt werden.

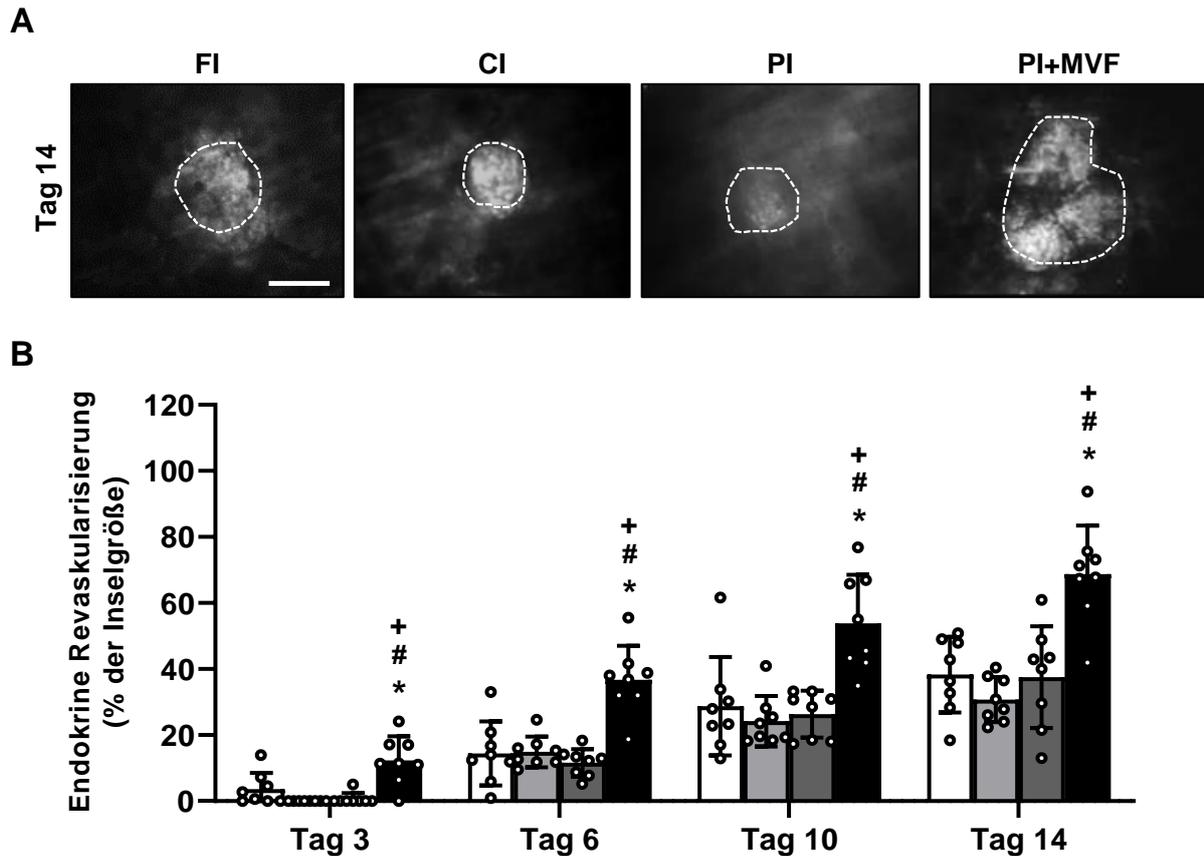


Abbildung 29: Fenestrierung der Gefäße in transplantierten FI, CI, PI und PI+MVF. (A) Intravitalmikroskopische Aufnahmen der FI, CI, PI und PI+MVF (umrandet mit gestrichelten Linien) an Tag 14 nach Transplantation. Die Fenestrierung des Endothels wurde indirekt mit dem Farbstoff Rhodamin 6G visualisiert. Maßstab: 70 μ m. (B) Quantitative Analyse der endokrinen Vaskularisierung (in % der jeweiligen Inselgröße) ($n = 8$ Tiere pro Gruppe). MW \pm SD. * $P < 0,05$ vs. FI; # $P < 0,05$ vs. CI; + $P < 0,05$ vs. PI.

Die Bestimmung mikrohämodynamischer Parameter der transplantierten Langerhans-Inseln und Inselorganoide zeigte signifikant größere Gefäßdurchmesser in PI+MVF im Vergleich zu FI, CI und PI an Tag 3 (Abbildung 30A). Zudem waren die Fließgeschwindigkeit und der Blutvolumenfluss innerhalb der Gefäße der PI+MVF an Tag 3 gegenüber den Kontrollen deutlich erhöht (Abbildung 30B und C). Innerhalb der darauffolgenden Tage glichen sich der Gefäßdurchmesser, die Fließgeschwindigkeit und der Blutvolumenfluss zwischen den Gruppen wieder an (Abbildung 30A-C). Lediglich PI+MVF wiesen an Tag 14 einen verringerten Gefäßdurchmesser im Vergleich zu CI auf (Abbildung 30A). Der Blutvolumenfluss der PI+MVF war gegenüber der FI-Gruppe an Tag 14 erhöht (Abbildung 30C).

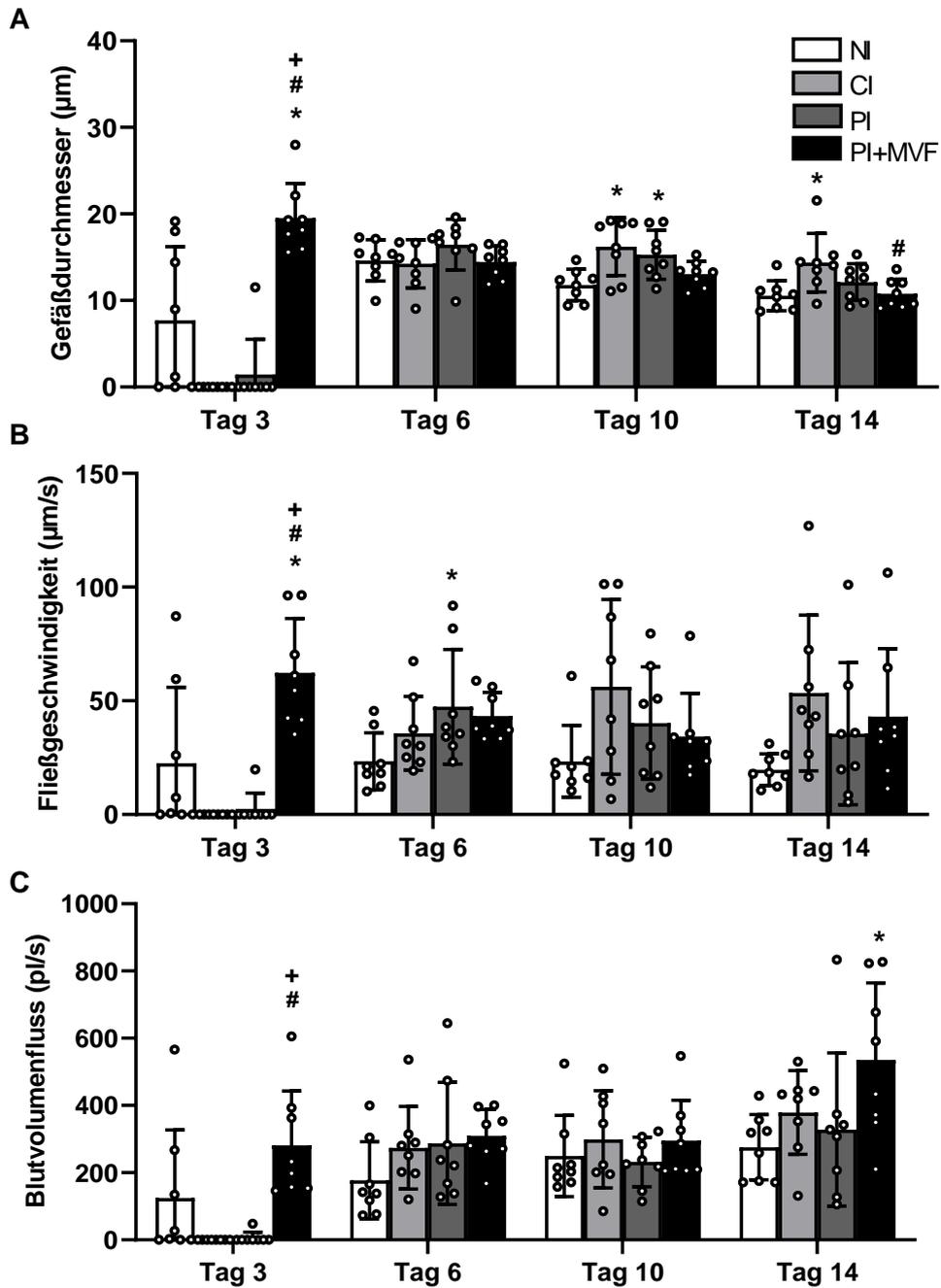


Abbildung 30: Mikrohämodynamische Parameter der transplantierten FI, CI, PI und PI+MVF. Quantitative Analyse des Gefäßdurchmessers (μm) (**A**), der Fließgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$) (**B**) und des Blutvolumenflusses (p/s) (**C**) der Gefäße innerhalb der FI, CI, PI und PI+MVF an den Tagen 3, 6, 10 und 14 nach Transplantation auf den quergestreiften Hautmuskel ($n = 8$ Tiere pro Gruppe). $MW \pm SD$. * $P < 0,05$ vs. FI; # $P < 0,05$ vs. CI; + $P < 0,05$ vs. PI.

Nach Abschluss der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie an Tag 14 wurde das Rückenhaut-Gewebe entnommen und die zelluläre Zusammensetzung der FI, CI, PI und PI+MVF immunhistochemisch analysiert. Dabei wurden Insulin, Glukagon, Somatostatin und CD31 mit spezifischen Antikörpern detektiert (*Abbildung 31A*). Die quantitative Auswertung der Insulin-, Glukagon- und Somatostatin-positiven Zellen zeigte keine Unterschiede zwischen den analysierten Gruppen (*Abbildung 31B-D*). Alle Gruppen wiesen ~65 % Insulin-positive β -

Zellen, ~20 % Glukagon-positive α -Zellen und ~10 % Somatostatin-positive δ -Zellen auf. Allerdings konnte innerhalb der PI+MVF im Vergleich zu den FI, CI und PI ein signifikant erhöhter Anteil CD31-positiver Endothelzellen nachgewiesen werden (Abbildung 31E).

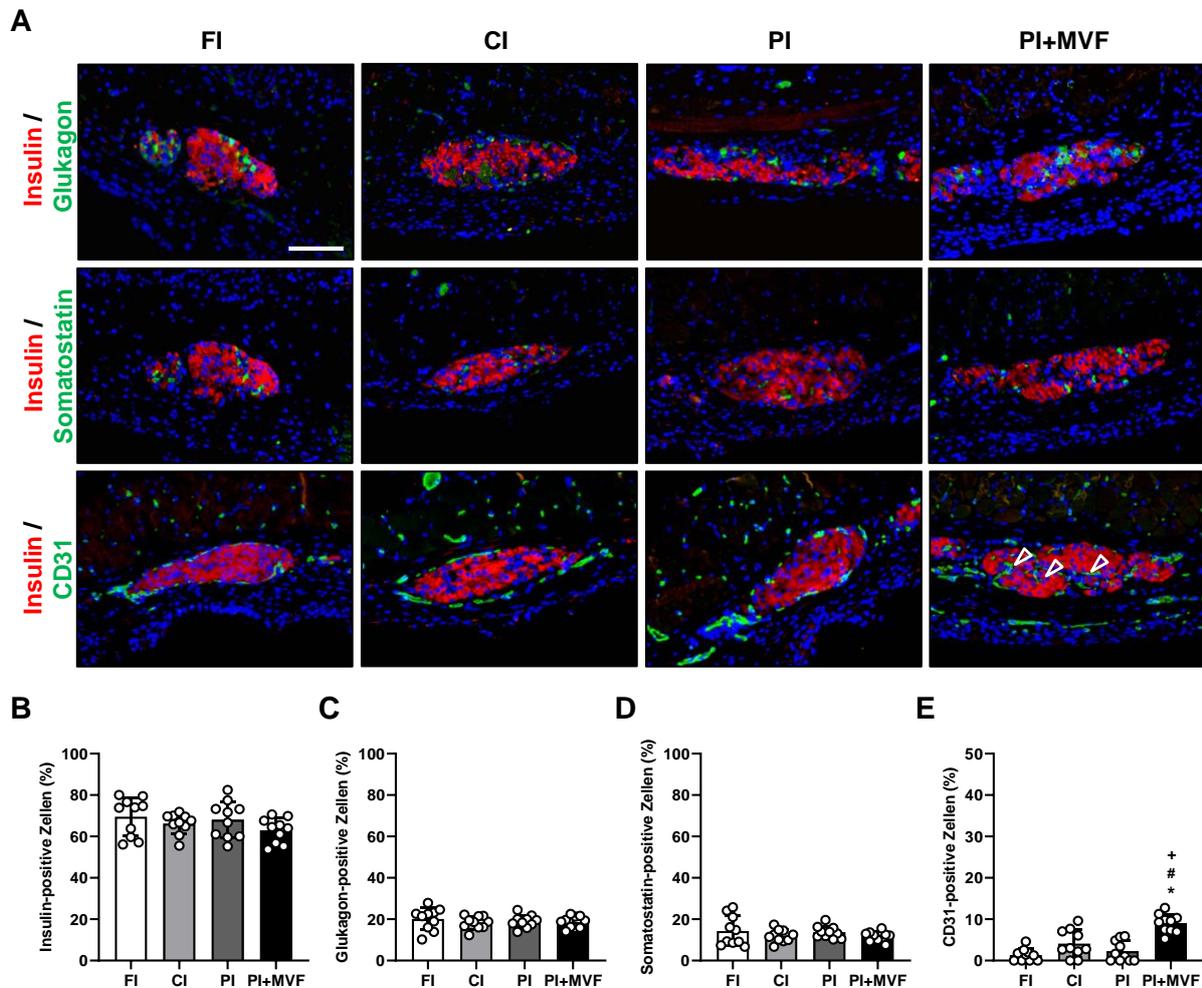


Abbildung 31: Zelluläre Zusammensetzung der FI, CI, PI und PI+MVF nach Transplantation. (A) 14 Tage nach Transplantation auf den quergestreiften Hautmuskel wurde das Gewebe der Rückenhautkammern entnommen und immunhistochemisch untersucht. Insulin, Glukagon, Somatostatin und CD31 wurden mit den entsprechenden spezifischen Antikörpern detektiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 visualisiert. Maßstab: 70 μ m. (B-E) Quantitative Analyse von Insulin- (B), Glukagon- (C), Somatostatin- (D) und CD31-positiven Zellen (E) (in % aller Inselzellen) ($n=10$). MW \pm SD. * $P < 0,05$ vs. FI; # $P < 0,05$ vs. CI; + $P < 0,05$ vs. PI.

6.2.7 Endokrine Aktivität der Langerhans-Inseln und Inselorganoiden

Die vorherigen Experimente zeigten sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, dass PI+MVF eine hohe angiogene Aktivität und Vaskularisierungskapazität besitzen. Daher wurde im nächsten Schritt untersucht, ob durch Transplantation von PI+MVF auch die Wiederherstellung eines physiologischen Blutglukosespiegels in diabetischen Tieren beschleunigt werden kann. Ein gut etabliertes Modell zur Analyse der endokrinen Funktion transplanteder Langerhans-Inseln

ist das STZ-induzierte diabetische Mausmodell. Das Glukoseanalogon STZ gelangt dabei über GLUT2 in die β -Zellen des Pankreas der Tiere, alkyliert die DNA und induziert dadurch Apoptose (Abbildung 32A). Acht Tage nach STZ-Injektion sind die Langerhans-Inseln weitestgehend zerstört, sodass sich ein T1D-ähnlicher Zustand der Tiere manifestiert [Furman, 2015]. Anschließend kann die Transplantation der Langerhans-Inseln unter die Nierenkapsel erfolgen.

Im vorliegenden Studienabschnitt erhielten gesunde C57BL/6N Wildtyp-Mäuse eine einmalige i.p. Injektion von STZ. Bei einem Blutzuckerspiegel zwischen 400 und 500 mg/dl wurden den Tieren an Tag 0 Langerhans-Inseln bzw. Inselorganoide transplantiert und anschließend repetitiv der Blutzuckerspiegel und das Körpergewicht der Tiere zweimal pro Woche bestimmt (Abbildung 32B).

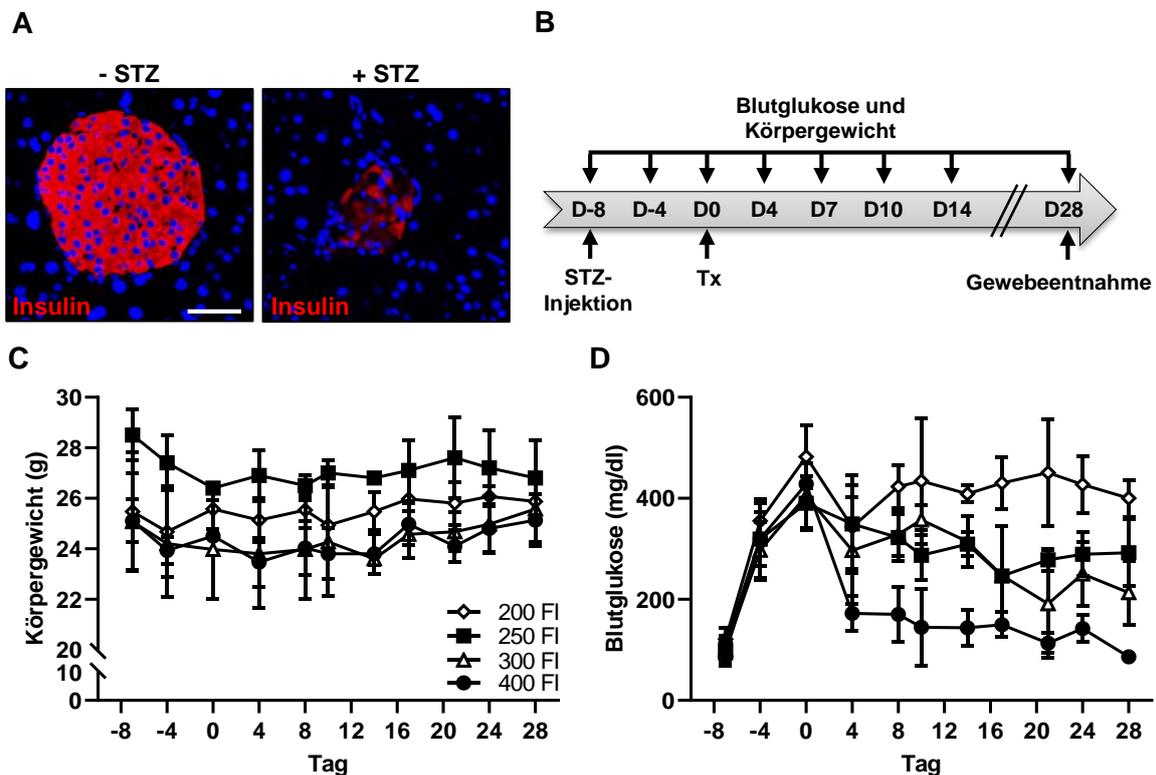


Abbildung 32: Bestimmung der kritischen Langerhans-Insel-Masse unter Verwendung des STZ-induzierten, diabetischen Mausmodells. (A) Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen einer Langerhans-Insel innerhalb des murinen Pankreas ohne und nach 8 Tagen der STZ-Behandlung (180 mg/kg Körpergewicht). Insulin-positive Zellen wurden mit spezifischen Insulin-Antikörpern detektiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 visualisiert. Maßstab: 70 μ m. (B) Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs des diabetischen Mausmodells. Körpergewicht und Blutzuckerspiegel wurden 2-mal wöchentlich von Tag -8 bis Tag 28 bestimmt. Acht Tage nach der i.p. STZ-injektion wurden die Langerhans-Inseln unter die Nierenkapsel transplantiert. An Tag 28 wurde das Nierengewebe mit den transplantierten Inseln für anschließende immunhistochemische Färbungen entnommen. (C und D) Körpergewicht (g) (C) und Blutzuckerspiegel (mg/dl) (D) von Mäusen, welchen 200, 250, 300 und 400 FI transplantiert wurden ($n = 3$). MW \pm SD.

In einem ersten Schritt wurde zunächst die kritische Insel-Masse, die trotz Transplantation nicht zur Wiederherstellung einer Normoglykämie (80-250 mg/dl Blutzuckerspiegel) innerhalb der ersten 28 Tage führt, anhand der Transplantation unterschiedlicher Anzahlen von FI bestimmt.

Dafür wurden den diabetischen Empfängertieren 200, 250, 300 bzw. 400 FI transplantiert und das Körpergewicht sowie der Blutglukosespiegel der Tiere über insgesamt 36 Tage an den angegebenen Zeitpunkten gemessen (*Abbildung 32C und D*). Die Transplantation von 400 FI führte innerhalb von 4 Tagen zur Normoglykämie, während 300 FI eine vergleichbare Senkung des Blutglukosespiegels erst nach ~20 Tagen erzielten (*Abbildung 32D*). Demgegenüber konnte durch die Transplantation von 200 und 250 FI kein physiologischer Blutglukosespiegel innerhalb des 28-tägigen Beobachtungszeitraums erreicht werden.

Basierend auf diesen Daten wurden im folgenden Versuchsaufbau 250 PI+MVF bzw. 250 FI transplantiert, um einen möglichen positiven Effekt der transplantierten PI+MVF auf den Blutglukosespiegel diabetischer Tiere im Vergleich zu Kontrollen detektieren zu können. FI dienten in diesem Fall als Kontrollgruppe, da diese, verglichen mit den anderen beiden Gruppen (CI und PI), die höchste Vaskularisierungskapazität im Rückenhautkammer-Modell aufwiesen (siehe Abschnitt 6.2.6). Zudem wurden gesunde Tiere, die keine STZ-Injektion und Inseltransplantation erhielten, als zusätzliche Kontrollen mitgeführt. Die Transplantation von 250 PI+MVF zeigte im Vergleich zu 250 transplantierten FI und zu gesunden Tieren keine signifikante Auswirkung auf das Körpergewicht der Tiere (*Abbildung 33A*). Entsprechend wies auch die Fläche unter der Kurve (AUC) der Körpergewichte über den gesamten Beobachtungszeitraum keine wesentlichen Unterschiede auf (*Abbildung 33B*). Im Gegensatz dazu zeigten die Messungen der Blutglukosespiegel, dass bereits an Tag 4 nach Transplantation der Blutglukosespiegel in der PI+MVF-Gruppe ($203,5 \pm 80,2$ mg/dl) im Vergleich zu den Tieren der FI-Gruppe, welche zu diesem Zeitpunkt noch einen Blutglukosespiegel von $360,3 \pm 70,3$ mg/dl aufwiesen, signifikant reduziert war (*Abbildung 33C*). Eine Normoglykämie der FI-transplantierten Tiere stellte sich über den gesamten Beobachtungszeitraum nicht ein. Auch 28 Tage nach Transplantation konnte in der FI-Gruppe lediglich eine Reduktion des Blutglukosespiegels auf $340,2 \pm 73,5$ mg/dl detektiert werden. Die Tiere aus der PI+MVF-Gruppe wiesen ab Tag 7 nach Transplantation bis zum Ende des Beobachtungszeitraums einen physiologischen Blutglukosespiegel auf, der sich nicht signifikant von dem der gesunden Kontrollgruppe unterschied. Dementsprechend war die AUC der Blutglukosespiegel von der PI+MVF-Gruppe und gesunden Tieren im Vergleich zu der FI-Gruppe signifikant reduziert, während keine signifikanten Unterschiede zwischen der gesunden Kontrollgruppe und der PI+MVF-Gruppe nachgewiesen werden konnten (*Abbildung 33D*).

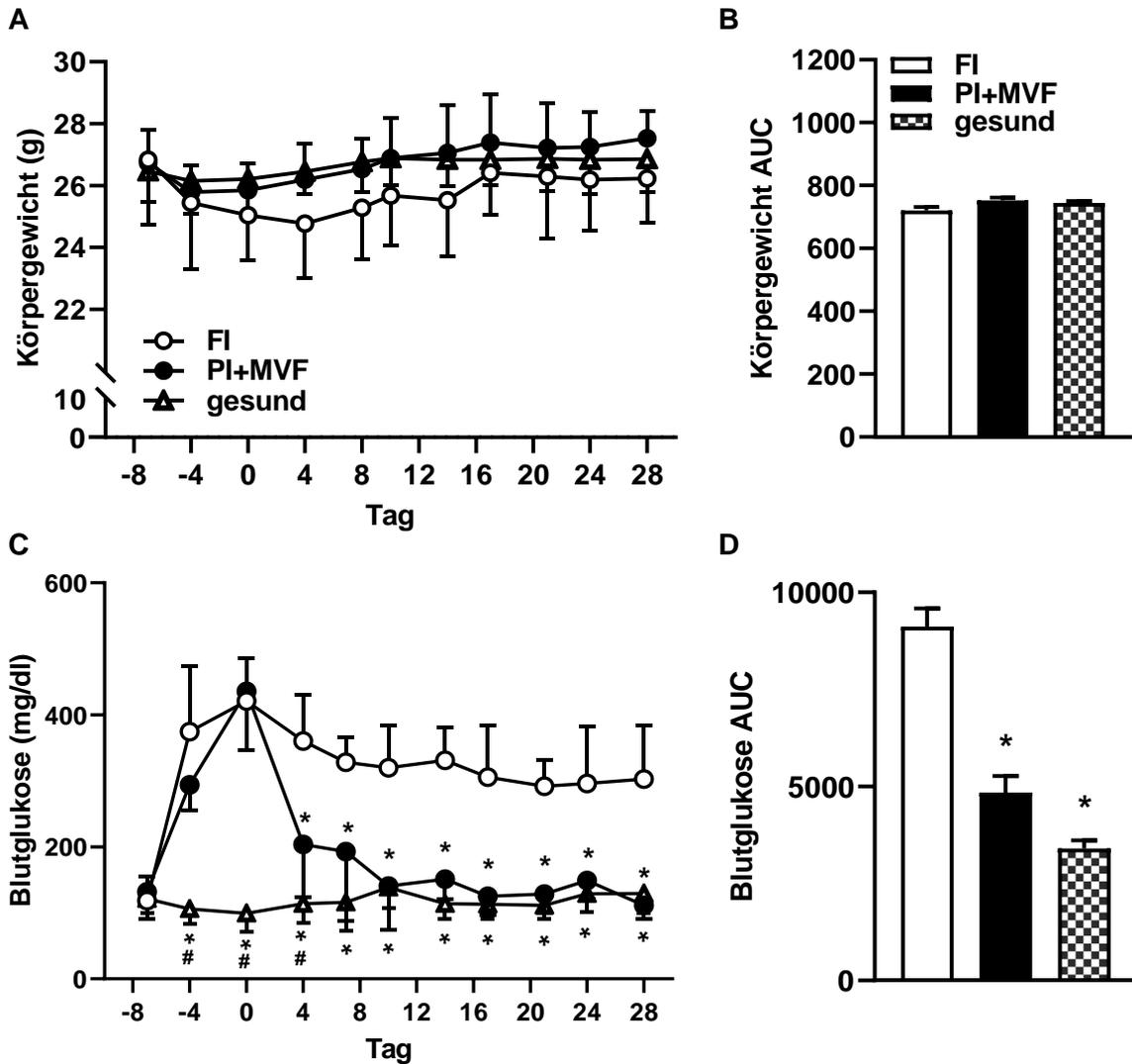


Abbildung 33: Endokrine Funktion der FI und PI+MVF im STZ-induzierten, diabetischen Mausmodell. (A und B) Körpergewicht (g) (A) und entsprechende AUC (B) von gesunden und STZ-behandelten Tieren, welchen 250 FI bzw. 250 PI+MVF transplantiert wurden ($n = 7$ Tiere pro Gruppe). MW \pm SD. (C und D) Blutglukose (mg/dl) (C) und entsprechende AUC (D) von gesunden und STZ-behandelten Tieren, denen 250 FI bzw. 250 PI+MVF transplantiert wurden ($n = 7$ Tiere pro Gruppe). MW \pm SD. * $P < 0,05$ vs. FI; # $P < 0,05$ vs. PI+MVF.

28 Tage nach Transplantation der FI und PI+MVF wurden die Nieren der Empfängertiere entnommen und die zelluläre Zusammensetzung der Transplantate immunhistochemisch untersucht (Abbildung 34A). Hierbei wurden die Fraktionen der Insulin-positiven β -Zellen, Glukagon-positiven α -Zellen, Somatostatin-positiven δ -Zellen und CD31-positiven Endothelzellen quantifiziert und in Prozent aller analysierten Inselzellen angegeben (Abbildung 34B). Diese Analyse zeigte keine Unterschiede in der zellulären Zusammensetzung zwischen der FI- und PI+MVF-Gruppe. Jedoch war die Gesamtzahl an Inselzellen in der PI+MVF-Gruppe im Vergleich zu der FI-Gruppe signifikant erhöht (Abbildung 34C).

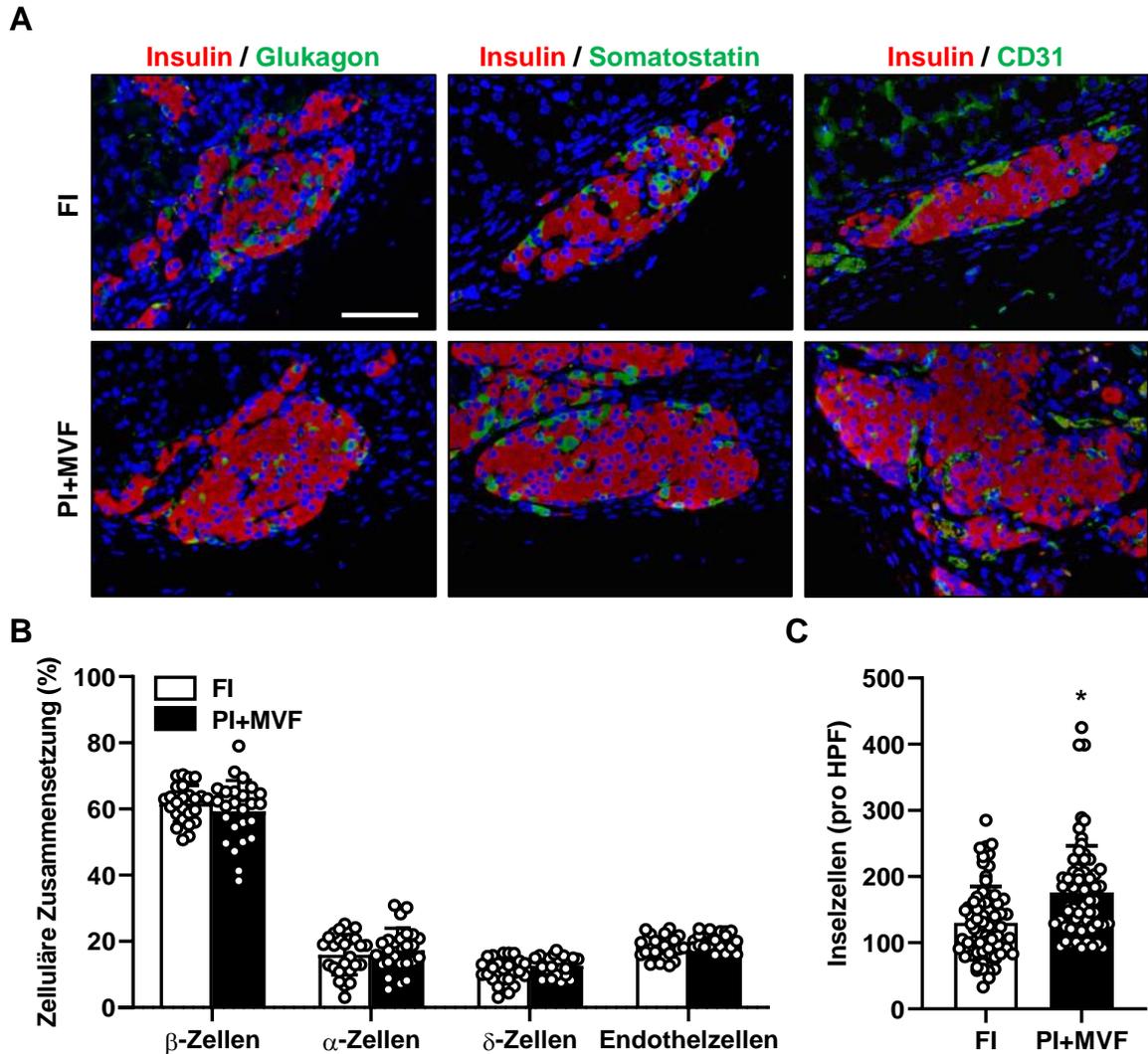


Abbildung 34: Zelluläre Zusammensetzung der FI und PI+MVF an Tag 28 nach Transplantation unter die Nierenkapsel. (A) 28 Tage nach Transplantation unter die Nierenkapsel diabetischer Tiere wurden die Nieren der transplantierten Tiere entnommen und immunhistochemisch untersucht. Insulin, Glukagon, Somatostatin und CD31 wurden mit den entsprechenden spezifischen Antikörpern detektiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 visualisiert. Maßstab: 50 μ m. (B) Quantitative Analyse von (A). Die Fraktionen der α -, β -, δ - und Endothelzellen der FI und PI+MVF sind in % aller Inselzellen dargestellt (n = 25 FI bzw. PI+MVF von n = 7 Tieren pro Gruppe). MW \pm SD. (C) Quantitative Analyse der Inselzellzahl pro high power field (HPF) in der FI- und PI+MVF-Gruppe nach Transplantation unter die Nierenkapsel (n = 70 HPF von n = 7 Tieren pro Gruppe). MW \pm SD. *P < 0,05 vs. FI.

6.2.8 Fusion muriner MVF mit humanen, primären Inselzellen

Im Rahmen dieses Studienabschnitts konnte bisher gezeigt werden, dass inkorporierte MVF die Vaskularisierung von Inselorganoiden beschleunigen, ohne deren endokrine Funktion zu beeinträchtigen. Im folgenden Abschnitt wurde daher ein erster translationaler Schritt unternommen und murine MVF in humane Inselorganoiden inkorporiert.

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Langerhans-Inseln wurden am ADI der Universität von Alberta, Kanada, isoliert, kultiviert und anschließend an das Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie in Homburg versandt (Abbildung 35A) [Lyon *et al.*, 2016]. Die

Kultivierungsdauer nach Isolierung der Langerhans-Inseln betrug zwischen 16 und 35 h. Die anschließende Lieferung nach Deutschland nahm 3 bis 5 Tage in Anspruch. Nach Ankunft am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie wurden die Langerhans-Inseln direkt für Versuche eingesetzt oder dissoziiert und innerhalb von 5 Tagen zu PI bzw. PI+MVF reaggregiert. Sowohl PI aus humanen Langerhans-Inselzellen (hPI) als auch PI+MVF aus humanen Langerhans-Inselzellen und murinen MVF (hPI+MVF) bildeten kompakte und kugelförmige Inselorganoide aus (*Abbildung 35B*). Diese ähnelten in ihrer Struktur frischen, humanen Langerhans-Inseln (hFI) und kultivierten, humanen Langerhans-Inseln (hCI) und waren auch in ihrer Größe mit murinen PI und PI+MVF vergleichbar [Nalbach, 2017].

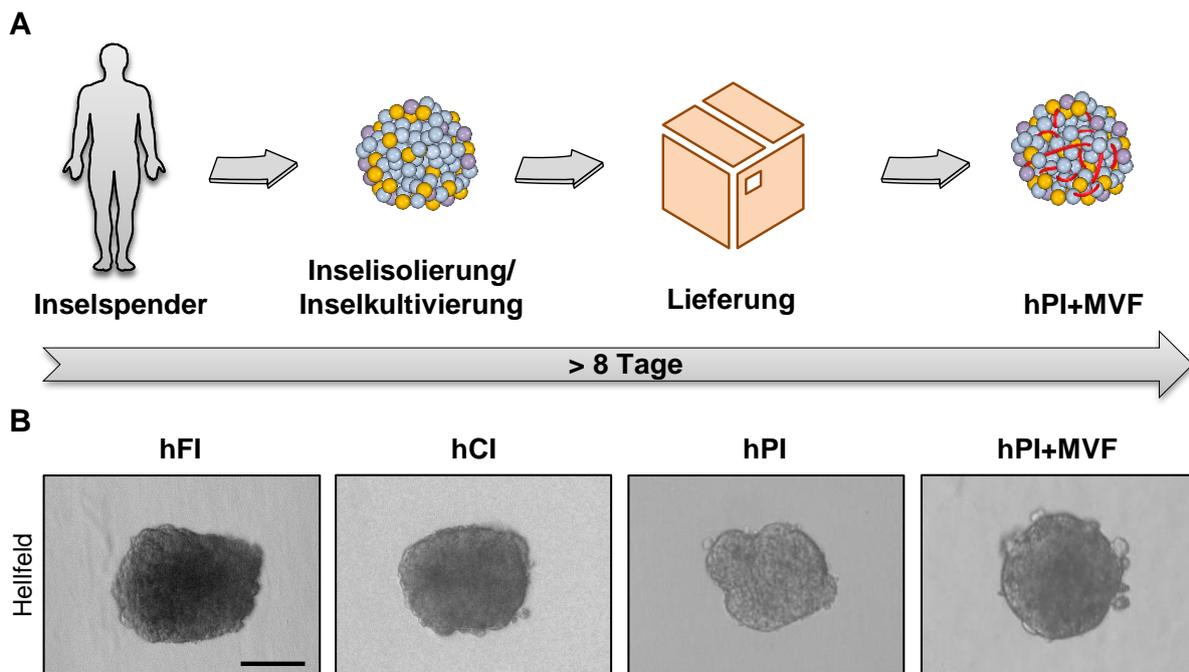


Abbildung 35: Generierung von hPI+MVF aus humanen Langerhans-Inseln und murinen MVF. (A) Schematische Darstellung der zeitlichen Abfolge von der Isolierung humaner Langerhans-Inseln bis hin zu hPI+MVF. Die Langerhans-Inseln wurden an der Universität von Alberta, Kanada, von humanen Todspendern isoliert und zwischen 16 und 35 h kultiviert, bevor sie innerhalb von 3 Tagen nach Deutschland versandt wurden. Vor Ort wurden die Langerhans-Inseln dissoziiert und innerhalb von 5 Tagen zu hPI bzw. hPI+MVF reaggregiert. Insgesamt nahm der gesamte Prozess von der Inselisolierung bis zur Fertigstellung der hCI, hPI bzw. hPI+MVF mehr als 8 Tage in Anspruch. (B) Repräsentative hellfeldmikroskopische Aufnahmen einer hFI unmittelbar nach Lieferung sowie einer hCI, hPI und hPI+MVF 5 Tage nach Kultivierung mithilfe der Liquid Overlay-Technik. Maßstab: 90 μ m.

Die Analyse der zellulären Zusammensetzung der hFI, hCI, hPI und hPI+MVF erfolgte mittels Immunhistochemie (*Abbildung 36*). In Übereinstimmung mit den zuvor erhobenen Daten im murinen Modell konnte auch hier eine signifikant erhöhte Anzahl CD31-positiver Zellen innerhalb der hPI+MVF-Gruppe nachgewiesen werden (*Abbildung 36E*). Die relative Anzahl Glukagon- und Somatostatin-positiver Zellen war hingegen im Vergleich zu hFI und hCI signifikant geringer. hPI wiesen einen signifikant höheren Anteil Insulin-positiver β -Zellen im

Vergleich zu hFI, hCI und hPI+MVF auf. Die Fraktion Glukagon- und Somatostatin-positiver Zellen der hPI war im Vergleich zu hFI und hCI signifikant geringer.

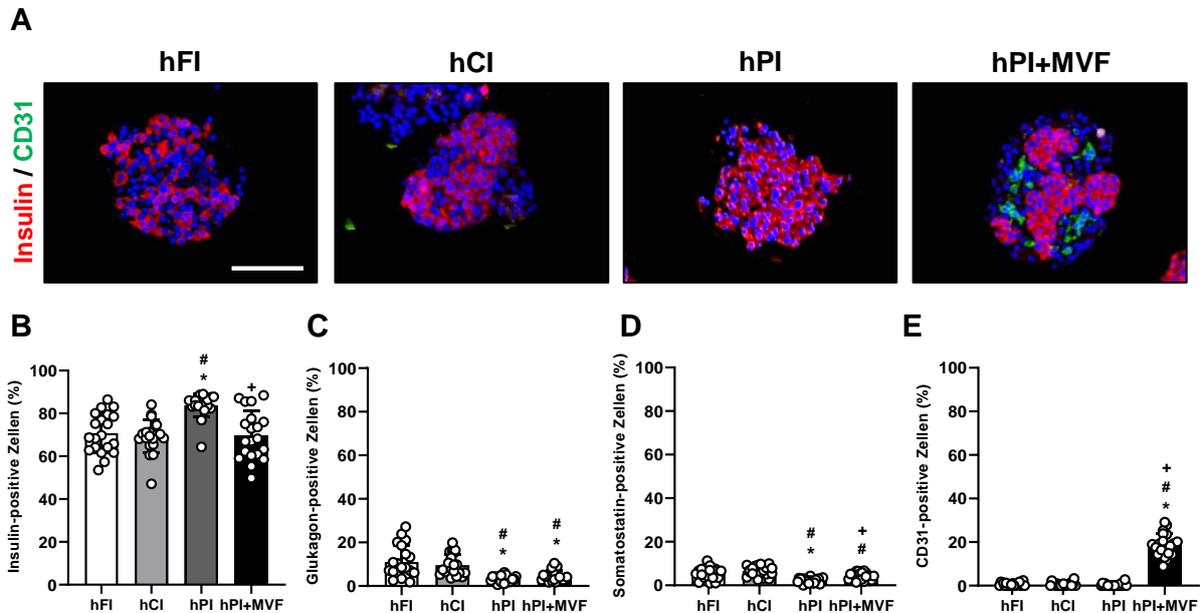


Abbildung 36: Zelluläre Zusammensetzung der hFI, hCI, hPI und hPI+MVF. (A) Immunhistochemische Färbung der hFI, hCI, hPI und hPI+MVF. Insulin und CD31 wurden mit den entsprechenden spezifischen Antikörpern detektiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 visualisiert. Maßstab: 150 μ m. (B-E) Quantitative Analyse von Insulin- (B), Glukagon- (C), Somatostatin- (D) und CD31-positiven Zellen (E) (in % aller Inselzellen) ($n = 20$). MW \pm SD. * $P < 0,05$ vs. hFI; # $P < 0,05$ vs. hCI; + $P < 0,05$ vs. hPI.

Abschließend wurden die hFI, hCI, hPI und hPI+MVF hinsichtlich ihrer angiogenen und endokrinen Aktivität *in vitro* analysiert. Die *Sprouting*-Analysen zeigten, dass hPI+MVF über den Beobachtungszeitraum von 3 Tagen eine signifikant erhöhte *Sprouting*-Kapazität im Vergleich zu allen Kontrollgruppen aufwies (Abbildung 37A und B). Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen der murinen Inselorganoide überein [Nalbach, 2017].

Die Analysen der C-Peptidsekretion ließen darauf schließen, dass die Inkorporation der murinen MVF keinen negativen Einfluss auf die endokrine Funktion der hPI+MVF in Vergleich zu hFI hat. Sowohl in Gegenwart einer niedrigen (1,1 mM) also auch einer hohen (16,5 mM) Glukose-Konzentration lagen keine signifikanten Unterschiede in der C-Peptidsekretion zwischen hPI+MVF und der hFI-Gruppe vor (Abbildung 37C). Auch diese Daten entsprechen den Analysen der Insulin-Sekretion von murinen PI+MVF (siehe Abschnitt 6.2.2).

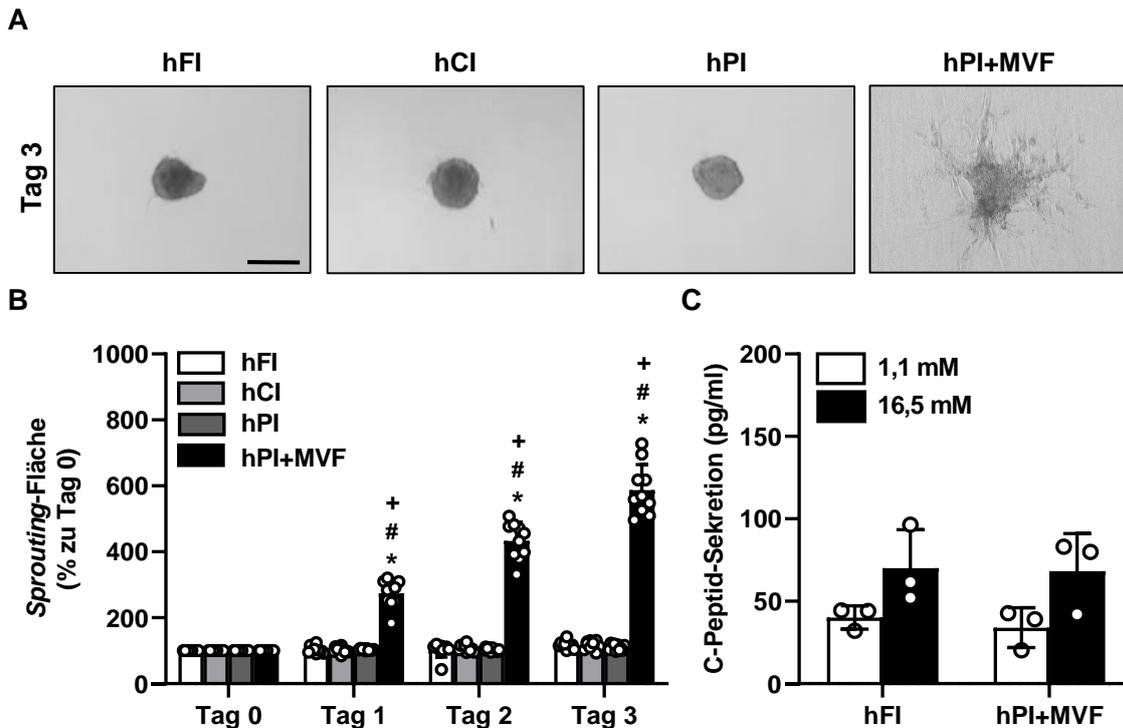


Abbildung 37: Angiogene und endokrine Aktivität der hFI, hCI, hPI und hPI+MVF. (A) Repräsentative hellfeldmikroskopische Aufnahmen der hFI, hCI, hPI und hPI+MVF im Sprouting-Assay nach 3 Tagen. Maßstab: 200 μm . (B) Quantitative Analyse der Sprouting-Fläche von hFI, hCI, hPI und hPI+MVF in % auf die jeweilige Fläche an Tag 0 ($n = 10$). $MW \pm SD$. * $P < 0,05$ vs. hFI; # $P < 0,05$ vs. hCI; + $P < 0,05$ vs. hPI. (C) C-Peptid-Sekretion (pg/ml) der hFI und hPI+MVF nach Inkubation mit 1,1 mM und 16,5 mM Glukose für 45 min ($n = 3$). $MW \pm SD$.

6.2.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die im zweiten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass sich die Inkorporation von MVF in Inselorganoide positiv auf die Viabilität und mitochondriale H_2O_2 -Konzentration der Inselzellen auswirkt. Das von den β -Zellen sekretierte Insulin hat außerdem einen positiven Effekt auf die Proliferation der Endothelzellen innerhalb der MVF. Unter Verwendung des murinen Rückenhautkammer-Modells konnte eine deutliche Verbesserung der Vaskularisierung transplanteder Inselorganoide durch die Inkorporation der MVF nachgewiesen werden. Zudem führte die Transplantation von PI+MVF in diabetische Mäuse innerhalb von 7 Tagen zur Normoglykämie, wohingegen die Kontrollgruppe (FI) über den gesamten Beobachtungszeitraum keine Senkung des Blutglukosespiegels auf ein physiologisches Level erzielte. Abschließend konnte gezeigt werden, dass sich dieser Prävaskularisierungs-Ansatz auch auf humane Langerhans-Inseln übertragen lässt. So konnten murine MVF auch in humane Inselorganoide inkorporiert werden, wodurch sich deren angiogene Aktivität *in vitro* signifikant verbesserte.

7. Diskussion

Die Transplantation von Langerhans-Inseln wird seit der Etablierung des Edmonton-Protokolls im Jahr 2000 [Shapiro *et al.*, 2000] als eine vielversprechende Strategie zur Behandlung von T1D beschrieben [Pepper *et al.*, 2018]. Für eine erfolgreiche klinische Anwendung dieses Ansatzes stellt jedoch die unzureichende Revaskularisierung der Transplantate nach wie vor eine große Herausforderung dar [Shapiro *et al.*, 2001]. Um dieses Problem zu lösen, wurden bereits in verschiedenen Studien unterschiedlichste Strategien, wie die Applikation von pharmakologischen Substanzen [Menger *et al.*, 2020a] und Wachstumsfaktoren [Cheng *et al.*, 2004; Golocheikine *et al.*, 2010] oder der Einbau einzelner Endothelzellen in Inselorganoide [Wolf-Jochim *et al.*, 1995; Pan *et al.*, 2011; Coppens *et al.*, 2013], getestet. Allerdings waren diese Ansätze nicht erfolgreich genug, um das Anwachsen der Langerhans-Inseln langfristig zu garantieren und damit die Inseltransplantation als Alternative zur Insulin-Applikation in der klinischen Praxis zu etablieren.

Entsprechend steht derzeit sowohl die Identifizierung einzelner Faktoren, die den Revaskularisierungsprozess beeinflussen, als auch die Entwicklung neuartiger Vaskularisierungsstrategien im Fokus der Forschung zur Inseltransplantation.

7.1 Einfluss von NG2 auf die Revaskularisierung von Langerhans-Inseln

Die spezifische Funktion von Endothelzellen innerhalb der Langerhans-Inseln wurde bereits sowohl unter physiologischen und hyperglykämischen Bedingungen im Pankreas als auch nach der Transplantation in die Portalvene oder Nierenkapsel eingehend untersucht [Cao & Wang, 2014; Del Toro-Arreola *et al.*, 2016; Hogan & Hull, 2017; Narayanan *et al.*, 2017]. Im Gegensatz dazu rückte die Funktion der Perizyten, welche die Endothelzellen umgeben, erst in den vergangenen 10 Jahren in den Fokus der Forschung [Franco *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2013; Juang *et al.*, 2015]. Im Zuge dessen konnte gezeigt werden, dass Perizyten durch ihre Interaktion mit den Endothelzellen den Blutfluss innerhalb der Langerhans-Inseln regulieren [Sasson *et al.*, 2016]. Weiterführend konnte die Ausbildung von T2D mit der Dysfunktion und dem Verlust von Perizyten in Verbindung gebracht werden [Almaça *et al.*, 2018]. So konnte erstmals dokumentiert werden, dass die Anzahl an Perizyten innerhalb der Inseln von adipösen Mäusen und humanen T2D-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant reduziert ist. Daher wurde hypothetisiert, dass dieser Verlust die Anpassung des Blutflusses innerhalb der Insel und damit die Hormonausschüttung beeinträchtigt, wodurch die Glukoseintoleranz verstärkt werden würde [Almaça *et al.*, 2018]. Ein essentieller Faktor, um

den Blutfluss innerhalb der Inseln zu kontrollieren, ist der enge Kontakt zwischen Perizyten und umliegenden Zellen bzw. der ECM [Hellström *et al.*, 1999; Franco *et al.*, 2011; Proebstl *et al.*, 2012]. Dieser Kontakt wird wiederum durch die Expression von verschiedenen Oberflächenproteinen ermöglicht. Eines dieser Oberflächenproteine ist das Proteoglykan NG2.

NG2 wird von Perizyten exprimiert und ist ein 300 kDa großes Typ-1-Transmembranprotein, dessen extrazelluläre Domäne post-translational über Disulfidbrücken und Glykosylierungen modifiziert werden kann [Yadavilli *et al.*, 2016]. Die kurze zytoplasmatische Domäne dient als Interaktionsbereich für verschiedene intrazelluläre Proteine wie ERK1/2 oder MUPP1 [Barritt *et al.*, 2000; Makagiansar *et al.*, 2007]. Die Hauptfunktion von NG2 besteht in der Interaktion mit extrazellulären Matrixproteinen und Kollagen VI, wodurch Zelladhäsion und Zellmotilität reguliert werden. Der Verlust der Kollagen-Interaktionsdomäne von NG2 hat eine verminderte Migrationsfähigkeit der Perizyten zur Folge [Burg *et al.*, 1997]. Weiterhin wurde bereits beschrieben, dass NG2 die Permeabilität von Blutgefäßen reduziert und über die Interaktion mit der ECM positiv zur Stabilisierung neu gebildeter Blutgefäße beiträgt [Schlingemann *et al.*, 1990; Ribatti *et al.*, 2011]. Folglich spielt NG2 auch während der Angiogenese eine entscheidende Rolle. Basierend auf diesen Studien sollte im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit untersucht werden, welche Auswirkungen der Verlust von NG2 auf die Revaskularisierung transplantierter Langerhans-Inseln hat.

Die Analysen der zellulären Zusammensetzung von NG2^{-/-}- und NG2^{+/+}-Langerhans-Inseln innerhalb des Pankreas zeigten keine Unterschiede in den Fraktionen der endokrinen Zellen. Auch nach Isolierung konnten keine signifikanten Unterschiede der endokrinen Zellfraktionen nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit diesen Daten wurden auch keine Veränderungen in der Insulin-Expression und der Glukose-abhängigen Insulin-Sekretion zwischen isolierten NG2^{-/-}- und NG2^{+/+}-Langerhans-Inseln festgestellt. Folglich konnte im Rahmen dieser Analysen gezeigt werden, dass NG2 keinen Einfluss auf die zelluläre Zusammensetzung und die endokrine Funktion von Langerhans-Inseln hat.

Auch die Analyse der Fraktion endothelialer Zellen im Pankreas von NG2^{-/-}- und NG2^{+/+}-Tieren zeigte keine Unterschiede. Allerdings war dieser Parameter nach der Inselisolierung in der NG2^{-/-}-Gruppe im Vergleich zu den NG2^{+/+}-Kontrollen signifikant reduziert. Langerhans-Inseln sind über kollagenhaltiges Bindegewebe mit dem exokrinen Pankreasgewebe verbunden [Shapiro *et al.*, 1996]. Dementsprechend erfolgt deren Isolierung durch einen enzymatischen Verdau des Pankreas mit Kollagenase. NG2 interagiert mit Kollagen VI, wodurch die Adhäsion von Perizyten in der ECM vermittelt wird [Burg *et al.*, 1996; Tillet *et al.*, 2002]. Zudem ist bekannt, dass der Verlust von NG2 in Perizyten zu einem stark reduzierten Kontakt zwischen Perizyten und der ECM führt [Yotsumoto *et al.*, 2015]. Daher kann hypothetisiert werden, dass

der Verlust von NG2 zu einer Destabilisierung der Blutgefäße führt und folglich während der Inselisolierung vermehrt Gefäße aus den NG2^{-/-}-Langerhans-Inseln herausgelöst werden. Inwieweit sich diese NG2-medierte Reduktion der Endothelzellen auf die Revaskularisierung der Langerhans-Inseln nach deren Transplantation auswirkt, wurde in nachfolgenden Analysen mithilfe des Rückenhautkammer-Modells untersucht. Aufgrund der geringeren Anzahl an Endothelzellen wurde hierbei hypothetisiert, dass die initiale Revaskularisierung der NG2^{-/-}-Inseln im Vergleich zu NG2^{+/-}-Inseln verzögert ist.

Das Rückenhautkammer-Modell ermöglicht die intravitalfluoreszenzmikroskopische Analyse der Mikrozirkulation *in vivo*. Unter Verwendung dieser Technik kann die Revaskularisierung transplanteder Inseln am lebenden Tier über einen Zeitraum von bis zu zwei Wochen repetitiv untersucht werden [Vajkoczy *et al.*, 1995a; Nishimura *et al.*, 2013; Menger *et al.*, 2020b]. Anhand der aufgenommenen mikroskopischen Bilder können im Anschluss verschiedene Parameter, wie die Größe, funktionelle Gefäßdichte und endokrine Revaskularisierung der transplantierten Langerhans-Inseln sowie der Durchmesser, die Fließgeschwindigkeit und der Blutvolumenfluss von neu gebildeten Blutgefäßen innerhalb der Transplantate, analysiert werden [Lipowsky *et al.*, 1978; Menger *et al.*, 1989; Klyszcz *et al.*, 1997].

Im Rahmen der hier durchgeführten *in vivo* Analysen konnte gezeigt werden, dass die funktionelle Gefäßdichte von NG2^{-/-}-Langerhans-Inseln im Vergleich zur NG2^{+/-}-Kontrollgruppe bis Tag 6 keine signifikanten Unterschiede aufweist. Erst an Tag 10 nach Transplantation war dieser Parameter in den NG2^{-/-}-Transplantaten signifikant reduziert. Dieses Ergebnis konnte durch immunhistochemische Analysen verifiziert werden. Auch hier konnte eine verringerte Anzahl CD31-positiver Endothelzellen innerhalb der NG2^{-/-}-Langerhans-Inseln an Tag 10 nach Transplantation nachgewiesen werden. Interessanterweise waren diese Ergebnisse aufgrund der initial reduzierten Endothelzell-Fraktion in den NG2^{-/-}-Transplantaten im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht zu erwarten. Jedoch kann anhand dieser Untersuchungen hypothetisiert werden, dass der Verlust von NG2 keinen Einfluss auf die frühen angiogenen Prozesse innerhalb der transplantierten Langerhans-Inseln hat. Allerdings lässt die Tatsache, dass die funktionelle Gefäßdichte innerhalb der NG2^{-/-}-Langerhans-Inseln an Tag 10 im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert war, vermuten, dass NG2 im späteren Verlauf der Inselrevaskularisierung an der Reifung der eingewachsenen Blutgefäße beteiligt ist. Die Gefäßreifung erfolgt erst nach dem Einwachsen der Blutgefäße ins Transplantat und führt zur Stabilisierung des neu gebildeten Blutgefäßnetzwerks [Darland & D'Amore, 1999]. Stimuliert wird dieser Prozess primär durch endotheliale Integrin-Signale [Murasawa *et al.*, 2008]. Integrine sind heterodimere Oberflächenrezeptoren, die sich aus je einer α - und einer β -Untereinheit zusammensetzen und Zellen miteinander oder mit der ECM verbinden [Ye *et al.*, 2011; Malinin *et al.*, 2012]. Andere

Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass der Verlust von NG2 zu einer reduzierten Aktivierung von Integrin $\beta 1$ in Endothelzellen führt, was die Verringerung der Stabilität sowie die unvollständige Ausreifung von Gefäßen zur Folge hat [You *et al.*, 2014; Yamamoto *et al.*, 2015]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Keimbahn-deletion von Integrin $\beta 1$ zur embryonalen Letalität führt, da unreife Blutgefäße nach kurzer Zeit abgebaut werden [Tanjore *et al.*, 2008]. Aufgrund dieser Studien kann vermutet werden, dass die verminderte Revaskularisierung transplanteder NG2^{-/-}-Langerhans-Inseln durch eine reduzierte NG2/Integrin- $\beta 1$ Interaktion verursacht wurde. Diese verminderte Interaktion könnte wiederum eine erhöhte Anzahl unreifer Blutgefäße innerhalb der NG2^{-/-}-Transplantate zur Folge haben, wodurch sich die Blutgefäße über den Zeitverlauf nachweislich zurückbilden [Wietecha *et al.*, 2013].

Während der Angiogenese bzw. der Revaskularisierung eines Transplantats ist der Durchmesser der neu gebildeten Gefäße zunächst groß, während die Fließgeschwindigkeit und der Blutvolumenfluss vergleichsweise gering sind [Coulon *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2015; Volz *et al.*, 2015]. Die hier durchgeführten Analysen des Durchmessers, der Fließgeschwindigkeit und des Blutvolumenflusses zeigten während des gesamten Beobachtungszeitraums von 10 Tagen keine Unterschiede zwischen den Blutgefäßen innerhalb der NG2^{+/-} und NG2^{-/-}-Langerhans-Inseln. Entsprechend kann angenommen werden, dass ein Verlust von NG2 weder den Durchmesser noch die Fließgeschwindigkeit oder den Blutvolumenfluss der neu gebildeten Gefäße innerhalb der ersten 10 Tage nach Transplantation maßgeblich beeinflusst. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass Veränderungen dieser Parameter erst nach 10 Tagen auftreten und daher im angewandten Modell nicht detektiert werden konnten.

Aufgrund ihrer hohen metabolischen Aktivität und endokrinen Funktion sind Inselzellen auf einen stetigen und uneingeschränkten trans-endothelialen Transport von Nährstoffen und Hormonen durch das vaskuläre System angewiesen [Vajkoczy *et al.*, 1995b; Olsson & Carlsson, 2006a; Stendahl *et al.*, 2009]. Dieser Austausch wird durch die endotheliale Fenestrierung gewährleistet, welche indirekt mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Rhodamin 6G nachgewiesen werden kann. Dieser Farbstoff kann aufgrund seines geringen Molekulargewichts fenestriertes Endothel passieren und in den umliegenden Zellen akkumulieren [Jbeily *et al.*, 2014; Jaworska *et al.*, 2015; Menger *et al.*, 2020a]. Der Nachweis von Rhodamin 6G in vaskularisierten Inselzellen wurde bereits 1995 von Vajkoczy *et al.* [1995a] als endokrine Revaskularisierung bezeichnet. Im Rahmen der hier durchgeführten Analysen konnten ab Tag 6 Rhodamin 6G-positive Bereiche innerhalb der transplantierten Inseln nachgewiesen werden. Folglich ist die endokrine Revaskularisierung der Inseln im Vergleich zum Einwachsen neuer Gefäße, das bereits an Tag 3 nach Transplantation

nachweisbar war, zeitlich verzögert. Dies ist damit zu begründen, dass die Fenestrierung des Endothels während der Blutgefäßreifung erfolgt und diese erst nach der Bildung und dem Einwachsen neuer Blutgefäße stattfindet [Satchell & Braet, 2009]. Dadurch kommt es zu einer zeitlichen Verzögerung zwischen der Bildung bzw. dem Einwachsen von Blutgefäßen und deren Fenestrierung. An Tag 10 nach Inseltransplantation war die endokrine Revaskularisierung der NG2^{-/-}-Transplantate im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert. Diese Beobachtung widerspricht den Forschungsergebnissen von You *et al.* [2014]. Sie konnten zeigen, dass NG2 direkt an der Verbesserung der Barrierefunktion des Endothels beteiligt ist. Ein über *small interfering RNA* (siRNA) vermittelter Abbau der NG2 mRNA (NG2 KO) innerhalb der Perizyten führte im Rahmen ihrer Analysen nicht nur zu strukturellen und funktionellen Defiziten von Blutgefäßen innerhalb eines intrakraniellen B16F10 Melanoms, sondern auch zu einer gestörten Interaktion von Endothelzellen und Perizyten sowie einer erhöhten Gefäßpermeabilität [You *et al.*, 2014]. Anhand dieser Ergebnisse wäre anzunehmen, dass in der hier durchgeführten Arbeit eine verstärkte Rhodamin-6G-Aufnahme in die NG2^{-/-}-Langerhans-Inseln erfolgt sein müsste. Allerdings sollte berücksichtigt werden, dass in der vorliegenden Arbeit auch eine verminderte funktionelle Gefäßdichte der NG2^{-/-}-Langerhans-Inseln an Tag 10 nachgewiesen wurde. Somit ist davon auszugehen, dass diese Transplantate auch eine reduzierte Gesamtzahl fenestrierter Blutgefäße an Tag 10 besaßen. Die hier detektierte Reduktion der endokrinen Revaskularisierung innerhalb der NG2^{-/-}-Gruppe im Vergleich zu den NG2^{+/+}-Kontrollen an Tag 10 ist folglich mit der ebenfalls verringerten funktionellen Gefäßdichte innerhalb der NG2^{-/-}-Langerhans-Inseln zu erklären. Inwieweit diese hier nachgewiesene, reduzierte Revaskularisierung durch die initial reduzierte Anzahl an Endothelzellen oder den Verlust von NG2 selbst zu begründen ist, sollte in weiterführenden Studien untersucht werden.

Zusammenfassend zeigen die im Rahmen dieses Studienabschnittes durchgeführten Untersuchungen, dass der Verlust von NG2 keinen Einfluss auf die Zusammensetzung und Funktion der endokrinen Zellen der Langerhans-Inseln hat. Im Gegensatz dazu ist die Zahl der Endothelzellen in NG2^{-/-}-Langerhans-Inseln im Vergleich zu NG2^{+/+}-Kontrollen nach deren Isolierung reduziert. *In vivo* führt der Verlust von NG2 zu einer reduzierten funktionellen Gefäßdichte und Gefäßfenestrierung in transplantierten Inseln. Die hier erhobenen Daten zeigen somit erstmalig, dass NG2 einen entscheidenden Einfluss auf die Revaskularisierung transplantiert Langerhans-Inseln hat. Diese Ergebnisse unterstreichen die Relevanz von Oberflächenproteinen während der Angiogenese und tragen zu einem besseren Verständnis der Rolle von Perizyten im Kontext der Inseltransplantation bei.

7.1.1 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Transplantation von Langerhans-Inseln als therapeutischer Ansatz für T1D-Patienten stellt eine vielversprechende Alternative zur Insulin-Applikation dar. Um diese Methode im klinischen Alltag zu etablieren, liegt der Fokus vieler Forschungsprojekte auf der Optimierung der Revaskularisierung transplanteder Inseln. In diesem Zusammenhang konnte im ersten Studienabschnitt dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Verlust von NG2 innerhalb der Langerhans-Inseln einen negativen Einfluss auf deren Revaskularisierung nach Transplantation hat. Inwieweit dieser Effekt allerdings durch die initial reduzierte Anzahl der Endothelzellen oder den Verlust von NG2 selbst zu begründen ist, konnte nicht weiter untersucht werden. Um dies zu überprüfen, sollte der KO von NG2 erst nach der Inseltransplantation induziert werden. Ist die Revaskularisierung in diesem Fall erneut reduziert, kann dies direkt auf die ausbleibende Funktion von NG2 zurückgeführt werden.

Zudem wurde in diesem Studienabschnitt ausschließlich die initiale post-Transplantationsphase im Rückenhautkammer-Modell untersucht. In weiterführenden Studien sollte allerdings zusätzlich der Einfluss von NG2 auf die Revaskularisierung transplanteder Langerhans-Inseln unter hyperglykämischen Bedingungen in diabetischen Tieren untersucht werden. Dabei könnte nicht nur der Reifeprozess der Blutgefäße über einen längeren Zeitraum untersucht werden, sondern auch, inwiefern der Verlust von NG2 die Wiederherstellung einer Normoglykämie beeinflusst.

7.2 Einfluss der Inkorporation von MVF auf die Vaskularisierung von Inselorganoiden

Im Rahmen einer vorangegangenen Masterarbeit konnte bereits ein Konzept zur Prävaskularisierung von Inselorganoiden durch die Inkorporation von MVF etabliert werden. Im zweiten Studienabschnitt dieser Arbeit wurde nun die Funktionalität dieser Inselorganoiden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* näher analysiert.

Als Kontrollgruppen wurden neben reinen PI auch CI und FI verwendet, da sowohl hCI als auch hFI unter klinischen Bedingungen transplanteder werden. Die Begründungen für die Verwendung von hFI bzw. hCI in der Klinik sind vielfältig. Das Hauptargument für die Verwendung von hCI ist, dass die Kultivierung eine Erholungsphase nach dem Isolierungsprozess darstellt, wodurch zellulärer Stress reduziert wird [Hamamoto *et al.*, 2003; Padmasekar *et al.*, 2013; Fujita *et al.*, 2018]. Zudem ist es aus logistischer Sicht schwierig, die Kultivierung isolierter hFI zu umgehen, da diese teilweise über große Distanzen in das jeweilige Transplantationszentrum transportiert werden müssen [Kaddis *et al.*, 2009; Niland *et al.*, 2010; Bertuzzi *et al.*, 2016]. Mögliche Viabilitäts- oder Funktionsverluste der Inselzellen

können hingegen durch die direkte Transplantation von hFI vermieden werden [Hughes *et al.*, 2018; Lablanche *et al.*, 2018]. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit nicht nur PI als nicht-prävaskularisierte Inselorganoide, sondern auch FI und CI als Kontrollgruppen verwendet und mit PI+MVF verglichen.

Die Kultivierung kann abhängig vom Durchmesser und der Kultivierungsdauer von Langerhans-Inseln bzw. Inselorganoiden eine zentrale Nekrose hervorrufen [Barisam *et al.*, 2018; Komatsu *et al.*, 2018]. Diese Nekrose entsteht aufgrund eines Sauerstoff- und/oder Nährstoffmangels im Kern der Zellagglomerate und ist auf eine limitierte Diffusionsstrecke von 70-150 μm zurückzuführen [Kauri *et al.*, 2003; Suszynski *et al.*, 2014]. Je länger die Kultivierung erfolgt und je größer der Durchmesser der Langerhans-Inseln bzw. Inselorganoide ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung einer Nekrose [Kauri *et al.*, 2003; Suszynski *et al.*, 2014]. Um diese in den PI+MVF auszuschließen, wurden im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen Viabilitätsanalysen durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die inkorporierten MVF keinen negativen Einfluss auf die Viabilität der Inselzellen haben, obwohl die PI+MVF im Vergleich zu den anderen Gruppen den größten Durchmesser aufwiesen. Interessanterweise wurde sogar ein positiver Einfluss der MVF auf die Viabilität der Inselzellen nachgewiesen. Endothelzellen sekretieren verschiedene Wachstumsfaktoren, wie HGF oder FGF, welche die Funktion, Proliferation und Viabilität von β -Zellen unterstützen [Eberhard *et al.*, 2010; Olerud *et al.*, 2011; Mazier & Cota, 2017]. Aufgrund der hier detektierten höheren Anzahl an vitalen Zellen innerhalb der PI+MVF kann folglich hypothetisiert werden, dass die inkorporierten Endothelzellen durch die Ausschüttung dieser Wachstumsfaktoren die Viabilität der β -Zellen verbesserten.

Neben der Ausbildung einer zentralen Nekrose wurde auch die verstärkte Produktion von ROS während der Inselisolierung und -Kultivierung sowie der Generierung von Inselorganoiden beschrieben [Shapiro *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2014]. Ein Marker, um diesen zellulären Stress zu detektieren, ist die Menge an mitochondrialem H_2O_2 , welche unter Verwendung von mito-roGFP2-Orp1-Mäusen analysiert werden kann [Kudryavtseva *et al.*, 2016; Blajszczak & Bonini, 2017]. Die Zellen dieser Mäuse exprimieren im Mitochondrium ein Fusionsprotein aus roGFP2 und Orp1. Dieses Fusionsprotein ändert in Abhängigkeit der mitochondrialen H_2O_2 -Konzentration seine Fluoreszenz-Emission, welche anschließend mikroskopisch gemessen werden kann [Fujikawa *et al.*, 2016]. Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zeigen, dass PI+MVF im Vergleich zu FI und PI geringere H_2O_2 -Level aufweisen, was auf eine schützende Funktion der MVF auf die Inselzellen hindeutet. Die Menge an mitochondrialem H_2O_2 in CI war hingegen mit der in PI+MVF vergleichbar. In vorausgegangenen Studien wurde gezeigt, dass in erster Linie die Inselisolierung zu oxidativem Stress und folglich zum Verlust von Inselzellen führt [Li *et al.*, 2015]. Folglich kann angenommen werden, dass vor allem der

Isolierungsprozess der Langerhans-Inseln erhöhten Zellstress verursacht, während sich die Kultivierung und die Inkorporation der MVF positiv auf die Inselzellen auswirken.

Um den positiven Effekt der MVF auf die Inselzellen näher zu analysieren, wurden im nächsten Schritt die molekularen Mechanismen untersucht, die dem Stress-induzierten H_2O_2 -Anstieg entgegenwirken können. In diesem Zusammenhang konnte eine deutlich erhöhte HO-1-Expression innerhalb der PI+MVF detektiert werden. Diese könnte durch den Transkriptionsfaktor *Nuclear factor erythroid 2-related factor* (Nrf2) induziert sein. Studien zeigten, dass erhöhte H_2O_2 -Spiegel zur Dissoziation des Nrf2/Keap1 Heterodimers führen [Mou *et al.*, 2018]. Nrf2 transloziert daraufhin in den Zellkern und induziert dort die Expression von HO-1 durch dessen Bindung an sogenannte *Amino acid Response Elements* (ARE) im HO-1-Promoter. In Folge der HO-1-Expression trägt diese Oxygenase dazu bei, das Redox-Gleichgewicht innerhalb der Zelle sicherzustellen [Nguyen *et al.*, 2009; Loboda *et al.*, 2016]. Daneben wurde gezeigt, dass eine erhöhte HO-1-Aktivität Zellen vor Apoptose schützt, Immunreaktionen reduziert und die Anwachsrate von Langerhans-Inseln nach der Transplantation verbessert [Pileggi *et al.*, 2001; Tobiasch *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 2004; Pileggi *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006]. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Induktion der HO-1-Expression einen protektiven Effekt gegenüber erhöhten ROS-Level hat. Allerdings zeigen die hier dargestellten Ergebnisse nicht, welche Zellen innerhalb der Inselorganoide verstärkt HO-1 exprimieren. Denkbar wäre, dass die β -Zellen vermehrt HO-1 exprimieren, da diese den größten zellulären Anteil der PI+MVF bilden und zudem bekannt ist, dass sie unter zellulärem Stress vermehrt HO-1 exprimieren [Mohammed Al-Amily *et al.*, 2019]. Um dies jedoch zu beweisen, sind weiterführende Untersuchungen, wie beispielsweise eine Fluoreszenz-Doppelfärbung von HO-1 mit verschiedenen Markern der endokrinen und vaskulären Zellen innerhalb der PI+MVF, notwendig.

Im Rahmen einer vorangegangenen Masterarbeit konnte bereits gezeigt werden, dass PI+MVF neben endokrinen Zellen und Endothelzellen auch Präadipozyten enthalten [Nalbach, 2017]. Dies ist durch die Zusammensetzung der MVF zu begründen, da diese neben Endothelzellen, Perizyten und Fibroblasten auch aus mesenchymalen Stammzellen und Präadipozyten bestehen [Frueh *et al.*, 2017a]. Präadipozyten differenzieren zu Adipozyten, welche als Speicher für Triglyzeride dienen [Yang *et al.*, 2018]. Diese Adipozyten exprimieren neben ihrer Speicherfunktion das Proteohormon Leptin, welches eine essentielle Funktion in der Regulation des Energiestoffwechsels im Organismus ausübt [Zhang & Chua, 2017]. Leptin unterdrückt dabei die Insulin-Sekretion, indem es die Leitfähigkeit der ATP-abhängigen Kalium-Kanäle der β -Zellen erhöht, sodass diese nicht mehr auf elektrische Schwankungen des eigenen Membranpotentials reagieren können [Cochrane & Shyng, 2019]. Eine zu große Anzahl an inkorporierten Präadipozyten, die im weiteren Verlauf zu Adipozyten heranreifen,

könnte sich somit über die Sekretion von Leptin negativ auf die Insulin-Sekretion von PI+MVF auswirken. Diese Hypothese konnte im Rahmen dieser Studie allerdings nicht bestätigt werden, da die Inkorporation der MVF weder die Insulin-Expression noch die Glukose-abhängige Insulin-Sekretion der PI+MVF beeinträchtigte. Dies kann durch den geringen Anteil von Präadipozyten von weniger als 7 % innerhalb der PI+MVF erklärt werden [Nalbach, 2017]. Zudem nimmt die Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten mindestens 12 Tage in Anspruch [Schwind *et al.*, 2017], sodass in den hier analysierten PI+MVF nach 5 Tagen vermutlich keine reifen Adipozyten, sondern vorwiegend Präadipozyten vorlagen. Leptin wird allerdings primär von reifen Adipozyten produziert [Salmeron *et al.*, 2015], sodass angenommen werden kann, dass ein negativer Effekt des sekretierten Leptins auf die Insulin-Sekretion der PI+MVF aufgrund der geringen Anzahl an Adipozyten ausblieb.

Die Effekte, die Insulin neben der Reduktion des Blutglukosespiegels auf das Wachstum sowie die Proliferation peripherer Zellen hat, wurden erstmalig 1981 von Straus [1981] zusammengefasst. In den nachfolgenden Jahren wurde die angiogene Funktion von Insulin untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass Insulin über die Bindung an IR und IGFR die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) und die Serin/Threonin-Kinase Akt aktiviert, wodurch die Proliferation und das Wachstum von Zellen induziert wird [Liu *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2012]. In den hier durchgeführten Analysen konnte eine signifikant erhöhte Aktivität dieser Signalwege nach Insulin-Behandlung von MVF festgestellt werden. Durch die Hemmung von IR und IGFR mit dem Rezeptorantagonist Linsitinib wurde die Proliferation von Endothelzellen innerhalb der PI+MVF reduziert, was auf eine stimulierende Funktion von Insulin auf die Endothelzell-Proliferation hindeutet. Insulin stimuliert jedoch nicht nur die Proliferation von Endothelzellen, sondern auch deren Migration [Wang *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009]. Dadurch kann ebenfalls das verstärkte *Sprouting*-Verhalten der PI+MVF in Abhängigkeit der Glukosekonzentration erklärt werden. Folglich ist anhand der hier gewonnenen Daten anzunehmen, dass sich die Insulin-Sekretion der β -Zellen positiv auf die Proliferation und angiogene Aktivität der MVF auswirkt.

Die *in vitro* erhobenen Daten zur angiogenen Aktivität der PI+MVF konnten mithilfe des Rückenhautkammer-Modells *in vivo* verifiziert werden. Die Kombination dieses Modells mit der Technik der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie zeigte, dass die PI+MVF im Vergleich zu den Kontrollen nach der Transplantation auf den quergestreiften Hautmuskel signifikant schneller vaskularisierten. Dies konnte sowohl durch eine signifikant erhöhte funktionelle Gefäßdichte, als auch eine größere Rhodamin 6G-positive Fläche, die ein Maß für die Fenestrierung der Insel-assoziierten Mikrogefäße darstellt [Hogan & Hull, 2017], gezeigt werden. Die verstärkte Fenestrierung der Blutgefäße lässt sich durch erhöhte VEGF-A-Spiegel innerhalb der PI+MVF erklären. Dieser Wachstumsfaktor wurde bereits in mehreren Studien mit der Angiogenese

und der Fenestrierung von Blutgefäßen in Zusammenhang gebracht [Lammert *et al.*, 2003; Brissova *et al.*, 2006]. Dabei wurde gezeigt, dass VEGF-A das Einwachsen von Blutgefäßen in transplantiertes Gewebe unterstützt und zudem die Permeabilität der Blutgefäße nach der Inseltransplantation erhöht. Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten erhöhte VEGF-A-Spiegel in den PI+MVF nachgewiesen werden, welche die angiogene Aktivität und Fenestrierung der MVF möglicherweise positiv beeinflussen. Durch die Analyse des Gefäßdurchmessers, der Fließgeschwindigkeit sowie des Blutvolumenflusses wurde zudem deutlich, dass nur die Blutgefäße innerhalb der PI+MVF erste Anzeichen der Gefäßreifung durch eine Senkung des Gefäßdurchmessers und der gleichzeitigen Zunahme des Blutvolumenflusses zeigen. Diese Beobachtung lässt sich damit erklären, dass die PI+MVF bereits vor der Transplantation reife Mikrogefäße enthalten, die sich unmittelbar nach der Transplantation mit dem Gefäßnetzwerk des Empfängers verbinden und folglich früher Anzeichen reifer Gefäße aufweisen, als die neu gebildeten Blutgefäße innerhalb der transplantierten FI, CI und PI [Hoying *et al.*, 1996; Frueh *et al.*, 2017a].

Anhand zusätzlicher immunhistochemischer Analysen der Transplantate an Tag 14 konnte im Vergleich zu allen Kontrollgruppen eine erhöhte Anzahl von Endothelzellen innerhalb der PI+MVF nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse korrelieren mit der hohen funktionellen Gefäßdichte innerhalb der PI+MVF und unterstützen somit die Hypothese, dass die inkorporierten MVF positiv zur Vaskularisierung der Inselorganoide beitragen [Nyqvist *et al.*, 2005]. Die Anwachsrate der PI+MVF war im Vergleich zu allen Kontrollgruppen tendenziell erhöht. Dies lässt sich damit begründen, dass der Verlust von Inselzellen oder ganzen Langerhans-Inseln nach Transplantation in den meisten Fällen auf eine zu lang andauernde oder unzureichende Vaskularisierung zurückzuführen ist [Shapiro *et al.*, 2001]. Durch die Inkorporation der MVF wurde die Vaskularisierung beschleunigt, wodurch eine frühere Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Inselzellen gewährleistet war. Entsprechend war auch der Verlust von Inselorganoiden in der Gruppe der PI+MVF geringer als in den Kontrollgruppen.

Das Modell der Rückenhautkammer dient zur Analyse der Vaskularisierung von Transplantaten. Die endokrine Funktion der transplantierten Langerhans-Inseln bzw. Inselorganoide konnte jedoch nicht mithilfe dieses Modells bestimmt werden. Um diese untersuchen zu können, wurde das STZ-induzierte, diabetische Mausmodell in Kombination mit der Inseltransplantation unter die Nierenkapsel angewandt. Die Nierenkapsel stellt seit mehr als 30 Jahren die präferierte präklinische Transplantationsstelle für Langerhans-Inseln dar [Mellgren *et al.*, 1986] und hat sich an Stelle der Leber als Goldstandard zur Analyse der endokrinen Funktion transplantierte Langerhans-Inseln bzw. Inselorganoide in tierexperimentellen Studien etabliert [Ar'Rajab *et al.*, 1990; Halberstadt *et al.*, 2005; Medarova

et al., 2009; Pepper *et al.*, 2015]. Ein Vorteil dieser Transplantationsstelle ist die verhältnismäßig schnelle Vaskularisierung der Transplantate im Vergleich zur intraportalen Inseltransplantation [Olsson *et al.*, 2011; Stokes *et al.*, 2017a]. Dadurch, dass die Inseln nach der Transplantation unter der Nierenkapsel verbleiben und sich nicht im gesamten Organ verteilen, bietet diese Transplantationsstelle zudem auch die Möglichkeit gezielter histologischer Untersuchungen, ohne dabei das gesamte Organ aufwendig auf einzelne Transplantate überprüfen zu müssen [van Suylichem *et al.*, 1994]. Des Weiteren bietet die Nierenkapsel als Transplantationsstelle auch die Möglichkeit für Explantationsstudien [van Suylichem *et al.*, 1994; Merani *et al.*, 2008; Olsson *et al.*, 2011; Stokes *et al.*, 2017b]. In diesem Fall kann die Niere nach einer erfolgreichen Inseltransplantation und einer entsprechenden Senkung des Blutglukosespiegels diabetischer Tiere mit den Transplantaten entnommen werden, woraufhin der Blutglukosespiegel der Versuchstiere wieder ansteigen sollte. Dieses Verfahren dient somit zum einen als Kontrolle für den langfristigen zytotoxischen Effekt des STZ und zum anderen als Kontrolle des therapeutischen Effekts der Inseltransplantation. Die Senkung des Blutglukosespiegels diabetischer Tiere nach Inseltransplantation ist jedoch bei allen Transplantationsstellen abhängig von der Anzahl der Transplantate [Oh *et al.*, 2013]. Daher wurden vor Beginn des Hauptversuchs 200, 250, 300 und 400 FI transplantiert, um die kritische Anzahl zu transplantierender Langerhans-Inseln zu ermitteln. In der Literatur schwankt diese Zahl zwischen 70 und 2000 Inseln [Montaña *et al.*, 1993; Ar'Rajab *et al.*, 1996; Tellez *et al.*, 2007; Ito *et al.*, 2010; Minardi *et al.*, 2019]. Diese Schwankungen sind abhängig von der Spezies des Empfängers, der Transplantationsstelle sowie der Qualität und Vorbehandlung der Transplantate [Markmann *et al.*, 2003; Briones *et al.*, 2006; Stokes *et al.*, 2017a; Kitamoto *et al.*, 2018]. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden 250 FI als die kritische Menge ermittelt, da durch diese Anzahl der pathologische Blutglukosespiegel diabetischer Tiere über den gesamten Beobachtungszeitraum nicht in den normoglykämischen Bereich gesenkt werden konnte. Basierend auf diesen Vorversuchen konnte im Anschluss untersucht werden, ob die Transplantation von 250 PI+MVF zur Wiederherstellung einer Normoglykämie bei STZ-induzierten, diabetischen Tieren führt. Da die Gruppe der FI im Rückenhautkammer-Modell im Vergleich zu den CI und PI eine schnellere Vaskularisierung aufwies, wurden im diabetischen Mausmodell lediglich FI als Kontrollen verwendet, um die Anzahl an Versuchstieren zu minimieren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen deutlich, dass die Transplantation von 250 PI+MVF den Blutzuckerspiegel der Empfängermäuse innerhalb von 7 Tagen normalisiert und anschließend über den gesamten Beobachtungszeitraum in einem physiologischen Bereich hält. Hingegen führte die gleiche Anzahl von FI nicht zur Wiederherstellung einer Normoglykämie. Im Vergleich zwischen der Transplantation von 250 PI+MVF und 400 FI ist

deutlich zu erkennen, dass beide Transplantationen ähnlich schnell zu einer Normoglykämie in den diabetischen Mäusen führten. In der Literatur werden verschiedene Strategien beschrieben, welche die Revaskularisierung von Langerhans-Inseln verbessern sollen. Hierzu zählt u.a. die Behandlung der Empfänger und/oder Transplantate mit pharmakologischen Substanzen [Menger *et al.*, 2020a] oder Wachstumsfaktoren [Cheng *et al.*, 2004; Golocheikine *et al.*, 2010]. Daneben wird auch die Co-Transplantation von Langerhans-Inseln mit Endothelzellen [Coppens *et al.*, 2013] oder die Inkorporation von Endothelzellen in Inselorganoide [Spelios *et al.*, 2018; Augsornworawat *et al.*, 2019] als erfolgsversprechend beschrieben. Allerdings waren diese Ansätze bisher nicht effektiv genug, um die Inselzellen durch eine beschleunigte Vaskularisierung vor Sauerstoff- und Nährstoffmangel zu schützen und dadurch deren Überlebensrate langfristig zu verbessern [Menger *et al.*, 2001]. Entsprechend finden sie heute keine Anwendung in der Klinik. Durch die in diesem Studienabschnitt angewandte neue Strategie der Prävasikularisierung von Inselorganoiden sind zahlreiche funktionelle Blutgefäße innerhalb der Transplantate vorhanden, welche bereits 3 Tage nach Transplantation mit Blut perfundiert werden. Zudem ist anzunehmen, dass durch die beschleunigte Vaskularisierung der PI+MVF weniger Inselzellen absterben und folglich weniger Organoiden transplantiert werden müssen, um eine Normoglykämie zu erreichen. Diese Reduktion der benötigten Transplantat-Menge durch den Einsatz von PI+MVF ist damit zu begründen, dass in dieser Arbeit die Transplantation von 400 FI den gleichen Effekt wie die Transplantation von 250 PI+MVF erzielten. Folglich könnte durch den Einsatz von PI+MVF das Spender-/Empfänger-Verhältnis der klinischen Inseltransplantation, welches gegenwärtig bei 3-4:1 [Plesner & Verchere, 2011] liegt, deutlich gesenkt werden. Dies ist besonders für die klinische Anwendung von Bedeutung, da hierdurch nicht nur die Anzahl an benötigten Spendern reduziert werden kann, sondern auch extrahepatische Transplantationsstellen Anwendung finden könnten. So werden Langerhans-Inseln derzeit ausschließlich intrahepatisch transplantiert, da sie auf diesem Weg über Gefäßverzweigungen in der gesamten Leber verteilt werden und vereinzelt in den portalen Venolen der Leber anwachsen können [Liljeback *et al.*, 2019]. Durch diese Vereinzelnung kann die Bildung von Inselagglomeraten vermieden werden, welche oftmals eine schlechtere Revaskularisierung einzelner Langerhans-Inseln mit sich bringt [Toso *et al.*, 2009]. Sollte allerdings durch den Einsatz von PI+MVF die Menge an zu transplantierenden Inselorganoiden gesenkt werden, kann die Wahrscheinlichkeit für die Bildung von Inselagglomeraten gesenkt werden. Dadurch bestünde auch die Möglichkeit weniger invasive Transplantationsstellen wie subkutanes Fettgewebe und intramuskuläres Gewebe für die Inseltransplantation in Betracht zu ziehen und somit die Inseltransplantation attraktiver für die klinische Anwendung zu gestalten [Nakamura *et al.*, 2016; Yasunami *et al.*, 2018; Liljeback *et al.*, 2019].

Bei der klinischen Inseltransplantation werden die Langerhans-Inseln in zentralen Einrichtungen isoliert und über den gesamten Globus zu spezialisierten Transplantationszentren (CITP) versendet, um sie den Patienten vor Ort transplantieren zu können [Ichii *et al.*, 2007]. Dies ist möglich, da in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, dass Langstreckentransporte isolierter Langerhans-Inseln keinen signifikanten Einfluss auf deren Viabilität, Quantität, Sterilität und Funktion haben [Langer *et al.*, 2004; Ikemoto *et al.*, 2010; Vaithilingam *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2015]. Unter Verwendung solcher humanen Langerhans-Inseln konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals die Fusion von murinen MVF mit humanen Inselzellen zu kompakten hPI+MVF beschrieben werden. Diese humanen Inselorganoide besitzen eine signifikant erhöhte Endothelzell-Fraktion und angiogene Aktivität im Vergleich zu Kontrollen, ohne dabei eine beeinträchtigte endokrine Funktion der β -Zellen aufzuweisen. Diese Versuchsergebnisse stellen folglich einen ersten wichtigen Schritt für die Translation der hier erarbeiteten Prävaskularisierungsstrategie in die klinische Praxis dar. Um die Funktionalität der hPI+MVF allerdings *in vivo* beurteilen zu können, müssen weiterführende Studien durchgeführt werden. Hierzu sollten humane MVF isoliert und in humane Inselorganoide inkorporiert werden. Diese könnten anschließend in immundefiziente NOD/SCID Mäuse transplantiert werden, um deren Vaskularisierung und endokrine Funktion analysieren zu können.

Zusammenfassend konnte in diesem Studienabschnitt eine neue und effektive Strategie zur Prävaskularisierung von Inselorganoiden durch die Inkorporation von MVF etabliert werden. Diese Prävaskularisierung kann nicht nur die Vaskularisierung der Inselorganoide verbessern, sondern möglicherweise auch dem limitierten Spenderangebot entgegenwirken. Zudem war es möglich, diesen experimentellen Ansatz auf primäre humane Langerhans-Inseln zu übertragen, was einen ersten wichtigen Schritt zur Translation dieser Prävaskularisierungsstrategie in die klinische Praxis darstellt.

7.2.1 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Inkorporation von MVF in Inselorganoide zur Generierung von PI+MVF stellt einen neuen Ansatz für die Optimierung der Inseltransplantation dar. Durch die Anwendung dieser Strategie könnten 2 der 3 zentralen Limitationen dieses therapeutischen Ansatzes – die unzureichende Revaskularisierung und das hohe Spender/Empfänger-Verhältnis [Gamble *et al.*, 2018] – verbessert werden. Allerdings stellt die Notwendigkeit einer immunsuppressiven Therapie zur Vermeidung einer Transplantatabstoßung nach wie vor eine letzte große Hürde der Inseltransplantation dar [Gamble *et al.*, 2018]. Diese könnte jedoch möglicherweise zukünftig

durch die Anwendung der „*β-cell replacement therapy*“ in Kombination mit der in dieser Arbeit entwickelten Prävaskularisierungsstrategie zur Generierung von hPI+MVF überwunden werden (*Abbildung 38*). Bei der *β-cell replacement therapy* werden humane, embryonale Stammzellen (hESC) oder induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC) des Patienten zu Insulin-produzierenden Zellen differenziert [Mehrabi *et al.*, 2015; Sui *et al.*, 2018; Ghani *et al.*, 2019]. Die Verwendung dieser Zellen hat den Vorteil, dass zum einen keine Spenderorgane benötigt werden und zum anderen keine Abstoßungsreaktion aufgrund der Syngenetität der zu transplantierten Zellen erfolgt [Agulnick *et al.*, 2015; Sordi *et al.*, 2017; Baeyens *et al.*, 2018].

Parallel dazu wird derzeit an Protokollen zur Isolierung von MVF aus humanem, liposuktioniertem Fettgewebe gearbeitet. In Zukunft könnten dem Patienten somit Vorläuferzellen entnommen und zu Insulin-produzierenden Zellen differenziert werden. Eine anschließende Fusion dieser Zellen mit Patienten-eigenen MVF nach Liposuktion würde zur Generierung von hPI+MVF führen, die sich ausschließlich aus Zellen des Patienten zusammensetzen (*Abbildung 38*). Diese Inselorganoide könnten folglich ohne die Verwendung von Immunsuppressiva einem Patienten retransplantiert werden und stellen somit eine vielversprechende Option zur Therapie des T1D dar.

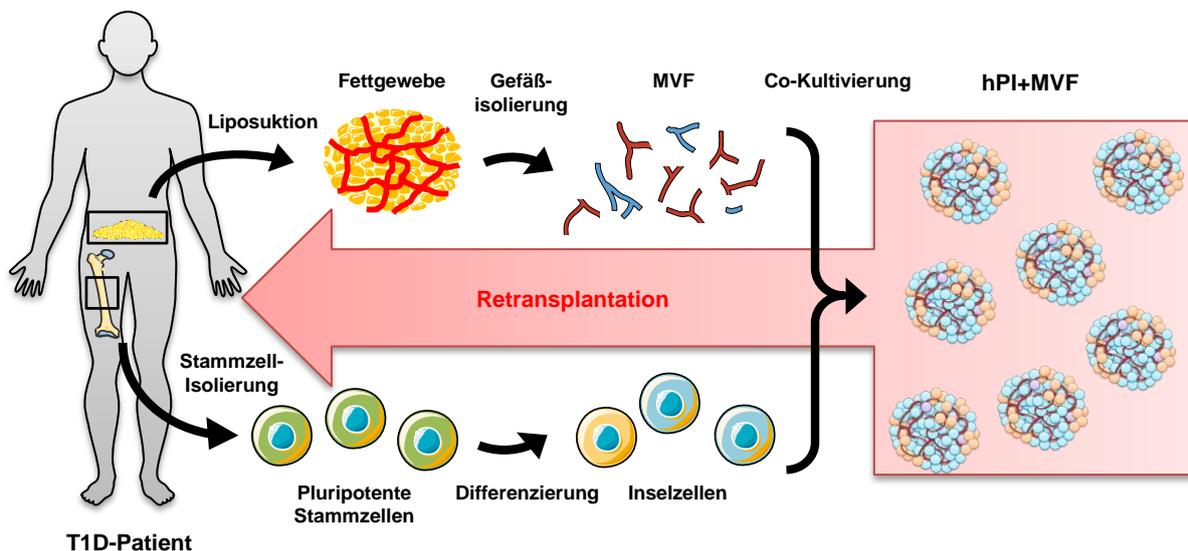


Abbildung 38: Zukunftsperspektive des Einsatzes von hPI+MVF. Aus dem Knochenmark von T1D-Patienten werden pluripotente Stammzellen entnommen. Diese werden im Labor zu Inselzellen differenziert und mit MVF aus dem Fettgewebe des Patienten nach einer Liposuktion zu hPI+MVF co-kultiviert. Die hPI+MVF werden dem Patienten anschließend transplantiert.

Die hier vorgestellte Prävaskularisierungsstrategie stellt jedoch nicht nur einen neuen Ansatz für die Optimierung der Vaskularisierung transplantiert Langerhans-Inseln dar, sondern könnte auch bei der Transplantation anderer Organoide eingesetzt werden. Beispielsweise werden neben Inselorganoiden auch Organoide aus Neuronen [Mansour *et al.*, 2018; Pham

et al., 2018], Darmzellen [Múnera *et al.*, 2017; Cortez *et al.*, 2018] oder Hepatozyten [Huch *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2019] *in vitro* gezüchtet und anschließend transplantiert. Durch die zusätzliche Inkorporation von MVF wäre es denkbar, dass diese Organoide ebenfalls schneller Anschluss an das umgebende Blutgefäßnetzwerk des Empfängergewebes finden, wodurch sich deren Überlebensrate und Funktion maßgeblich verbessern könnte.

8. Literaturverzeichnis

1. **Agulnick AD, Ambruzs DM, Moorman MA, Bhoumik A, Cesario RM, Payne JK, Kelly JR, Haakmeester C, Srijemac R, Wilson AZ, Kerr J, Frazier MA, Kroon EJ, D'Amour KA.** Insulin-producing endocrine cells differentiated in vitro from human embryonic stem cells function in macroencapsulation devices in vivo. *Stem Cells Transl Med* 4: 1214-1222, 2015
2. **Almaça J, Weitz J, Rodriguez-Diaz R, Pereira E, Caicedo A.** The pericyte of the pancreatic islet regulates capillary diameter and local blood flow. *Cell Metab* 27: 630-644, 2018
3. **Almalki SG, Agrawal DK.** Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation* 92: 41-51, 2016
4. **American Diabetes Association.** Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 36 Suppl 1: S67-74, 2013
5. **Ar'Rajab A, Ahrén B, Alumets J, Lögdberg L, Bengmark S.** Islet transplantation to the renal subcapsular space improves late complications in streptozotocin-diabetic rats. *Eur Surg Res* 22: 270-278, 1990
6. **Ar'Rajab A, Harris RB, Sentementes JT, Dawidson IJ.** The effect of preexisting long-term diabetes on the outcome after islet transplantation in rats. *Pancreas* 13: 372-380, 1996
7. **Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C.** Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 97: 512-523, 2005
8. **Armulik A, Genové G, Betsholtz C.** Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell* 21: 193-215, 2011
9. **Augsornworawat P, Velazco-Cruz L, Song J, Millman JR.** A hydrogel platform for in vitro three dimensional assembly of human stem cell-derived islet cells and endothelial cells. *Acta Biomater* 97: 272-280, 2019
10. **Baeyens L, Lemper M, Staels W, De Groef S, De Leu N, Heremans Y, German MS, Heimberg H.** (Re)generating human beta cells: status, pitfalls, and perspectives. *Physiol Rev* 98: 1143-1167, 2018
11. **Barisam M, Saidi MS, Kashaninejad N, Nguyen NT.** Prediction of necrotic core and hypoxic zone of multicellular spheroids in a microbioreactor with a U-shaped barrier. *Micromachines (Basel)* 9: 94, 2018
12. **Barritt DS, Pearn MT, Zisch AH, Lee SS, Javier RT, Pasquale EB, Stallcup WB.** The multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cytoplasmic ligand for the membrane-spanning proteoglycan NG2. *J Cell Biochem* 79: 213-224, 2000
13. **Bergers G, Song S.** The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol* 7: 452-464, 2005

14. **Bertuzzi F, Antonioli B, Tosca MC, Galuzzi M, Bonomo M, Marazzi M, Colussi G.** Islet transplantation in pediatric patients: current indications and future perspectives. *Endocr Dev* 30: 14-22, 2016
15. **Bertuzzi F, Colussi G, Lauterio A, De Carlis L.** Intramuscular islet allotransplantation in type 1 diabetes mellitus. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 22: 1731-1736, 2018
16. **Blajszczak C, Bonini MG.** Mitochondria targeting by environmental stressors: implications for redox cellular signaling. *Toxicology* 391: 84-89, 2017
17. **Briones RM, Miranda JM, Mellado-Gil JM, Castro MJ, Gonzalez-Molina M, Cuesta-Muñoz AL, Alonso A, Frutos MA.** Differential analysis of donor characteristics for pancreas and islet transplantation. *Transplant Proc* 38: 2579-2581, 2006
18. **Brissova M, Fowler M, Wiebe P, Shostak A, Shiota M, Radhika A, Lin PC, Gannon M, Powers AC.** Intra-islet endothelial cells contribute to revascularization of transplanted pancreatic islets. *Diabetes* 53: 1318-1325, 2004
19. **Brissova M, Shostak A, Shiota M, Wiebe PO, Poffenberger G, Kantz J, Chen Z, Carr C, Jerome WG, Chen J, Baldwin HS, Nicholson W, Bader DM, Jetton T, Gannon M, Powers AC.** Pancreatic islet production of vascular endothelial growth factor- α is essential for islet vascularization, revascularization and function. *Diabetes* 55: 2974-2985, 2006
20. **Burg MA, Nishiyama A, Stallcup WB.** A central segment of the NG2 proteoglycan is critical for the ability of glioma cells to bind and migrate toward type VI collagen. *Exp Cell Res* 235: 254-264, 1997
21. **Burg MA, Tillet E, Timpl R, Stallcup WB.** Binding of the NG2 proteoglycan to type VI collagen and other extracellular matrix molecules. *J Biol Chem* 271: 26110-26116, 1996
22. **Burlacu A, Grigorescu G, Rosca AM, Preda MB, Simionescu M.** Factors secreted by mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells have complementary effects on angiogenesis in vitro. *Stem Cells Dev* 22: 643-653, 2013
23. **Cabric S, Sanchez J, Johansson U, Larsson R, Nilsson B, Korsgren O, Magnusson PU.** Anchoring of vascular endothelial growth factor to surface-immobilized heparin on pancreatic islets: implications for stimulating islet angiogenesis. *Tissue Eng Part A* 16: 961-970, 2010
24. **Cantley J, Grey ST, Maxwell PH, Withers DJ.** The hypoxia response pathway and β -cell function. *Diabetes Obes Metab* 12 Suppl 2: 159-167, 2010
25. **Cao Z, Wang X.** The endocrine role between β -cells and intra-islet endothelial cells. *Endocr J* 61: 647-654, 2014
26. **Carmeliet P.** Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6: 389-395, 2000
27. **Chen H, Zhang ZW, Guo Y, Wang Y, Liu Y, Luo N, Zhu Y.** The proliferative role of insulin and the mechanism underlying this action in human breast cancer cell line MCF-7. *J BUON* 17: 658-662, 2012

28. **Chen W, Xia P, Wang H, Tu J, Liang X, Zhang X, Li L.** The endothelial tip-stalk cell selection and shuffling during angiogenesis. *J Cell Commun Signal* 13: 291-301, 2019
29. **Cheng K, Fraga D, Zhang C, Kotb M, Gaber AO, Guntaka RV, Mahato RI.** Adenovirus-based vascular endothelial growth factor gene delivery to human pancreatic islets. *Gene Ther* 11: 1105-1116, 2004
30. **Chinnakotla S, Majumder K, Sutherland DE.** Controversies in pancreas transplantation. *Minerva Chir* 70: 57-62, 2015
31. **Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlrogge AW, Malanda B.** IDF diabetes atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract* 138: 271-281, 2018
32. **Cochrane V, Shyng SL.** Leptin-induced trafficking of K_{ATP} channels: a mechanism to regulate pancreatic β -cell excitability and insulin secretion. *Int J Mol Sci* 20: 2660, 2019
33. **Conway EM, Collen D, Carmeliet P.** Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 49: 507-521, 2001
34. **Cooper DK, Ezzelarab MB, Hara H, Iwase H, Lee W, Wijkstrom M, Bottino R.** The pathobiology of pig-to-primate xenotransplantation: a historical review. *Xenotransplantation* 23: 83-105, 2016
35. **Coppens V, Heremans Y, Leuckx G, Suenens K, Jacobs-Tulleneers-Thevissen D, Verdonck K, Lahoutte T, Lutun A, Heimberg H, De Leu N.** Human blood outgrowth endothelial cells improve islet survival and function when co-transplanted in a mouse model of diabetes. *Diabetologia* 56: 382-390, 2013
36. **Cortez AR, Poling HM, Brown NE, Singh A, Mahe MM, Helmrath MA.** Transplantation of human intestinal organoids into the mouse mesentery: a more physiologic and anatomic engraftment site. *Surgery* 164: 643-650, 2018
37. **Coulon C, Georgiadou M, Roncal C, De Bock K, Langenberg T, Carmeliet P.** From vessel sprouting to normalization: role of the prolyl hydroxylase domain protein/hypoxia-inducible factor oxygen-sensing machinery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30: 2331-2336, 2010
38. **Couri CE, Oliveira MC, Stracieri AB, Moraes DA, Pieroni F, Barros GM, Madeira MI, Malmegrim KC, Foss-Freitas MC, Simões BP, Martinez EZ, Foss MC, Burt RK, Voltarelli JC.** C-peptide levels and insulin independence following autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA* 301: 1573-1579, 2009
39. **Darland DC, D'Amore PA.** Blood vessel maturation: vascular development comes of age. *J Clin Invest* 103: 157-158, 1999
40. **Dean PG, Kukla A, Stegall MD, Kudva YC.** Pancreas transplantation. *BMJ* 357: j1321, 2017
41. **Del Toro-Arreola A, Robles-Murillo AK, Daneri-Navarro A, Rivas-Carrillo JD.** The role of endothelial cells on islet function and revascularization after islet transplantation. *Organogenesis* 12: 28-32, 2016

42. **Desai T, Shea LD.** Advances in islet encapsulation technologies. *Nat Rev Drug Discov* 16: 338-350, 2017
43. **Dhanasekaran M, George JJ, Loganathan G, Narayanan S, Hughes MG, Williams SK, Balamurugan AN.** Pig islet xenotransplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 22: 452-462, 2017
44. **Dufrane D, Gianello P.** Pig islet for xenotransplantation in human: structural and physiological compatibility for human clinical application. *Transplant Rev (Orlando)* 26: 183-188, 2012
45. **Eberhard D, Kragl M, Lammert E.** 'Giving and taking': endothelial and beta-cells in the islets of Langerhans. *Trends Endocrinol Metab* 21: 457-463, 2010
46. **Elk N, Iwuchukwu OF.** Using personalized medicine in the management of diabetes mellitus. *Pharmacotherapy* 37: 1131-1149, 2017
47. **Fischer C, Schneider M, Carmeliet P.** Principles and therapeutic implications of angiogenesis, vasculogenesis and arteriogenesis. *Handb Exp Pharmacol* 176: 157-212, 2006
48. **Form DM, Pratt BM, Madri JA.** Endothelial cell proliferation during angiogenesis. In vitro modulation by basement membrane components. *Lab Invest* 55: 521-530, 1986
49. **Franco M, Roswall P, Cortez E, Hanahan D, Pietras K.** Pericytes promote endothelial cell survival through induction of autocrine VEGF-A signaling and Bcl-w expression. *Blood* 118: 2906-2917, 2011
50. **Froud T, Ricordi C, Baidal DA, Hafiz MM, Ponte G, Cure P, Pileggi A, Poggioli R, Ichii H, Khan A, Ferreira JV, Pugliese A, Esquenazi VV, Kenyon NS, Alejandro R.** Islet transplantation in type 1 diabetes mellitus using cultured islets and steroid-free immunosuppression: Miami experience. *Am J Transplant* 5: 2037-2046, 2005
51. **Frueh FS, Später T, Lindenblatt N, Calcagni M, Giovanoli P, Scheuer C, Menger MD, Laschke MW.** Adipose tissue-derived microvascular fragments improve vascularization, lymphangiogenesis, and integration of dermal skin substitutes. *J Invest Dermatol* 137: 217-227, 2017a
52. **Frueh FS, Später T, Scheuer C, Menger MD, Laschke MW.** Isolation of murine adipose tissue-derived microvascular fragments as vascularization units for tissue engineering. *J Vis Exp* 55721, 2017b
53. **Fu SH, Hsu BR, Juang JH, Chen ST, Yang TY, Hsu S.** Cobalt-protoporphyrin treatment enhances murine islets engraftment. *Transplant Proc* 36: 2205-2206, 2004
54. **Fujikawa Y, Roma LP, Sobotta MC, Rose AJ, Diaz MB, Locatelli G, Breckwoldt MO, Misgeld T, Kerschensteiner M, Herzig S, Müller-Decker K, Dick TP.** Mouse redox histology using genetically encoded probes. *Sci Signal* 9: rs1, 2016
55. **Fujita I, Utoh R, Yamamoto M, Okano T, Yamato M.** The liver surface as a favorable site for islet cell sheet transplantation in type 1 diabetes model mice. *Regen Ther* 8: 65-72, 2018

56. **Furman BL.** Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr Protoc Pharmacol* 70: 5.47.1-5.47.20, 2015
57. **Gamble A, Pepper AR, Bruni A, Shapiro AMJ.** The journey of islet cell transplantation and future development. *Islets* 10: 80-94, 2018
58. **Ghani MW, Ye L, Yi Z, Ghani H, Birmani MW, Nawab A, Cun LG, Bin L, Mei X.** Pancreatic β -cell replacement: advances in protocols used for differentiation of pancreatic progenitors to β -like cells. *Folia Histochem Cytobiol* 57: 101-115, 2019
59. **Giuliani M, Moritz W, Bodmer E, Dindo D, Kugelmeier P, Lehmann R, Gassmann M, Groscurth P, Weber M.** Central necrosis in isolated hypoxic human pancreatic islets: evidence for postisolation ischemia. *Cell Transplant* 14: 67-76, 2005
60. **Golocheikine A, Tiriveedhi V, Angaswamy N, Benschhoff N, Sabarinathan R, Mohanakumar T.** Cooperative signaling for angiogenesis and neovascularization by VEGF and HGF following islet transplantation. *Transplantation* 90: 725-731, 2010
61. **Halberstadt CR, Williams D, Emerich D, Goddard M, Vasconcellos AV, Curry W, Bhatia A, Gores PF.** Subcutaneous transplantation of islets into streptozocin-induced diabetic rats. *Cell Transplant* 14: 595-605, 2005
62. **Hamamoto Y, Fujimoto S, Inada A, Takehiro M, Nabe K, Shimono D, Kajikawa M, Fujita J, Yamada Y, Seino Y.** Beneficial effect of pretreatment of islets with fibronectin on glucose tolerance after islet transplantation. *Horm Metab Res* 35: 460-465, 2003
63. **Hellström M, Kalén M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C.** Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* 126: 3047-3055, 1999
64. **Hogan MF, Hull RL.** The islet endothelial cell: a novel contributor to beta cell secretory dysfunction in diabetes. *Diabetologia* 60: 952-959, 2017
65. **Hoying JB, Boswell CA, Williams SK.** Angiogenic potential of microvessel fragments established in three-dimensional collagen gels. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 32: 409-419, 1996
66. **Huang SH, Chu CH, Yu JC, Chuang WC, Lin GJ, Chen PL, Chou FC, Chau LY, Sytwu HK.** Transgenic expression of haem oxygenase-1 in pancreatic beta cells protects non-obese mice used as a model of diabetes from autoimmune destruction and prolongs graft survival following islet transplantation. *Diabetologia* 53: 2389-2400, 2010
67. **Huang W, Zhao N, Bai X, Karram K, Trotter J, Goebbels S, Scheller A, Kirchhoff F.** Novel NG2-CreERT2 knock-in mice demonstrate heterogeneous differentiation potential of NG2 glia during development. *Glia* 62: 896-913, 2014
68. **Huch M, Gehart H, van Boxtel R, Hamer K, Blokzijl F, Versteegen MM, Ellis E, van Wenum M, Fuchs SA, de Ligt J, van de Wetering M, Sasaki N, Boers SJ, Kemperman H, de Jonge J, Ijzermans JN, Nieuwenhuis EE, Hoekstra R, Strom S, Vries RR, van der Laan LJ, Cuppen E, Clevers H.** Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. *Cell* 160: 299-312, 2015

69. **Hughes SJ, Bateman PA, Cross SE, Brandhorst D, Brandhorst H, Spiliotis I, Ballav C, Rosenthal M, Rutter MK, Shaw J, Gough S, Johnson PRV.** Does islet size really influence graft function after clinical islet transplantation? *Transplantation* 102: 1857-1863, 2018
70. **Ichii H, Sakuma Y, Pileggi A, Fraker C, Alvarez A, Montelongo J, Szust J, Khan A, Inverardi L, Naziruddin B, Levy MF, Klintmalm GB, Goss JA, Alejandro R, Ricordi C.** Shipment of human islets for transplantation. *Am J Transplant* 7: 1010-1020, 2007
71. **Ikemoto T, Matsumoto S, Itoh T, Noguchi H, Tamura Y, Jackson AM, Shimoda M, Naziruddin B, Onaca N, Yasunami Y, Levy MF.** Assessment of islet quality following international shipping of more than 10,000 km. *Cell Transplant* 19: 731-741, 2010
72. **Ito T, Itakura S, Todorov I, Rawson J, Asari S, Shintaku J, Nair I, Ferreri K, Kandeel F, Mullen Y.** Mesenchymal stem cell and islet co-transplantation promotes graft revascularization and function. *Transplantation* 89: 1438-1445, 2010
73. **Iuamoto LR, Franco AS, Suguita FY, Essu FF, Oliveira LT, Kato JM, Torsani MB, Meyer A, Andraus W, Chaib E, D'Albuquerque LAC.** Human islet xenotransplantation in rodents: a literature review of experimental model trends. *Clinics (Sao Paulo)* 72: 238-243, 2017
74. **Jansson L, Carlsson PO.** Graft vascular function after transplantation of pancreatic islets. *Diabetologia* 45: 749-763, 2002
75. **Jaworska A, Wojcik T, Malek K, Kwolek U, Kepczynski M, Ansary AA, Chlopicki S, Baranska M.** Rhodamine 6G conjugated to gold nanoparticles as labels for both SERS and fluorescence studies on live endothelial cells. *Mikrochim Acta* 182: 119-127, 2015
76. **Jbeily N, Claus RA, Dahlke K, Neugebauer U, Bauer M, Gonnert FA.** Comparative suitability of CFDA-SE and rhodamine 6G for in vivo assessment of leukocyte-endothelium interactions. *J Biophotonics* 7: 369-375, 2014
77. **Jin SM, Kim KW.** Is islet transplantation a realistic approach to curing diabetes? *Korean J Intern Med* 32: 62-66, 2017
78. **Juang JH, Kuo CH, Peng SJ, Tang SC.** 3-D imaging reveals participation of donor islet schwann cells and pericytes in islet transplantation and graft neurovascular regeneration. *EBioMedicine* 2: 109-119, 2015
79. **Kaddis JS, Olack BJ, Sowinski J, Cravens J, Contreras JL, Niland JC.** Human pancreatic islets and diabetes research. *JAMA* 301: 1580-1587, 2009
80. **Kanak MA, Takita M, Kunnathodi F, Lawrence MC, Levy MF, Naziruddin B.** Inflammatory response in islet transplantation. *Int J Endocrinol* 2014: 451035, 2014
81. **Karakose M, Pinarli FA, Arslan MS, Boyuk G, Boztok B, Albayrak A, Ulus AT, Cakal E, Delibasi T.** Comparison of the ovary and kidney as sites for islet transplantation in diabetic rats. *Transplant Proc* 48: 2216-2220, 2016
82. **Kauri LM, Jung SK, Kennedy RT.** Direct measurement of glucose gradients and mass transport within islets of Langerhans. *Biochem Biophys Res Commun* 304: 371-377, 2003

83. **Kim J, Chung M, Kim S, Jo DH, Kim JH, Jeon NL.** Engineering of a biomimetic pericyte-covered 3D microvascular network. *PLoS One* 10: e0133880, 2015
84. **Kitamoto T, Sakurai K, Lee EY, Yokote K, Accili D, Miki T.** Distinct roles of systemic and local actions of insulin on pancreatic β -cells. *Metabolism* 82: 100-110, 2018
85. **Klyszcz T, Jünger M, Jung F, Zeintl H.** Cap image - a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed Tech (Berl)* 42: 168-175, 1997
86. **Kojima N.** In vitro reconstitution of pancreatic islets. *Organogenesis* 10: 225-230, 2014
87. **Kolka CM, Bergman RN.** The barrier within: endothelial transport of hormones. *Physiology (Bethesda)* 27: 237-247, 2012
88. **Komatsu H, Kandeel F, Mullen Y.** Impact of oxygen on pancreatic islet survival. *Pancreas* 47: 533-543, 2018
89. **Kudryavtseva AV, Krasnov GS, Dmitriev AA, Alekseev BY, Kardymon OL, Sadritdinova AF, Fedorova MS, Pokrovsky AV, Melnikova NV, Kaprin AD, Moskalev AA, Snezhkina AV.** Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget* 7: 44879-44905, 2016
90. **Kuwabara R, Hamaguchi M, Fukuda T, Sakaguchi S, Iwata H.** Preparation of immunotolerant space under the skin and transplantation of islets in the space. *Tissue Eng Part A* 25: 183-192, 2019
91. **Lablanche S, Vantuyghem MC, Kessler L, Wojtuszczyzn A, Borot S, Thivolet C, Girerd S, Bosco D, Bosson JL, Colin C, Tetaz R, Logerot S, Kerr-Conte J, Renard E, Penfornis A, Morelon E, Buron F, Skaare K, Grguric G, Camillo-Brault C, Egelhofer H, Benomar K, Badet L, Berney T, Pattou F, Benhamou PY.** Islet transplantation versus insulin therapy in patients with type 1 diabetes with severe hypoglycaemia or poorly controlled glycaemia after kidney transplantation (TRIMECO): a multicentre, randomised controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol* 6: 527-537, 2018
92. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970
93. **Lammert E, Gu G, McLaughlin M, Brown D, Brekken R, Murtaugh LC, Gerber HP, Ferrara N, Melton DA.** Role of VEGF-A in vascularization of pancreatic islets. *Curr Biol* 13: 1070-1074, 2003
94. **Langer RM, Máthé Z, Doros A, Máthé ZS, Weszelits V, Filó A, Bucher P, Morel P, Berney T, Járay J.** Successful islet after kidney transplantations in a distance over 1000 kilometres: preliminary results of the Budapest-Geneva collaboration. *Transplant Proc* 36: 3113-3115, 2004
95. **Laschke MW, Menger MD.** Adipose tissue-derived microvascular fragments: natural vascularization units for regenerative medicine. *Trends Biotechnol* 33: 442-448, 2015
96. **Laschke MW, Menger MD.** Prevascularization in tissue engineering: current concepts and future directions. *Biotechnol Adv* 34: 112-121, 2016

97. **Laschke MW, Vollmar B, Menger MD.** The dorsal skinfold chamber: window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue. *Eur Cell Mater* 22: 147-164, 2011
98. **Lee DY, Lee S, Nam JH, Byun Y.** Minimization of immunosuppressive therapy after islet transplantation: combined action of heme oxygenase-1 and PEGylation to islet. *Am J Transplant* 6: 1820-1828, 2006
99. **Lee S, Takahashi Y, Lee KM, Mizuno M, Nemenko JG, Takebe T, Lee JI.** Viability and functional assessment of murine pancreatic islets after transportation between Korea and Japan. *Transplant Proc* 47: 738-741, 2015
100. **Lehmann R, Pavlicek V, Spinass GA, Weber M.** Islet transplantation in type I diabetes mellitus. *Ther Umsch* 62: 481-486, 2005
101. **Leto D, Saltiel AR.** Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 383-396, 2012
102. **Li S, Vaziri ND, Masuda Y, Hajighasemi-Ossareh M, Robles L, Le A, Vo K, Chan JY, Foster CE, Stamos MJ, Ichii H.** Pharmacological activation of Nrf2 pathway improves pancreatic islet isolation and transplantation. *Cell Transplant* 24: 2273-2283, 2015
103. **Liljeback H, Espes D, Carlsson PO.** Unsurpassed intrahepatic islet engraftment - the quest for new sites for beta cell replacement. *Cell Med* 11: 2155179019857662, 2019
104. **Lipowsky HH, Kovalcheck S, Zweifach BW.** The distribution of blood rheological parameters in the microvasculature of cat mesentery. *Circ Res* 43: 738-749, 1978
105. **Lipowsky HH, Zweifach BW.** Application of the "two-slit" photometric technique to the measurement of microvascular volumetric flow rates. *Microvasc Res* 15: 93-101, 1978
106. **Liu HT, Gao Y.** Efficacy of short-term intensive treatment with insulin pump to improve islet β -cell function in newly diagnosed type 2 diabetes via inhibition of oxidative stress. *Exp Ther Med* 18: 2293-2298, 2019
107. **Liu Y, Petreaca M, Martins-Green M.** Cell and molecular mechanisms of insulin-induced angiogenesis. *J Cell Mol Med* 13: 4492-4504, 2009
108. **Liu Z, Hu W, He T, Dai Y, Hara H, Bottino R, Cooper DKC, Cai Z, Mou L.** Pig-to-primate islet xenotransplantation: past, present, and future. *Cell Transplant* 26: 925-947, 2017
109. **Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, Jozkowicz A, Dulak J.** Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell Mol Life Sci* 73: 3221-3247, 2016
110. **Lyon J, Manning Fox JE, Spigelman AF, Kim R, Smith N, O'Gorman D, Kin T, Shapiro AM, Rajotte RV, MacDonald PE.** Research-focused isolation of human islets from donors with and without diabetes at the Alberta Diabetes Institute IsletCore. *Endocrinology* 157: 560-569, 2016
111. **Ma Z, Moruzzi N, Catrina SB, Grill V, Björklund A.** Hyperoxia inhibits glucose-induced insulin secretion and mitochondrial metabolism in rat pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 443: 223-228, 2014

112. **Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, Oh SW, Zariwala HA, Gu H, Ng LL, Palmiter RD, Hawrylycz MJ, Jones AR, Lein ES, Zeng H.** A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci* 13: 133-140, 2010
113. **Maffi P, Nano R, Monti P, Melzi R, Sordi V, Mercalli A, Pellegrini S, Ponzoni M, Peccatori J, Messina C, Nocco A, Cardillo M, Scavini M, Magistretti P, Doglioni C, Ciceri F, Bloem SJ, Roep BO, Secchi A, Piemonti L.** Islet allotransplantation in the bone marrow of patients with type 1 diabetes: a pilot randomized trial. *Transplantation* 103: 839-851, 2019
114. **Makagiansar IT, Williams S, Mustelin T, Stallcup WB.** Differential phosphorylation of NG2 proteoglycan by ERK and PKCalpha helps balance cell proliferation and migration. *J Cell Biol* 178: 155-165, 2007
115. **Malinin NL, Pluskota E, Byzova TV.** Integrin signaling in vascular function. *Curr Opin Hematol* 19: 206-211, 2012
116. **Mansour AA, Goncalves JT, Bloyd CW, Li H, Fernandes S, Quang D, Johnston S, Parylak SL, Jin X, Gage FH.** An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids. *Nat Biotechnol* 36: 432-441, 2018
117. **Markmann JF, Deng S, Huang X, Desai NM, Velidedeoglu EH, Lui C, Frank A, Markmann E, Palanjian M, Brayman K, Wolf B, Bell E, Vitamaniuk M, Doliba N, Matschinsky F, Barker CF, Naji A.** Insulin independence following isolated islet transplantation and single islet infusions. *Ann Surg* 237: 741-749, 2003
118. **Matzner Y, Bar-Ner M, Yahalom J, Ishai-Michaeli R, Fuks Z, Vlodavsky I.** Degradation of heparan sulfate in the subendothelial extracellular matrix by a readily released heparanase from human neutrophils. Possible role in invasion through basement membranes. *J Clin Invest* 76: 1306-1313, 1985
119. **Mazier W, Cota D.** Islet endothelial cell: friend and foe. *Endocrinology* 158: 226-228, 2017
120. **McDaniel JS, Pilia M, Ward CL, Pollot BE, Rathbone CR.** Characterization and multilineage potential of cells derived from isolated microvascular fragments. *J Surg Res* 192: 214-222, 2014
121. **Medarova Z, Vallabhajosyula P, Tena A, Evgenov N, Pantazopoulos P, Tchipashvili V, Weir G, Sachs D, Moore A.** In vivo imaging of autologous islet grafts in the liver and under the kidney capsule in non-human primates. *Transplantation* 87: 1659-1666, 2009
122. **Mehrabi M, Mansouri K, Hosseinkhani S, Yarani R, Yari K, Bakhtiari M, Mostafaie A.** Differentiation of human skin-derived precursor cells into functional islet-like insulin-producing cell clusters. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 51: 595-603, 2015
123. **Mellgren A, Schnell Landström AH, Petersson B, Andersson A.** The renal subcapsular site offers better growth conditions for transplanted mouse pancreatic islet cells than the liver or spleen. *Diabetologia* 29: 670-672, 1986
124. **Menger MD, Jaeger S, Walter P, Feifel G, Hammersen F, Messmer K.** Angiogenesis and hemodynamics of microvasculature of transplanted islets of Langerhans. *Diabetes* 38 Suppl 1: 199-201, 1989

125. **Menger MD, Yamauchi J, Vollmar B.** Revascularization and microcirculation of freely grafted islets of Langerhans. *World J Surg* 25: 509-515, 2001
126. **Menger MM, Nalbach L, Roma LP, Körbel C, Wrublewsky S, Glanemann M, Laschke MW, Menger MD, Ampofo E.** Erythropoietin accelerates the revascularization of transplanted pancreatic islets. *Br J Pharmacol* 177: 1651-1665, 2020a
127. **Menger MM, Nalbach L, Wrublewsky S, Glanemann M, Gu Y, Laschke MW, Menger MD, Ampofo E.** Darbepoetin-alpha increases the blood volume flow in transplanted pancreatic islets in mice. *Acta Diabetol* 57: 1009-1018, 2020b
128. **Merani S, Toso C, Emamaullee J, Shapiro AM.** Optimal implantation site for pancreatic islet transplantation. *Br J Surg* 95: 1449-1461, 2008
129. **Minardi S, Guo M, Zhang X, Luo X.** An elastin-based vasculogenic scaffold promotes marginal islet mass engraftment and function at an extrahepatic site. *J Immunol Regen Med* 3: 1-12, 2019
130. **Mohammed Al-Amily I, Lundquist I, Salehi A.** Expression levels of enzymes generating NO and CO in islets of murine and human diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 520: 473-478, 2019
131. **Montaña E, Bonner-Weir S, Weir GC.** Beta cell mass and growth after syngeneic islet cell transplantation in normal and streptozocin diabetic C57BL/6 mice. *J Clin Invest* 91: 780-787, 1993
132. **Mou K, Liu W, Miao Y, Cao F, Li P.** HMBG1 deficiency reduces H₂O₂-induced oxidative damage in human melanocytes via the Nrf2 pathway. *J Cell Mol Med* 22: 6148-6156, 2018
133. **Múnera JO, Sundaram N, Rankin SA, Hill D, Watson C, Mahe M, Vallance JE, Shroyer NF, Sinagoga KL, Zarzoso-Lacoste A, Hudson JR, Howell JC, Chatuvedi P, Spence JR, Shannon JM, Zorn AM, Helmrath MA, Wells JM.** Differentiation of human pluripotent stem cells into colonic organoids via transient activation of bmp signaling. *Cell Stem Cell* 21: 51-64.e6, 2017
134. **Murasawa Y, Hayashi T, Wang PC.** The role of type V collagen fibril as an ECM that induces the motility of glomerular endothelial cells. *Exp Cell Res* 314: 3638-3653, 2008
135. **Murfee WL, Rehorn MR, Peirce SM, Skalak TC.** Perivascular cells along venules upregulate NG2 expression during microvascular remodeling. *Microcirculation* 13: 261-273, 2006
136. **Nakamura K, Iwazawa R, Yoshioka Y.** Introduction to a new cell transplantation platform via recombinant peptide petaloid pieces and its application to islet transplantation with mesenchymal stem cells. *Transpl Int* 29: 1039-1050, 2016
137. **Nalbach L.** Herstellung und Charakterisierung prävasikularisierter Pseudo-Inseln. *Masterarbeit, Universität des Saarlandes*, 2017
138. **Narayanan S, Loganathan G, Dhanasekaran M, Tucker W, Patel A, Subhashree V, Mokshagundam S, Hughes MG, Williams SK, Balamurugan AN.** Intra-islet endothelial cell and β -cell crosstalk: implication for islet cell transplantation. *World J Transplant* 7: 117-128, 2017

139. **Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM.** Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 18: 1135-1149, 2000
140. **Nguyen T, Nioi P, Pickett CB.** The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem* 284: 13291-13295, 2009
141. **Niland JC, Stiller T, Cravens J, Sowinski J, Kaddis J, Qian D.** Effectiveness of a web-based automated cell distribution system. *Cell Transplant* 19: 1133-1142, 2010
142. **Nishimura R, Ushiyama A, Sekiguchi S, Fujimori K, Ohuchi N, Satomi S, Goto M.** Effects of glucagon-like peptide 1 analogue on the early phase of revascularization of transplanted pancreatic islets in a subcutaneous site. *Transplant Proc* 45: 1892-1894, 2013
143. **Nyqvist D, Köhler M, Wahlstedt H, Berggren PO.** Donor islet endothelial cells participate in formation of functional vessels within pancreatic islet grafts. *Diabetes* 54: 2287-2293, 2005
144. **Oh BJ, Oh SH, Jin SM, Suh S, Bae JC, Park CG, Lee MS, Lee MK, Kim JH, Kim KW.** Co-transplantation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells improves revascularization and organization in islet grafts. *Am J Transplant* 13: 1429-1440, 2013
145. **Olerud J, Mokhtari D, Johansson M, Christofferson G, Lawler J, Welsh N, Carlsson PO.** Thrombospondin-1: an islet endothelial cell signal of importance for β -cell function. *Diabetes* 60: 1946-1954, 2011
146. **Olsson R, Carlsson PO.** The pancreatic islet endothelial cell: emerging roles in islet function and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 492-497, 2006
147. **Olsson R, Olerud J, Pettersson U, Carlsson PO.** Increased numbers of low-oxygenated pancreatic islets after intraportal islet transplantation. *Diabetes* 60: 2350-2353, 2011
148. **Ozerdem U, Grako KA, Dahlin-Huppe K, Monosov E, Stallcup WB.** NG2 proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis. *Dev Dyn* 222: 218-227, 2001
149. **Ozerdem U, Stallcup WB.** Pathological angiogenesis is reduced by targeting pericytes via the NG2 proteoglycan. *Angiogenesis* 7: 269-276, 2004
150. **Padmasekar M, Lingwal N, Samikannu B, Chen C, Sauer H, Linn T.** Exendin-4 protects hypoxic islets from oxidative stress and improves islet transplantation outcome. *Endocrinology* 154: 1424-1433, 2013
151. **Pan X, Xue W, Li Y, Feng X, Tian X, Ding C.** Islet graft survival and function: concomitant culture and transplantation with vascular endothelial cells in diabetic rats. *Transplantation* 92: 1208-1214, 2011
152. **Pathak S, Regmi S, Gupta B, Pham TT, Yong CS, Kim JO, Yook S, Kim JR, Park MH, Bae YK, Jeong JH.** Engineered islet cell clusters transplanted into subcutaneous space are superior to pancreatic islets in diabetes. *FASEB J* 31: 5111-5121, 2017
153. **Pellegrini S, Cantarelli E, Citro A, Incerti E, Piemonti L, Sordi V.** Selective local irradiation improves islet engraftment and survival in intra-bone marrow islet transplantation. *Cytotherapy* 21: 1025-1032, 2019

154. **Penko D, Mohanasundaram D, Sen S, Drogemuller C, Mee C, Bonder CS, Coates PT, Jessup CF.** Incorporation of endothelial progenitor cells into mosaic pseudoislets. *Islets* 3: 73-79, 2011
155. **Pepper AR, Bruni A, Shapiro AMJ.** Clinical islet transplantation: is the future finally now? *Curr Opin Organ Transplant* 23: 428-439, 2018
156. **Pepper AR, Pawlick R, Gala-Lopez B, MacGillivray A, Mazzuca DM, White DJ, Toleikis PM, Shapiro AM.** Diabetes is reversed in a murine model by marginal mass syngeneic islet transplantation using a subcutaneous cell pouch device. *Transplantation* 99: 2294-2300, 2015
157. **Perez-Basterrechea M, Esteban MM, Alvarez-Viejo M, Fontanil T, Cal S, Sanchez Pitiot M, Otero J, Obaya AJ.** Fibroblasts accelerate islet revascularization and improve long-term graft survival in a mouse model of subcutaneous islet transplantation. *PLoS One* 12: e0180695, 2017
158. **Persson AB, Buschmann IR.** Vascular growth in health and disease. *Front Mol Neurosci* 4: 14, 2011
159. **Pham MT, Pollock KM, Rose MD, Cary WA, Stewart HR, Zhou P, Nolte JA, Waldau B.** Generation of human vascularized brain organoids. *Neuroreport* 29: 588-593, 2018
160. **Pileggi A, Molano RD, Berney T, Cattan P, Vizzardelli C, Oliver R, Fraker C, Ricordi C, Pastori RL, Bach FH, Inverardi L.** Heme oxygenase-1 induction in islet cells results in protection from apoptosis and improved in vivo function after transplantation. *Diabetes* 50: 1983-1991, 2001
161. **Pileggi A, Molano RD, Berney T, Ichii H, Jose SS, Zahr E, Poggioli R, Linetsky E, Ricordi C, Inverardi L.** Prolonged allogeneic islet graft survival by protoporphyrins. *Cell Transplant* 14: 85-96, 2005
162. **Pilia M, McDaniel JS, Guda T, Chen XK, Rhoads RP, Allen RE, Corona BT, Rathbone CR.** Transplantation and perfusion of microvascular fragments in a rodent model of volumetric muscle loss injury. *Eur Cell Mater* 28: 11-23, 2014
163. **Plesner A, Verchere CB.** Advances and challenges in islet transplantation: islet procurement rates and lessons learned from suboptimal islet transplantation. *J Transplant* 2011: 979527, 2011
164. **Proebstl D, Voisin MB, Woodfin A, Whiteford J, D'Acquisto F, Jones GE, Rowe D, Nourshargh S.** Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo. *J Exp Med* 209: 1219-1234, 2012
165. **Rackham CL, Jones PM.** Potential of mesenchymal stromal cells for improving islet transplantation outcomes. *Curr Opin Pharmacol* 43: 34-39, 2018
166. **Ribatti D, Nico B, Crivellato E.** The role of pericytes in angiogenesis. *Int J Dev Biol* 55: 261-268, 2011
167. **Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, Olack BJ, Scharp DW.** Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* 37: 413-420, 1988
168. **Risau W.** Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-674, 1997

169. **Salmerón C, Johansson M, Asaad M, Angotzi AR, Rønnestad I, Stefansson SO, Jönsson E, Björnsson BT, Gutiérrez J, Navarro I, Capilla E.** Roles of leptin and ghrelin in adipogenesis and lipid metabolism of rainbow trout adipocytes in vitro. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 188: 40-48, 2015
170. **Sasson A, Rachi E, Sakhneny L, Baer D, Lisnyansky M, Epshtein A, Landsman L.** Islet pericytes are required for β -cell maturity. *Diabetes* 65: 3008-3014, 2016
171. **Satchell SC, Braet F.** Glomerular endothelial cell fenestrations: an integral component of the glomerular filtration barrier. *Am J Physiol Renal Physiol* 296: F947-956, 2009
172. **Scharp DW, Marchetti P.** Encapsulated islets for diabetes therapy: history, current progress, and critical issues requiring solution. *Adv Drug Deliv Rev* 67-68: 35-73, 2014
173. **Schlingemann RO, Rietveld FJ, de Waal RM, Ferrone S, Ruiter DJ.** Expression of the high molecular weight melanoma-associated antigen by pericytes during angiogenesis in tumors and in healing wounds. *Am J Pathol* 136: 1393-1405, 1990
174. **Schumann C, Faust M.** Diabetic ketoacidosis and hyperosmolar hyperglycemic state. *Dtsch Med Wochenschr* 143: 384-391, 2018
175. **Schwind L, Nalbach L, Zimmer AD, Kostelnik KB, Menegatti J, Grässer F, Götz C, Montenarh M.** Quinalizarin inhibits adipogenesis through down-regulation of transcription factors and microRNA modulation. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1861: 3272-3281, 2017
176. **Shapiro AM, Hao E, Rajotte RV, Kneteman NM.** High yield of rodent islets with intraductal collagenase and stationary digestion - a comparison with standard technique. *Cell Transplant* 5: 631-638, 1996
177. **Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV.** Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343: 230-238, 2000
178. **Shapiro AM, Pokrywczynska M, Ricordi C.** Clinical pancreatic islet transplantation. *Nat Rev Endocrinol* 13: 268-277, 2017
179. **Shapiro AM, Ricordi C, Hering B.** Edmonton's islet success has indeed been replicated elsewhere. *Lancet* 362: 1242, 2003
180. **Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, Secchi A, Brendel MD, Berney T, Brennan DC, Cagliero E, Alejandro R, Ryan EA, DiMercurio B, Morel P, Polonsky KS, Reems JA, Bretzel RG, Bertuzzi F, Froud T, Kandaswamy R, Sutherland DE, Eisenbarth G, Segal M, Preiksaitis J, Korbutt GS, Barton FB, Viviano L, Seyfert-Margolis V, Bluestone J, Lakey JR.** International trial of the edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med* 355: 1318-1330, 2006
181. **Shapiro AM, Ryan EA, Lakey JR.** Diabetes. Islet cell transplantation. *Lancet* 358 Suppl: S21, 2001
182. **Shapiro SD.** Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol* 10: 602-608, 1998

183. **Shrader CD, Bailey KM, Konat GW, Cilento EV, Reilly FD.** Insulin enhances proliferation and viability of human umbilical vein endothelial cells. *Arch Dermatol Res* 301: 159-166, 2009
184. **Singh P, Alex JM, Bast F.** Insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor receptor 1 (IGF-1R) signaling systems: novel treatment strategies for cancer. *Med Oncol* 31: 805, 2014
185. **Slepian MJ, Massia SP, Dehdashti B, Fritz A, Whitesell L.** Beta3-integrins rather than beta1-integrins dominate integrin-matrix interactions involved in postinjury smooth muscle cell migration. *Circulation* 97: 1818-1827, 1998
186. **Sordi V, Pellegrini S, Piemonti L.** Immunological issues after stem cell-based β cell replacement. *Curr Diab Rep* 17: 68, 2017
187. **Später T, Frueh FS, Menger MD, Laschke MW.** Potentials and limitations of Integra® flowable wound matrix seeded with adipose tissue-derived microvascular fragments. *Eur Cell Mater* 33: 268-278, 2017a
188. **Später T, Körbel C, Frueh FS, Nickels RM, Menger MD, Laschke MW.** Seeding density is a crucial determinant for the in vivo vascularisation capacity of adipose tissue-derived microvascular fragments. *Eur Cell Mater* 34: 55-69, 2017b
189. **Spelios MG, Afinowicz LA, Tipon RC, Akirav EM.** Human EndoC- β H1 β -cells form pseudoislets with improved glucose sensitivity and enhanced GLP-1 signaling in the presence of islet-derived endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 314: E512-E521, 2018
190. **Stallcup WB.** The NG2 proteoglycan in pericyte biology. *Adv Exp Med Biol* 1109: 5-19, 2018
191. **Stendahl JC, Kaufman DB, Stupp SI.** Extracellular matrix in pancreatic islets: relevance to scaffold design and transplantation. *Cell Transplant* 18: 1-12, 2009
192. **Stokes RA, Cheng K, Lalwani A, Swarbrick MM, Thomas HE, Loudovaris T, Kay TW, Hawthorne WJ, O'Connell PJ, Gunton JE.** Transplantation sites for human and murine islets. *Diabetologia* 60: 1961-1971, 2017a
193. **Stokes RA, Simond DM, Burns H, Patel AT, O'Connell PJ, Gunton JE, Hawthorne WJ.** Transplantation sites for porcine islets. *Diabetologia* 60: 1972-1976, 2017b
194. **Stone R, Rathbone CR.** Microvascular fragment transplantation improves rat dorsal skin flap survival. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 4: e1140, 2016
195. **Straus DS.** Effects of insulin on cellular growth and proliferation. *Life Sci* 29: 2131-2139, 1981
196. **Sui L, Danzl N, Campbell SR, Viola R, Williams D, Xing Y, Wang Y, Phillips N, Poffenberger G, Johannesson B, Oberholzer J, Powers AC, Leibel RL, Chen X, Sykes M, Egli D.** β -cell replacement in mice using human type 1 diabetes nuclear transfer embryonic stem cells. *Diabetes* 67: 26-35, 2018

197. **Suszynski TM, Wilhelm JJ, Radosevich DM, Balamurugan AN, Sutherland DE, Beilman GJ, Dunn TB, Chinnakotla S, Pruett TL, Vickers SM, Hering BJ, Papas KK, Bellin MD.** Islet size index as a predictor of outcomes in clinical islet autotransplantation. *Transplantation* 97: 1286-1291, 2014
198. **Szot GL, Koudria P, Bluestone JA.** Transplantation of pancreatic islets into the kidney capsule of diabetic mice. *J Vis Exp* 404, 2007
199. **Tang SC, Chiu YC, Hsu CT, Peng SJ, Fu YY.** Plasticity of schwann cells and pericytes in response to islet injury in mice. *Diabetologia* 56: 2424-2434, 2013
200. **Tanjore H, Zeisberg EM, Gerami-Naini B, Kalluri R.** Beta1 integrin expression on endothelial cells is required for angiogenesis but not for vasculogenesis. *Dev Dyn* 237: 75-82, 2008
201. **Télez N, Montolio M, Estil-les E, Escoriza J, Soler J, Montanya E.** Adenoviral overproduction of interleukin-1 receptor antagonist increases beta cell replication and mass in syngeneically transplanted islets, and improves metabolic outcome. *Diabetologia* 50: 602-611, 2007
202. **Thomas RL, Halim S, Gurudas S, Sivaprasad S, Owens DR.** IDF diabetes atlas: a review of studies utilising retinal photography on the global prevalence of diabetes related retinopathy between 2015 and 2018. *Diabetes Res Clin Pract* 157: 107840, 2019
203. **Tillet E, Gential B, Garrone R, Stallcup WB.** NG2 proteoglycan mediates beta1 integrin-independent cell adhesion and spreading on collagen VI. *J Cell Biochem* 86: 726-736, 2002
204. **Tobiasch E, Günther L, Bach FH.** Heme oxygenase-1 protects pancreatic beta cells from apoptosis caused by various stimuli. *J Investig Med* 49: 566-571, 2001
205. **Toso C, Isse K, Demetris AJ, Dinyari P, Koh A, Imes S, Kin T, Emamullee J, Senior P, Shapiro AM.** Histologic graft assessment after clinical islet transplantation. *Transplantation* 88: 1286-1293, 2009
206. **Usuelli V, La Rocca E.** Novel therapeutic approaches for diabetic nephropathy and retinopathy. *Pharmacol Res* 98: 39-44, 2015
207. **Vaithilingam V, Bal S, Tuch BE.** Encapsulated islet transplantation: where do we stand? *Rev Diabet Stud* 14: 51-78, 2017
208. **Vaithilingam V, Barbaro B, Oberholzer J, Tuch BE.** Functional capacity of human islets after long-distance shipment and encapsulation. *Pancreas* 40: 247-252, 2011
209. **Vajkoczy P, Menger MD, Simpson E, Messmer K.** Angiogenesis and vascularization of murine pancreatic islet isografts. *Transplantation* 60: 123-127, 1995a
210. **Vajkoczy P, Olofsson AM, Lehr HA, Leiderer R, Hammersen F, Arfors KE, Menger MD.** Histogenesis and ultrastructure of pancreatic islet graft microvasculature. Evidence for graft revascularization by endothelial cells of host origin. *Am J Pathol* 146: 1397-1405, 1995b

211. **van Suylichem PT, Strubbe JH, Houwing H, Wolters GH, van Schilfgaarde R.** Rat islet isograft function. Effect of graft volume and transplantation site. *Transplantation* 57: 1010-1017, 1994
212. **Voltarelli JC, Couri CE, Stracieri AB, Oliveira MC, Moraes DA, Pieroni F, Coutinho M, Malmegrim KC, Foss-Freitas MC, Simões BP, Foss MC, Squiers E, Burt RK.** Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA* 297: 1568-1576, 2007
213. **Volz KS, Jacobs AH, Chen HI, Poduri A, McKay AS, Riordan DP, Kofler N, Kitajewski J, Weissman I, Red-Horse K.** Pericytes are progenitors for coronary artery smooth muscle. *Elife* 4: e10036, 2015
214. **Wang S, Li X, Parra M, Verdin E, Bassel-Duby R, Olson EN.** Control of endothelial cell proliferation and migration by VEGF signaling to histone deacetylase 7. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 7738-7743, 2008
215. **Warshauer JT, Bluestone JA, Anderson MS.** New frontiers in the treatment of type 1 diabetes. *Cell Metab* 31: 46-61, 2020
216. **Watada H.** Role of VEGF-A in pancreatic beta cells. *Endocr J* 57: 185-191, 2010
217. **Weber CJ, Hardy MA, Pi-Sunyer F, Zimmerman E, Reemtsma K.** Tissue culture preservation and intramuscular transplantation of pancreatic islets. *Surgery* 84: 166-174, 1978
218. **Wietecha MS, Cerny WL, DiPietro LA.** Mechanisms of vessel regression: Toward an understanding of the resolution of angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 367: 3-32, 2013
219. **Wolf-Jochim M, Wöhrle M, Federlin K, Bretzel RG.** Comparison of the survival of fresh or cultured pancreatic islets, pseudoislets and single cells following allotransplantation beneath the kidney capsule in non-immunosuppressed diabetic rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 103 Suppl 2: 118-122, 1995
220. **Wu F, Wu D, Ren Y, Huang Y, Feng B, Zhao N, Zhang T, Chen X, Chen S, Xu A.** Generation of hepatobiliary organoids from human induced pluripotent stem cells. *J Hepatol* 70: 1145-1158, 2019
221. **Wu SL.** Staging of type 2 diabetes mellitus. *Genet Mol Res* 14: 2118-2121, 2015
222. **Yadavilli S, Hwang EI, Packer RJ, Nazarian J.** The role of NG2 proteoglycan in glioma. *Transl Oncol* 9: 57-63, 2016
223. **Yamamoto H, Ehling M, Kato K, Kanai K, van Lessen M, Frye M, Zeuschner D, Nakayama M, Vestweber D, Adams RH.** Integrin β 1 controls VE-cadherin localization and blood vessel stability. *Nat Commun* 6: 6429, 2015
224. **Yamamoto T, Horiguchi A, Ito M, Nagata H, Ichii H, Ricordi C, Miyakawa S.** Quality control for clinical islet transplantation: Organ procurement and preservation, the islet processing facility, isolation, and potency tests. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 16: 131-136, 2009

225. **Yang W, Yang C, Luo J, Wei Y, Wang W, Zhong Y.** Adiponectin promotes preadipocyte differentiation via the PPARgamma pathway. *Mol Med Rep* 17: 428-435, 2018
226. **Yasunami Y, Nakafusa Y, Nitta N, Nakamura M, Goto M, Ono J, Taniguchi M.** A novel subcutaneous site of islet transplantation superior to the liver. *Transplantation* 102: 945-952, 2018
227. **Ye F, Kim C, Ginsberg MH.** Molecular mechanism of inside-out integrin regulation. *J Thromb Haemost* 9 Suppl 1: 20-25, 2011
228. **Yotsumoto F, You WK, Cejudo-Martin P, Kucharova K, Sakimura K, Stallcup WB.** NG2 proteoglycan-dependent recruitment of tumor macrophages promotes pericyte-endothelial cell interactions required for brain tumor vascularization. *Oncoimmunology* 4: e1001204, 2015
229. **You WK, Yotsumoto F, Sakimura K, Adams RH, Stallcup WB.** NG2 proteoglycan promotes tumor vascularization via integrin-dependent effects on pericyte function. *Angiogenesis* 17: 61-76, 2014
230. **Zhang Y, Chua S, Jr.** Leptin function and regulation. *Compr Physiol* 8: 351-369, 2017

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Prof. Dr. M.D. Menger und Prof. Dr. M.W. Laschke danken, die mir meine Promotionsarbeit am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie sowie den Zugang zu allen zugehörigen Materialien und Geräten ermöglicht haben.

Vor allem Prof. Dr. Laschke möchte ich für die konstruktiven Kritiken, die regelmäßigen Diskussionen, die Crashkurse im wissenschaftlichen Schreiben und Präsentieren sowie die Korrektur dieser Arbeit danken. Vielen Dank für die Unterstützung bei komplexen Fragestellungen und dem jederzeit offenen Ohr.

Dr. Emmanuel Ampofo hat mich während der gesamten vier Jahre meiner Master- und Promotionsarbeit betreut, in meiner Arbeit bestärkt und unterstützt. Dank dieser Zusammenarbeit habe ich während der letzten Jahre nicht nur viel über den Alltag im Labor lernen dürfen, sondern auch gelernt, Publikationen auszuformulieren, Projekte auf Kongressen vorzustellen sowie nationale und internationale Kooperationen aufzubauen und zu pflegen. Dafür bin ich ihm unheimlich dankbar!

Caroline Bickelmann möchte ich für die Anfertigung der histologischen Schnitte und deren Färbung danken. Julia Parakenings für die technische Unterstützung beim Western Blot und Dr. Christina Körbel für die Unterstützung bei der Inseltransplantation. Ein großes Dankeschön möchte ich auch an alle weiteren Mitarbeiter des Instituts richten. Vor allem Beate Schmitt, Vivien Becker, Ruth Nickels, Selina Wrublewsky, Mandy Pack, Dr. Jeanette Rudzitis-Auth, Christina Marx, Anne-Sophie Böwe, Sandra Hans und Janine Becker möchte ich für die gemeinsame Zeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Durch Euch bekam ich jederzeit einen fachkompetenten Rat, technische Unterstützung und hatte immer viel Spaß bei der gemeinsamen Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Prates-Roma, die mir neue Techniken der Analyse von Langerhans-Inseln näherbrachte und mit uns gemeinsam neue Fragestellungen über die Langerhans-Inseln bearbeitete. Danke für diese großartige und erfolgreiche Zusammenarbeit!

Zuletzt danke ich meinen Freunden und besonders meiner Familie. Ohne Eure Unterstützung, den Rückhalt und die Motivation wäre mein Weg bis hierher um einiges beschwerlicher geworden. Danke, dass Ihr immer für mich da seid!

10. Publikationen

10.1 Originalarbeiten aus dieser Dissertation

Nalbach L, Roma LP, Schmitt BM, Becker V, Körbel C, Wrublewsky S, Pack M, Später T, Metzger W, Menger MM, Frueh FS, Götz C, Lin H, Fox JEM, MacDonald PE, Menger MD, Laschke MW, Ampofo E. Generation of prevascularized islet organoids by fusion of islet cells with functional blood vessels to improve islet transplantation. *EMBO Mol Med* 2020, in press

Nalbach L, Schmitt BM, Becker V, Scheller A, Laschke MW, Menger MD, Ampofo E. Nerve/gliial antigen 2 is crucially involved in the revascularization of freely transplanted pancreatic islets. *Cell Tissue Res* 378: 195-205, 2019

10.2 Weitere Originalarbeiten

Schmitt BM, Boewe AS, Becker V, **Nalbach L**, Gu Y, Götz C, Menger MD, Laschke MW, Ampofo E. Protein kinase CK2 regulates nerve/gliial antigen (NG)2-mediated angiogenic activity of human pericytes. *Cells* 9: 1546, 2020

Scheuer R, Philipp SE, Becker A, **Nalbach L**, Ampofo E, Montenarh M, Götz C. Protein kinase CK2 controls CaV2.1-dependent calcium currents and insulin release in pancreatic β -cells. *Int J Mol Sci* 21: 4668, 2020

Vilas-Boas EA, Karabacz N, Marsiglio-Libraais GN, Valle M, **Nalbach L**, Ampofo E, Morgan B, Carpinelli AR, Roma LP. Chronic activation of GPR40 does not negatively impact upon BRIN-BD11 pancreatic β -cell physiology and function. *Pharmacol Rep* 2020, in press: doi: 10.1007/s43440-020-00101-6

Menger MM, **Nalbach L**, Wrublewski S, Glanemann M, Gu Y, Laschke MW, Menger MD, Ampofo E. Darbepoetin- α increases the blood volume flow in transplanted pancreatic islets in mice. *Acta Diabetol* 57: 1009-1018, 2020

Ampofo E, Später T, **Nalbach L**, Menger MD, Laschke MW. The marine-derived triterpenoid frondoside A inhibits thrombus formation. *Mar Drugs* 18: 111, 2020

Menger MM*, **Nalbach L***, Roma LP, Körbel C, Wrublewski S, Glanemann M, Laschke MW, Menger MD, Ampofo E. Erythropoietin accelerates the revascularization of transplanted pancreatic islets. *Br J Pharmacol* 177: 1651-1665, 2019

*Geteilte Erstautorenschaft

Spohrer S, Groß R, **Nalbach L**, Schwind L, Stumpf H, Menger MD, Ampofo E, Montenarh M, Götz C. Functional interplay between the transcription factors USF1 and PDX-1 and protein kinase CK2 in pancreatic β -cells. *Sci Rep* 7: 16367, 2017

Schwind L, **Nalbach L**, Zimmer AD, Kostelnik KB, Menegatti J, Grässer F, Götz C, Montenarh M. Quinalizarin inhibits adipogenesis through down-regulation of transcription factors and microRNA modulation. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1861: 3272-3281, 2017

Hollstein R, Parry DA, **Nalbach L**, Logan CV, Strom TM, Hartill VL, Carr IM, Korenke GC, Uppal S, Ahmed M, Wieland T, Markham AF, Bennett CP, Gillessen-Kaesbach G, Sheridan EG, Kaiser FJ, Bonthron DT. HACE1 deficiency causes an autosomal recessive neurodevelopmental syndrome. *J Med Genet* 52: 797-803, 2015

10.3 Übersichtsarbeiten

Ampofo E, **Nalbach L**, Menger MD, Laschke MW. Regulatory mechanisms of somatostatin expression. *Int J Mol Sci* 21: 4170, 2020

Ampofo E, **Nalbach L**, Menger MD, Montenarh M, Götz C. Protein kinase CK2 – a putative target for the therapy of diabetes mellitus? *Int J Mol Sci* 20: 4398, 2019

10.4 Zitierfähige Abstracts

Nalbach L, Ampofo E, Becker V, Metzger W, Schmitt BM, Später T, Wilhelm N, Menger MD, Laschke MW. Improvement of islet transplantation by the generation of prevascularized pseudo-islets. *Eur Surg Res* 60: 172, 2019

Vortrag im Rahmen der 23. Chirurgischen Forschungstage 2019 in Aachen

Nalbach L, Ampofo E, Becker V, Metzger W, Wilhelm N, Menger MD, Laschke MW. Prevascularization of pseudo-islets with adipose tissue-derived microvascular fragments. *Eur Surg Res* 60 Suppl 1: 23, 2019

Vortrag im Rahmen der Preisträgersitzung auf dem 136. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie 2019 in München

Nalbach L, Ampofo E, Später T, Becker V, Metzger W, Wilhelm N, Menger MD, Laschke MW. Incorporation of adipose tissue-derived microvascular fragments enhances the revascularization process of pseudo-islets. *Eur Surg Res* 59: 198, 2018

Vortrag im Rahmen der 22. Chirurgischen Forschungstage 2018 in Erlangen

Nalbach L, Ampofo E, Später T, Becker V, Metzger W, Wilhelm N, Menger MD, Laschke MW. Co-culture of pancreatic islet cells and adipose tissue-derived microvascular fragments for the generation of prevascularized pseudo-islets. *Eur Surg Res* 59 Suppl 1: 42, 2018

Vortrag auf dem 135. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie 2018 in Berlin

Nalbach L, Ampofo E, Später T, Menger MM, Laschke MW. Generation of prevascularized pseudo-islets by co-culture of adipose tissue-derived microvascular fragments and islet cells in liquid overlay technique. *Eur Surg Res* 58: 282, 2017

Vortrag im Rahmen der 21. Chirurgischen Forschungstage 2017 in Köln

10.5 Nichtzitierfähige Abstracts

Nalbach L, Ampofo E, Becker V, Roma LP, Metzger W, Schmitt BM, Später T, Wilhelm N, Menger MD, Laschke MW. Generation of prevascularized pseudo-islets as a new strategy to enhance the revascularization of pseudo-islets, 2019

Poster im Rahmen des 55. Kongresses der European Association for the Study of Diabetes 2019 in Barcelona

Nalbach L, Ampofo E, Becker V, Metzger W, Schmitt BM, Später T, Wilhelm N, Menger MD, Laschke MW. Improvement of islet transplantation by the incorporation of adipose tissue-derived microvascular fragments into pseudo-islets, 2019

Poster auf dem 3. EASD Islet Study Group & Beta-Cell Workshop 2019 in Oxford

Nalbach L, Ampofo E, Becker V, Metzger W, Wilhelm N, Menger MD, Laschke MW. Prevascularization of pseudo-islets: A new strategy to improve the engraftment of transplanted islets, 2018

Poster im Rahmen des 54. Kongresses der European Association for the Study of Diabetes 2018 in Berlin

Nalbach L, Ampofo E, Später T, Becker V, Metzger W, Wilhelm N, Menger MD, Laschke MW.
Co-culture of pancreatic islet cells and adipose tissue-derived microvascular fragments for the
generation of prevascularized pseudo-islets, 2018

Vortrag auf der 38. Jahrestagung des deutschen Pancreasclubs e.V. 2018 in Ulm

11. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen ist der Lebenslauf nur in der gedruckten Version der Dissertation enthalten.